

**T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KABARLA ÇİLEK ÇEŞİDİNDEN GLUTATYON S-
TRANSFERAZ VE GLUTATYON REDUKTAZ GENLERİNİN
İZOLE EDİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Gülsüm Nur ÇELİK

**Danışman
Prof. Dr. Yaşar KARAKURT**

ISPARTA - 2019



© 2019 [Gülsüm Nur ÇELİK]

TEZ ONAYI

KABARLA ÇİLEK ÇEŞİDİNDEN GLUTATYON S- TRANSFERAZ VE GLUTATYON REDUKTAZ GENLERİNİN İZOLE EDİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Gülsüm Nur ÇELİK tarafından hazırlanan bu tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan **Prof. Dr. Yaşar KARAKURT**
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Üye **Prof. Dr. Semra KILIÇ**
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye **Doç. Dr. Halime ÜNLÜ**
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

İmza

.....
.....
.....

Yukarıdaki Jüri kararı Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/..../....
tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Yusuf UÇAR
Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

02/07/2019

Gülsüm Nur ÇELİK



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Materyal	13
3.2. Yöntem.....	13
3.2.1. RNA izolasyonu	13
3.2.2. Dejenere primerlerin hazırlanması	14
3.2.3. DNase uygulaması ve cDNA eldesi.....	14
3.2.4. PCR analizleri	15
3.2.4.1. GR PCR analizi	15
3.2.4.2. GST PCR analizi	15
3.2.5. PCR ürünlerinin saflaştırılması	15
3.2.6. RACE analizi	16
3.2.6.1. RACE cDNA sentezi.....	16
3.2.6.2. RACE PCR analizi.....	17
3.2.7. DNA izolasyonu.....	18
3.2.8. Southern Blot analizi.....	19
4. BULGULAR	21
4.1. RNA İzolasyonu.....	21
4.2. PCR Analizleri	21
4.3. RACE Analizi	22
4.4. DNA İzolasyonu.....	23
4.5. Southern Blot Analizi.....	24
4.6. Sekans Analizleri	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	45

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KABARLA ÇİLEK ÇEŞİDİNDEN GLUTATYON S-TRANSFERAZ VE GLUTATYON REDUKTAZ GENLERİNİN İZOLE EDİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Gülsüm Nur ÇELİK

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Abiyotik ve biyotik stresler sonucu bitkilerde reaktif oksijen türleri (ROS) artmaktadır. ROS'lar hücre içi maddeler ve hücre zarı ile etkileşime girerek bitkilere zarar vermektedir. ROS'lar ile mücadele etmek için bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemleri vardır. Glutasyon reduktaz (GR) ve glutasyon s-transferaz (GST) antioksidan enzimlerindedir. Glutasyon reduktaz oksitlenmiş glutasyon (GSSG)'u indirgenmiş glutasyon (GSH)'a dönüştürür ve hücre içi GSH/GSSG dengesini sağlar. Glutasyon s-transferaz ise hücre içi toksik maddelerin detoksifikasyonunu sağlamaktadır. Bitkilerde GR, GR1 ve GR2 olarak iki sınıf bulunurken GST'de tau, phi, lambda, teta, zeta, beta ve delta sınıfları bulunmaktadır.

Streslerle başa çıkmak için son derece önemli olan bu enzimlerin sekans bilgileri çilek dahil olmak üzere birçok bitkide araştırılmamıştır. Bu çalışmada Kabarla çilek çeşidinden GR ve GST antioksidan enzim genleri izole edilerek sekans bilgileri elde edilmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır. Bunun için dejenere primerler dizayn edilerek PCR ile kısmi cDNA'lar çoğaltılmış ve tam uzunlukta nükleotidler elde edebilmek için 3' ve 5' RACE analizi yapılmıştır.

Sekans sonuçlarına göre GR ve GST genleri sırası ile 2091 ve 1007 nükleotidden meydana geldiği, 557 ve 287 amino asitten oluşan açık okuma çerçevesine sahip oldukları saptanmıştır. Ayrıca izole edilen GR geni *Pisum sativum*, *Medicago truncatula*, *Cicer arietinum* ile GST geni *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Prosopis juliflora* genleri ile yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Moleküler düzeyde karakterize edilen bu genler gerek diğer türlerde benzer genlerin karakterizasyonu için gerekse de stres koşullarına karşı dayanıklı çilek çeşitlerinin geliştirilmesi için kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Kabarla, Antioksidan, Glutasyon reduktaz, Glutasyon s-transferaz

2019, 45 sayfa

ABSTRACT

M.Sc.Thesis

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE AND GLUTATHIONE REDUCTASE IN CABARLA STRAWBERRY VARIETY

Gülsüm Nur ÇELİK

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Agriculture Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Reactive oxygen species (ROS) increase in plants due to abiotic and biotic stresses. ROS interfere with intracellular substances and cell membrane to damaged plants. Plants have enzymatic and non-enzymatic antioxidant system from protect themselves against ROS. Glutathione reductase and glutathione s-transferase are two of the antioxidant enzymes. Glutathione reductase converts oxidized glutathione (GSSG) into reduced glutathione (GSH) and it provides intracellular GSH / GSSG balance. Whereas Glutathione s-transferase detoxifies intracellular toxic substances. GR contains GR1 and GR2 two classes and GST contains tau, phi, lambda, theta, zeta, beta and delta classes in plants.

The sequence information of these enzymes, which are extremely important for coping with stress, has not been investigated in many plants including strawberries. In this study, GR and GST antioxidant enzyme genes were isolated and characterized from Karbala strawberry variety. For this purpose, degenerated primers were designed and partial cDNAs were amplified by PCR, 3' and 5' RACE analysis were performed to obtain full length nucleotides.

According to the sequence results, the GR and GST genes were composed of 2091 and 1007 nucleotides, respectively, and were found to have an open reading frame of 557 and 287 amino acids. In addition, the isolated GR gene *Pisum sativum*, *Medicago truncatula*, *Cicer arietinum* and GST gene *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Prosopis juliflora* genes have shown a high degree of similarity. These genes, which are characterized at molecular level, can be used for the characterization of similar genes in other species as well as for the development of strawberry varieties resistant to stress conditions.

Key Words: Cabarla, Antioxidant, Glutathione reductase, Glutathione s-transferase

2019, 45 pages

TEŐEKKÖR

Tezimin yűrűtűlmesinde desteęini ve emeęini hiębir zaman esirgemeyen tez danıőmanım sayın Prof. Dr. Yaőar KARAKURT'a, ęalıőma sűresince bana desteklerinden dolayı sayın Damla GÜVERCİN'e ve Songűl CARUS'a teőekkűrlerimi sunarım.

Tezimin her aőamasında beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Gűlsűm Nur ÇELİK
ISPARTA, 2019



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Glutasyon reduktazın diğer enzimler ile birlikte abiyotik ve biyotik streslere karşı çalışması ve indirgenmiş glutasyonun görevleri.....	4
Şekil 1.2. Askorbat-glutasyon döngüsü.....	4
Şekil 2.1. Domatesten izole edilen SIGSTU5'in protein yapısı ele alınarak oluşturulan üç boyutlu resmi, N-terminal ve C-terminal bölgeleri	8
Şekil 2.2. GST'nin işlevleri.....	8
Şekil 3.1. A: GR'ye ait PCR ürünü, B: GST'ye ait PCR ürünü, C: markör	21
Şekil 3.2. A: Markör, B: RACE kontrol, C: 5' RACE GR PCR ürünü, D: 5' RACE GST PCR ürünü	22
Şekil 3.3. A: Markör, B: 3' RACE GR PCR ürünü, C: 3' RACE GST PCR ürünü.....	23
Şekil 3.4. Çilek genomik DNA'ları.....	24
Şekil 3.5. GST ve GR genine ait southern blot görüntüsü.....	25
Şekil 4.1. GR proteinin domeyn organizasyonu	33
Şekil 4.2. GST proteinin domeyn organizasyonu	33
Şekil 4.3. Kabarla'dan izole edilen GR geninin filogenetik ağacı.....	34
Şekil 4.4. Kabarla'dan izole edilen GST geninin filogenetik ağacı.....	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Gene özel dizayn edilen primerler	14
Çizelge 4.1. GR'nin tam nükleotid sekansı.....	26
Çizelge 4.2. GST'nin tam nükleotid sekansı.....	26
Çizelge 4.3. GR genine ait amino asit sekansı	27
Çizelge 4.4. GST genine ait amino asit sekansı.....	27
Çizelge 4.5. Kabarla meyvesinden izole edilen GR ve GST genlerinin toplam nükleotid, 5' kodlamayan, 3' kodlamayan nükleotid sayıları ve genlerin ORF bölgelerindeki amino asit sayıları.....	28
Çizelge 4.6. GR genine ait amino asit içeriği.....	28
Çizelge 4.7. GST genine ait amino asit içeriği.....	29
Çizelge 4.8. Kabarla'dan elde edilen GR geni ile diğer türlerden izole edilen GR genlerinin nükleotid ve amino asit sekanslarının karşılaştırılması.....	30
Çizelge 4.9. Kabarla'dan elde edilen GST geni ile diğer türlerden izole edilen GST genlerinin nükleotid ve amino asit sekanslarının karşılaştırılması.....	31

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bç	Baz çifti
CaCl ₂	Kalsiyum klorid
Cu ⁺	Bakır
CTAP	Hekzadesil trimetil amonyum bromür
dATP	Deoksiadenin trifosfat
DEPC	Dietanol polifenolkarbonat
dCTP	Deoksisitozin trifosfat
dGTP	Deoksiguanin trifosfat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
dTTP	Deoksitimin trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FAD	Flavoprotein
Fe ⁺²	Demir
g	Gram
GR	Glutasyon reduktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
GST	Glutasyon s-transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
kDa	Kilo dalton
KCl	Potasyum klorid
LiCl	Lityumklorür
M	Molarite
mg	miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorid
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MOPS	3-(N-morpholino) propansülfonik asit
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
ng	Nanogram
O ⁻	Süperoksit
OH ⁻	Hidroksil
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PVP	Polivinil pirolidin
RACE	cDNA uçlarının hızlı çoğaltımı
RNA	Ribo nükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
SDS	Sodium dodesil sülfat
sn	Saniye
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAP	Tobacco acid pyrophosphate
TBE	Tris-borikasit-EDTA çözeltisi
TE	Tris-EDTA çözeltisi
Tm	Erime sıcaklığı
UV	Ultraviyole

xg	Relatif santrifüj kuvveti
Zn ⁺²	Çinko
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromol



1. GİRİŞ

Rosales takımının, *Rosaceae* (gülgiller) familyasında, *Fragaria* cinsinin içerdiği türlere çilek denilmektedir. Anavatanı kuzey ve güney Amerika olan çilek değişik ekolojik koşullara adapte olduğu için dünyada birçok bölgede doğal olarak yetişebilmektedir. Çilek çeşitleri fotoperiyodizme göre kısa gün, nötr gün ve uzun gün olarak üç katagoriye ayrılırlar. Çilek en çok kumlu-tınlı, aktif kireç içeriği ve tuzluluk oranı düşük, hafif asidik toprakları sevmektedir (Aybak, 2005).

Kabarla, Early Sweet ve Selva'nın melezlenmesi sonucu meydana gelen kısa gün çeşitidir. Kısa gün çeşitler gün uzunluğunun 12 saatten az olduğu zamanda çiçeklenmeye başlarlar. Kısa gün çilekleri kışların soğuk geçtiği bölgelerde haziran gibi meyve verirken, kışların ılık geçtiği bölgelerde aralık ayından itibaren meyve verirler. Kabarla verimli bir çilek çeşidi olup meyvesi orta büyüklükte ve parlaklıktadır. Yapılan çalışmalarda Kabarla çilek çeşidinin verimi diğer birçok çeşide göre daha fazla olduğu saptanmıştır (Aybak, 2005; Yılmaz vd., 2009; Berk, 2013; Özbahçalı, 2014; Özbay, 2016).

Çilek; indirgenmiş glutasyon (GSH), B3 (nikotinik asit), B6 (piridoksin hidroklorik), B9 (folik asit), C (askorbik asit) vitamini ve antioksidan bakımından zengin bir meyve olduğu araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır (Tuncer ve Karataş, 2012).

Antosiyaninler bitkilere kırmızı ve mor rengi veren ve suda çözünebilen flavonoidlerdir. Çiçeklerin yapısında bulunarak tozlayıcı böcekleri cezbederken aynı zamanda zararlı ışınlar, kuraklık, düşük sıcaklık, tuzluluk gibi farklı çevresel streslere karşı da bitkiyi korumaktadırlar. Ayrıca çeşitli olaylar sonucunda meydana gelen reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bu reaktiflerin meydana getirebileceği zararları önlemektedirler. Antioksidanlar serbest radikallerin aktivitesini engeller ya da geciktirirler.

Serbest radikallere karşı üç şekilde savaşır; reaktif oksijenleri yok ederek, reaktif oksijenlerin oluşumunu engelleyerek ya da yapılan hasarı onararak (Şenses vd., 1999; Keser, 2012; Aztekin ve Kasım, 2016).

Bitkiler kuraklık ve soğukla karşılaşınca yapraklarda, stoma ve mezofil yapısı bozulduğu için dehidrasyon artmaktadır. Kuraklık ve düşük sıcaklık gibi abiyotik stresler hücrelerde osidatif reaksiyon türlerini artırmaktadır. Kuraklık antioksidan enzimlerini artırırken, soğuk enzim olan ve enzim olmayan antioksidanların seviyelerini artırmaktadır. Bu durum düşük sıcaklığın enzim aktivitesini azalttığı için enzimin yanısıra enzim olmayan antioksidanlara ihtiyacın olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Strese maruz kalan kahve bitkilerinde antioksidan enzimlerin yanı sıra askorbat, zeaksantin ve fenolik bileşik miktarının arttığı görülmüştür (Ramalho vd., 2018).

Organizmanın oksijenli solunum yapması sonucunda hücrelerde bulunan oksijenler çeşitli biyokimyasal aktiviteler sonucu enzimlerle birlikte birçok besinin yıkımında görev alır ve bu yıkım sonucunda çeşitli son ürünler oluşur. Bu son ürünlerin içerisinde serbest radikallerde bulunmaktadır. Hem yararlı metabolik amaçlar için hem de kimyasal yıkım reaksiyonların ara basamaklarından sızması sonucu organizmalarda serbest radikaller bulunur. Mitokondriler, hücre zarı, sitokrom P450 ve aktive lökositler organizma içinde bulunan (endojen) radikal kaynaklarıdır. Diplock (1998) çevre kirliliği, radyasyon ve ilaçlar dışarıdan organizmaya giren (ekzojen) radikaller olarak belirtmektedir (Erenel vd., 1992; Şenses vd., 1999; Koca ve Karadeniz, 2005).

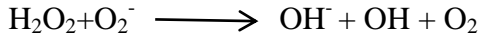
Serbest radikaller hücrelerde sebep olduğu sorunlar; lipitler ile etkileşime geçerek lipit peroksidasyonu oluşturur ve bu durum membran akışkanlığını azaltmaktadır, DNA'yı etkileyerek baz ve deoksiribozların yapılarını değiştirir böylelikle mutasyon ve sitotoksiteye neden olmaktadır. Ayrıca karbonhidrat ve proteinlerin yapılarını da değiştirmektedir (Erenel vd., 1992).

Abiyotik stresler, bitkilerde bazı istenmeyen etkilere sebep olmaktadır. Bu etkiler büyüme ve gelişmenin durması, verimin azalması ve ilerleyen aşamalarda bitkinin ölmesidir. Abiyotik streslerin büyük bir çoğunluğu, süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil olan zararlı oksijen türlerinin (ROS) miktarını artırmaktadır. Bitkiler ROS'lar ile bünyelerinde barındırdıkları enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler vasıtasıyla savaşmaktadır (Yousuf vd., 2012).

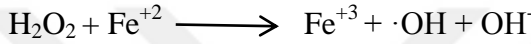
Shen vd. (1997), reaktif oksijen türleri hücreden üç farklı şekilde bulunduğunu bildirmiştir. Bunlar;

1. Süperoksit (O_2^-), moleküler oksijenin bir elektron kaybetmesi ile oluşur. İlk oluşan ROS'tur.
2. Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit bir elektron daha kaybederek meydana gelen O_2^{-2} 'nin iki proton tarafından nötralize edilmesi sonucu oluşmaktadır.
3. Hidroksil (OH^\cdot), üçüncü ve en zararlı olan ROS'tur ve iki yolla oluşmaktadır.

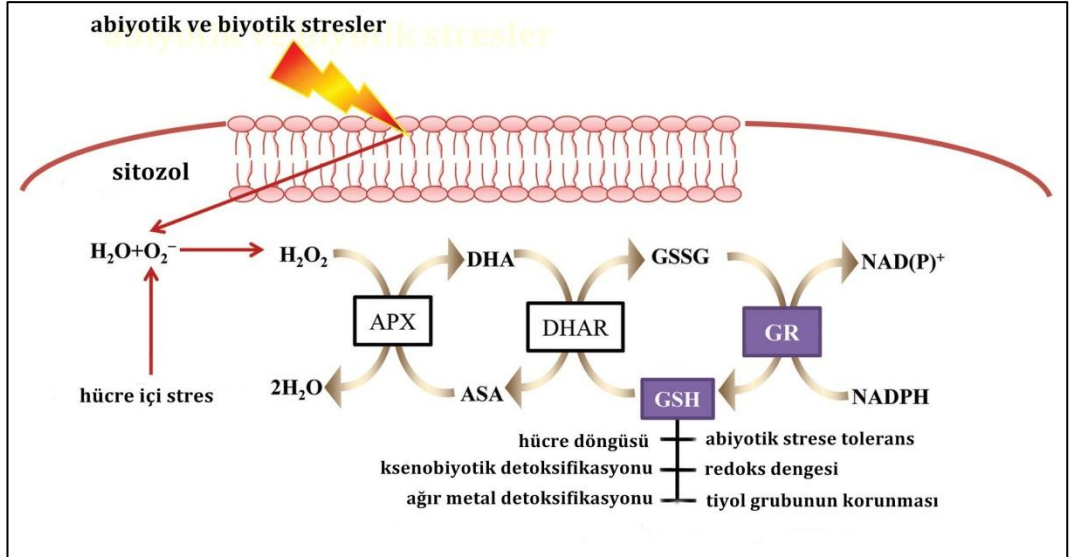
Haber-Weiss reaksiyonu: normal koşullarda metabolik olaylar sonucu gerçekleşir ve düşük hızda ilerlemektedir.



Fenton reaksiyonu: Fe^{+2} , Cu^+ , Zn^{+2} gibi metallerin varlığında gerçekleşmektedir.

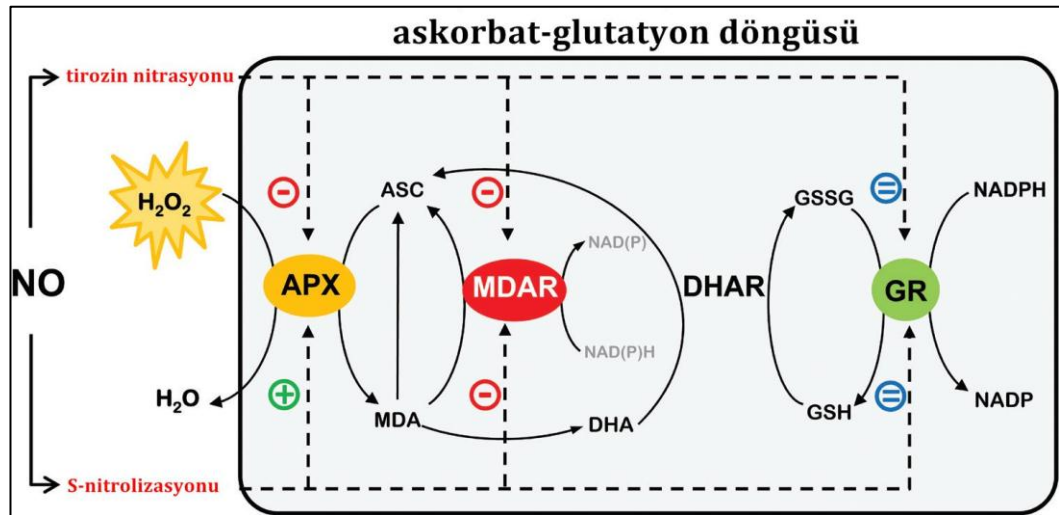


Glutasyon reduktaz (GR) ve glutasyon s-transferaz (GST) enzimleri, prokaryot ve ökaryotlarda bir çok canlıda bulunmaktadır. GR, yapısında FAD bulunduran ve NADPH'ya bağlı olan bir enzimdir ve katalitik döngüsü iki fazdan oluşmaktadır. Birincisi NADPH'yı indirgeyerek $NADP^+$ 'ye dönüştürdüğü yarı reaksiyon fazı ve diğeri GSSG (yükseltgenmiş glutasyon)'u indirgeyerek GSH (indirgenmiş glutasyon)'a dönüştürdüğü aktif fazdır (Şekil 1.1). Glutasyon reduktazların çoğunluğu kloroplastlarda bulunmaktadır. GR sayesinde oluşan GSH kloroplastta enzimlerin stabil çalışmasını sağlamaktadır. Ayrıca GR, H_2O_2 'ı saran askorbat-glutasyon döngüsüne katılmaktadır (Şekil 1.2). Ortamda düşük miktarda GSH olduğunda, kloroplastta früktoz difosfataz enziminin düzgün çalışmadığı belirtilmiştir (Foyer ve Halliwell, 1976; Yousuf vd., 2012; Ding vd., 2015).



Şekil 1.1 Glutasyon reduktazın diğer enzimler ile birlikte abiyotik ve biyotik streslere karşı çalışması ve indirgenmiş glutasyonun görevleri (Trivedi vd., 2013)

Glutasyon, bitkiler dahil olmak üzere birçok organizmada bulunmaktadır ve yapısında üç amino asit bulundurmaktadır. Bunlardan biri kükürt içeren sistein, diğerleri ise glutamin ve glisindir. Glutasyon bitkilerde gen ekspresyonu, hücre sinyalizasyonu, hücre döngüsü, bitki gelişimi ve hücre ölümünü düzenleyen çok işlevli bir proteindir (Şekil 1.1) (Dixon vd., 2002; Noctor vd., 2011; Noctor vd., 2012).



Şekil 1.2 Askorbat-glutasyon döngüsü (Begara-Morales vd., 2015)

Askorbat-glutasyon döngüsünü hidrojen peroksidi parçalayan, birçok enzimin birbiri ile çalıştığı metabolik bir yoldur. Bu döngüde görev yapan enzimler, askorbat peroksidaz (APX), monodehidro askorbat reduktaz (MDAR), dehidro askorbat

reduktaz (DHAR) ve glutatyon reduktaz (GR)'dir. APX ve MDAR enzimleri döngü boyunca nitrik oksitleri (NO), tirozin nitrasyonu ve S-nitrilasyonu yolu ile askorbat-glutatyon yolunu modüle etmektedir. GR, yükseltgenmiş glutatyonu indirgenmiş glutatyon ve NADPH'yı NADP⁺'ye çevirmektedir. Bir glutatyon s-transferaz enzimi olan DHAR ise glutatyon redoks döngüsünde rol almaktadır (Dietz, 2011; Begara-Morales vd., 2015).

Glutatyon transferazlara, glutatyon s-transferazda denilmektedir. Glutatyon s-transferaz (GST), GR gibi birçok organizmada bulunmaktadır. GST büyük bir gen ailesi tarafından kodlanmakta ve birden fazla işlevi bulunmaktadır. Bitki GST'leri çeşitli stres sonucu meydana gelen oksidatif reaksiyon türlerini (ROS) detoksifiye etmektedir. Bitkilerde tau, lambda, phi, teta, zeta, beta ve delta sınıfı GST'ler bulunmaktadır. Beta, delta, tau ve phi aynı zamanda bakteri ve böceklerde de bulunmaktadır (Sherratt ve Hayes, 2001; Dixon vd., 2002; Liu vd., 2009). GST'ler ayrıca sitoplazmada, tirozin katabolizması sırasında maleylasetoasetatı fumarilasetoasetata dönüştürmektedir. Sitoplazmadaki bir diğer rolü ise flavanoidleri bağlamaktır (Dixon vd, 2002). Büyük bir gen ailesi tarafından kodlanan bitki GST'leri ksenobiyotiklerin ve oksidatif stres metabolizmasının zararlarını ortadan kaldırmada büyük rol oynarlar (Liu vd., 2009).

Bu tezin amacı, Kabarla çilek çeşidinde antioksidan enzimlerinden olan glutatyon s-transferaz (GST) ve glutatyon reduktaz (GR) genlerinin izole edilip sekans dizilimlerinin ortaya çıkarılmasıdır. Bu çalışmanın sonucunda GST ve GR enzimleri kodlayan genler izole edilip karakterize edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Gıda endüstrisinde fenolik bileşiği zengin gıdalara eğilim artmaktadır. Meyve tür, kalite ve kimyasal içeriğinin orantılı olması meyve tüketimini artırmaktadır. Çilek ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda meyve iriliği ile kimyasal özellikleri arasında herhangi bir ilişki bulunmazken, meyve iriliği ve kalitesi arasında negatif ilişki saptanmıştır (Gündüz ve Özdemir, 2012). Üzümsü meyveler ile yapılan çalışmada 10 µM fenolik madde içeren ekstraktlarının hidroperoksitlerin inhibisyonu üzerine etkisi araştırılmış ve çileğin % 27 oranında etkili olduğu belirtilmiştir. Çilek yüksek miktarda antosiyanin içeren üzümsü meyve olduğu ve antosiyaninlerin lipozom oksidasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (Tosun ve Yüksel, 2003). Çileğe kırmızı rengini antosiyaninler vermektedir. Çilekte antosiyanin gen düzenlenmesi ile yapılan çalışmada beyaz meyveli yabani çilek çeşidinden mutasyonla elde edilen bir mutantta antosiyaninlerin azalmasının sebebi glutatyon s-transferaz geninde erken durdurma kodonunun bulunması olduğu tespit edilmiştir (Lou vd., 2017). Glutatyon s-transferin antosiyaninlerle ilişkili olması, enzimin birçok meyvede olabileceğinin göstergesidir.

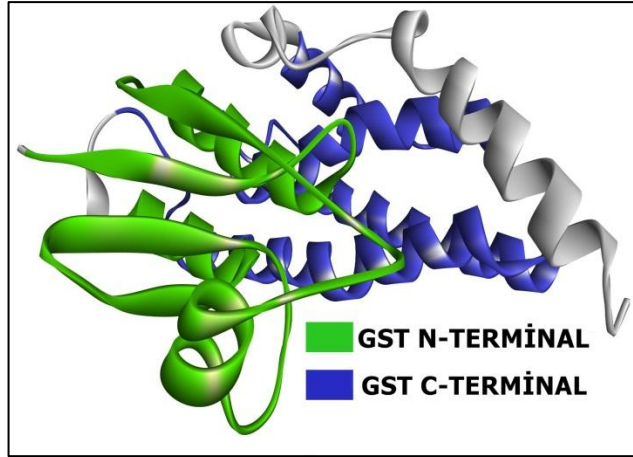
Keser (2012), böğürtlen, civanperçemi ve alıçtan elde ettiği ekstraktların yüksek oranda peroksidasyonu inhibe ettiği, bu üç bitkiden böğürtlenin en yüksek toplam antioksidan aktiviteye sahip olduğunu belirtmiştir. DPPH· ve ABTS·+ serbest radikalleri kullanılmış yine böğürtlenden elde edilen yaprak, çiçek, ham meyve ve meyve ekstreleri diğer bitkilere göre radikalleri daha çok inhibe ettiğini saptamıştır.

Gloria ve Kabarla ile yapılan tuz stresi çalışmasında Kabarlanın tuza daha dayanıklı olduğu bulunmuştur (Yılmaz vd., 2009). Üzal (2009), Kabarla'nın da içinde bulunduğu dokuz farklı çilek çeşidinde jasmonik asidin tuz stresi altındaki bitkilerde etkilerini araştırmıştır. Jasmonik asidin stres altındaki bitkilerde katalaz aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı fakat stres altında olmayan bitkilerde önemli bir değişime sebep olmadığını, askorbat peroksidaz aktivitesinde ise stres altında bulunan ve bulunmayan bütün bitkilerde artış olduğunu saptamıştır. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinde ise önemli bir artış olmadığını belirtmiştir. Candler, Camarosa ve Tiago çilek çeşitlerinde tuzluluk stresi araştırıldığında aspartik asit, lisin, lösin ve glutamik asit amino asit miktarları tuz stresinde arttığı belirtilmiştir (Turhan, 2002).

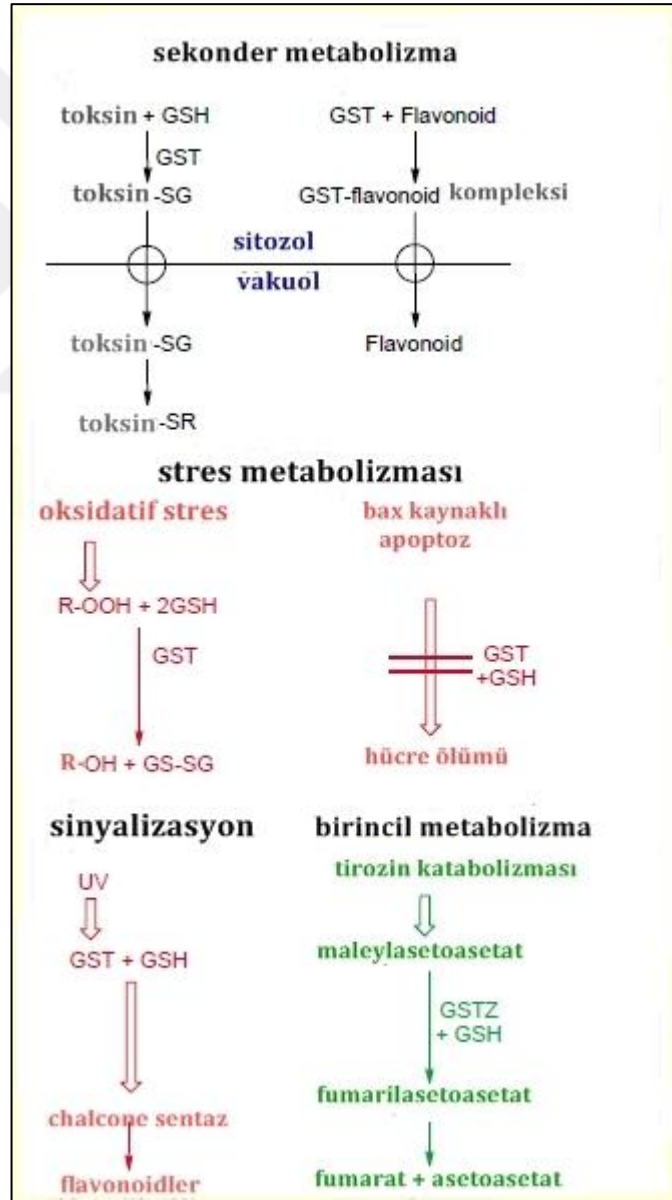
Kızılçamda kuraklık stresinin, buğdayda ise tuz stresinin glutatyon s-transferaz (GST) aktivitesini arttırdığı aynı şekilde soyada kuraklık stresinin glutatyon reduktaz (GR) aktivitesini arttırdığı ancak su stresinin GR aktivitesini azalttığı bilinmektedir (Yılmaz, 2006; Mohammadi vd., 2016; Taşğın vd., 2017).

Glutatyon s-transferazlar, glutatyonun diğer proteinlere bağlanmasını, çevresel toksinler ve serbest radikallerin zararlarını yok ederek hücre içi detoksifikasyonda rol oynarlar. GST'ler bir N-terminal alanı ve bir C-terminal alanı içermektedirler. N-terminal bölgesinde tioredoksin katlanma alanı ve C-terminal bölgesinde de hidrofobik substrat bağlanma bölgesi bulunmaktadır GSH'da N-terminal bölgesine bağlanmaktadır (Şekil 2.1) (Anonim, 2019).

Glutatyon transferazlar (GST) bitkilerde geniş ve çeşitli bir gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Yapılan araştırmalar, *Arabidopsis thaliana*'da GST'ye ait 48 genin bulunduğu ve bu genlerin en çok tau ve phi sınıfı glutatyon transferazları kodladığı bulunmuştur. GST'ler sitoplazmada herbisitlerin detoksifikasyonunu, oksidatif stres sonrası oluşan hidroperoksitlerin indirgenmesini ve tirozin katabolizmasının önemli bir adımını katalizlemektedir. GST'ler form ve yapılarını koruyan ve aynı zamanda da birden fazla işlevi yerine getirebilen çok yönlü enzimlerdir (Şekil 2.2). Domateste ise GST'ye ait 90 gen saptanıp 10 sınıfa ayrılırken, lahanada 65 GST geni tanımlanmış ve 11 sınıfa ayrılmıştır. Domates, çeltik ve arabidopsiste yapılan filogenetik analizlerde GST gen ailesini on sınıfa ayırmışlardır. Bu sınıflardan tau ve lambda domateste, tau ve phi ise arabidopsis ve çeltikte en çok bulunanlardır (Dixon vd., 2002; Vijayakumar vd., 2016; Islam vd., 2017).



Şekil 2.1 Domatesten izole edilen *SIGSTU5*'in protein yapısı ele alınarak oluşturulan üç boyutlu resmi, N-terminal ve C-terminal bölgeleri (Islam vd., 2017).



Şekil 2.2 GST'nin işlevleri (Dixon vd., 2002)

Glutasyon reduktaz (GR), pridin nükleotid-disülfür oksidoreduktaz gen ailesine aittir ve yapılan southern blot analizleri glutasyon reduktaz ile ilgili iki genin olduğunu ortaya çıkarmıştır. GR'ler bitkilerde kloroplastta, mitokondride ve sitoplazmada bulunmaktadır. Bezelye yapraklarından saflaştırılan GR'lerin 55 kDa ağırlığında olduğu hesaplanmış ve bulunduğu yerler; %77 kloroplast, %20 sitoplazma ve %3 mitokondri olarak saptanmıştır. Arabidopsiste NADPH'ya bağlı tioredoksin sisteminde GR aktivitesinin %65'ini GR1, %35'ini ise GR2 nin gerçekleştirdiği ve GR1'in sitoplazmada, GR2'nin ise kloroplast ve mitokondride daha çok bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca mitokondriyal GR'nin aktivitesi NADPH'ye bağlı olduğu belirlenmiştir. Arabidopsiste GR aktivitesinin büyüme ile ilişkili olduğu bulunmuştur. GR1 aktivitesi bitki büyümesi ve gelişimi için fazla rolü bulunmasa da GR2 aktivitesi kök büyümesi ve kök apikal meristemi için oldukça önemlidir. GR2 ekspresyonu azaldığında, kök apikal meristemlerinde GSSG oranının arttığı ve buna bağlı olarak gelişimin gerilediği gözlemlenmiştir (Edwards vd., 1990; Creissen vd., 1995; Marchler-Baver vd, 2009; Marty vd., 2009; Yu vd; 2013). Mangoda tau sınıfına ait *MiGSTU* enzim geninin 690 bç uzunluğunda olduğu ve 229 amino asidi kodladığı, moleküler ağırlığının ise 25.5 kDa olduğu tespit edilmiştir. Arabidopsiste bulunan GR2 geni ise 1698 bç uzunluğunda, 11 ekzon ve 10 intron içermektedir. Bu gen 565 amino asidi kodlamaktadır (Yu vd., 2013; Valenzuela-Chovira vd., 2017).

Börülce yaprakları kuraklıkla karşılaştığında GR aktivitesinin arttığı, dayanıklı türlerde ekspresyonun daha önce başladığı bildirilmiştir. GR'nin sekans bilgilerine bakıldığında 544 amino asidi kodladığı ve moleküler ağırlığının 58.5 kDa olduğu hesaplanmıştır. GST enzimleri ile yapılan çalışmada ise sorgumdan A1/A1 ve B1/B2 enzimleri izole edilerek A1/A1'in her bir A1 alt ünitesinin moleküler ağırlığı 26 kDa, B1/B2'nin B1 alt ünitesi 26 kDa, B2 alt ünitesi ise 28 kDa olduğu hesaplanmıştır. GST A1/A1 enziminin aktivitesi 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) varlığında arttığı, B1/B2 enziminin aktivitesi ise metaloklor varlığında arttığı, soya fasülyesinde yapılan bir çalışmada ise yine 1-kloro-2,4-nitrobenzenin GST enzimi olan *GmGST8*'in aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. Başka bir araştırmada da *PpGST1* ve *PpGST2* gen ekspresyonlarının salisilik asit ve indol-3-asetik asit tarafından indüklendiği belirtilmiştir (Gronwald ve Plaisance, 1998; McGonidle vd., 2000; Contour-Arsel, 2006; Shi vd., 2014).

Çeltikte bulunan tau sınıfı *OsGSTU4* GST geninin tuzluluğa karşı dayanıklılığı arttırdığı bilinmektedir. *OsGSTU4* genine ait proteinlerin nükleus ve sitoplazmada bulunduğu tespit edilmiştir. Bu gen *Arabidopsis thaliana*'ya aktarılarak tuz stresine gösterdiği tepkiler araştırılmış, tuzluluk ve oksidatif strese karşı toleransının arttığı saptanmıştır. Ayrıca transgenik bitkinin oksin ve absisik aside karşı daha az duyarlılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Domateste bulunan *LeGSTU2* geni de yine *A. thaliana*'ya aktarılmış ve transgenik bitkilerin NaCl ve mannitol tarafından indüklendiği böylelikle tuz ve ozmotik strese karşı daha dayanıklı olduğu belirtilmiştir. Her iki gende *A. thaliana*'da GST miktarını artırmıştır (Sharma vd., 2014; Xu vd., 2015).

Farklı organizmalar incelendiğinde Zn^{+2} , tiyolün, Cu^{+2} ve Cd^{+2} nin GR enzimi üzerinde inhibisyona sebep olduğu belirtilmektedir (Foyer ve Halliwell, 1978; Tekman, 2007). Soyada GR enzim aktivitesinin ve mRNA seviyesinin kuraklık ve salisilik asit ile ilişkisine bakıldığında kuraklığın transkripsiyon seviyesini arttırdığı, salisilik asitin ise GR-RNA seviyesini azalttığı (Taşgın, 2017), fotooksidatif stresinde sarıçamda hem sitosol mRNA'sında hem de kloroplast mRNA'sında artış olduğu fakat süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin GR'den daha yüksek olduğu, böylelikle iki enziminde fotooksidatif stresle başa çıkmak için kullanıldığı belirtilmiştir (Karpinski vd., 1993). Farklı stres durumlarında çeltik ve arabidopsisten GR genleri araştırılmış ve çeltikte *LOC_Os02 g56850*, *LOC_Os03 g06740*, *LOC_Os10 g28000* genleri, arabidopsiste ise *AT3G54660* ve *AT3G24170* genleri tespit edilmiştir. Arabidopsiste bulunan *AT3G54660* geninin 11 ekzon ve 10 intron içerdiği, tam uzunlukta açık okuma çerçevesinin 1698 bç olduğu ve 565 amino asidi kodladığı bulunmuştur (Yu vd., 2013; Trivedi vd., 2013).

Tatlı patatese Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , As^{+3} ve H_2O_2 her biri tek tek uygulanarak farklı ağır metal ve hidrojen peroksit stresinde bitkinin tepkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak GST genlerinden her birinin ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir. Tatlı patatese belirlenen 42 GST geni bulunmaktadır. Bu yüzden ağır metal ve hidrojen peroksit stresi farklı dokularda farklı GST genlerinin aktif olmasını sağlamıştır. 42 genden bazıları uygulanan 5 farklı stresten sadece birine yanıt verirken, bazılarının birden fazla strese yanıt verdiği tespit edilmiştir.

IbGSTU3 ve *IbGSTU12* genlerinin aktiviteleri uygulanan bütün stres koşullarında arttığı, toprak altı dokularda ise en fazla artış gösteren genlerin *IbGSTU24*, *IbGSTU27* ve *IbGSTU16* olduğu belirtilmiştir (Ding vd., 2017).

Kluyveromyces lactis'in yabani ve mutant (*rag2*) türü ile yapılan çalışmada oksidatif strese karşı direnç ölçülmüş ve *rag2* türünün daha dirençli olduğu ve bünyesinde daha fazla glutatyon reduktaz ve katalaz enzimi bulundurduğu saptanmıştır (Tarrío vd., 2008). Arabidopsis'te GR2 geninin yaprakların yaşlanması üzerine bir araştırma yapılmış ve bu kapsamda GR2 genine zarar verilerek mutant bitkiler elde edilmiştir. Yapraklar yaşlanmaya başladığında oksidatif stresin ve fitohormonların hücrelerde arttığı bildirilmiştir. Mutant bitkilerde kontrole göre H₂O₂ miktarının fazla ve GSH/GSSG oranının düşük olduğu tespit edilmiştir. GR2 geninin yaprak yaşlanmasında önemli bir enzim olduğu ortaya çıkmıştır (Ding vd., 2015). Kavak yapraklarına, bakteriyel GR geninin aktarılmasıyla kloroplast GR aktivitesi 1000 kat artarken sitoplazmada en fazla 10 kat artış olmuştur. Sitoplazmada GR'nin ekspresyon artışı glutatyon seviyesini etkilemezken, kloroplastta GR ekspresyonunun artması glutatyon seviyesini yükselterek fotoinhibisyona karşı koruma sağlamıştır. Kloroplastlarda GR aktivitesinin artması antioksidan kapasiteyi artırarak oksidatif stresle daha iyi savaşmayı sağlamıştır (Foyer, 1995).

Domateste *LeGSTU2* geninin bitkide tuz, osmatik ve ısı stresine karşı ifade edildiği bilinmektedir. *LeGSTU2* geni arabidopsise aktarılarak genin etkileri gözlemlenmiş ve transgenik bitki ile kontrol bitkilerin fenolik özelliklerinin farklı olmadığı gözlemlenmiştir. Fakat transgenik bitkilerin NaCl ve mannitol tarafından uyarılan tuz ve osmatik strese karşı daha çok direnç göstermiştir. Benzer bir çalışma da tütün bitkisinde yapılmıştır. Tütünün Cd'ye direnç göstermesi için bir mantar türü olan *Trichoderma virens*'ten *TvGST* geni *Nicotiana tabacum*'a aktarılmıştır. Bitkiler Cd'ye maruz kaldığında kontrole göre transgenik bitkilerin daha dayanıklı olduğu ve bünyelerinde lipid peroksidasyon seviyelerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Cd stresine maruz kalan transgenik bitkilerde glutatyon s-transferazın yanı sıra farklı birçok antioksidan enzim miktarlarında da artış gözlemlenmiştir (Dixit vd., 2011; Xu vd., 2015).

Abiyotik stresler bitkilerde oksidatif stresi arttırdığı gibi biyotik streslerde oksidatif strese sebep olmaktadır. Mısırdaki yaprak bitine dayanıklı ve duyarlı iki çeşit yaprak bitine maruz kaldıklarında hücrelerdeki GR1 ve GR2 enzimleri karşılaştırılmıştır. Belirli bir süre zararlıya maruz kalan dayanıklı bitkilerde GR1 gen ekspresyonunda kademeli olarak artış gözlemlenmiş, fakat maruz kalma süresi arttıkça ekspresyonda azalma saptanmıştır. Aynı şekilde GR2 gen ekspresyonu da dayanıklı bitkilerde önemli ölçüde artmıştır. Duyarlı bitkilerde GR1 ve GR2 gen ekspresyonları artsa da önemli bir fark görülmemiştir. Sonuç olarak, bitki genotipi, yaprak biti sayısı ve istila süresi GR1 ve GR2 gen ekspresyonunu önemli ölçüde etkilemiştir. Benzer bir çalışmada da Bambu Mozaik Virüsü'ne (BaMV) GST enziminin etkisi araştırılmış, Bambu Mozaik Virüsü tek iplikçikli pozitif-sens RNA virüsüdür. *E.Coli*'den sentezlenen *NbGSTU4* proteininin glutasyon varlığında BaMV RNA'sının 3' UTR'si ile etkileşime girdiği ve negatif-sens RNA'ya dönüştürdüğü, ayrıca *Nicotiana bentiana*'da *NbGSTU4* gen ekspresyonunun BaMV enfeksiyonunda arttığı bildirilmiştir (Chen vd., 2013; Sytykiewicz, 2016).

Yabancı otlar birçok kültür bitkileri ile rekabete girerek kalite ve verimin düşmesini sağlamaktadır. Bu sebeple yabancı otlar ile mücadele etmek için herbisitler kullanılmaktadır. Herbisitler yabancı otları öldürdüğü gibi kültür bitkilerine de zararları bulunmaktadır. Yabancı ot olan *Alopecurus myosuroides* (kara otlar) ve *Lolium rigidum* (çavdar otu)'da çoklu herbisit direnci (MHR), ksenobiyotiklerin detoksifiye edilmesi için geliştirilmiş bir yetenektir. Kara ot ve çavdarda herbisitleri zararsız hale getirmek için phi sınıfı GST'ler bulunmaktadır ve herbisitlerle karşılaştıklarında ifadeleri artmaktadır. Kara otta bulunan ve herbisit direncini sağlayan *AmGSTF1* geni arabidopsise aktarılmış ve çoklu herbisite karşı dayanıklı bitkiler elde edilmiştir. Buğdayda ise tau sınıfı *TtGSTU1* ve *TtGSTU2* genlerinin herbisit varlığında kök ve sürgünlerde ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Her iki gende 2,4-diklorofenoksiasetik asit ve absisik asit tarafından uyarılmıştır (Cummins vd., 2013; Xu vd., 2002).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama Bahçesinde yetiştirilmekte olan Kabarla çilek çeşidinden sağlanmıştır. Çalışmada Kabarla çeşidinin meyvesi kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. RNA izolasyonu

Toplam RNA'lar guanidyum izotiyasanat metodu (Strommer vd., 1993) izlenerek elde edilmiştir. Bu amaçla, taze ya da -80 °C'de saklanmış çilek örneklerinden 1 g sıvı azot içerisinde öğütülüp toz haline geldikten sonra % 0.5 sarkosil, 0.1 M merkaptotanol, 4 M guanidyum izotiyasanat, 25 mM sodyum sitrat (pH 7.0) içeren 5 mL'lik ekstraksiyon çözeltisine konulmuştur. Hazırlanan bu karışım içerisine 0.5 mL 2 M sodyum asetat (pH 4.0) eklenip 30 sn vortekslendikten sonra, karışıma 3 mL kloroform:izoamil alkol (24:1 v/v) ilave edilerek tekrar 30 sn vortekslenmiştir. Daha sonra 5.000 xg'de izopropanol katılarak hafifçe karıştırılıp -20 °C'de bir gece bekletilmiştir. Bir gece beklemenin ardından santrifüj işlemi (4 °C, 10000 xg / 30 dk) yapılmıştır. Daha sonra sıvı kısım dökülerek pelet elde edilmiştir. Elde edilen pelet 500 µL RNaz'dan arındırılmış suda çözündürüldükten sonra 10 dk santrifüj yapılmış ve üstte kalan faz başka bir tüpe aktarılmıştır. Sıvının üzerine eşit hacimde kloroform:izoamil alkol ilave edilip karıştırılmış ve 5.000 xg'de 10 dk tekrar santrifüj işlemi uygulanmıştır. İkili sıvı fazdan üstte olanı başka bir tüpe alınarak üzerine örnek ile eşit hacimde 4 M LiCl eklenip 0 °C'de 3 saat bekletilmiştir. Böylece RNA'ların çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen örneklerle santrifüj (15.000 rpm / 5 dk) işlemi uygulandıktan sonra pelet %70'lik etanol ile 2 defa yıkanarak son kalıntılarda uzaklaştırılmıştır. Kurutulan örnekler RNaz içermeyen su ile çözdürülüp -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Dejenere primerlerin hazırlanması

Dejenere primerler, daha önce başka bitkilerden elde edilmiş olan GST ve GR gen sekansları incelenerek bunlar arasından değişmeden kalan kısımlar baz alınarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Gene özel dizayn edilen primerler

GEN	DİZİ	TM
Gulutasyon reduktaz (F)	GGAGCATCTTATGGAGGTGAAC	60
Glutasyon reduktaz (R)	CAGTTTTTTCTTGTCGCCAG	58
Gulutasyon s-transferaz (F)	CTTNNCTTKCYCTYAAAYCC	55
Glutasyon s-transferaz (R)	CATMATCWGTKSTCWTRCC	53

3.2.3. DNaz uygulaması ve cDNA elde edilmesi

DNaz kiti (ambion) kullanılarak 10 µg RNA içeren çözeltiliye 0.1 hacminde 10X DNaz I tampon çözeltisi (100 mM Tris, pH 7.5, 25 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂) ve 1.5 µL rDNaz I toplam RNA'ya ilave edildikten sonra 37 °C'de 30 dk bekletilmiştir. Bu karışıma RNA'nın 0.2 hacminde DNaz inaktivasyon solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. 10.000 xg'de 1.5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır.

Olası DNA kirliliği ortadan kaldırılan RNA örnekleri, cDNA'ya çevrilmiştir. RNA'ları cDNA'ya çevirmek için 'Advantage RT-PCR' kiti (Clontech) kullanılarak üretici firmanın protokolü uygulanmıştır. Bu amaçla, 1 µg toplam RNA'ya DEPC uygulanmış su ilave edilerek toplam toplam 12.5 µL'de çözdürülmüştür. Çözdürülen RNA'ya 1 µL 20 µM random hexamer primeri ilave edildikten sonra, RNA'lar 70 °C'de 2 dakika ısıtılmış ve hızlı bir şekilde buza konulmuştur. 12 µL 5X reaksiyon tampon çözeltisi (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 3 µL dNTP karışımı (her biri 10 mM olan dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 1.5 µL rekombinant RNaz inhibitörü, 3 µL MMLV ters transkriptaz enzimi içeren 19.5 µL karışımdan 6.5 µL ilave edilip karıştırıldıktan sonra örnekler 42 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra reaksiyonu sonlandırmak için örnekler 94 °C'de 5 dk bekletilmiştir.

3.2.4. PCR analizleri

3.2.4.1. GR PCR analizi

PCR örnekleri 5 µL cDNA, 3 µL dejenere ileri (forward) primer, 3 µL dejenere geri (reverse) primer, 5µL 10X PCR tamponu, 1 µL dNTP karışımı (10mM), 1.2 µL Taq polimeraz, 31.8 µL saf su ile toplam 50 µL olacak şekilde PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. PCR karışımı 95 °C'de 10 dk ön denaturasyon, 95 °C'de 15 sn denaturasyon (DNA çift iplikçığının ayrılması), 60-40 °C'de 40 sn annealing (primerin bağlanması), 68 °C'de 40 sn extension (yeni iplikçığın sentezlenmesi), 60 °C'de 10 dk son yazılım olacak şekilde ayarlandı ve döngü denaturasyon-extension arasında 40 defa tekrarlanmıştır.

3.2.4.2. GST PCR analizi

PCR örnekleri 8 µL cDNA, 3.5 µL dejenere forward primer, 3.5 µL dejenere reverse primer, 5µL 10X PCR tamponu, 1.2 µL dNTP karışımı (10mM), 1 µL Taq polimeraz, 27.8 µL saf su ile toplam 50 µL PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. PCR örneği 94 °C'de 5 dk ön denaturasyon, 94 °C'de 1 dk denaturasyon (DNA çift iplikçığının ayrılması), 51-44 °C'de 1,5 dk annealing (primerin bağlanması), 72 °C'de 1 dk extension (yeni iplikçığın sentezlenmesi), 72 °C'de 1 dk extension (yeni iplikçığın sentezlenmesi), 72 °C'de 10 dk son yazılım şeklinde ayarlandı ve 40 döngü denaturasyon-extension arasında tekrarlanmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri 1X'lik TBE (89 mM tris, 89 mM borik asit ve 2 mM EDTA ph:8.00) ile hazırlanmış %1'lik agaroz jelde 90 V'da 2.5 saat koşuturulmuş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir.

3.2.5. PCR ürünlerinin saflaştırılması

Jelde koşutularak uzunluğu belirlenen bantlar steril bistüri yardımıyla UV ışığı altında kesilip tartılmıştır. Kesilen bantlar GeneJet PCR saflaştırma kiti (Thermo) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi kitte bulunan protokole göre yapılmıştır.

Jelden kesilen GR bandı (800 bç) 500 mg, GST bandı (1100 bç) 370 mg olarak tartılmıştır. Jelden kesilen ürünlerin ağırlığına göre 1mg/1µL bağlanma solüsyonu eklenmiştir. 60 °C’de 10 dk ara ara karıştırılarak jelin erimesi sağlanmıştır (eğer jel tamamen erimesiye 5 dk daha bekletilmiştir), daha sonra yaklaşık 20 sn vortex yapılmıştır. Eriyik jel kitten çıkan filtrelili ependorfa aktarılıp 12000 xg’de 1 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Filtrenin altında kalan sıvı dökülerek ependorfun üzerine 100 µL bağlanma solüsyonu eklenip 12000 xg’de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Aynı şekilde, altta kalan sıvı dökülmüştür. 700 µL yıkama solüsyonu eklenerek 12000 xg’de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Yine aynı şekilde filtrenin altında kalan sıvı dökülmüştür. Son olarak 50 µL elüsyon tamponu eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletilip, 12000 xg’de 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra saflaştırılan DNA -20 °C’ye kaldırılmıştır.

Elde edilen saflaştırılmış DNA örnekleri daha sonra sekanslanarak BLAST programları yardımıyla ilgili genlerin sekansları oldukları kanıtlanmıştır.

3.2.6. RACE analizi

3.2.6.1. RACE cDNA sentezi

Tam uzunlukta genleri izole etmek için FirstChoice RLM-RACE kiti (Invitrogen) ve kite ait protokol kullanılmıştır.

Protokole göre; 5’ RLM-RACE cDNA için 1 µg herhangi bir DNA kirliliği bulunmayan RNA, 2 µL 10X CIP tamponu, 2 µL CIP (calf intestine alkaline phosphatase), toplam hacmi 20 µL olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile tamamlanmıştır. Karşıma 10 sn santrifüj işlemi uygulandıktan sonra 37 °C’de 1 saat bekletilmiştir. Karşıma 15 µL amonyum asetat solüsyonu, 115 µL nükleaz içermeyen su ve 150 µL fenol:kloroform eklenip homojen hale getirilmiş ve maximum hızda santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası oluşan iki fazlı sıvıdan üstte olan sıvı yeni steril ependorfa aktarılmıştır. Daha sonra, 150 µL kloroform eklenerek oda sıcaklığında 5 dk maximum hızda santrifüj yapılmıştır. Aynı şekilde üstte olan sıvı kısım yeni ependorfa aktarılmıştır. Örneğe 150 µL izopropanol ilave edilerek 10 dk buzda bekletilmiştir. Buzda bekleyen örnek 20 dk maximum hızda santrifüj

yapılarak peletin çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra 0.5 mL %70'lik etanol ile pelet yıkanmıştır. Daha sonra alkol uzaklaştırılarak pelet kurutulmuştur. Kuruyan pelet 4 µL 1X TAP çözeltisi ile çözdürülüp, üzerine 1µL tobacco acid pyrophosphate eklenip 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. 5' RACE adaptörü takmak için 5 µL CIP/TAP-treated RNA'ya 1 µL 5' RACE adaptör, 1µL 10X RNA ligaz tamponu, 2 µL T4 RNA ligaz (2.5 U/µL), 1 µL nükleaz içermeyen su hafifçe karıştırılıp 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Ters transkripsiyon için 2 µL 5' RACE adaptörü takılan RNA, 4 µL dNTP karışımı, 2 µL random dekamers, 2 µL 10X RT tampon çözeltisi, 1 µL RNase inhibitör, 1 µL MMLV ters transcriptaz, 8 µL su hafifçe karıştırılarak 1 saat 42 °C'de bekletilmiştir.

3' RLM-RACE cDNA için 2 µL DNaz uygulanmış RNA, 4 µL dNTP karışımı, 2 µL 3' adaptör, 2 µL 10X RT tampon çözeltisi, 1 µL RNaz inhibitör, 1 µL M-MLV ters transkriptaz, 8 µL saf su hafifçe karıştırılıp 42 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

3.2.6.2. RACE PCR analizi

Outer 5' RLM-RACE PCR için daha önceki aşamalarda elde ettiğimiz RT reaksiyonundan 1 µL, 10X PCR tampon çözeltisinden 5 µL, dNTP karışımından 4 µL, 10 µM gene özel dizayn edilen primer (forward)'den 2 µL, 5' RACE outer primer'den 2 µL, Taq polimerazdan 0.2 µL, ve saf sudan 33.8 µL konularak toplam hacim 50 µL olmuştur. Elde edilen PCR karışımı hafifçe karıştırılarak 94 °C'de 3 dk ön denaturasyondan sonra, 35 döngü 94 °C'de 30 sn, 60 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 30 sn olduktan sonra 72 °C'de 7 dk son uzama yapılmıştır.

Inner 5' RLM-RACE PCR için 3 µL outer 5'RACE PCR ürünü, 5 µL 10X PCR tampon çözeltisi, 4 µL dNTP karışımı, 2 µL 10 µM gene özel dizayn edilen primer (reverse), 2 µL 5' RACE inner primer, 0.2 µL Taq polimeraz ve 33.8 µL saf su hafifçe karıştırılarak outer 5'RLM-RACE ile aynı PCR döngüleri uygulanmıştır.

Outer 3' RLM-RACE PCR için 1 µL ters transkriptaz reaksiyonu, 5 µL 10X PCR tampon çözeltisi, 2 µL gene özel dizayn edilen primer (reverse), 2 µL 3' RACE outer primer, 0.2 µL Taq polimeraz ve 35.8 µL saf su hafifçe karıştırılarak 94 °C'de 3 dk

ön denaturasyondan sonra 35 döngü 94 °C'de 30 sn, 60 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 30 sn olduktan sonra 72 °C'de 7 dk son uzama yapılmıştır.

Inner 3' RLM-RACE PCR için outer 3' RACE PCR ürününden 1 µL, 10X PCR tampon çözeltisinden 5 µL, dNTP karışımından 4 µL, gene özel dizayn edilen primer (forward)'den 2 µL, 3' RACE inner primerden 2 µL, Taq polimerazdan 0.2 µL ve saf sudan 35.8 µL alınarak yapılan karışım outer 3' RLM-RACE PCR ile aynı döngüler uygulanarak PCR yapılmıştır.

Elde edilen RACE PCR ürünlerinden 10 µL alınarak 1X'lik TBE ile hazırlanan %2'lik jelde 2 saat 40 dk koşturulmuştur. Elektroforez sonucu ayrışan bantlar UV ışığı altında steril ve tek kullanımlık jilet ile kesilip GeneJet PCR saflaştırma kiti (Thermo) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan örnekler sekans analizi için Atlas Biyoteknoloji laboratuvarına gönderilmiştir.

3.2.7. DNA izolasyonu

Çileğe ait genomik DNA'lar CTAB protokolü ile izole edilmiştir. Bunun için 0.5 mL CTAB tamponuna 0.02 g PVP ve 2.5 µL β-merkaptolanol eklenerek 55 °C'de çözdürülerek kullanıma hazır hale getirildi. 100 mg meyve dokusu sıvı azot yardımıyla havanda iyice ezilip temiz ependorfa aktarılmıştır. Üzerine 500 µL CTAB karışımı eklenip 20 sn vorteks yapılarak 1 saat 55 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 500 µL kloroform eklenerek 7 dk 16000 xg'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant temiz bir ependorfa aktarılarak 0.08 hacminde 7.5 M amonyum asetat ve 0.54 hacminde soğuk izopropanol eklenerek nazikçe karıştırılmıştır. Tüpler 30 dk buzda bekletildikten sonra 3 dk 16000 xg'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülüp pelet 700 µL %70'lik etanolle hafifçe karıştırılarak yıkanmış ve 1 dk 16000 xg'de santrifüj yapıp etanol tüpten dökülerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 700 µL %95'lik etanol ile tekrar yıkanıp 16000 xg'de 1 dk santrifüj yapılarak etanol uzaklaştırılıp pelet kurutulmuştur. Kuruyan pelet 50 µL TE (10 mM Tris ve 1 mM EDTA ph: 8.00) tamponunda çözdürülmüştür. Elde edilen DNA'nın kalitesi ve miktarı nanodrop ile ölçülmüştür. Ayrıca genomik DNA'nın kalitesi %1'lik agaroz jel ile elektroforez işlemi uygulanarak tayin edilmiştir.

3.2.8. Southern blot analizi

Southern blot analizi DIG high prime DNA labeling and detection starter kit (Roche) kullanılarak yapılmıştır. Southern blot analizi için Kabarla çilek çeşidinin meyve kısmından CTAB protokolü ile izole edilen genomik DNA'lar kullanılmıştır. 20 µg DNA, 1 µL EcoRI restriksiyon enzimi ve 2 µL 10X EcoRI tamponu kullanılarak karışım 37 °C'de 16 saat bekletilerek DNA'nın parçalanması sağlanmıştır. Elde edilen DNA parçaları %1'lik agaroz jelde 15 V'da yürütülmüştür. Elektroforez tankından çıkarılan jel iki defa distile su ile yıkanmıştır. Yatay çalkalayıcıya alınan jel 15 dk depurinasyon solüsyonu içerisinde çalkalanmıştır. Solüsyondan çıkarılan jel iki kez distile su ile yıkandıktan sonra denaturasyon solüsyonunun içerisine konulup çalkalayıcıda 30 dk çalkalanmıştır. Aynı şekilde solüsyondan çıkarılan jel iki kez distile su ile yıkanmıştır. Son olarak nötralizasyon solüsyonuna alınan jel 30 dk çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra iki kez distile su ile yıkayıp blot düzeneği kurulmuştur. 20X SSC (0.3 M tri-sodyum sitrat ve 3 M sodyum klorid) solüsyonu tanka konulmuştur. 20X SSC ile ıslatılmış whatman kağıtları jelin altına yerleştirilmiştir. Jelin üzerine pozitif değerli naylon membran hava kabarcığı olmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Düzeneğin üzerine yaklaşık 15 cm yüksekliğinde olacak şekilde peçeteler yerleştirilmiş ve son olarak en üstte 500 g ağırlık konularak bir gece boyunca transferin gerçekleşmesi sağlanmıştır.

Membran 10X SSC ile ıslatılmış 3 mm whatman kağıdının üzerine yerleştirilmiştir. Islak membran UV-crosslink ile sabitlendikten sonra distile su ile yıkayıp hava ile kurutulmuş ve + 4 °C'de saklanmıştır.

Prob için daha önce cDNA kullanılarak yapılan PCR ürünleri kullanılmıştır. Prob işaretleme için DIG high prime DNA labeling and detection starter kitII (Roche)'i ve kite ait protokol kullanılmıştır. Protokole göre 10 ng-3 µg DNA örneği son hacim 16 µL olacak şekilde saf su eklenerek çözdürülmüş ve denatüre etmek için 10 dk kaynayan suda bekletilip, ardından 30 sn buza konulmuş ve üzerine 4 µL DIG-high prime eklenmiştir. Karışım 37 °C'de 20 saat inkübe edildikten sonra reaksiyon 2 µL 0,2 M EDTA (ph:8) ile sonlandırılmıştır.

Ön hibridizasyon için hibridizasyon fırını tüpüne konulan membranın üzerine 10 mL DIG Easy Hyb hibridizasyon solüsyonu dökülmüş ve 42 °C'de 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Hibridizasyon aşaması için 5 dk kaynayan suda denatüre edilen DIG-labeled DNA prob hızlıca buza konulmuş ve önceden ısıtılmış DIG Easy Hyb hibridizasyon solüsyonu ile karıştırılmıştır (3.5 mL/100 cm² membran). Elde edilen karışım tüpte bulunan membranın üzerine dökülüp ve çalkalayıcıda bir gece boyunca 42 °C'de inkübe edilmiştir. Hibridizasyonun sonunda membran 2X SSC ve % 0.1 SDS'den oluşan karışımla iki kez 5'er dakika yıkanmıştır. Daha sonra 0.5X SSC ve % 0.1 SDS'den oluşan karışımla 68 °C'de iki kez 15'er dakika yıkanmıştır. Son olarak 5 dakika kitle bulunan yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Membran 30 dk 100 mL Blocking solüsyonu ile inkübe edildikten sonra 30 dk 20 mL Antibody solüsyon ile inkübe edilmiştir. 100 mL yıkama tamponu ile iki kez 15'er dk yıkandıktan sonra 5 dk 20 mL detection tamponu ile inkübe edilmiştir. Membranın DNA transfer edilen yüzeyine 1 mL CSPD uygulayıp 25 °C'de 5 dk bekletilmiştir. Fazla sıvı atıldıktan sonra membran 37 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Membran son aşamada jel görüntüleme sistemi (Kodak GL 1500) ile analiz edilmiştir.

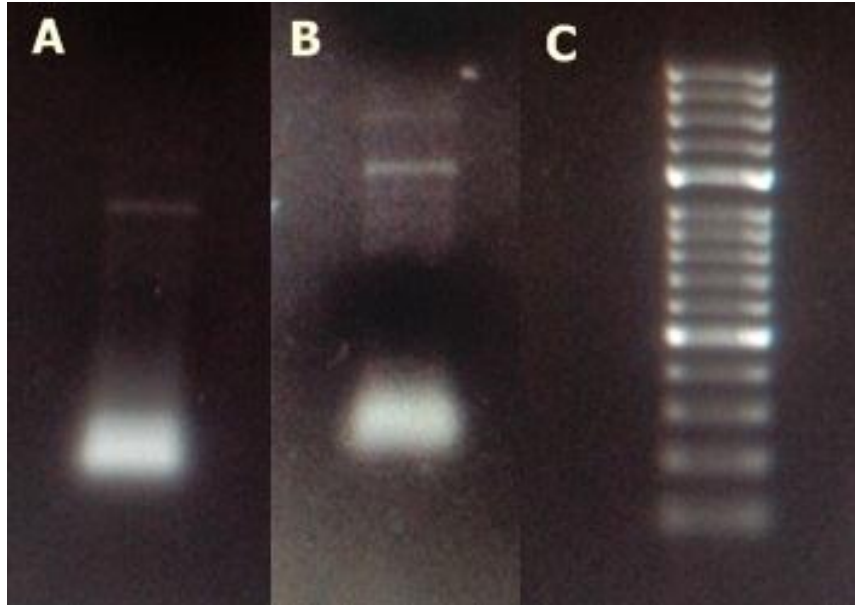
4. BULGULAR

4.1. RNA İzolasyonu

Guanidin izothiocyanate metodu ile RNA, Kabarla çilek çeşidinin meyve kısmından izole edilmiştir. RNA'ların kalitesi ve konsantrasyonu nanodrop ile tespit edilmiştir. Ayrıca RNA'ların kalitesi formaldehit-agaroz jel ile tayin edilmiştir. Nanodrop'tan elde edilen verilere göre konsantrasyonları 0.0431 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.0733 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ve 260/280 değeri sırası ile 1.95 ve 1.91 olan RNA'lar elde edilmiştir. RNA'ların uzunlukları ise elektroforez sonucuna göre 1600 bç ve 1200 bç olduğu ayrıca RNA'ların iki alt üniteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.2. PCR Analizleri

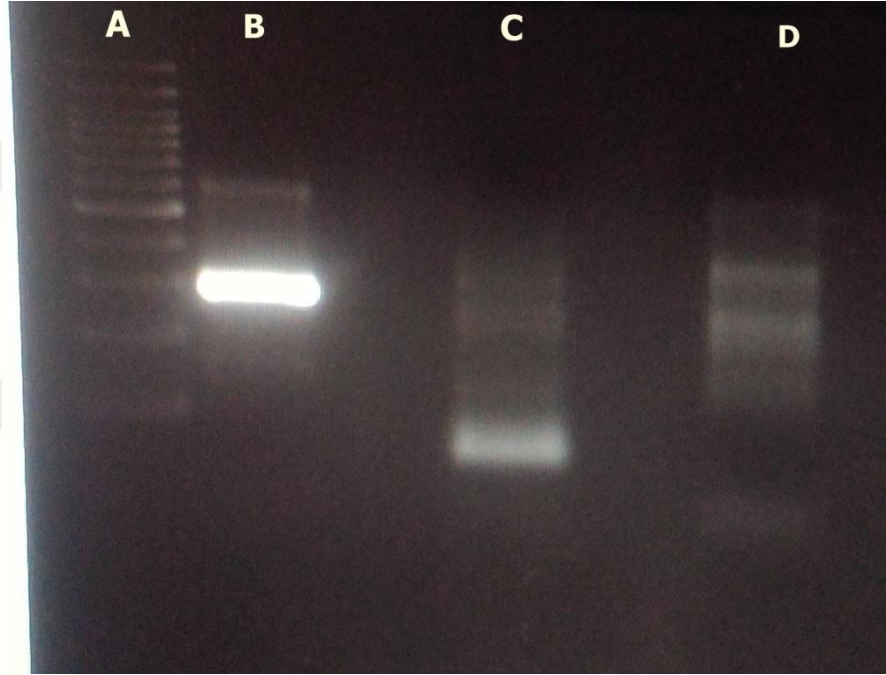
cDNA'ya dönüştürülen RNA'lar GST ve GR genlerine özel dizayn edilen primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri 2000-100 bç DNA büyüklük markörü ile birlikte % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılarak görüntülenmiştir. Sonuç olarak, GST baz uzunluğu 1100 bç ve GR baz uzunluğu 800 bç olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.1).



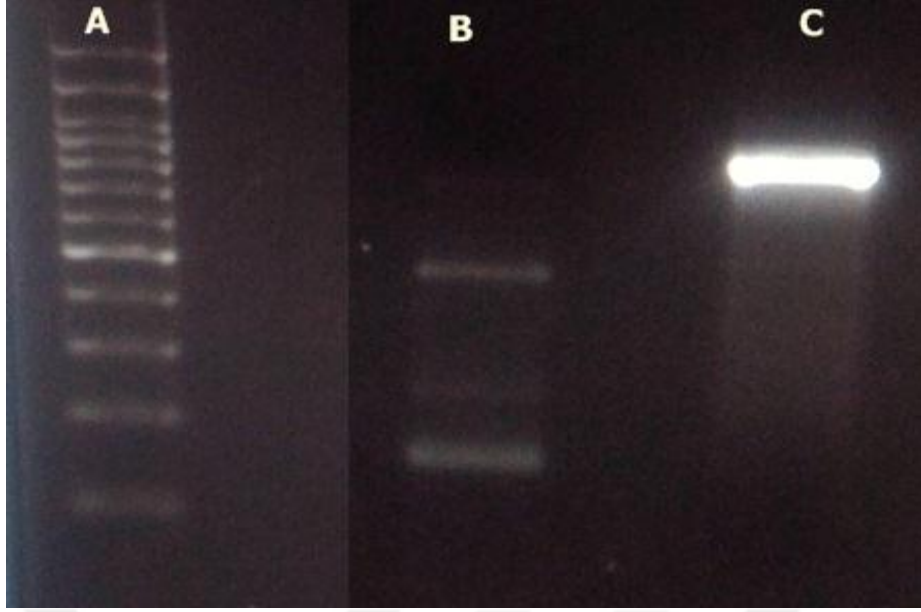
Şekil 3.1 A: GR'ye ait PCR ürünü, B: GST'ye ait PCR ürünü, C: Markör

4.3. RACE Analizi

PCR ile GR ve GST genlerine ait kısmi çoğaltım yapılmıştır. Eksik olan kısımlar 3' ve 5' RACE ile tamamlanmıştır. FirstChoice RLM-RACE kiti (Invitrogen) ve kite ait protokol kullanılarak 5' ve 3' RACE PCR ürünleri elde edilmiştir. RACE PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel kullanılarak elektroforez ile ayrıştırılmıştır. 5'RACE GR PCR ürünü 100 bç, 5' RACE GST PCR ürünü 400 bç (Şekil 3.2), 3' RACE GR PCR ürünü 450 bç, 3'RACE GST ürünü 900 bç (Şekil 3.3) olarak tespit edilmiştir.



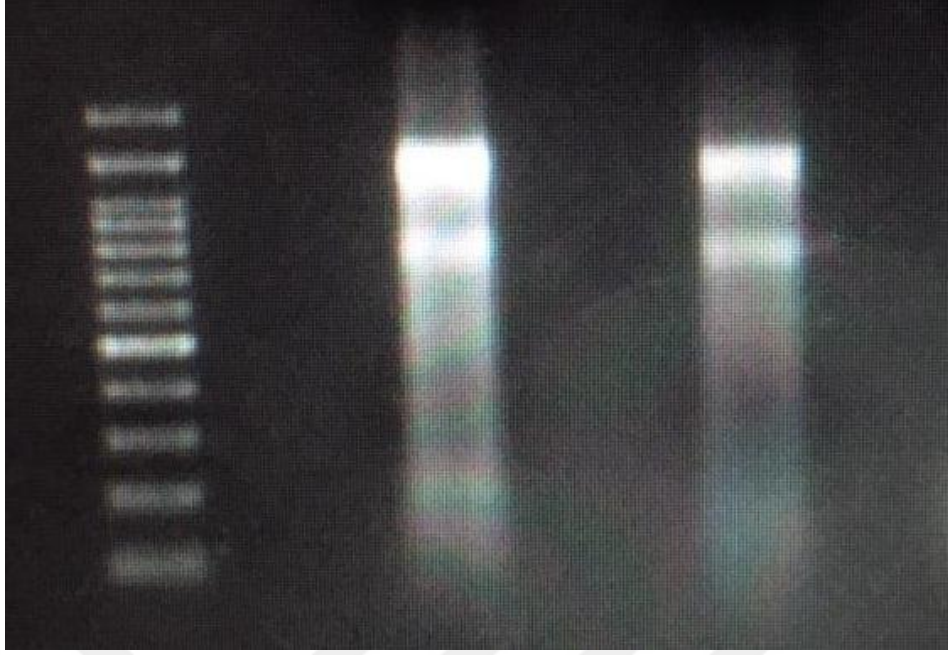
Şekil 3.2 A: Markör, B: 5' RACE Kontrol, C: 5' RACE GR PCR ürünü, D: 5' RACE GST PCR ürünü.



Şekil 3.3 A: Markör, B: 3' RACE GR PCR ürünü, C: 3' RACE GST PCR ürünü.

4.4. DNA İzolasyonu

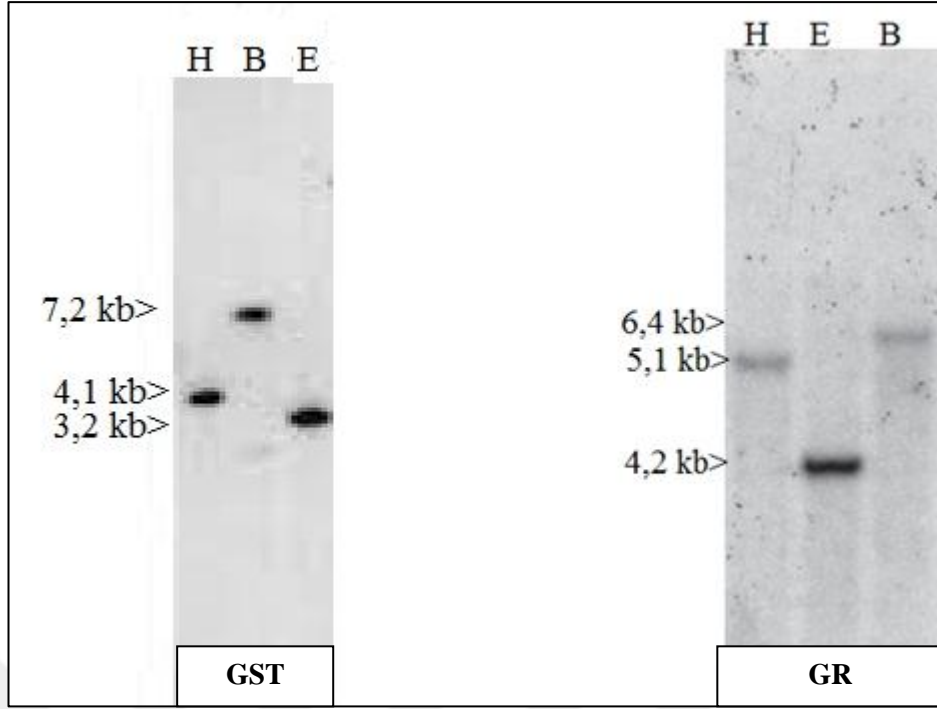
Genomik DNA'lar CTAB protokolü ile çileğin meyve kısmından izole edilmiştir. Elde edilen genomik DNA'lar 1500-100 bp DNA büyüklük markörü ile birlikte % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılarak görüntülenmiştir. DNA'ların 1200 bp uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.4). Ayrıca, nanodrop ile DNA'ların konsantrasyonu ve kalitesi tayin edilmiştir. Sırayla konsantrasyon; 65.5 ng/ μ L, ile 60.5 ng/ μ L ve 260/280 değeri ise sırasıyla 2.09, 2.03 olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.4 Çilek genomik DNA'ları

4.5. Southern Blot Analizi

Southern blot analizi DIG high prime DNA labeling and detection starter kit (Roche) kullanılarak yapılmıştır. Her iki gende üç farklı enzimle (EcoRI, BamHI ve HindIII)kesilmiş ve sonuç olarak hem GST genin hem de GR geninin tek kopyaya sahip genler oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6).



Şekil 3.5. GST ve GR genine ait southern blot görüntüsü (E=*EcoRI*, B=*BamHI* ve H=*HindIII*)

4.6. Sekans Analizleri

PCR ve RACE PCR sonucu elde edilen gen parçaları sekanslanmış ve elde edilen sekans sonuçları birleştirilip tam uzunlukta GR ve GST genleri elde edilmiştir. İzole edilen GR ve GST'ye ait nükleotid dizileri sırası ile çizelge 4.1 ve 4.2'de kodladıkları amino asit sekansları ise çizelge 4.3 ve 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. GR geninin tam nükleotid sekansı

CTTGTATTACTCCACCGAGATATCCGGATTATCAAGGTGGTTGGTTACTAAGCACCACCG
GGAACAGAGAGGGAAACTCTAATGAACCAAGCAATGGCTACTCCACTTTCTCTCTTTGT
TGTTCTGCGCCGCTAACTCGGAGCACTCTTTCTTACGAAAGGTTTCCATTTTTGCGCGCT
CCCTCTTAAACCTCTGGGCCTCTGGACCGAAACAGGAATTTTCGATGGCGACCCCGCTG
AGCCTGAGCTGTCCGCGCTGCAGCCCGACCCTGACCCGACCCAGCACGCCTGTATGACTT
TGACCTTTTTACCATCGGCGCGCAAACCGGACGTCCGTGGCTTTCCGTTTAGCCGCAGCTT
TCGGCTTCCCGTGCTGTCTGGCAGAGCACCTTTCTCCATCTCTCCTCCTGGTGGGACCGC
TGGTGTGCGCGGCATCTGTGTAATATGGAGGTGAATCCTAAAGTAATTGCTCGTCTATGC
CTCAAGGCCCTCTCATGGGTTTCAAGAGTCTCATGGCTTTGGATGGACATTTGGGACTGG
TCCGAAGCATGGCTGGAACACTCTCATAGCCAACAAAATACAGAGCTGCAGCGCCTAG
TTTGTATTTACAAGAATATTTTGAACAATGCTGGAGTCACTCTAATTGGACAACGTGGCA
AGATTGCAGGTGCTCACACAGTTCACGTTGTTGGGAAGCCATATTTTCGCGAAACACATTT
TAGTTTCAGCCGGAGGCCAACCCCTTCAATCCAAATATTCTGGACAGGAGTTGGGTATAA
CATCTGTTGGGGCAGCTTGATTTCCATCCAAGCCCCAGAAGATAGCTATTGTTGGTGGGG
GTTACACCTCCGTGGAGTTTGTGTCATCTTAATGGTTTGGGAAGGTGGAGTTCATGTAT
TTATGGACCGAAGAAAGGGTTCTGCGGGATTTTGAAGCGATTAGAGATTTTGTTCATA
TAATATGGCTCTGAGAGCCATTGAAAACGCCATTGAAAAGTCTCCTATAGCTATCACTAA
GGCAGCTGATGGTTTCGCTCTCGTTAAAACCAACAGGAGGGCCGATGAAGGTTTCTCTCA
TATCATGTTTGGCACTGGGCGGTGGCCTAATATCTATGGATTTGGGGGTGGAGTCGTTGG
TGTGAAAGTGGCTAAAGGATGGCCCAATAGAGGTTGGTGGTACTCTCAAACATCGGGTC
CTTCATTTGGGGCAATTGGAGATGCCTATATAAGAGTAAATCTCCGGGCCAAATGCTTTG
ATGGAGGGAGTGGCATTAGCAAAAACCTTTGGGGCAGAATGGGGCAGAAAACCTGGTTA
TGGGGCCAGACCTTCTGGCGGGTTTTCCCAACCAACTGGAGGAGTTGGTCTTACAG
AGGAGCAGGGTGTGGACAATTGGGTGGGATTGACGTTCCACAGCAATTGGGAGGCCG
ATGGACCGCACACTCTCTGGGCCTGCAGACCGGGCCCTTATGAACTATTGGGTCTGCA
GAAACAAATGTTGTTGGTGGATTGCACATGTGTGGGCGAAGATGCGCGGAAATTGCGC
AGGGCTTTGCGGTGGGCATTAAGCGGGCCTGACCAAAGCGGATTTTGTATGCGACCGT
GGCATTCAACCGCGCTGAGGAATTTGTTACCATGAGGAAACCCAGAGGAAGGTT
CGGAAAGAACCAAGCTTACCAGCGAAGTCAAGTCTATAGCAAAGGTTGTGGCGAATT
ATTATAAGAACCAGGTTTGAAGGCGAAACCAGACCCTAAGGCAAAGCCGCGGCCGGA
CCTTGGGAGGATTAACCCGCTTCAATTATGATAGCCAAAGAAACTTGCAGGAGCCTTAAG
GCCGTTATTGAGGGTTCAGTGATCTCTGTCAACGGAGCCTTGAAGACAATCCATGAA
ATAGCCTGCAGAGGGCATCTGGGAAACCGGAGCAGGGAAATTTGGCGAGCCATTATGGG
CAATTTGGAAAAGATTTCTCACCTTTGGGACCAATTTATTTGGCACCCCTAACCTTACCCAT
TTGTACAAATGAAGAGGAAAGTTTCGCGAGGCACGGGGAGGTTAAGTAAAATAAAAAAA

Çizelge 4.2. GST geninin tam nükleotid sekansı

AGAAGATTATGGCGATCAAAGTCCATGGTAGCCCATGTCAATTTTCATCGACAAGAAGATGTCAAACG
CAAGCTCCCAAGCAGCTACCAACCAGCCGGGAGAGGGAGCGCACGCACACGACAATGGCCACAGAGGA
AGGTGTATGCGACCATCTAAGGGTGAGGAACAAGAGACCAGCACCAGTATGAACTGCGGACACAGGG
GGCCGACAGCTCAAGGGTATGCGGAGACACTAAACCCCTTCGGTCTGGTTGAGCCAAAACCAAAGCGC
ACTTTTCTCTACTCTCAACCCATTTGGTTAAGTCGTTCCGGTCTTTAAGATGGAGATCTCAAACCTT
TTCGAACCAAAGCGATCACGCGATACCTAGCCGAGCAATACAAAGACGTTGGAACAAATCTATTACC
AGATTATCCTTATTACAGAGCTCAAGCTTGATTCTGGGCTTATTTTGTGTTGTTAGAAGGTGCACGGCA
TGATGCGGCAAGTGGGGTGTGGACAAAGAAAGGGGAAGAGCTTGAGACAGCAAAGAAGGACTTCATA
GCTGTCTTGAAGCAGCTGCAATCAAGGGGCTGGAGTACGAGAACGTTGGAGGAGGACCTCACCAACAAG
AGCGACCTGCTCCTCGCCTCAACGCGCCCTCCACAAGCTCGTTCCCGTCTCGGAGGCTCCACGGCG
ACAAGCCCATCTCCGAGTCACTCGTCATCGTGGAGTACCTCGACGACGCTTCCCCGGCGTGGCCACG
TGCGCGGAGAAATTATGGCGATCAAAGTAGCCATGGTAGCCATCCATGTCACGCATTTTCATCGACAAG
TTGGCCAAGATGTCAAACGCAAGCTCCCAAGCAGCTACCAACCAGCCGGGAGAGGGAGCGCACGCACA
CGAGGCACAGAGGAAGGTGTATGCGACCAAGGGTGAGGAACAAGACATGGACACCACAGTATGTTCCG
CTGACAAGGGGGCCGAGCAAAAATGGTATGTTGCCGGAGCCCGGGTACCAA

Çizelge 4.3. GR genine ait amino asit sekansı

10	20	30	40	50	60
MNQAMATPLS	LSCCSAPLTR	STLFFTKGFH	FSRSLSKPLG	LWTETRNFDG	DPAEPELSAL
70	80	90	100	110	120
QPDPTQHA	CMTLTLFLPSA	RKPDVRGFPF	SRSFRLPVLS	GRAPFLHLSS	WDRWCARHL
130	140	150	160	170	180
CNMEVNPKEI	ARLCLKALSW	VRRVSWLWMD	IWDWSEAWLE	HSHSQQKYRA	AAPSLYLQEY
190	200	210	220	230	240
FEQCWSHSNW	TTWQDCRCSH	SSRCWEAIFR	ETHFSFSRRP	TLHSKYSWTG	VGYNICWGS
250	260	270	280	290	300
ISIQAPEDSY	CWWGLHLRGV	CWHLNGLGRW	SSCIYGPKKG	FLRDFAIRD	FVAYNMALRA
310	320	330	340	350	360
IENAIEKSPI	AITKAADGSL	SLKTNRRAD	GFHIMFATG	RWPNIYGFGG	GVVGVKVAKG
370	380	390	400	410	420
WPNRGWWSQ	TSGPSFGAIG	DAYIRVNLRA	KCFDGGSGIS	KNFGAEWATK	TWLWGQTFWR
430	440	450	460	470	480
VFPNHQLEEL	VLQRSRVLDN	WVGLTFPQQ	GGRWTAHSLG	LQTGPLMNYW	VLQKQMLLVD
490	500	510	520	530	540
CTCVGEDAAE	IAQGFVAVGIK	AGLTKADFDA	TVGIHPTAAE	EFVTMRKPRG	RFKGNQASPA
550					
KSDSIKGVV	NYKYNQV				

Çizelge 4.4. GST genine ait amino asit sekansı

10	20	30	40	50	60
MSNASSQAAT	NQPGEGAHAA	DNGHRGRCMR	PSKGEEQETD	HQYELRTQGA	AAQGYAETLN
70	80	90	100	110	120
PSVWLSPPKPK	AHFSLYSQPI	WLSRSGSLRW	RSQTFRTKGD	HAIPSRAIQR	RWNKSITRLS
130	140	150	160	170	180
LLQSSSLILG	LFCLLEGARH	DAASGVWTKK	GEELETAKKD	FIAVLKQLQS	RGWSTRTRWR
190	200	210	220	230	240
TSPTRATCSS	PPTRPSTSSF	PSSEAPRQA	HLRVTRHRGV	PRRRLPRRWP	RARRNYGDQS
250	260	270	280		
SHGSHPCFAF	HRQVGQDVKR	KLPSSYQPA	RGSARTRGTE	EGVCDQG	

Sekans sonuçlarına göre GR ve GST genleri sırayla 2091 ve 1007 baz çiftlerinden oluştuğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Kabarla meyvesinden izole edilen GR ve GST genlerinin toplam nükleotid, 5' kodlamayan, 3' kodlamayan nükleotid sayıları ve genlerin ORF bölgelerindeki amino asit sayıları

Gen	Nükleotid (baz)	Amino asit	5' kodlamayan	3' kodlamayan
GR	2091	557	81	336
GST	1007	287	57	87

GR geni 557 amino asitlik bir proteini kodlayan bir ORF'den [open reading frame (açık okuma çerçevesi)] oluştuğu belirlenmiştir. Genin 5' kodlamayan bölgesinin 81 ve 3' kodlamayan kısmının ise 336 nükleotidden meydana geldiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). GR geni yaklaşık 63.203 kDa molekül ağırlığa ve 9.26 pI değerine sahiptir. Ayrıca, 44 adet negatif ve 62 adet pozitif amino asitten oluşmaktadır. GR genine ait amino asit içeriği Çizelge 4.6'da verilmiştir. GST geni 287 amino asitlik bir proteini kodlayan ORF'den oluştuğu ortaya konulmuştur. Bu genin 5' kodlamayan ve 3' kodlamayan bölgelerinin sırasıyla 57 ve 87 nükleotidden meydana geldiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). GST geni yaklaşık 32.242 kDa molekül ağırlığa ve 11.28 pI değerine sahiptir. GST genine ait amino asit içeriği çizelge 4.7' de verilmiştir.

Çizelge 4.6 GR genine ait amino asit içeriği

Amino asidin adı	Yüzde içeriği
Alanin	8.4
Arginin	6.6
Asparagin	3.6
Aspartat	3.9
Sistein	3.1
Glutamin	3.8
Glutamat	3.9
Glisin	8.1
Histidin	2.9
İzolösin	3.8
Lösin	8.6
Lisin	4.5

Çizelge 4.6 GR genine ait amino asit içeriği (devam)

Metionin	1.8
Fenilalanin	5.4
Prolin	5.0
Serin	8.6
Trionin	5.2
Triptofan	5.6
Tirosin	2.5
Valin	4.7

Çizelge 4.7 GST genine ait amino asit içeriği

Amino asidin adı	Yüzde içeriği
Alanin	8.4
Arginin	12.9
Asparagin	2.1
Aspartat	2.8
Sistein	1.7
Glutamin	6.3
Glutamat	4.5
Glisin	8.0
Histidin	4.5
İzolösin	2.1
Lösin	7.0
Lisin	4.2
Metionin	0.7
Fenilalanin	2.1
Prolin	6.6
Serin	12.2
Trionin	6.6
Triptofan	2.8
Tirosin	1.7
Valin	2.8

Yapılan BLAST analizine göre Kabarla'dan izole edilen GR ve GST genleri, daha önce diğer türlerden elde edilen GR ve GST genlerinin sekansları ile hem nükleotid hem de amino asit sekansları bakımından önemli derecede benzerlikler göstermişlerdir. GR geni nükleotid sekansı bakımından % 81 *Pisum sativum*, % 75 *Medicago truncatula* ve % 75 *Cicer arietinum*; amino asit sekansı bakımından ise % 59 *Citrus clemential*, % 58 *Capsium annuum* ve % 56 *Erythranthe guttata* ile benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.8). GST geni nükleotid sekansı bakımından % 96 *Arabidopsis thaliana*, % 95 *Zea mays* ve % 93 *Prosopis juliflora*; amino asit sekansı bakımından % 75 *Arabidopsis thaliana*, % 70 *Eutrema salsugineum* ve % 67 *Brassica rapa* ile benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.8 Kabarla'dan elde edilen GR genleri ile diğer türlerden izole edilen GR genlerinin nükleotid ve amino asit sekanslarının karşılaştırılması

Gen	Benzerlik (%)
Nükleotid	
<i>Pisum sativum</i> mRNA	81
<i>Medicago truncatula</i> chloroplastic/mitochondrial (LOC25484346) mRNA	75
<i>Cicer arietinum</i> chloroplastic/mitochondrial (LOC101514119) transcript variant X3 mRNA	75
<i>Cicer arietinum</i> chloroplastic/mitochondrial (LOC101514119) transcript variant X2 mRNA	75
<i>Cicer arietinum</i> chloroplastic/mitochondrial (LOC101514119) transcript variant X2 mRNA	75
Amino asit	
<i>Citrus clemential</i> hypothetical protein cicle_v10019567mg	59
<i>Capsium annuum</i> chloroplastic	58
<i>Erythranthe guttata</i> chloroplastic	56

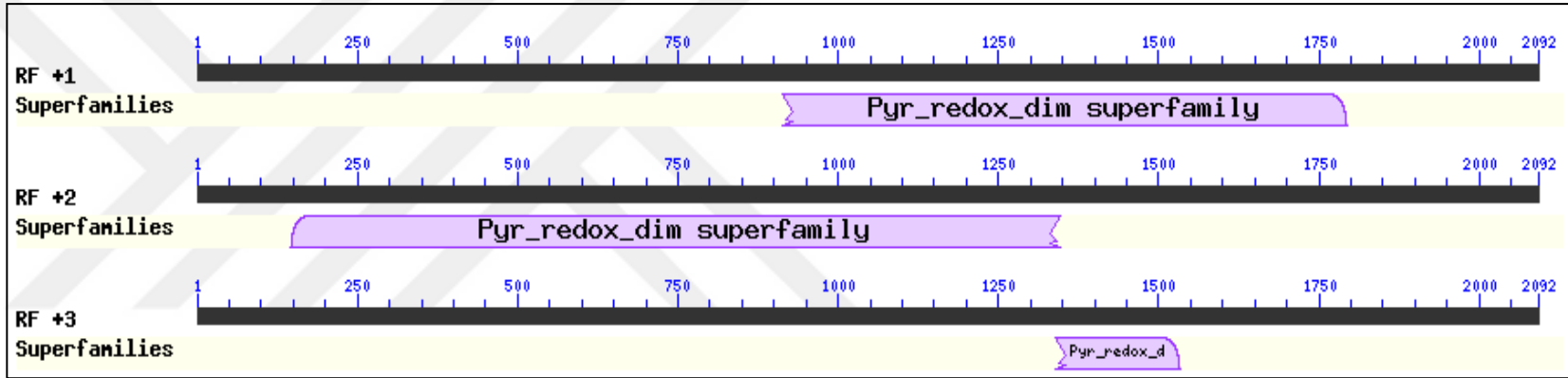
Çizelge 4.9 Kabarlar'dan elde edilen GST genleri ile diğer türlerden izole edilen GST genlerinin nükleotid ve amino asit sekanslarının karşılaştırılması

Gen	Benzerlik (%)
Nükleotid	
<i>Arabidopsis thaliana</i> glutathione s-transferase (class phi) 14 (GSTF14), mRNA	96
<i>Zea mays</i> clone 381987 glutathione S-transferase GSTU6 mRNA, complete cds	95
<i>Zea mays</i> full-length cDNA clone ZM_BFc0067E20 mRNA, complete cds	95
<i>Zea mays</i> PCO061770 mRNA sequence	95
<i>Zea mays</i> glutathione transferase27 (pco061770a), mRNA	95
<i>Prosopis juliflora</i> isolate pj 296 auxin-induced glutathione S transferase mRNA, complete cds	93
Amino asit	
<i>Arabidopsis thaliana</i> glutathione S-transferase (class phi) 14	75
<i>Arabidopsis thaliana</i> GSTF14	75
<i>Eutrema salsugineum</i> glutathione S-transferase F14	70
<i>Brassica rapa</i> unnamed protein product	67

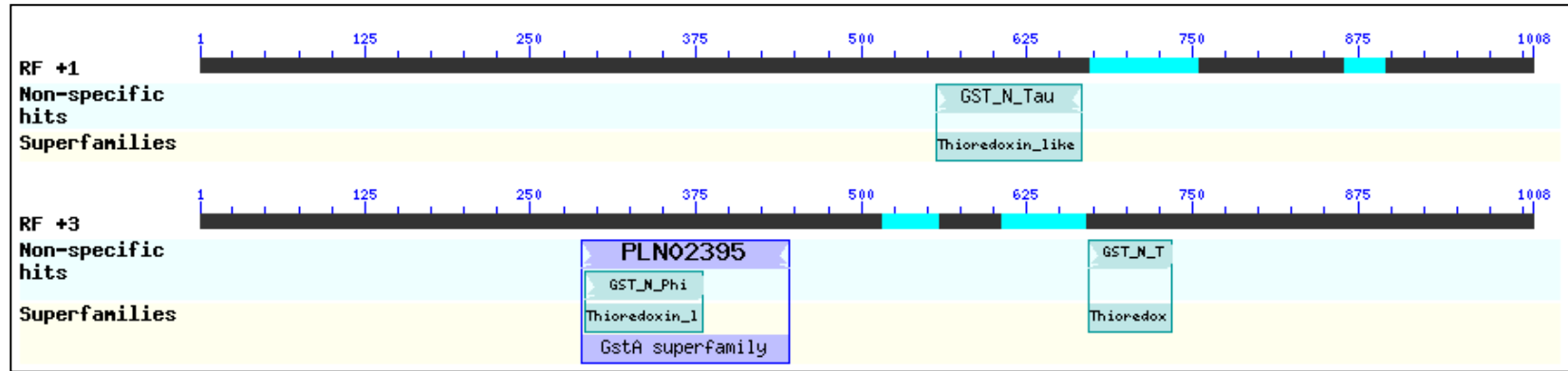
Korunmuş domeyn analizine göre GR proteininde üç farklı okuma çerçevesinde pridin nükleotid-disülfid oksidoredüktaz, dimerizasyon domeyni mevcut olduğu bulunmuştur (Şekil 4.1). Bu gen ailesi sınıf I, sınıf II oksidoredüktazlar ile NADH oksidazlar ve peroksidazları içerir. GST'nin korunmuş domeyn analizinde spesifik olmayan isabetlere göre iki farklı okuma çerçevesinde sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre iki okuma çerçevesinde de tioredoksin domeyni saptanmıştır (Şekil 4.2). Tioredoksin domeyni, protein disülfür oksidoredüktazlar ve tioredoksin katlamalı proteinleri içerir. Bu süper ailenin birçok üyesi redoks aktif CXXC motifine sahip klasik bir TRX (tioredoksin) katlama alanı içerir. Aynı zamanda belirlenen GST tau domeyni ve GST phi domeyni tioredoksin süper ailesinin birer üyeleridir. Ayrıca Kabarlar'dan izole edilen glutatyon reduktaz ve glutatyon s-transferaz genlerinin diğer türlerden izole edilen GR ve GST ile oluşturdukları filogenetik ağaç şekil 4.3 ve şekil 4.4 'de verilmiştir.

Kabarla'dan izole edilen GR geni veri tabanında bulunan yaklaşık 100 farklı GR proteini ile karşılaştırılmış ve %40-59 benzerlik oranı saptanmıştır. Dizi hizalamasında GR protein dizisine en çok benzeyen 11 farklı protein dizisi kullanılmıştır. Karşılaştırmada kullanılan proteinlerin farklı bitki türlerine ait olmasına dikkat edilmiştir. Kabarla GR protein dizisi ile en yüksek benzerlik gösteren tür *Pisum sativum*'dur. Tam uzunlukta amino asit sekanslarına bakıldığında *Oryza sativa*, *Panicum hallii*, *Arachis ipaensis*, *Medicago truncatula* benzerlik gösteren türlerdir. *Eleusine coracana*, *Triforium repens*, *Brassica oleraceae*, *Setaria talica* daha az benzerliğe sahipken en az *Glycine max* ile benzerlik bulunmaktadır (Şekil 4.3).

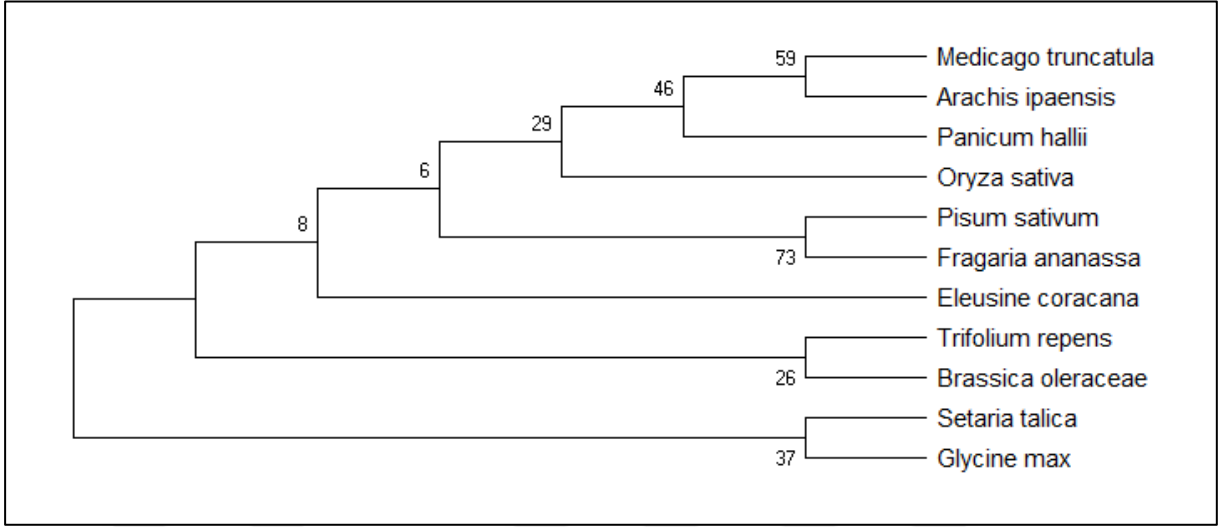
Kabarla'dan izole edilen GST geninin filogenetik ağacını oluşturmak amacıyla yine aynı şekilde yaklaşık 100 farklı GST geni gen bankasının veri tabanında karşılaştırılmış ve %34-75 benzerlik oranları saptanmıştır. Dizi hizalamasında GST protein dizisine en çok benzeyen 9 farklı protein dizisi kullanılmıştır. Bunun için farklı bitki türlerine ait proteinler olmasına dikkat edilmiştir. Kabarla GST protein dizisi ile en yüksek benzerlik gösteren tür *Sorghum bicolor* olmuştur. Tam uzunlukta amino asit sekanslarına bakıldığında *Aegilops tauschii*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* benzerlik gösteren türlerdir. Daha az benzerliğe sahip türler *Brascisca rapa*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* olarak belirlenmiştir. En düşük benzerlik oranı ise *Triticum aestivum* türüne ait GST proteini ile olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).



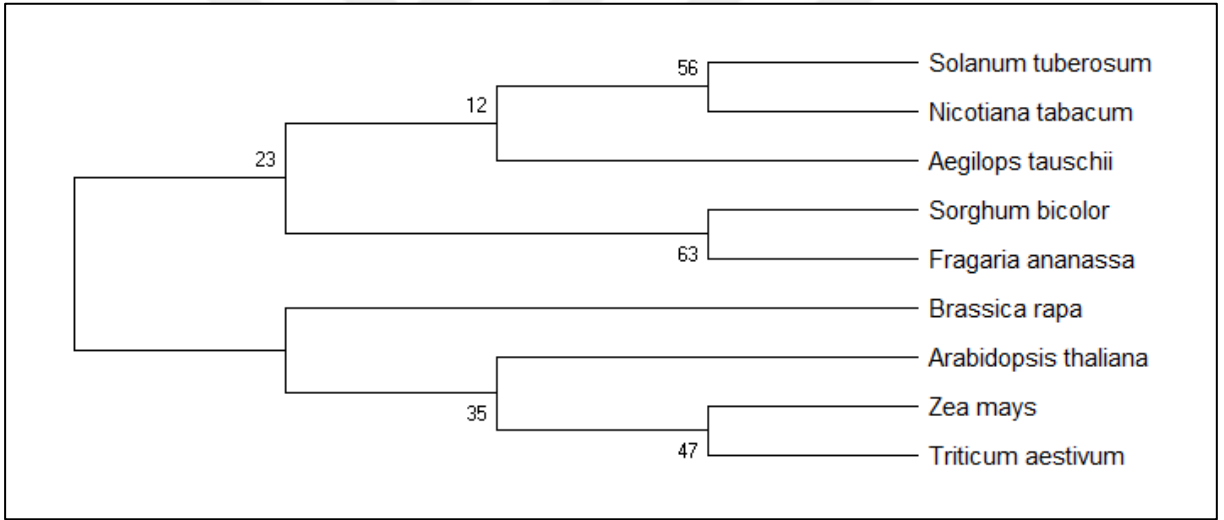
Şekil 4.1 GR proteinin domeyn organizasyonu



Şekil 4.2 GST proteinin domeyn organizasyonu



Şekil 4.3 Kabarla'dan izole edilen GR geninin filogenetik ağacı



Şekil 4.4 Kabarla'dan izole edilen GST geninin filogenetik ağacı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Oksidatif hasarı engellemek için ökaryotik hücrelerin farklı organellerine dağılmış çeşitli antioksidan ajanlar bulunmaktadır. Birçok organizmada bulunan glutatyon reduktaz ve glutatyon s-transferaz, organizmaları çeşitli streslerden koruyan ve hücre içi reaktif oksijen türlerini dengeleyen antioksidan enzimlerden sadece ikisidir. Glutatyon reduktaz hücre içi redoksu dengelemektedir. Bunun için glutatyon disülfitin indirgenmesini katalize eder. Ayrıca askorbat-glutatyon döngüsünde rol oynamaktadır. Glutatyon s-transferaz ise ksenobiyotikleri glutatyona bağlayarak hücreden uzaklaştıran detoksifikasyon enzimleridir (Foyer ve Halliwell, 1978; Dixon vd., 2002; Yu vd., 2013). Glutatyon s-transferaz, glutatyon reduktaz ile birlikte kloroplastlarda bulunan reaktif oksijen türlerini yok etmek için çalışmaktadırlar. Bu çalışmada Kabarla'dan glutatyon reduktaz ve glutatyon s-transferaz genlerinin izole edilmesi ve karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

Bitkilerde glutatyon s-transferazlar, sekonder metabolitlerin sentezi, hormon homeostasi, patojenlerden korunma ve zararlı bileşiklerden kaynaklanan hasarın önlenmesi ve detoksifikasyonunu sağladığı bilinmektedir. Yapılan araştırmalara göre 20 farklı bitki türünden 1107 GST protein sekansı analiz edilmiştir (Monticolo vd., 2017). Daha önce çilekte GST genine ait çalışma yapılmadığından bu çalışmalara bir yenisini eklemek için çilekten GST nükleotid ve protein sekans analizleri yapılmıştır.

Gossypium raimondii ve *Gossypium arboreum*'dan sırası ile 59 ve 49 GST geni izole edilmiştir. *G. Raimondii*'den izole edilen 59 genin moleküler ağırlığı 22.25 kDa ile 47.69 kDa arasında değişirken, *G. Arboreum*'dan izole edilen 49 genin moleküler ağırlığı 15.40 kDa ile 47.65 kDa arasında değiştiği bildirilmiştir (Dong vd., 2016). Kabarla'dan izole edilen GST genine ait özelliklere bakıldığında sekans analizlerine göre 1007 baz çifti içerdiği tespit edilmiştir. Bu gene ait açık okuma çerçevesi (ORF) 287 amino asit kodladığı ve genin yaklaşık moleküler ağırlığının 32.242 kDa olduğu bulunmuştur.

Başka bir çalışmada mangodan izole edilen GST geninin 690 baz çiftinden oluştuğu, ORF'nin 229 amino asidi kodladığı ve moleküler ağırlığının 25.5 kDa olduğu belirtilmiştir (Valenzuela-Chavira, 2017).

Bitkilerde bilinen on sınıf GST geni bulunmaktadır, fakat en yaygın bulunanı phi ve tau sınıfı olduğu bildirilmiştir (Nutricati vd., 2006). *Gossypium raimondii*'den 59 GST geni izole edilmiş ve en çok tau sınıfına ait GST geni (38) izole edilmiş ve onu Phi sınıfının (6) takip ettiği bildirilmiştir. Aynı şekilde, *Gossypium arboreum*'dan izole edilen 49 GST geninden 29'u tau sınıfına aitken, 6 tanesi phi sınıfına ait olduğu bulunmuştur (Dong vd., 2016). Domateste yapılan bir çalışmada izole edilen 90 GST geni on sınıfa ayrıldığında en çok tau sınıfına ait (57) gen tespit edilmiş ve bunu phi sınıfı (6) takip etmiştir (Islam vd., 2017). Kabarla'dan izole edilen GST genine ait korunmuş domeyn analizine göre tau ve phi sınıfına ait domeynlerin bulunduğu tespit edilmiştir.

Oksidatif stres ile savaşmak için hücreler sitozol, mitokondri ve kloroplastlar arasında dağılmış sayısız antioksidan faktörlerle birlikte evrimleştiği ve indirgenmiş glutasyonu katalizleyen glutasyon reduktaz da bu faktörlerden biri olduğu bildirilmiştir (Outten ve Culotta 2004; Yu vd., 2013). *Arabidopsis thaliana*'da reaktif oksijen türlerinin kontrol edilmesini sağlayan 152 gen tespit edilmiştir. *Arabidopsis* genomunda GR kodlayan iki gen tespit edilmiştir. Bir çalışmada izole edilen GR (*At3g54660*) geninin nükleotid uzunluğu 1698 bp olduğu ve 565 amino asidi kodladığı bulunmuştur (Mittler vd., 2004; Marchler-Baver vd., 2009; Yu vd., 2013). Başka bir çalışmada bürülceden izole edilen GR geninin 1734 bp uzunluğunda olduğu ve 500 amino asidi kodladığı bildirilmiş, moleküler ağırlığının ise 53.6 kDa olduğu bulunmuştur (Countour-Ansel vd., 2006). Bu çalışmada GR geninin 2091 baz çiftinden oluştuğu ve bu gene ait açık okuma çerçevesinin (ORF) 557 amino asidi kodladığı tespit edilmiştir. Genin yaklaşık moleküler ağırlığının 63.203 kDa olduğu bulunmuştur.

Çeltik ve Arabidopsisten izole edilen GR genleri karşılaştırılmış ve korunmuş pridin nükleotid disülfid oksidoredüktazlar sınıf I domeyni tespit edilmiştir (Trivedi vd., 2013).

Kabarla'dan izole edilen GR geninin korunmuş domeyn analizinde üç farklı okuma çerçevesinde pridin nükleotid-disülfid oksidoredüktaz, dimerizasyon domeyni mevcut olduğu bulunmuştur.

Bir çok bitkide çeşitli antioksidan enzimleri izole edilsede çok azında GST ve GR genlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Yapılan araştırmalar gösteriyorki bu iki gen de bitkilerin yaşlanmasında, abiyotik ve biyotik streslerle başa çıkmasında, diğer enzimler ile birlikte çalışarak karmaşık reaksiyonları gerçekleştirmede oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında da Kabarla çilek çeşidinden izole edilen ve moleküler olarak karakterize edilen GST ve GR genleri bundan sonra diğer türlerde bu genlerin izole edilmesi ve karakterizasyonunda kullanılabilineceği gibi, değişik streslere karşı yüksek tolerans özelliğine sahip olan yeni çilek çeşitlerin geliştirilmesine de önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Anonim, (2019).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=198296> (Son erişim tarihi 15.04.2019)
- Aybak, H. Ç. (2005). *Çilek yetiştiriciliği*. İstanbul, Hasad Yayıncılık.
- Aztekin, F. & Kasım, R. (2016). *Ultraviyole Işık ve Çevresel Stres Şaertlarında Meyve ve Sebzelerde Antosiyaninlerin Oluşumu ve Değişimi*. VII. Bahçe Ürünlerinde Muhafaza ve Pazarlama Sempozyumu, 4-7 Ekim. Eğirdir.
- Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Mata-Pérez, C., Valderrama, R., Padilla M. N., López-Jaramillo, J., Luque, F., Corpas, F. J. & Barrosa, J. B. (2015). Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *Experimental Botany*, 66(19), 5983-5996. <https://doi/10.1093/jxb/erv306>
- Berk, S. (2013). Bolu (Mudurnu) Ekolojik koşullarında organik olarak yetiştirilen bazı çilek çeşitlerinin verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 6(1), 68-72.
- Chen, I. H., Chiu, M. H., Cheng, S. F., Hsu, Y. H. & Tsai, C. H. (2013). The Glutathione Transferase of *Nicotiana benthamiana* NbGSTU4 Plays a Role in Regulating the Early Replication of *Bamboo mosaic virüs*. *New Phytology*, 199, 749-757. <https://doi/10.1111/nph.12304>
- Contour-Ansel, D. Torres-Franklin, M. L., Carvalho, M. H. C., D'arcy-Lameta, A. & Zuily-Fodil, Y. (2006). Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment. *Annals of Botany*, 98, 1279-1287. <https://doi/10.1093/aob/mcl217>
- Creissen, G. & Mullineaux, P. M. (1995). Cloning and characterisation of glutathione reductase cdnas and identification of two genes encoding the tobacco enzyme. *Planta*, 197, 422-425.
- Cummins, I., Wortley, D. J., Sabbadin, F., He, Z., Coxon, C. R., Straker, H. E., Sellars, J. D., Knight, K., Edwards, L., Hughes, D., Kaundun, S. S., Hutching, S. J., Steel, P. G. & Edwards, R. (2013). Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proceeding of The National Academy of Sciences of The United States America*, 110(15), 5812-5817. <https://doi/10.1073/pnas.1221179110>
- Dietz, K. J. (2011). Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(4), 1129-1159. <https://doi/10.1089/ars.2010.3657>.
- Ding, S., Wang, L., Yang, Z., Lu, Q., Wen, X. & Lu, C. (2015). Decreased glutathione reductase2 leads to early leaf senescence in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58, 29-47. <https://doi/10.1111/jipb.12371>

- Ding, N., Wang, A., Zhang, X., Wu, Y., Wang, R., Cui, H., Huang, H. & Luo, Y. (2017). Identification and analysis of glutathione s-transferase gene family in sweet potato reveal divergent GST-mediated networks in aboveground and underground tissues in response to abiotic stresses. *BMC Plant Biology*, 17(225), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1179-z>.
- Dixit, P., Mukherjee, P. K., Rmachandra, V. & Eapen, S. (2011). Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plos One*, 6(1), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016360>
- Dixon, D. P., Laphorn, A. & Edward, R. (2002). Plant glutathione transferase. *Genome Biology*, 3(3), 1-10. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-3-reviews3004>.
- Edwards, E. A., Rawstrone, S. & Mullineaux, P. M. (1990). Subcelular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180, 278-284. <https://doi.org/10.1007/BF00194008>
- Erenel, G., Erbař, D. & Arıcioğlu, A. (1992). Serbest radikaller ve antioksidan sistemleri. *Gazi Tıp Dergisi*, 3, 243-250.
- Ergin, S. (2012). *Yüksek Sıcaklık Stresinin Çilek Bitkisinde Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar ile Protein Metabolizmasına Etkileri*. (Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Foyer, C. H. & Halliwell, B. (1978). Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *An International Journal of Plant Biology*, 139(1), 9-17. <https://doi.org/10.1007/BF00390803>
- Foyer, C. H. & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133, 21-25. <https://doi.org/10.1007/BF00386001>
- Foyer, C. H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K. J., Pruvost, C. & Jounanin, L. (1995). Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiology*, 109, 1047-1057. <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.1047>
- Gündüz, K. & Özdemir, E. (2012). Çileklerde meyve kalite özellikleri arasındaki ilişkiler. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(1), 9-14.
- Gronwald, J. W. & Plaisence, K. L., (1998). Isolation and characterization of glutathione s-transferase isozymes from sorghum. *Plant Physiology*, 117, 877-892. <https://doi.org/10.1104/pp.117.3.877>

- Islam, S., Rahman, I. A., Islam, T. & Ghosh, A. (2017). Genome-wide identification and expression analysis of glutathione s-transferase gene family in tomato: gaining an insight to their physiological and stress-specific roles. *Plos One*, 12(11), 1-28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187504>
- Karpinski, S., Wingles, G., Karpinska, B. & Hallgren, J. E. (1993). Molecular responses to photooxidative stress in *Pinus sylvestris*. II. Differential expression of CuZn-superoxide dismutases and glutathione reductase. *Plant Physiology*, 103, 1385-1391. <https://doi.org/10.1104/pp.103.4.1385>
- Keser, S. (2012). *Civanperçemi (Achillea millefolium), Alıç (Crataegus monogyna) ve Böğürtlen (Rubus discolor)'den Toplam Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Oksidatif Stres Oluşturulmuş Ratlarda Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi*. (Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Koca, N. & Karadeniz, F. (2005). Gıdalardaki doğal antioksidanlar. *Gıda Dergisi*, 30(4), 229-236.
- Liu, Y. J., Han, X. M., Ren, L. L., Yang, H. L. & Zeng, Q. Y. (2009). Functional divergence of the glutathione s-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plant. *Plant Physiology*, 161, 773-786. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205815>
- Lou, H., Dai, C., Li, Y., Feng, J., Liu, Z. & Kang, Z. (2017). Reduced anthocyanins in petioles codes for a GST anthocyanin transporter that is essential for the foliage and fruit coloration in strawberry. *Experimental Botany*, 69(10), 2595-2608. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery096>
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczyvki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang, N. & Bryant, S. H. (2009). CDD: Specific functional annotation with the conserved domain database. *Nucleic Acid Research*, 37, D205-D210. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn845>
- Marty, L., Siala, W., Schwarzländer, M., Fricker, M. D., Wirtz, M., Seweetlove, L., Meyer, Y., Meyer, A. J., Reicheld, J. P. & Hell, R. (2009). The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in Arabidopsis. *Proceeding of The National Academy of Sciences of The United States America*, 106(2), 9109-9114. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900206106>
- McGonigle, B., Keeler, S. J., Lau, S. M. C., Koeppe, M. K. & O'Keefe, D. P. (2000). A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione s-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiology*, 124, 1105-1120. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1105>

- Menevşeoğlu, A. (2012). *Çilek Suyu Konsantresi Üretim Aşamalarında ve Depolama Sürecinde Profenoller, Askorbik Asit ve Antioksidan Aktivitedeki Değişimler*. (Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Breusegem, F. V. (2004). Reactive oxygen gene network of plant. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Mohammadi, S., Pourmohammad, A., Esfandiari, E. & Mousavi, S. B. (2016). Effect of cadmium on grown and some parameters of oxidative stress in seedling stage of two durum wheat (*Triticum durum*) genotypes. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 26(4), 594-602
- Monticolo, F., Colantuono, C. & Chiusano, M. L. (2017). Shaping the evolutionary tree of green plants: evidence from the GST family. *Scientific Reports*, 7, 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14316-w>
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Foyer, C., H., 2011. Glutathione, *The Arabidopsis Book*, (pp. 1-32)
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G. & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, 35, 454-484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
- Nutricati, E., Miceli, A., Blando, F. & De Bellis, L. (2006). Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione s-transferases. *Plant Cell Reports*, 25(9), 997-1005. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0146-1>
- Outten, C. E. & Culotta, V. C. (2004). Alternative start site in the *S. cerevisiae* *GLR1* gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoform of glutathione reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 1-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312421200>
- Özbahçalı, G. (2014). *Bazı Çilek Çeşitleri (Fragaria x ananassa Duch.)'nin Erzurum Ekolojisindeki Performanslarının Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Özbay, H. (2016). *Çileklerde Çeşit ve Lokasyon Etkileşiminin Verim ve Bazı Meyve Kalite Özellikleri Üzerine Etkileri*. (Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Ramolho, J. C., Rodrigues, A. P., Lidon, F. C., Marques, L. M. C., Letiã, A. E., Fortunato, A. S., Pais, I. P., Silva, M. J., Campos, P. C., Lopes, A., Reboredo, F. H. & Rebeiro- Barros, A. I. (2018). Stress cross-response of the antioxidative system promoted by superimposed drought and cold conditions in *Coffea* spp. *Plos One*, 13(6), 1-30. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198694>

- Sharma, R., Sahoo, A., Devendran, R. & Jain, M. (2014). Over-expression of a rice tau class glutathione s-transferase gene improves tolerance to salinity and oxidative stresses in Arabidopsis. *Plos One*, 9(3), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092900>
- Shen, B., Jensen, R. G. & Bohnert, H. J. (1997). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology*, 113, 1177-1183.
- Sherratt, P. J. & Hayes, J. D. (2001). Glutathione s-transferases. *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*, (pp. 319-352)
- Shi, H. Y., Li, Z. H., Zhang, Y. X., Chen, L., Xiang, D. Y. & Zhang, Y. F. (2014). Two pear glutathione s-transferases genes are regulated during fruit development and involved in response to salicylic acid, auxin, and glucose signaling. *Plos One*, 9(2), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089926>
- Strommer, J., Gregerson, R., Vayda, M. (1993). Isolation and characterization of plant mRNA. In *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* (pp. 49-65), CRC Press.
- Sytykiewicz, H. (2016). Expression patterns of genes involved in ascorbate-glutathione cycle in aphid-infested maize (*Zea mays* L.) seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(268), 1-30. <https://doi.org/10.3390/ijms17030268>
- Şenses, S. V., Özyazgan, S. & Akkan, A. G. (1999). Serbest oksijen radikalleri-I: Vücuttaki antioksidan sistemleri. *Türk Aile Hekimi Dergisi*, 3(1-2), 5-11.
- Tarrío, N., García-Leiro, A., Cerdán, M. E. & González- Siso, M. I. (2008). The role of glutathione reductase in the interplay between oxidative stress response and turnover of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces lactis*. *Federation of European Microbiological Societies*, 8(4), 597-606. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00366.x>
- Taşgın, E., Nadaroğlu, H., Adıgüzel, A., Baltacı, M. Ö. & Sönmez, Z. (2017). Soya bitkisindeki glutatyon redüktaz aktivitesi ve mRNA seviyesinin kuraklık stresinde salisilik asit ile değişimleri. *Akademik Platform Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 5(2), 48-52. <https://doi.org/10.21541/apjes.290973>
- Tekman, B. (2007). *Gökkuşağı Alabalık (Oncorhynchus mykiss) Karaciğer Dokusundan Glutatyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Metallerin Enzim Üzerine İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Tosun, İ. & Yüksel, S. (2003). Üzümsü meyvelerin antioksidan kapasitesi. *Gıda Dergisi*, 28(3), 305-311.

- Trivedi, D. K., Gill, S. S., Yadav, S. & Tuteja, N. (2013). Genome-wide analysis of glutathione reductase (GR) genes from *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior*, 8(2), 1-7 <https://doi.org/10.4161/psb.23021>
- Turhan, E. (2002). *Farklı Ortamlarda Yetiştirilen Çileklerin Tuza Dayanıklılık Fizyolojisi Üzerine Araştırmalar*. (Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Tuncer, H. & Karataş, F. (2012). Investigation of water soluble compounds in strawberry (*Fragaria vesca*). *New World Sciences Academy*, 7(3), 93-97.
- Üzal, Ö. (2009). *Tuz Stresi Altında Yetiştirilen Bazı Çilek Çeşitlerinde Jasmonik Asitin Bitki Gelişimi ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi*. (Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Valenzuela-Chavira, I., Contreras-Vergara, C. A., Arvizu-Flores A. A., Serrano-Posada, H., Lopez-Zavala, A. A, García-Orozco, K. D., Hernandez-Paredes, J., Rudiño-Piñera, E., Stojanoff, V., Sotelo-Mundo, R. R. & Islas-Osuna, M. A. (2017). Insights into ligand binding to a glutathione s-transferase from mango: structure, thermodynamics and kinetics. *Biochimie Author Manuscript*, 135, 35-45 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.005>
- Vijayakumar, H., Thamilarasan, S. K., Shanmugam, A., Natarajan, S., Jung, H. J., Park, J. I., Kim, H. R., Chung, M. Y. & Nou, S. (2016). Glutathione transferases superfamily: cold-inducible expression of distinct *GST* genes in *Brassica oleracea*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1211), 1-23. <https://doi.org/10.3390/ijms17081211>
- Yılmaz, C. (2006). *Glutathione S-Transferase Activity and Glutathione Levels in Drought Stressed Pinus brutia Ten. Trees Growing in Ankara*. (Graduate Thesis, Middle East Technical University, The Graduate School of Natural and Applied Science)
- Yılmaz, H., Yıldız, K., Kına, A. & Oğuz, İ. (2009). Changes of some macro and micronutrients accumulations of strawberries plant (*Fragaria x ananassa* Dutch L.) under salt stress. *Asian Journal of Chemistry*, 21(4), 2761-276.
- Yousuf, P. Y., Hakeem, K. R., Chandna, R. & Ahmad, P. (2012). Role of glutathione reductase in plant abiotic stress. *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*, (pp. 149-158)
- Yu, X., Pasternak, T., Eiblmeier, M., Ditengou, F., Kochersperger, P., Sun, J., Wang, H., Rennenberg, H., Teale, W., Paponov, I., Zhou, W., Li, C., Li, X. & Palme, K. (2013). Plastid-localized glutathione reductase2-regulated glutathione redox status is essential for *Arabidopsis* root apical meristem maintenance. *The Plant Cell*, 25, 4451-4468. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117028>

- Xu, F., Lagudah, E. S., Moose, S. P. & Riechers, D. E. (2002). Tandemly duplicated safener-induced glutathione s-transferase genes from *Triticum tauschii* contribute to genome- and organ-specific expression in hexaploid wheat. *Plant Physiology*, *130*, 362-373. <https://doi.org/10.1104/pp.004796>
- Xu, J., Xing, X. J., Tian, Y. T., Peng, R. H., Xue, Y. Zhao, W. & Yao, Q. H. (2015). Transgenic arabidopsis plants expressing tomato glutathione s-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress. *Plos One*, *10*(9), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136960>



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülsüm Nur ÇELİK

Doęum Yeri ve Yılı : Konya, 1993

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : celikgulsumnur@gmail.com

Taranmıř
Fotoęraf
(3.5cm x 3cm)

Eğitim Durumu

Lise : Kadınhanı Zeki Altındağ Anadolu Lisesi, 2011

Lisans : SD, Ziraat Fakültesi