

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KABARLA ÇİLEK ÇEŞİDİNDEN KATALAZ VE SÜPEROKSİT
DİSMUTAZ GENLERİNİN İZOLE EDİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Songül CARUS

**Danışman
Prof. Dr. Yaşar KARAKURT**

ISPARTA - 2019



© 2019 [Songül CARUS]

TEZ ONAYI

**KABARLA ÇİLEK ÇEŞİDİNDEN KATALAZ VE
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ GENLERİNİN İZOLE EDİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Songül CARUS 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.

İmza

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	

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.

26/06/2019

Songül CARUS

S. Carus

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	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. RNA İzolasyonu.....	13
3.1.1. Elektroforez yöntemi.....	13
3.1.2. Spetrofotometrik Yöntem.....	14
3.1.3. DNaz uygulaması	14
3.1.4. cDNA sentezi	14
3.1.5. Dejenere primer sentezi.....	15
3.2. PCR Analizleri	15
3.2.1. CAT PCR analizi	15
3.2.2. SOD PCR analizi	15
3.2.3. PCR ürünlerinin jelden çıkarılması	16
3.2.4. PCR ürünlerinin saflaştırılması	16
3.3. RACE Analizleri	16
3.3.1. RACE Ready cDNAsentezi (Tam uzunluktaki genlerin izolasyonu).....	16
3.3.2. RACE PCR analizi.....	17
3.4. Southern Blot Analizi.....	19
3.4.1. Genomik DNA izolasyonu	19
3.4.2. Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesilmesi.....	19
3.4.3. Naylon membrana DNA aktarımı	20
3.4.4. DNA'nın işaretlenmesi ve hibridizasyonu	20
3.4.5. Dizileme ve biyoinformatik analizler	22
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	24
4.1. RNA İzolasyonu.....	24
4.2. RACE Analizleri	26
4.3. Southern Blot Analizi.....	27
4.4. CAT Geninin Moleküler Karakterizasyonu	29
4.4.1. CAT genine ait nükleotid analizleri	29
4.4.2. CAT Geninin Tam Nükleotid Sekans	32
4.4.3. CAT Domeyn Organizasyonu.....	32
4.4.4. CAT Protein Parametreleri.....	33
4.4.5. CAT Geninin Filogenetik İlişkisi.....	35
4.5. SOD Geninin Moleküler Karakterizasyonu	34
4.5.1. SOD genine ait nükleotid analizleri	36
4.5.2. SOD Geninin Tam Nükleotid Sekans	37
4.5.3. SOD Protein Parametreleri.....	38
4.5.4. SOD Geninin Filogenetik İlişkisi.....	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41

6. KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	50



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KABARLA ÇİLEK ÇEŞİDİNDEN KATALAZ VE SÜPEROKSİT DİSMUTAZ GENLERİNİN İZOLE EDİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Songül CARUS

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Bitkiler olumsuz çevre şartlarına maruz kaldıklarında gelişmeleri olumsuz etkilenir ve bu duruma stres denir. Bitkilerde iki tür stres ortamı vardır; Abiyotik ve biyotik stresler. Bitkiler olumsuz etkileri azaltmak veya engellemek amacıyla moleküler savunma mekanizmalarına sahiptirler. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) hücre içi maddeler ve hücre zarı ile etkileşime girerek bitkilere zarar vermektedir. ROS'lar ile mücadele etmek ve ROS'ları uzaklaştırmak için en etkili enzimler CAT ve SOD enzimleridir. Katalaz enzimi redoks reaksiyonunu teşvik eden en etkili protein katalistlerinden birisidir. Katalaz mitokondri ve peroksizomda lokalize olan, kloroplastta bulunmayan, H₂O₂'yi suya ve oksijene dönüştürerek ortamı temizleyen antioksidan bir enzimdir. Süperoksit Dismutaz reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma hattını oluşturan olağanüstü katalitik etkinlikte çalışan metalloproteindir. İnsanlarda SOD'un üç formu bulunur. Bunlardan bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD) sitozolde, manganez (Mn) içeren süperoksit dismutaz (Mn SOD) mitokondride ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC SOD) hücre dışı sıvılarda bulunur.

Bitkilerde stresle başa çıkmak için son derece önemli olan bu enzimlerin sekans bilgileri çilek dahil olmak üzere birçok bitkide araştırılmamıştır. Bu çalışmada Kabarla çilek çeşidinden CAT ve SOD 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 de 3' ve 5' RACE analizi yapılmıştır.

Sekans sonuçlarına göre CAT ve SOD genleri sırası ile 496 ve 317 amino asitten oluşan açık okuma çerçevesine sahip oldukları saptanmıştır. Ayrıca izole edilen CAT geni *Solanum Lycopersicum*, *Prunus persica* ile SOD geni *Prunus persica* geni 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, katalaz, Süperoksit Dismutaz

2019, 50 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CATALASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE IN KABARLA STRAWBERRY VARIETY

Songül CARUS

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

Supervisor: Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

When exposed to the unsuitable environmental conditions the development of plants are affected negatively and this situation is called stress. There are two stress conditions for plants which are abiotic and biotic stresses. In order to decrease or prevent the negative effects of the stress, plants have defence mechanisms. Under stress conditions ROSes interact with cell membrane and the materials within the cell and thus negatively affect plant development. CAT and SOD are the most effective enzymes for combating and removing the ROSes. The catalase enzyme is one of the most effective protein catalysts encouraging the redox reactions. Catalase is an antioxidant enzyme localized in mitochondria and peroxisome, not available in chloroplast and cleaning the media from ROSes by converting the H₂O₂ to water and oxygen. Superoxide dismutase is a metalloprotein with an exceptional catalytic activity forming the first line of defence against the reactive oxygen species.

The gene sequences of these enzymes that are very important for the defence against stress conditions have not been determined in many plants including strawberry. In this study, the genes encoding CAT and SOD antioxidant enzymes have been isolated, sequenced and characterized in Kabarla strawberry variety. For this purpose, degenerate primers have been designed and used in PCR reactions in order to obtain the partial cDNA sequences and then 3' and 5' RACE analyses have been conducted in order to obtain their full length sequences.

According to the sequence results, CAT and SOD genes contained open reading frames encoding 496 and 317 amino acids respectively. The isolated CAT gene showed high level of similarity to the *Solanum Lycopersicum* and *Prunus persica* genes and the isolated SOD gene demonstrated high similarity to the *Prunus persica* SOD gene. These molecularly characterized genes could either be used for the characterization of similar genes in other plant species or for the development of new strawberry cultivars more resistant to the stress conditions.

Keywords: Kabarla, antioxidant, catalase, superoxide dismutase.

2019, 50 page

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Yaşar KARAKURT'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım. Çalıőmamda yardımcı olan Damla GÜVERCİN'e ve çalışma arkadaőım Gülsüm Nur elik'e teşekkür ederim.

Tezimin her aőamasında maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme de sonsuz teőekkürler ederim.

Songül CARUS
ISPARTA, 2019



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 4.1. Guanidyum izotiyasanat metoduyla elde edilen 28S ve 18 S büyüklüğündeki RNA jel görüntüsü	24
Şekil 4.2. RT PCR sonucu katalaz genine ait 800bp ve 600bp büyüklüğündeki elektroforez görüntüsü.....	25
Şekil 4.3. RT PCR sonucu Süperoksit Dismutaz genine ait 300bp büyüklüğündeki elektroforez görüntüsü	25
Şekil 4.4. 5'RACE sonucunda Kontrol, CAT ve SOD genine ait PRC görüntüsü	26
Şekil 4.5. 3'RACE sonucunda CAT ve SOD genlerine ait PCR görüntüsü.....	27
Şekil 4.6. Çilek Genomik DNA 'ları	28
Şekil 4.7. CAT geninin Kabarla genomundaki Southern Blot analizleri. Hedef gen CAT, restriksiyon enzimleri (E=EcoRI, B=BamHI ve H=HindIII) ve blotlanmış olan DNA parça büyüklükleri	29
Şekil 4.8. SOD geninin Kabarla genomundaki Southern Blot analizleri. Hedef gen SOD, restriksiyon enzimleri (E=EcoRI, B=BamHI ve H=HindIII) ve blotlanmış olan DNA parça büyüklükleri	29
Şekil 4.9. CAT genine ait Domeyn Organizasyonu.....	33
Şekil 4.10. CAT Geninin Filogenetik Haritası.....	36
Şekil 4.11. SOD Geninin Filogenetik Haritası.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. CAT ve SOD genlerine ait sentezlenen dejenere primerler.....	15
Çizelge 3.2. 5'RACE PCR Döngü programı	18
Çizelge 3.3. 3'RACE PCR Döngü programı	18
Çizelge 3.4. Kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.....	20
Çizelge 3.5. DIG işaretlemesi, melezleme ve görüntüleme de kullanılan çözeltiler ve tamponlar	21
Çizelge 3.5. DIG işaretlemesi, melezleme ve görüntüleme de kullanılan çözeltiler ve tamponlar(Devamı).....	22
Çizelge 4.1. CAT genine ait tam uzunluktaki protein dizisi	30
Çizelge 4.2. Kabarla'dan elde edilen CAT geninin diğ er türlerden izole edilen CAT genlerinin nükleotid ve amino asit sekanslarının karşılaştırılması	31
Çizelge 4.3. CAT genine at elde edilen tam nükleotid sekans bilgileri	32
Çizelge 4.4. Kabarla çilek çeşidinden izole edilen CAT geninin nükleotid ve tahmini aminoasit sekansları	33
Çizelge 4.4. Kabarla çilek çeşidinden izole edilen CAT geninin nükleotid ve tahmini aminoasit sekansları(devamı).....	34
Çizelge 4.5. CAT geninin tam uzunluktaki tahmini protein dizisinde kodlanan amino asitlerin sayısı ve yüzdesi.....	34
Çizelge 4.5. CAT geninin tam uzunluktaki tahmini protein dizisinde kodlanan amino asitlerin sayısı ve yüzdesi(devamı)	35
Çizelge 4.6. SOD genine ait tam uzunluktaki protein dizisi	36
Çizelge 4.7. SOD geninin diğ er genlere olan benzerlik yüzdesi.....	37
Çizelge 4.8. SOD genine ait tam nükleotid sekans bilgileri	37
Çizelge 4.9. Kabarla'dan izole edilen SOD genine ait amino asit sekansı	38
Çizelge 4.10. SOD geninin tam uzunluktaki tahmini protein dizisinde kodlanan amino asitlerin sayısı ve yüzdesi.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bç	Baz Çifti
CaCl ₂	Kalsiyum Klorid
CAT	Katalaz
Cu ⁺	Bakır
CTAP	HekzadesilTrimetil Amonyum Bromür
°C	Santigrat Derece
dATP	DeoksiadeninTrifosfat
DEPC	DietanolPolifenolkarbonat
dCTP	DeoksisitozinTrifosfat
dGTP	DeoksiguaninTrifosfat
DIG	Digoxigenin
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	DeoksinükleotidTrifosfat
dTTP	DeoksitiminTrifosfat
EDTA	Etilen DiaminTetra Asetik Asit
FAD	Flavoprotein
Fe ⁺²	Demir
g	Gram
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
MMLV	MurinaLeukemia Virüs
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
NADP	Nikotinamidadenindinükleotid fosfat
O ⁻	Süperoksit
OH ⁻	Hidroksil
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVP	PolivinilPirrolidin
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	Dakikadaki Dönme Sayısı
SOD	SüperoksitDismutaz
sn	Saniye
TAP	TobaccoAcidPyrophosphate
TBE	Tris-borikasit-EDTA çözeltisi
TE	Tris-EDTA Çözeltisi
UV	Ultraviyole
Zn ⁺²	Çinko
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromol

Taq Thermusaquaticus
TOS toplam oksidan durum
MOPS 3-(N-morpholino) propansülfonik asit



1. GİRİŞ

Kültür çileği (*Fragaria×ananassa*) cinsinin yaygın olarak yetiştirilen Gülgiller familyasında yer alan melez türlerinden biridir. Ilıman iklim meyvesi içerisinde yer almaktadır (Abd El-Maksoud vd., 2015). Çilek hem yenilebilirliği hem de sağlıklı değerlerinden dolayı ekonomik öneme sahip model bir bitkidir. M.S. 23-79 da “Natural History (Tabiat Tarihi)” adlı eserin içerisinde Çilek ile ilgili ilk yazılı bilgiye rastlanmıştır. İtalya’nın tabii bitkisi olarak söz edilen çilek “Fraga” ismiyle belirtilmiştir. Fakat, daha sonra bunun ağaç çileği olan kocayemiş ile karıştırıldığı ortaya çıkmıştır. 1300’lü tarihlerde çilek ilk olarak Avrupa’da kültüre alınmıştır. Özellikle Fransa’da evlerin bahçelerine *Fragaria vesca*’nın dikildiği, 1324 yılında meyveleri kullanılarak huzurevleri ve hastanelerin gelirlerini arttırmak amacı için kullanıldığı, Charles V’in bahçıvanı tarafından Loure kraliyet bahçesine 1386 yılında 1200’den fazla çilek bitkisini diktiği bilinmektedir (Çekiç vd., 2017). İlk çilek resmi 1485 yılında Botanik olarak bilinen Mainz Herbaryumunda bulunduğu bilinmektedir. ABD’de 1800’lü yıllarda ticari açıdan çilek yetiştiriciliği başlamıştır. 1800’lü tarihlerin sonlarında çilek tarımı ABD’nin birçok yerine yayılma göstermeye başlamıştır (Aydoğdu, 2003). Modern anlamda çilek yetiştiriciliği Türkiye’de ise ancak 1960’lı tarihlerin başında “Tarsus Bölge Toprak – Su Araştırma Enstitüsü” vasıtasıyla çilek yetiştiriciliği üzerine denemeler başlatılmıştır. Bu çalışmaların neticesinde Adana, Antalya, Aydın, Muğla, Ankara, İzmir gibi illerde belli başlı çalışmalar yürütülmüş ve bölgeye uygun çilek çeşitleri tespit edilmiştir. Akdeniz ve Marmara Bölgesi ile başlayan çalışmalar diğer bölgelere de yayılma göstermiş ve çilek yetiştiriciliği ile ilgili kitaplar yazılıp basılmaya başlanmıştır (Özkan, 2014). Çilek, Türkiye’de hem yurt içerisinde tüketilen hem de ihraç edilen önemli bir üzüm sü meyve grubu içerisinde yer almaktadır (Efil, 2018). Çilek, tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde yetişen yıllık yaklaşık 9223815 tonluk bir üretim ile dünya çapında çok önemli bir üründür (Chen vd., 2016).

Ülkemizde yetiştirilen en önemli çilek çeşitleri; Pocahontas, Dorit (216), Douglas, Chandler, Selva, Camarosa, Oso Grande, Red Chief, Honeoye, Ventana, Sweet Charlie, Festival, Fern, Calgiant, Aromas, Albion, Aliso, Tioga, Balcalı1, Balcalı2, Balcalı3, Brio, Pajaro, Lester, Redlands Hope, 216 ve Kabarla çilek çeşididir (Özbahçali, 2014; Demirsoy vd., 2012) .

Kabarla, Early Sweet ve Selva'nın çaprazlanması sonucu elde edilen, nötr gün bir çeşittir. Kabarla çeşidi Avustralya'da geliştirilen erkenci, yüksek verimli ve nötr gün çeşididir. Meyveler orta irilikte olup, dış rengi gösterişli, kırmızı ve orta parlaklıktadır (Özbahçali ve Aslantaş, 2014).

Çilek meyvesinde salisilik asit, A, B vitaminleri, kalsiyum, demir, fosfor gibi mineral maddeler önemli miktarda yer alırlar. Brom, silisyum, iyot ve çok az miktarda kükürt de içermektedir. Ayrıca çilek sindirimin kolaylaştırılmasında büyük bir rol oynadığı bilinmekte, bu da selülozca zengin bir meyve içerisinde yer aldığı kanıtıdır (Özgüven ve Yılmaz, 2009).

Çilek meyvesi olgunlaşmasında yer alan süreçlere ilişkin artan bilgi miktarına rağmen, bu süreçlerin düzenlenmesi hakkında çeşitli fitohormonların rol oynadığı bilinir. Diğer meyvelerle kıyaslandığında, çilek meyvesinin nispeten zayıf anlaşılmasının ana nedeni, çilek meyvesi olarak adlandırılan şeyin aslında akenden (yumurtalıklardan gelişen gerçek meyveler) ve daldırılmış çiçek yuvasından (Etkili kısım) oluşan ve her iki organ da vasküler demetlerle bağlanan yalancı bir meyvedir. Bu iki organ, aken ve hazne, gelişimsel programları boyunca özellikle de erken gelişim aşamalarında birbiriyle bağlantılı olsalar da, hem gen ekspresyonu çalışmaları hem de metabolik profiller tarafından ortaya çıktığı gibi hücre ontogenesi ve işlevi açısından çok farklıdır. Bu nedenle, gelişme ve olgunlaşma sırasında ortaya çıkan temel düzenleyici süreçlerin her organ için farklılık göstermesi beklenmektedir (Merchante vd., 2013).

Çilek yaprağı, tannis, flavonoidler, askorbik asit ve uçucu yağ içeren birçok biyoaktif bileşen içerir. Çilek meyvelerinde anti-kanserojen aktiviteler ve anti-trombotik etkiler vardır (Abd El-Maksoud vd., 2015).

Antioksidan maddeler; serbest radikal oluşumunu engelleyerek, oluşan serbest radikallerin aktivitesini durdurarak veya azaltarak oksidasyonun neden olabileceği hasarların önüne geçen bileşikler ya da sistemlerdir (Singh, 2008). Diyet halinde antioksidanları yüksek miktarda içeren meyve ve sebze gibi gıdaların tüketimi oksidasyonun neden olabileceği hasarları azaltmaktadır. Meyve ve sebzelerdeki doğal antioksidanlar vitaminler, karotenoidler ve fenolik maddeler olmak üzere üç ana

bileşen grubundan oluşmaktadır. Fenolik bileşiklerin beyin hücrelerini koruyucu, antiinflamatuvar, antikanserojen, kalbi koruyucu, kronik hastalıkları önleyici olduğu çalışmalarla belirlenmiştir (Seydim vd., 2014).

Fenolik bileşikler, çok sayıdaki ve her yerde bulunan bitki sekonder metabolit gruplarından birini oluşturur ve insan sağlığının korunması üzerindeki faydalı etkileri nedeniyle dikkat çekmiştir. Bahçe çileği (*Fragaria x ananassa*) meyveleri, dünya çapında yüksek miktarlarda tüketilmekte ve flavonoidler, antosiyaninler, flavonoller ve proantosiyanidinler, fenolik asitler dahil olmak üzere flavan-3-ols gibi değerli bir fenolik kaynağı olduğu için sağlığı teşvik edici potansiyele sahiptir. Bu bileşikler kırmızı renkli antosiyaninlerin tohumları dağıtmaya yardımcı olan frugivorları çekebildiğinden, flavonollerin meyve cildinde koruyucu UV-B emici kimyasallar olarak hareket ettiğinden ve proantosiyanidinlerin savunma ve stres direncine katkıda bulunduğundan, bitkilerdeki birçok önemli fonksiyonu yerine getirirler. Fenilpropanoik asitlerin Glc esterleri, bitki ikincil metabolizmasında enerji açısından zengin substratlar olarak hizmet eder ve ellagik asit, predasyon ve bitki büyüme regülasyonundan korunmada rol oynayabilir. Çilek meyvesinin sağlığını destekleyici etkisinden fito-kimyasalların da sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Song, 2015).

Bitkiler olumsuz etkileri azaltmak veya engellemek amacıyla moleküler savunma mekanizmalarına sahiptirler. Bu savunma mekanizmalarına Reaktif Oksijen Türleri (ROS) denilmektedir. Bitkilerde endojen olarak kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde NADPH oksidaz, hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkileriyle meydana gelen serbest radikallere de ROS denmektedir. Radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkması sonucu ya da atom veya moleküle bir elektron ilavesi sonucunda oluşurlar. İndirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar (Büyük vd., 2012).

Hücrelerde bilinen başlıca ROS'lar: süperoksit anyon radikal (O_2^-) ve hidroksil radikal ($-OH$) gibi oksijensiz radikalleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijen ($1^{\circ}O_2$) gibi radikal olmayan oksidanları kapsar (Zorov vd., 2014).

Bitkilerde ROS üretimi; kuraklık, tuzluluk, soğuk, metal toksisitesi ve UV radyasyonu gibi abiyotik stres faktörleri altında artmaktadır. Hücrel ROS konsantrasyonunun artmasıyla antioksidan savunma sistemleri ve ROS üretimi arasındaki denge bozulmakta ve zincirleme reaksiyonlar şeklinde organizmada ROS artışı sonucu bitkiler oksidatif strese girmektedir. ROS üretiminin Stres altında artışı ağların yükseltgenmesi sonucu bozulma, proteinlerin yükseltgenmesine, nükleik asit hasarına, enzim gelişmesinin engellenmesine, programlı hücre ölümü (apoptozis) aktivasyonuna ve hücrelerin ölümüne varıncaya kadar birçok hasara yol açabilir. Bitkiler ROS'un kontrolü ve organizmanın kendisine zararlı olan toksik maddelerden temizlenmesini sağlayan antioksidanlara sahiptirler bu sayede oksidatif stres altında yaşamlarını devam ettirebilmek ve stresle başa çıkma yeteneğindedirler. Düşük konsantrasyonlarda yükseltgenme yapabilen enzimlere Antioksidanlar denmektedir. Antioksidanlar, enzimatik olmayan antioksidanlar ve enzimatik antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Enzimatik olmayanlar, askorbik asit (AA), tokoferoller (vitamin E), karotenoidler, glutatyon ve fenolik bileşiklerdir. Enzimatik antioksidanlar ise süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) olarak bilinmektedir (Büyük vd., 2012).

Süperoksit Dismutaz, reaktif oksijene karşı ilk savunma hattını oluşturulan ve reaksiyon hızını artırmak için yeterince güçlü bir katalisttir (Koca vd., 2003). Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen enzimatik özellikte bir antioksidandır. Hidrojen peroksit daha sonra, CAT ya da GPx vasıtasıyla ortamdan uzaklaştırılır. İnsanlarda SOD üç formda bulunur; Bunlardan bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD) sitozolde, manganez (Mn) içeren süperoksit dismutaz (Mn SOD) mitokondride ve ekstrasellüler süperoksitdismutaz (EC SOD) hücre dışı sıvılarda bulunmaktadır (Karabulut vd., 2016).

Katalaz: Katalaz (CAT), hidrojen peroksidi ortadan kaldırıp organizmaları oksidatif strese karşı koruyan önemli bir antioksidan enzimdir (Lu vd., 2017). Katalaz enzimi bir metalloenzim olarak bilinen redoks reaksiyonunu teşvik eden en önemli protein katalistlerinden birisidir (Koca vd., 2003). Katalaz mitokondri ve peroksizomda yeri ve niteliği belli olan, kloroplastta bulunmayan, H_2O_2 'yi suya ve oksijene dönüştürerek vücudu temizleyen antioksidan bir enzimdir (Kasnak vd., 2015).

Kabarla çeşidinde antioksidan genleriyle ilgili çok çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada Kabarla çeşidinde antioksidan enzimleri olan katalaz ve süperoksit dismutazı kodlayan genler izole edilmiştir.



2.KAYNAK ÖZETLERİ

Yapılan bir çalışmada, serbest radikallerin üretimine ve antioksidanlarda değişimlere yol açmak için oksidatif strese neden olan Dimetoatın sebep olduğu ratlardaki karaciğer toksisitesine karşı antioksidan bileşikler içeren *Laurocerasus officinalis* Roem. meyve ekstresinin etkileri incelenmiştir. Ratlar Kontrol grubu, dimetoate ile muamele edilen grup, *L. officinalis* ile muamele edilen grup, dimetoat öncesi *L. officinalis* verilen grup, dimetoat öncesi vitamin C verilen grup ve dimetoat sonrası *L. officinalis* ile muamele edilen grup şeklinde altı gruba ayrılmıştır. Karaciğer fonksiyon testleri olarak aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT) ve toplam bilirubin (TBil) ile toplam oksidan durum (TOS), toplam antioksidan durum (TAS), superoksitdismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) gibi oksidatif stres parametreleri ölçülmüştür. Sonuç olarak, dimetoat'ın rat karaciğeri üzerindeki toksik etkileri esas olarak hepatik fonksiyon enzimleri, oksidatif stres ve DNA hasarına neden olurken, bu etkiler *L. officinalis* meyve ekstresi tarafından büyük ölçüde iyileştirildiği ortaya konulmuştur (Eken vd., 2017).

Bitki probiyotik bakterisi olan *Bacillus amyloliquefaciens* BChi1 ve *Paraburkholderia fungorum* BRRh-4'ün çilek meyvelerinde büyüme, meyve verimi ve antioksidan içerikler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. BChi1 ve BRRh-4 izolatları ile aşılınmış bitkilerden elde edilen meyvelerin, muamele edilmemiş kontrole göre önemli ölçüde daha yüksek fenolik, karotenoid, flavonoid ve antosiyanin içeriği olduğu belirtilmiştir. Toplam antioksidan aktivitesi de her iki probiyotik bakteri ile tedavi edilen çilek bitkilerinin meyvelerinde anlamlı olarak daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır ($p<0.05$). Bu durum, tarla koşullarında bitki probiyotik bakterileri BChi1 ve BRRh-4'ün uygulanmasıyla hem çilek veriminin hem de kalitesinin önemli ölçüde iyileştirilmesinin ilk raporudur (Rahman vd., 2018).

Nanjing'te yetiştirilen üç adet meyvenin (yaban mersini, böğürtlen ve çilek) toplam antioksidan kapasitesi ve fenolik bileşimi araştırılmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak yapılan bir ön analiz, test edilen yaban mersini, böğürtlen ve çilek örneklerinin bir dizi fenolik asit (gallik asit, protokansik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanililik asit, kafeik asit, p-kumarik, ferulik asit, ellagik asit ve

sinamik asit) ve çeşitli flavonoid tipleri (flavon: luteolin; flavonoller: rutin, mirisetin, kuersetin ve kuersetin; flavanoller: gallocatechin, epigallocatechin, catechin ve catechingallate; antosiyanidinler: malvidin-3 -galaktosit, malvidin-3-glukozit ve siyanidin) içerdiğini göstermiştir. Özellikle, yaban mersininin güçlü antioksidan aktivitelerinden sorumlu yüksek düzeyde proantosiyanidinler ve antosiyanidinler içerdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçların, meyveler (özellikle yaban mersini) için fonksiyonel bir gıda maddesi veya nutrasötik olarak potansiyel bir pazar rolünü gösterdiği belirtilmiştir (Huang vd., 2012).

Çilek ve diğer meyvelerden elde edilen flavonoidler ve polifenoller; obezite ve komplikasyonlarının neden olduğu oksidatif stresi azaltmak için önerilmiştir. Yapılan bir çalışmada, UV ışınlama çileğinin in vitro ve in vivo antioksidan kapasitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, UV-C ile çilek dilimlerinin ışınlanmasının, UV ışınlanmış çilek ekstresinin antioksidan kapasitesinin daha sonradan çekilmiş çilek ekstresinden daha yüksek olduğunu ve antioksidan içeriğini arttırdığını göstermiştir. Sonuç olarak, UV ışınlaması, antioksidan kapasitesini arttırmış antioksidan kapasitesi ile in vitro olarak korele olduğunu ortaya çıkarmıştır (Oviedo- Solis vd., 2017).

Süperoksit dismutaz enzimini kodlayan genlerin gerçek zamanlı kantitatif PCR tekniği kullanılarak ifade seviyelerinin incelendiği çalışmalarda, çeşitli stres koşulları ve bitki türlerine bağlı olarak gen ifadesinde değişiklik gösterdiği bu ifade değişikliklerinin stres savunmasında rolü olduğu belirtilmiştir (Büyük vd., 2012).

Meyveler arasında, taze çileklerin yüksek oranda askorbik asit içeriğine sahip olduğu düşünülmektedir. Meyvelerdeki biyoaktif bileşikler esas olarak fenolik bileşikler (fenolik asitler, antosiyaninler ve flavonoller ve tanenler gibi flavonoidler) ve askorbik asitlerdir. Bu bileşikler, tek tek veya birleşik olarak, çeşitli kanserlerin riskini azaltmak için, enflamasyon bozukluklarının, kardiyovasküler hastalıkların veya koruyucu etkilerin önlenmesi gibi, meyvelerin çeşitli sağlık yararlarından sorumludurlar. Çileklerde askorbat içeriği oldukça değişken olup 5 -80 mg/100g arasında farklılık göstermektedir. Bilindiği gibi, depolama sıcaklığı veya süresi arttıkça askorbat içeriğinde kademeli bir azalma olur. Bununla birlikte, bir haftalık depolama sırasında, çeşitli sıcaklıklarda çileklerde hiçbir askorbat kaybı meydana gelmediği saptanmıştır.

Buna karşılık, taze meyve sularında askorbik asit kaybı, özellikle depolama sıcaklıkları, soğutulmuş koşullardan daha yüksek olduğunda, depolama süresiyle birlikte artacağı belirtilmiştir (Skrovankova vd., 2015).

Yapılan bir diğer çalışmada, çilek (*Fragaria x ananassa*) yaprak ekstresinin sıçanlarda diyabetik nefropati üzerine etkisini ortaya konulması amaçlanmıştır. Streptozotosin (STZ) diyabetik sıçanlar, 30 gün boyunca üç doz (50, 100 ve 200 mg/kg) çilek yaprağı ekstresi ile oral olarak tedavi edilmiştir. Deneyin sonunda plazma ve böbrek nefropati biyobelirteçleri incelenmiştir. Bu arada, çilek yaprağı ekstresi ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda plazma insülin, albümin, ürik asit, katalaz (CAT), süperoksitdismutaz (SOD) ve vaskülerendotelial büyüme faktörü A (VEGF-A) seviyeleri anlamlı olarak yükselmiştir. Bu sonuçlar diyabetik nefropatide çilek yaprağı ekstresinin anti-diyabetik, antioksidan, antiinflamatuvar ve anti-apoptoz olarak rolünü göstermiştir (Abd El-Maksoud vd., 2015).

Kadmiyum (Cd), çevreyi etkileyen en zehirli metallere biri olarak bilinir ve bitki büyümesini ve gelişimini engelleyebilir özelliktedir. Bu çalışmada, Cd toksisiteleri çilekte araştırılmıştır. Klorofil ve malondialdehit (MDA) içeriği, katalaz (CAT), süperoksitdismutaz (SOD), askorbatperoksidaz (APX) aktiviteleri ve mineral besin konsantrasyonları Cd uygulamalarından sonra çilek bitkisinin kök ve yapraklarında incelenmiştir. Bu çalışmada sunulan sonuçlar, Cd tedavilerinin klorofil içeriği üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğunu ve çilekte bitki büyümesinin neredeyse % 30'unu azalttığını göstermiştir. Çilek kökleri, yapraklardan daha yüksek Cd biriktirmiştir. MDA ve antioksidan enzim (CAT, SOD ve APX) içeriği çilek bitkisinde Cd toleransının saptanması için iyi bir araç olarak kabul olabileceği tespit edilmiştir (Muradoğlu vd., 2015).

Ordu ekolojik koşullarında yetiştirilen, farklı dönemlerde hasat edilen 2 farklı çilek çeşidinin (San andreas, Albion) meyve ağırlığı, geometrik ortalama çap, et sertliği ve renk gibi kalite özelliklerinin yanı sıra suda çözünebilir kuru madde (SÇKM), pH, titre edilebilir asitlik (TEA), toplam fenolik bileşikler, antioksidan aktivitesi ve toplam flavonoid gibi biyokimyasal özelliklerini belirlemek amacı ile yürütülmüştür. Her iki çeşit için en yüksek meyve ağırlığı ve geometrik ortalama çap 2. hasat döneminde tespit edilmiştir. İncelenen çeşitlerde SÇKM içeriği en yüksek 2. hasatta San Andreas

(%10.46) çeşidinde, en düşük ise 2. hasatta Albion (%4.32) çeşidinde; TEA içeriği en yüksek 4. hasatta San Andreas (%1.07) çeşidinde, en düşük ise 2. hasatta Albion (%0.50) çeşidinde ve pH değeri en yüksek 2. hasatta Albion (3.46) çeşidinde, en düşük ise 4. hasatta San Andreas (3.17) çeşidinde tespit edilmiştir. En yüksek toplam fenolik bileşikler, antioksidan aktivitesi ve toplam flavonoid içeriği 2. hasat döneminde San Andreas çeşidinden elde edilmiştir. Sonuç olarak 2. hasat döneminde derimi yapılan çilek meyvelerinin daha iyi meyve kalitesine sahip olduğu ifade edilmiştir (Karakaya vd., 2015).

Çilek, hasat sonrası kayıplara çok duyarlıdır. Bu amaçla, hasat sonrası metil jasmonat ile muamelenin (0, 8 ve 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 'de) bazı kalite özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Sabrosa çilek meyvesinin 1 ± 0.5 °C'de ve % 90-95 nem içeriğine sahip bir ortamda saklanması sonrasında 14 gün boyunca 24 saat 20 °C'de incelenmiştir. Metil jasmonat, her iki konsantrasyonda (0,8 ve 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 'de) meyvelerin ağırlık kaybını azaltmıştır. Metil jasmonat uygulanan meyvelerin katalaz aktivitesi ilk günlerde azalmış, ancak ikinci haftada önemli bir artış göstermiştir. Metil jasmonat, konsantrasyona paralel olarak, peroksidaz aktivitesi geliştirilmiştir. Meyvenin toplam antioksidan kapasitesi metil jasmonat uygulaması ile artırılmıştır. Sonuç olarak, metil jasmonatın streslere karşı direnç oluşturmasında, meyve savunma sistemlerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu fitokimyasal, Sabrosa çilek meyvesinin hasat sonrası teknolojisinde kullanılmak ve meyve hasat sonrası yaşamını geliştirmek için iyi bir potansiyele sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Asghari vd.,2016). Bir diğer çalışmada, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD ve CAT mRNA'larının nispi ifadeleri ve düşük sıcaklıkta stres altında aşılınmış ve aşısız hıyar yapraklarında SOD, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD ve CAT aktivitelerinin değişimi ve hıyarların soğuk direnci ile ilişkileri incelenmiştir. Hem aşılınmış hem de kendi köklü salatalık yaprakları için, düşük sıcaklık uygulaması altında Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD mRNA'larının nispi ifadesi, sırasıyla Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD aktivitelerinin değişimlerine uygun olurken; CAT mRNA, CAT aktivitesinin değişimine uygun olmadığı, Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD mRNA'larının göreceli ekspresyonu ve aşılınmış hıyar yapraklarında SOD, Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD aktiviteleri, aşılınmamış hıyar yapraklarındakinden daha yüksek olduğu, MDA içeriği ve elektrolitik sızıntı ters orantılı olduğu belirtilmiştir (Junlie vd., 2009).

Bu çalışmada Spermine sentaz (SPMS, EC 2.5.1.22), spermin (Spm) biyosentezinin enziminin, stres yanıtı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çay bitkisinden (*Camellia sinensis*) SPMS kodlayan bir genin klonlanması ve Karakterizasyonu üzerinde durulmuştur. Düşük sıcaklık stresine maruz kalan *C. sinensis*'de eksojen Spm uygulamasının etkisi de araştırılmıştır. 1113 bp'lik bir açık okuma çerçevesine sahip tam uzunlukta bir SPMS tamamlayıcı DNA (cDNA) (CsSPMS), ters transkripsiyon-PCR ve "Yingshuang" çeşidinin cDNA uçlarının (RACE) hızlı amplifikasyonu kullanılarak klonlanmıştır. 371bç'lik amino asit polipeptidini kodlayan CsSPMS geninin homolog olduğu tespit edilmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı PCR, CsSPMS geninin, esas olarak çay bitkisinin yaprağı ve kökünde, dokuya özgü ifadeyi göstermiştir. Ekspresyon analizi, CsSPMS geninin soğuk stres ile hızlı bir şekilde indüklendiğini ve dört çeşitte benzer eğilimlere sahip olduğunu göstermiştir. Spm destekli örneklerde peroksidaz (POD), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve serbest prolin içeriği aktiviteleri, deney süresince veya belirli bir zaman noktasında kontrolden daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Spm, antioksidan sistemler üzerinde olumlu bir etki yapmıştır. Dahası, tütün yapraklarında CsSPMS'nin *Agrobacterium* aracılığıyla yapılan ekspresyon nispeten daha yüksek soğuk toleransı göstermiştir. Birlikte ele alındığında, bu bulgular çay bitkilerinde CsSPMS gen düzenleyicilerin, poliaminlerin birikimi ve soğuğa toleransın arasındaki ilişkilerin anlaşılmasını artıracakları belirtilmiştir (Zhu vd., 2015).

Çalışmada, deniz yosunu ekstralarının (SW) ve hümik asidin, meyve verimi, kuru ağırlık, protein, prolin, lipit peroksidasyonu (LPO) ve biber bitkilerinin (*Capsicum annuum L.*) antioksidatif enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar tuzluluk stresinin bitki gelişimini ve diğer tüm parametreleri olumsuz etkilediğini göstermiştir. Ayrıca, deniz yosunu (SW) ve hümik asit (HA) uygulamaları, bitkide tuzluluk koşulları altında uygulanan tüm konsantrasyon seviyelerinde vejetatif büyümeyi iyileştirmiştir. Taze yaprak ve kuru ağırlığı, tuzluluk stresi altındaki bitkilerin tüm SW ve HA uygulamalarında kontrole göre artmıştır. Ayrıca, SW ve HA uygulamalarının tuz stresi altındaki süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), katalaz (CAT) aktiviteleri gibi antioksidan enzim aktivitesinde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir. Deniz yosunu ve hümik asit uygulamalarının artmasında tuz stres toleransını ve biber bitkisinin oksidatif strese

karşı korunmasında önemli etkilere neden oldukları saptanmıştır (Yıldıztekin vd., 2018).

Çabuk bozulan ürünler olarak taze çilek meyveleri, kısa bir muhafaza ömrüne sahiptir ve mantar çürümelerine eğilimlidirler. Bu çalışmada, 0, 1, 10, 100 ve 1000 $\mu\text{mol/L}$ dozlarındaki melatoninlere fungal bozulmalar üzerindeki etkisi ve çilek meyvelerinin beslenme kalitesinin korunması üzerinde durulmuştur. 100 $\mu\text{mol/L}$ 'deki melatonin uygulaması, düşük katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitelerine bağlı daha yüksek süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinden kaynaklanan ve daha düşük oranlarda çürümelere neden olan H_2O_2 birikimini tetiklemiştir (Aghdam vd., 2017).

Hücreler, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarı önlemek veya onarmak ve ayrıca redoks duyarlı sinyal yollarını düzenlemek için çok sayıda antioksidan içerir. Genel protokoller, süperoksitdismutaz (SOD), katalaz ve glutatyonperoksidazın antioksidan enzim aktivitesini ölçmek için tanımlanmıştır. SOD'lar süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürürken, katalaz ve peroksidazlar hidrojen peroksiti suya dönüştürür. Bu şekilde, iki toksik tür, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit, zararsız ürün suyuna dönüştürülür. Western blot analizleri, aktivite jelleri ve aktivite analizleri, her bir deney için gerekli protein miktarına bağlı olarak, hem hücrelerdeki hem de dokudaki protein ve aktiviteyi belirlemek için kullanılan çeşitli yöntemlerdir. İmmünohistokimya ve immüno-gold dahil diğer teknikler, doku ve hücrelerde çeşitli antioksidan enzimlerin seviyelerini daha fazla değerlendirebilir. Genel olarak, bu testlerin tamamlanması 24-48 saat gerektirir (Weydert vd., 2010).

Baklagiller, fitokimyasal içeriklerinden dolayı sağlık açısından faydalıdır. Polifenoller, antioksidan özellikleri için yoğun olarak çalışılan en önemli fitokimyasal bileşiklerdir. Bu çalışmada, güçlü antioksidan baklagil bitki ekstraktlarının ksantin oksidaz (XO), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerine olan etkisi incelenmiştir. XO, plazmadaki en güçlü antioksidan molekül olan ürik asit üretirken, egzersiz sırasında serbest radikallerin en önemli katkısı olduğu için ikili bir rol oynar. CAT ve SOD, dokuların antioksidan savunmasının ana enzimlerinden iki tanesidir. Ekstraktların çoğunun XO aktivitesini inhibe ettiğini, ancak düşük konsantrasyonlarda

kullanıldığında CAT inhibisyonu ve SOD indüksiyonunu etkilemediği görülmüştür. Bu sonuçlar, test edilen ekstrelerin olası yeni XO inhibitörleri kaynağı olarak düşünülebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, egzersizden önce bilinen bir XO inhibitörü olan allopurinol uygulamasının, performansı düşürdüğünü ve sıçanlarda oksidatif stresi indüklediği belirlenmiştir (Spanou vd., 2012).

Polipropilen solucandan elde edilen Cu/Zn süperoksitdismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) cDNA'ları klonlanmış ve bu solucandaki ham yağ maruziyeti ile stres cevabı arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla klonlanmıştır. PaSOD ve PaCAT genlerine ait nükleotid uzunlukları sırasıyla; 870 bp ve 1967 bp olduğu ve 150 ve 506 amino asit kodladıkları tespit edilmiştir. Sonuç olarak *P. aibuhitensis*'teki CAT geninin ve enzim aktivitesinin ifadesinin, ham petrol konsantrasyonu ile pozitif bir şekilde korele olduğunu ve 3000 mg/kg ham yağa 15 gün maruz kaldığı maksimum bir süreye ulaştığını göstermiştir. SOD geninin ifadesi ve *P. aibuhitensis* içinde SOD'un enzim aktivitesi de ham yağa maruz kalma sırasında artmıştır ve 3000 mg/kg ham yağa maruz kaldığında 10 gün boyunca maksimum bir değere ulaşmıştır. Bu sonuçlar SOD ve CAT'nin hücrel metabolizma dengesini korumak ve *P. aibuhitensis*'i ham petrol toksisitesinden korumak için önemli olduğunu göstermiştir (Zhao vd., 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. RNA İzolasyonu

Bahçe Bitkileri Bölümüne ait yetiştirilen Kabarla çilek çeşidi toplanıp -80C' ye çalışmada kullanılmak üzere kaldırıldı. RNA'lar Karakurt ve Huber(2004) tarafından çilek için kullanılan metotlardan yararlanılarak çıkarılmıştır. Bu amaçla 2gr çilek plasenta dokusu alınarak sıvı azot içerisinde ezilmiş ve %0.5 sarcosyl-0.1M mercaptoethanol, 4M guanidiniumisothiocyanate-25 mM sodyum sitrat (pH:7.0)'dan oluşan 10ml'lik ekstraksiyon tampon çözeltisine konulmuştur. Hazırlanan bu karışım içerisine 1ml 2M sodyumasetat (pH:4.0) ilave edilip 30 saniye vortekslenmiştir. Bu karışıma 6ml kloroform:izoamilalkol (24:1v/v) ilave edilerek 30 saniye çalkalanmıştır. Daha sonra 5000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan faz başka bir tüpe aktarılıp eşit hacimde kloroform:izoamilalkol ilave edilerek iyice karıştırılıp 5000xg'de 10 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Üstte kalan faz başka bir tüpe alınarak bunun üzerine eşit hacimde izopropanol ilave edilerek karıştırılmış ve -20°C'de bir gece inkübasyona tabii tutulmuştur. Santrifüj işlemi (4°C, 10000xg/30dakika) yapıldıktan sonra elde edilen pellet 500µl RNaz' dan ari suda çözündürülmüştür. Bu solüsyona 500 µl 4M LiCl eklenip 0°C' de 3 saat süreyle inkübasyona tabii tutularak RNA çöktürülmüştür. Elde edilen örnekler santrifüj (15000 rpm/5 dakika) edildikten sonra pelet %70'lik etanol ile 2 defa yıkanıp kurutulmuştur. Elde edilen RNA örnekleri 200 µl DEPC (diethylpirokarbonat) uygulanmış saf su içerisinde çözülmüş ve -80°C'lik dolapta muhafaza edilmiştir.

3.1.1. Elektroforez yöntemi

Elde edilen RNA örneklerindeki RNA'nın kalitesi %1'lik formaldehit-agaroz jel elektroforezi ile teyit edilmiştir. Bu amaçla 1g agaroz 72 ml saf suda eritilip, sıcaklığı 60°C'ye getirildikten sonra 10ml 10X MOPS [0.4MMOPS(3-(N-morpholino) propanesülfonikası), pH 7.0, 0.1 M sodyum asetat, 0.01 M EDTA (etilendiamin tetraasetikası)], 18 ml % 37' lik formaldehit ve % 0.1 oranında etidyum bromür ilave edilmiştir. 2X oranında formaldehit yükleme solüsyonu (% 50 gliserol, 1mM EDTA, %0.25 bromofenol, %0.25 xilenecyanol) ve 2µg RNA örneği karıştırıldıktan sonra 70°C sıcaklıkta 10 dakika boyunca denature edildikten sonra jele yüklenmiş ve 1X

MOPS solüsyonu içerisinde yürütülmüştür. Örnekler jel elektroforezinde ayrıştırılmıştır. Araştırmada kullanılan RNA örneklerinde 28S rRNA bandının yoğunluğu 18S rRNA'nın 2 katı olanlar ve jelin alt kısmında parçalanmış RNA'ların mevcut olmadığı örnekler kullanılmıştır.

3.1.2. Spetrofotometrik yöntem

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonunu ve kalitesini belirlemek amacıyla Nanodrop sonucuna göre konsantrasyonu 0.0431 µg/µL ve 260/280 değeri 1.95 olan ve konsantrasyonu 0.0733 µg/µL ve 260/280 değeri 1.91 olan RNA'lar elde edilmiştir. Elektroforez sonucuna göre RNA'ların 1600 bp ve 1200 bp uzunluğunda iki alt üniteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

3.1.3. DNaz uygulaması

Elde edilen RNA örneklerine bu örnekler içerisinde olması muhtemel DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak amacıyla DNaz uygulaması yapılmıştır (Ambion). Bu amaçla kullanılan toplam RNA'nın 0.1 hacminde 10X DNazI tampon çözeltisi (100 mM Tris, pH 7.5, 25 mM MgCl₂, 5mM CaCl₂ ve 1.5 µl rDNazI) toplam RNA'ya ilave edildikten sonra 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Bu karışıma RNA'nın 0.2 hacminde DNaz inaktivasyon solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. 10000xg'de 1.5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant başka bir tüpe aktarılmış ve kontrol edilmek amacıyla %1.2 agaroz jel üzerinde ayrıştırılmıştır.

3.1.4. cDNA sentezi

DNaz uygulaması sonucu muhtemel DNA kontaminasyonundan temizlenen RNA örnekleri, 'Advantage RT-PCR' kiti (Clontech) kullanılarak üretici firmanın protokolleri takip edilerek cDNA'ya dönüştürülmüştür. Bu amaçla toplam hacim 12.5µl olacak şekilde 1µg toplam RNA'ya DEPC uygulanmış su ilave edilmiştir. 1µl 20 µM oligo(dT)₁₈ primeri ilave edildikten sonra, RNA 70°C'de 2 dakika ısıtılmış ve hızlı bir şekilde buza konulmuştur. 4µl 5X reaksiyon tampon çözeltisi (250mM Tris-HCL, pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 1µl dNTPmix (her biri 10mM olan dATP,

dCTP, dGTP ve dTTP), 0.5 µl rekombinant RNaz inhibitör, 1µl MMLV (Malooney Murine Leukemia Virus) geriye transkriptaz enzimi ilave edilip karıştırıldıktan sonra örnekler 42°C’ de 1 saat inkübasyona tabii tutulmuşlardır. Daha sonra örnekler 94°C’ de 5 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Her bir reaksiyona toplam hacim 100µl olacak şekilde DEPC uygulanmış su ilave edilerek cDNA hazır hale getirilmiştir. cDNA sentezinin kontrolü için 1 µg/µl kontrol RNA kullanılarak Advantage RT-PCR kitinde belirtilen aşamalar takip edilmiştir.

3.1.5. Dejenere primer sentezi

Katalaz ve süperoksitdismutaz genlerinde dejenere primer dizayn edilmiştir.

Çizelge 3. 1. CAT ve SOD genlerine ait sentezlenen dejenere primerler

Katalaz	5’GAGAGGGTTGTGCAT GCTA	3’ACATGGGGCCATCDCK CTG
Süperoksit Dismutaz	5’CATGGHTTYCATGTT CATGC	3’CCCYTKCCAAGRTCATC AGG

3.2. PCR Analizleri

3.2.1. CAT PCR analizi

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

3.2.2. SOD PCR analizi

PCR örnekleri 6 µL cDNA, 3.5 µL dejenere ileri primer, 3.5 µL dejenere geri primer, 5µL 10X PCR tamponu, 2 µL dNTP karışımı (10mM), 1.5 µL Taq polimeraz, 28.5 µL saf su ile toplam 50 µL PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. PCR örneği 95 °C’de

5 dk ön denaturasyon, 95 °C’de 45 sn denaturasyon (DNA çift iplikçığının ayrılması), 35-50 °C’de 45 sn annealing (primerin bağlanması), 72 °C’de 1 dk extension (yeni iplikçığın sentezlenmesi), 72 °C’de 7 dk son yazılım olacak şekilde ayarlandı ve döngü denaturasyon-extension arasında 35 defa tekrarlanmıştır.

3.2.3. PCR ürünlerinin jelden çıkarılması

PCR ürünlerinin görselleştirilmesi için, 300 ml 1X TBE tamponu içinde % 2 agaroz jelleri üzerinde elektroforeze tabi tutuldu; bunlar daha sonra etidyum bromür ile boyandı ve UV ışığı altında incelenmiştir. Elektroforez sonucunda katalazdan 800bp ve 600bp büyüklüğünde iki bant elde edilmiştir. Süperoksit Dismutazdan 300bp’lik bant elde edilmiştir. Bantlar UV altında kesilip ağırlıkları tartılıp (CAT 800bp=0.34gr, CAT 600bp=0.41gr, SOD 300bp 0.55gr) Thermo Scientific Gene JET Gel Extraction Kiti ile saflaştırılmıştır.

3.2.4. PCR ürünlerinin saflaştırılması

Thermo Scientific Gene JET Gel Extraction Kiti kullanılarak jelden kesilen ürünlerin ağırlığına göre 1 mg içinde 1 µl Binding Buffer ilave edilmiştir. Her bir uzunluktaki bant tek tek saflaştırılmıştır. 60 °C’de 10 dk jel eriyene kadar ara ara ters düz edilerek bekletilmiştir. Ardından 20 sn vortex yapılmıştır. 12000xg’de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Altta kalan sıvı dökülüp 700 µl Wash Buffer eklenip tekrar 12000xg’de 1dk santrifüj yapılmıştır. Alltaki sıvı tekrar boşaltılıp ve herhangi bir solüsyon ilave edilmeden boş bir şekilde 12000xg’de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Mor renkteki tüpler temiz bir ependorf tüpüne yerleştirildi ve üzerine 10 µl Elution Buffer eklendikten sonra oda sıcaklığında 10 dk bekletilip 12000xg’de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Saflaştırılan ürünler bir sonraki aşamaya kadar -20’ye kaldırılmıştır.

3.3. RACE Analizleri

3.3.1. RACE Ready cDNA sentezi (Tam uzunluktaki genlerin izolasyonu)

İlgili genin kodlama yapan dizisinin tamamını elde edebilmek, genin öncesinde ve sonrasında bulunan kontrol bölgelerinin dizisine ulaşabilmek adına RACE (Rapid

Amplification of cDNA Ends) analizine başvurulmuştur. Bunun için FirstChoice RLM-RACE kiti (invitrogen) ve kite ait protokol izlenerek çalışma yürütülmüştür.

Protokole göre; 5' RLM-RACE cDNA için 1 µg DNaz uygulanmış RNA, 2 µL 10X CIP buffer, 2 µL CIP (calfintestinal alkaline phosphatase), toplam hacmi 20 µL olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile tamamlanmıştır. Karşım 10 sn santrifüj yapıldıktan sonra 37 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Karşıma 15 µL amonyum asetat solüsyonu, 115 µL nükleaz içermeyen su ve 150 µL fenol:kloroform eklenip kısaca vorteks yapıldı ve maximum hızda santrifüj yapılarak iki fazlı sıvıdan üstte olan sıvı yeni steril ependorfa aktarılmıştır. Daha sonra, 150 µL kloroform konularak oda sıcaklığında 5 dk maximum hızda santrifüj yapılarak yine üstte olan sıvı kısım yeni ependorfa aktarılmıştır. Örneğin üzerine 150 µL izopropanol eklenerek 10 dk buzda bekletildikten sonra 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 randomdekamers, 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 MMLV ters transkriptaz, 8 µL saf su hafifçe karıştırılıp 42 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

3.3.2. RACE PCR analizi

Outer 5' RLM-RACE PCR için toplam hacim 50 µL olacak şekilde 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 , saf sudan 33.8 μL hafifçe karıştırılarak PCR yapılmıştır.

Çizelge 3. 2. 5'RACE PCR Döngü programı

İşlem	Süre	Sıcaklık	Döngü
Denatürasyon	3 dk	94 °C	
Denatürasyon	30 sn	94 °C	
Bağlanma	30 sn	60 °C	35
Uzama	30 sn	72 °C	
Son uzama	7 dk	72 °C	

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 iner 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 outerprimer, 0.2 μL Taq polimeraz ve 35.8 μL saf su hafifçe karıştırılarak PCR yapılmıştır.

Çizelge 3. 3. 3'RACE PCR Döngü programı

İşlem	Süre	Sıcaklık	Döngü
Denatürasyon	3 dk	94 °C	
Denatürasyon	30 sn	94 °C	
Bağlanma	30 sn	60 °C	35
Uzama	30 sn	72 °C	
Son uzama	7 dk	72 °C	

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 iner 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 ürünlerinin 10 µL'si 1X'lik TBE ile hazırlanan %2'lik jelde 2 saat 40 dk koşturulup ayrışan bantlar UV ışığı altında steril bistürü ile kesilip GeneJet PCR saflaştırma kiti (Thermo) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan örnekler sekans analizi için Atlas Biyoteknoloji laboratuvarına gönderilmiştir.

3.4. Southern Blot Analizi

Katalaz ve Süperoksit Dismutaz genlerinin kaç kopya ile temsil edildiğini belirlemek için Southern Blot yöntemi kullanılmıştır. Southern blot analizi Sambrook vd. (1989)'a göre yapılmıştır.

3.4.1. Genomik DNA izolasyonu

Kabarla çilek çeşidinin yaprak dokularından genomik DNA'lar CTAB metodu (Doyle ve Doyle, 1990) kullanılarak çıkarılmıştır. Bu amaçla, -80 °C'de saklanan 300 mg bitki dokusu soğutulmuş steril havana alınarak sıvı azotla toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür. Örneğe 1 mL CTAB tamponu eklendikten sonra özüt 60°C'de 1 saat bekletilmiştir. 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra steril tüpe aktarılmış süpernatanta eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1 v/v) eklenmiştir. Tüpler 5 dakika ters-düz edilerek karıştırıldıktan sonra, 20000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant temiz tüpe aktarılmıştır. Bu aşama en az iki kez tekrarlanmıştır. RNaz uygulaması sonrası izopropanol ile çöktürülen genomik DNA peleti, %70 etanol ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuş ve TE tamponunda çözülmüştür. Genomik DNA'nın miktar ve kalitesi spektrofotometre ve %1'lik agaroz jel elektroforezi ile teyit edilmiştir.

3.4.2. Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesilmesi

Southern blot çalışması için *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* restriksiyon enzimleri kullanılarak genomik DNA'nın kesim işlemi yapılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3. 4. Kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Reaksiyon Bileşeni	Miktar
Genomik DNA(10-20 µg)	10 µl
Restriksiyon Enzimi(5 U/µl)	5 µl
10X Restriksiyon Enzim Tamponu	2 µl
ddH ₂ O	3 µl
Toplam Hacim	20 µl

Restriksiyon enzimleriyle gece boyu 37 °C’de kesime bırakılan genomik DNA’nın inkübasyon sonrası kesim ürünleri %0.8’lik agaroz jelde elektroforez işlemiyle ayrıştırılmıştır.

3.4.3. Naylon membrana DNA aktarımı

Elektroforez işleminden sonra jel plastik bir kabın içine yerleştirilip 0.25 N HCl içerisinde 15 dakika bekletilmesinin ardından denatürasyon çözeltisinde (0.5 M NaOH ve 1 M NaCl) 2 kere 15’er dakika bekleme işlemine bırakılmıştır. Denatürasyon sonrası jel 0.5 M Tris-HCl (pH 7.0) ve 3.0 M NaCl ile 2 kere 15’er dakika yıkanmış ve kısa süre distile su ile yıkanarak başlangıç kısmını belirlemek üzere jelin bir köşesi işaretleme işlemi yapılmıştır. Jelin membrana kapiler transferi işlemi temiz bir kaptaki “sandviç sistemi” kurularak sağlanmıştır. Transfer sonrası membran dikkatle çıkarılıp yapışan agaroz parçalarını uzaklaştırmak için 5 X SSC ile kısa süreli yıkama işlemi yapılmıştır. UV Çapraz bağlayıcı cihaz (Stratalinker) kullanılarak DNA örnekleri membrana sabitlenmiştir.

3.4.4. DNA’nın işaretlenmesi ve hibridizasyon

İlgili genlerden elde edilmiş olan cDNA parçaları RT-PCR ile amplifiye edilmiş ve jel blot analizi için prob olarak kullanılmıştır. DNA probu DIG DNA işaretleme kiti ile işaretlenmiştir (Roche, Katalog no: 634858). Membran önceden belirlenmiş olan T_{opt} sıcaklığına (Optimal sıcaklık= $T_{opt}=T_m-20-25$ °C) getirilmiş (42 °C), 10 ml “Mezleme Tamponu” (Roche, DIG EasyHyb) içerisinde 30 dakika ön mezlemeye alınmıştır. Ön mezlemenin bitmesine 10 dakika kala DIG ile işaretlenmiş olan prob kaynayan suda 5 dakika denatüre edilip buz üzerine alınmıştır. Prob soğuduktan sonra,

önceden 42 °C 'ye ısıtılan 3.5 ml Melezleme Tamponu eklenerek gece boyunca melezleme fırınında melezlemeye bırakılmıştır. Melezleme sonrası, membran oda sıcaklığındaki %0.1 SDS içeren 2X SSC içinde 2 kez 5'er dakika yıkama işlemi yapılmıştır. % 0.1 SDS içeren 0.5X SSC içinde 50-52 °C'de 2 kez 15'er dakika yıkama işleminden sonra 1-5 dakika "Yıkama Tamponu"nda (Çizelge 3.5) çalkalanmıştır. 100 ml "1X Bloklama Çözeltisi"nde hafifçe çalkalanarak 30 dakika bekletilmiştir. 20 ml antikor çözeltisinde 30 dakika çalkalanarak inkübe edilen membran 2 kez 15'er dakika 100 ml yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra, 20 ml "Belirleme Tamponu"nda 2-5 dakika dengelenmiştir. Membran 10 ml taze hazırlanmış renk-substrat çözeltisinde karanlıkta renk oluşumu gözleninceye kadar (30 dakika-16 saat) sabit bir zemin üzerinde çalkalamadan bekletilmiş veya hibridizasyon sinyali kimyasal aydınlatma ile belirlenerek ve jel görüntüleme sisteminde (Kodak GL1500) analiz edilmiştir.

Çizelge 3.5. DIG işaretleme, melezleme ve görüntüleme için kullanılan çözeltiler ve tamponlar

Çözelti/Tampon	İçerik	Derişim
Maleik Asit Tamponu pH:7.5	Maleik Asit	0.1 M
	NaCl	0.15 M
10 X Bloklama Tamponu	Stok Kit içinde yer alan bloklama tozu	%10 (w/v) Maleik asit tamponu içinde
Yıkama Tamponu pH: 7.5	Maleik asit	0.1 M
	NaCl	0.15 M
	Tween 20	% 0.3 (v/v)
1 X Bloklama Tamponu*	10X Bloklama Tamponu	Maleik asitle 1X'e indirildi
Belirleme Tamponu pH: 9.5	Tris-HCl	0.1 M
	NaCl	0.1 M
Renk-Substrat Çözeltisi**	NBT/BCIP çözeltisi stok belirleme tamponuna	200 µl 10 ml
Antikor Çözeltisi***	Anti-digoksinin-AP konjugatı (Anti-DIG-AP) (750 ünite/ml)	1:5000 şeklinde (150 mU/ml)

Çizelge 3. 5. DIG işaretleme, melezleme ve görüntüleme için kullanılan çözeltiler ve tamponlar(Devamı)

20X SSC pH: 7.0	NaCl	200mM
	Sodyum sitrat	300mM
2XSSC Yıkama Çözeltisi	SSC	2X
	SDS	%0.1 (w/v)
0.5XSSC Yıkama Çözeltisi	SSC	0.1 X
	SDS	%0.1 (w/v)
Melezleme Tamponu	BSA	2.5 g/250 ml
	EDTA	0.93g/250 ml
	SDS	17.5 g/250 ml
	Na ₂ HPO ₄ (pH:7.2)	1.5 M 125 ml

*10 X bloklama çözeltisi maleik asit tamponuyla 1X'e sulandırılır.

**Daima taze hazırlanan bu çözelti ışıktan korunmalıdır.

***Anti-DIG-AP orijinal şişesi içinde her kullanımdan önce 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Gereken miktar pipetle dikkatle üst kısımdan alınarak kullanılır. Anti-DIG-AP bloklama çözeltisinde sulandırılır.

3.4.5. Dizileme ve biyoinformatik analizler

PCR sonucu elde edilen ve klonlanan DNA parçaları firmaya gönderilip sekanslanmıştır (İontek, İstanbul). Nükleotid dizilemeleri enzimatik Sanger's dideoksi yöntemi temelinde yapılmıştır. Diziler BioEdit (Hall, 2004) programlarında açılarak, okuma kalitesi kontrol edilmiştir. Nükleotid dizilerin protein dizine dönüştürülmesinde <http://www.fr33.net/translator.php> kullanılmıştır. NCBI veri bankasında bulunan ve diğer bitki türlerinden elde edilmiş benzer dizilerin karşılaştırılmasında BLASTn ve BLASTp (Altschul vd., 1997) programları (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılmıştır. Nükleotid ve protein dizilerinin hizalanmasında BioEdit (Hall, 2004) ve ClustalW (2.1) (Thompson, 1994; Jeanmougin vd., 1998) programlarından yararlanılmıştır. Dizi analizlerinde ExPASy Tools (<http://www.expasy.org/tools/>), Conserved Domain Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) ve 3D SWISS MODEL

(<http://swissmodel.expasy.org/>) programlarından yararlanılmıştır. Protein dizileri ile gen bankasından seçilmiş yakın protein dizileri arası filogenetik ilişkiler MEGA6 (Tamura vd., 2013) paket programı kullanılarak gösterilmiştir. Ayrıca ORF dizisinin doğruluğunu kanıtlamak adına "Sequence Manipulation Suite" (<http://www.bioinformatics.org/>) veri tabanında ORF Finder (Stothard, 2000) programı kullanılmış ve genin açık okuma çerçevesi belirlenmiştir. Tahmini protein sekanslarının dizi analizi ve karşılaştırılması Clustal X (Jeanmougin vd., 1998) ve GeneDoc (Nicholas ve Nicholas, 1997) programları ile gerçekleştirilmiştir.

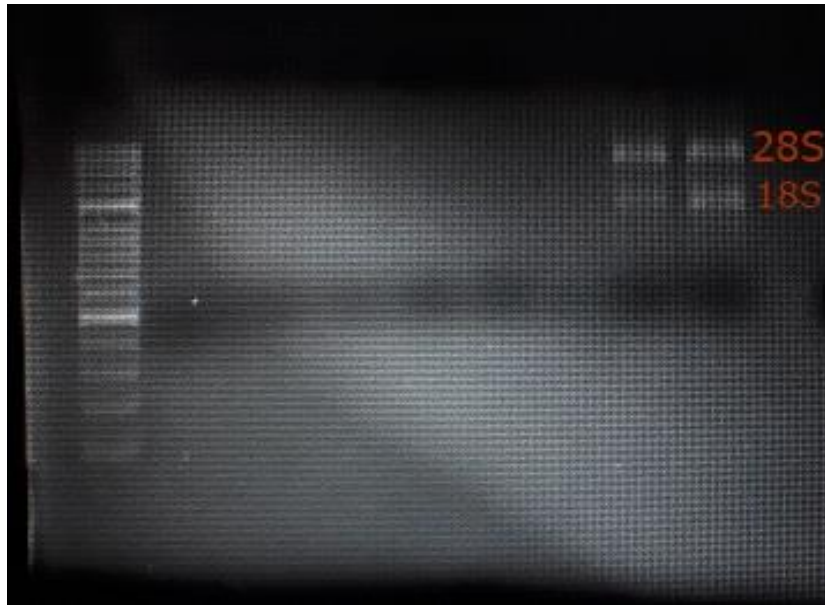


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu araştırmada, Kabarla ilek çeşidinde bulunan antioksidanca zengin genlerin kısmi sekanslanması ve karakterizasyonundan yola çıkılarak katalaz ve süperoksitdismutaz genlerinin nükleotid ve amino asit dizilerinin biyoinformatik araçlarla belirlenmesi hedeflenmiŐtir. Ayrıca, bu genlerin Kabarla genomundaki muhtemel kopya sayısı Southern Blot yöntemi ile analiz edilmiştir.

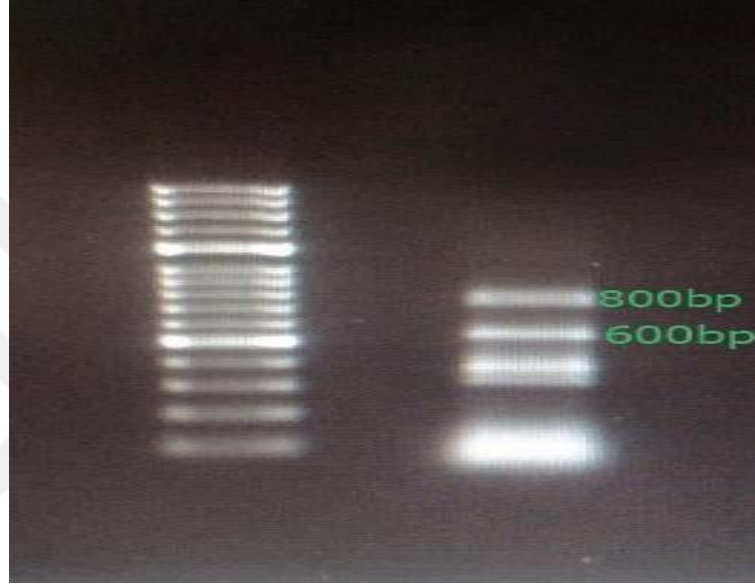
4.1. RNA İzolasyonu

Total RNA Kabarla ilek çeşidinin yapraklarından guanidyum izotiyasanat metodu (Strommer vd., 1993) ile izole edilmiştir. Elde edilen total RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı (OD_{260}/OD_{280}) spektrofotometrede yapılan ölçümlerle kontrol edilmiş ve kullanılacak örneklerin saflıklarının 1.80 ile 2.10 arasında olmasına dikkat edilmiştir. Total RNA'ların konsantrasyon ve saflıklarının kontrolü için formaldehitli agaroz jelde ayrıŐmaları sağlanmıştır. Nanodrop sonucuna göre konsantrasyonu $0.0431 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ve 260/280 değeri 1.95 olan ve konsantrasyonu $0.0733 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ve 260/280 değeri 1.91 olan RNA'lar elde edilmiştir. Elektroforez sonucuna göre RNA'ların 1600 b ve 1200 b uzunluğunda iki alt üniteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

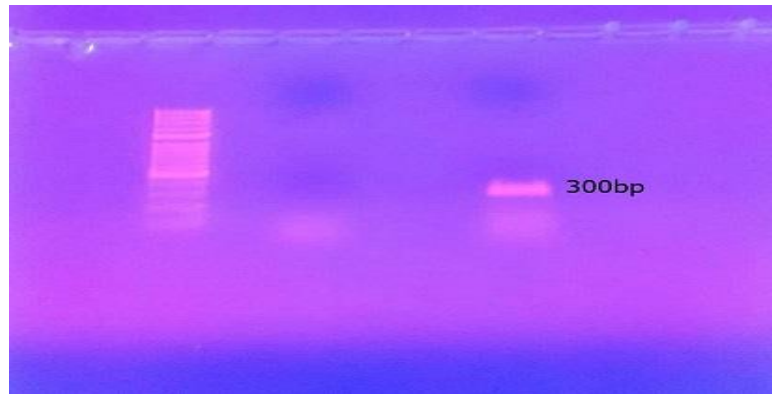


Şekil 4. 1. Guanidyum izotiyasanat metoduyla elde edilen 28S ve 18 S byklĞindeki RNA jel görüntüsü

Total RNA'ya DNaz I enzimi uygulanarak genomik DNA'nın uzaklaştırılması sağlanmış ve RNA örnekleri geriye transkriptaz yardımıyla cDNA'ya dönüştürülmüştür. Bugüne kadar, Kabarla çeşidinde hedef genlerle ilgili herhangi bir moleküler biyoloji çalışma olmamasından dolayı dejenere primerler kullanılarak PCR uygulamaları yapılmıştır. Dejenere oligonükleotidler ve cDNA kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonları sonucunda, beklenen boyutlarda kısmi cDNA'lar (SOD 300bç, CAT 600bç, CAT 800bç) olarak elde edilmiştir.



Şekil 4. 2. RT PCR sonucu katalaz genine ait 800bp ve 600bp büyüklüğündeki elektroforez görüntüsü



Şekil 4. 3. RT PCR sonucu Süperoksit Dismutaz genine ait 300bp büyüklüğündeki elektroforez görüntüsü

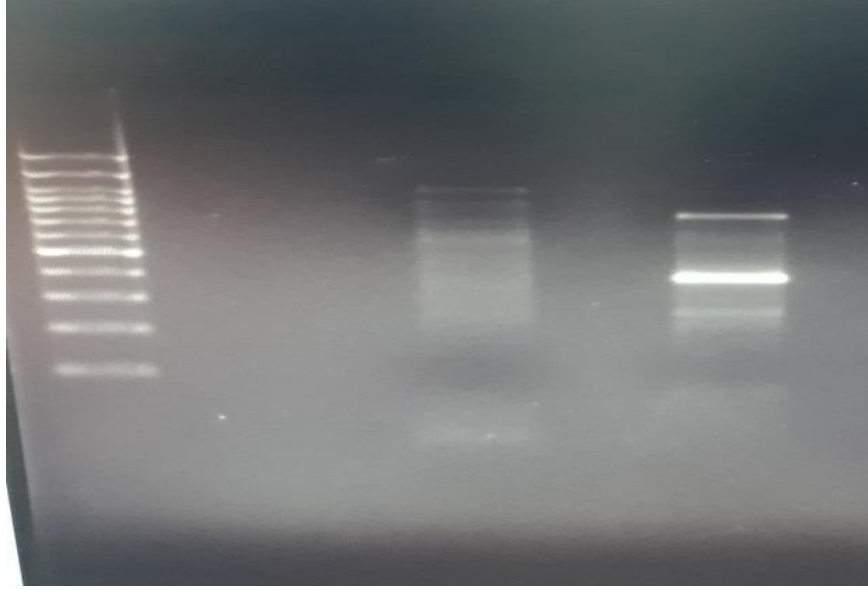
4.2. RACE Analizleri

Genin varlığı belirlendikten sonra genin moleküler karakterizasyonuna yönelik analizler için 5' ve 3' RACE (Rapid Amplification Of cDNAEnds) sistemi kullanılmıştır. Elde edilen kısmi cDNA'lara 3' ve 5' RACE analizi uygulanarak tam uzunluktaki cDNA klonları elde edilmiştir. 5' ve 3' RACE PCR sonucunda; 5' CAT 1300bp, 5'CAT 500bp, 5'SOD 1000 bp 3'CAT 4000 bp, 3'CAT 1000bp, 3'SOD 7000 bp olarak tespit edilmiştir.

Tam uzunluktaki bu genler sekanslandıktan sonra elde edilen dizilerin doğruluğu biyoinformatik analizlerle kanıtlanmıştır. Bu analizler sonucunda 5'- ve 3'- dizileri birleştirilerek hedef genlere ait tam uzunlukta cDNA dizileri elde edilmiştir. Kabarla çilek çeşidinden CAT ve SOD geni ile ilgili elde edilen dizi sonuçları Gen Bankasında BLASTn programında taranmıştır.



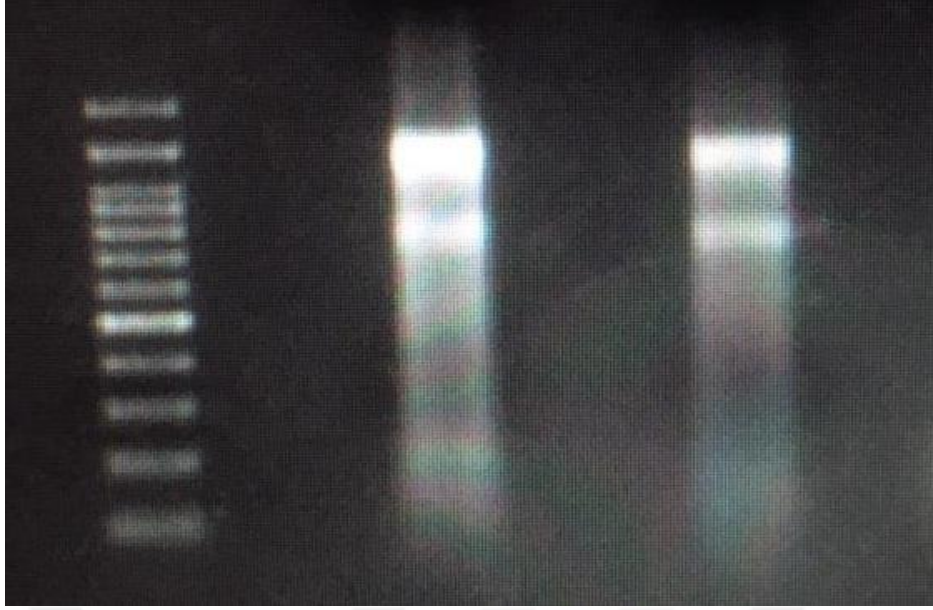
Şekil 4. 4. 5'RACE sonucunda Kontrol, CAT ve SOD genine ait PRC görüntüsü



Şekil 4. 5. 3'RACE sonucunda CAT ve SOD genlerine ait PCR görüntüsü

4.3. Southern Blot Analizi

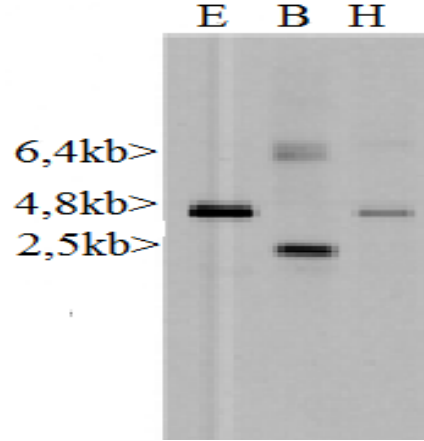
Tez çalışması kapsamında izolasyonu ve karakterizasyonu hedeflenmiş olan CAT ve SOD geninin Kabarla genomunda kaç kopya ile temsil edildiğini belirleyebilmek için Southern Blot yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, Kabarla yaprak dokularından genomik DNA'lar klasik CTAB metodu ile çıkarılmış ve genomik DNA'nın miktar ve kalitesi spektrofotometre ile belirlenmiştir. Sırayla konsantrasyonları; 65.5 ng/ μ L ile 60.5 ng/ μ L ve 260/280 değeri ise sırasıyla 2.09 ve 2.03 olarak ölçülmüştür. Southern Blot analizi için 30 μ g genomik DNA üç farklı restriksiyon enzimi ile ayrı reaksiyonlarda kesilmiş ve DNA parçaları %1'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmıştır.



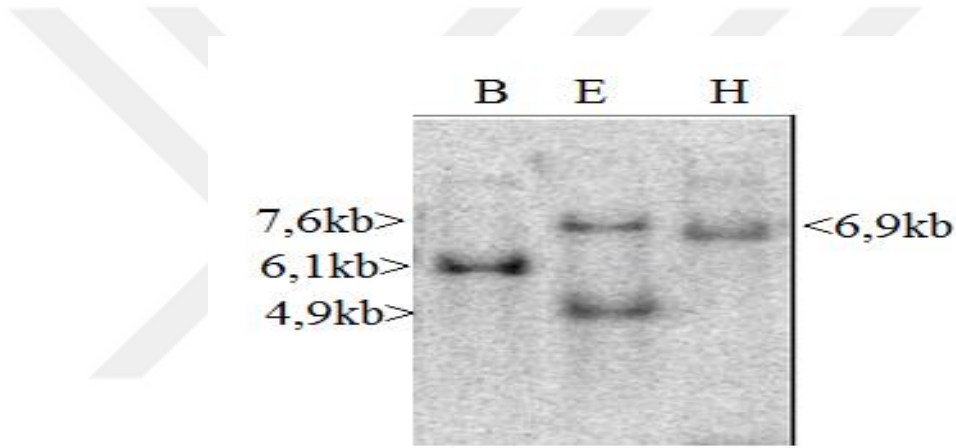
Şekil 4. 6. Çilek Genomik DNA 'ları

Hedef genlerin her biri cDNA'dan RT-PCR ile çoğaltılmış ve prob olarak kullanılmıştır. DNA probu DIG DNA işaretleme kiti ile işaretlendikten sonra hibridizasyon sinyali kimyasal aydınlatma ile belirlenmiş ve jel görüntüleme sisteminde (Kodak GL1500) analiz edilmiştir. Tez kapsamında çalışılan CAT genin Southern blot analizleri sonuçları Şekil 4.7'da verilmiştir. CAT geninin üç farklı enzimle kesimi sonucunda DNA bantları ürettiği görülmüştür. E ve H kesimi sonucunda tek DNA bandı üretilirken *BamHI* kesimi sonucu çift DNA bandı üretilmiştir. CAT geni için yalnızca *BamHI* enzimiyle kesim sonucunda çift bant (6.4 ve 2.5 kb) gözlenmiştir. Elde edilen bu bulgular CAT geninin Kabarla genomunda 2 kopya ile temsil edildiğini göstermiştir.

SOD genin Southern blot analizleri sonuçları Şekil 4.8'de verilmiştir. SOD geninin üç farklı enzimle kesimi sonucunda DNA bantları ürettiği görülmüştür. B ve H kesimi sonucunda tek DNA bandı üretilirken *EcoRI* kesimi sonucu çift DNA bandı üretilmiştir. SOD geni için yalnızca *EcoRI* enzimiyle kesim sonucunda çift bant (7.6 ve 4.9 kb) gözlenmiştir. Elde edilen bu bulgular SOD geninin Kabarla genomunda 2 kopya ile temsil edildiğini göstermiştir.



Şekil 4. 7. CAT geninin Kabarla genomundaki Southern Blot analizleri. Hedef gen CAT, restriksiyon enzimleri (E=EcoRI, B=BamHI ve H=HindIII) ve blotlanmış olan DNA parça büyüklükleri



Şekil 4. 8.SOD geninin Kabarla genomundaki Southern Blot analizleri. Hedef gen SOD, restriksiyon enzimleri (E=EcoRI, B=BamHI ve H=HindIII) ve blotlanmış olan DNA parça büyüklükleri

4.4. CAT Geninin Moleküler Karakterizasyonu

4.4.1. CAT genine ait nükleotid analizleri

3'-5' RACE reaksiyonları sonucunda CAT genine ait tam uzunluk cDNA nükleotid uzunluğu 676 nükleotid olarak belirlenmiştir. Nükleotid dizisinde Metionin başlama kodonunu ve ona benzer diğer işaretli kısımlar stop kodonunu göstermektedir. Kırmızı renk ile işaretli bölge açık okuma çerçevesini göstermektedir. Bu dizide 5'-UTR (translasyona uğramayan bölge) 119 baz çifti (bç), protein kodlama bölgesi 496 bç, 3'-UTR bölgesi 61 baz çiftinden oluşmuştur.

Çizelge 4. 1. CAT genine ait tam uzunluktaki protein dizisi

```
FFIGHWTRVSPGWKSELKIQKAFPCCFPRWTLSNREL  
ARIADSRHPKLAMLCLLPA Stop PRSVCAHKITCSRPI  
CTARRAPSTPQKCL Stop LDHFIS SNSGAPVWNNPTFEA  
PSSAPSPSYQAHEVFLPIFLCMDPYKSRPSSAFNSPFW  
TTNSGAPVWNNSSLTVGSRDPVLVEDYHLAEKLTNS  
DREGYPELV LHARGATAKELSGVPPDMEQHTPPWPR  
WTQRSSYHTGSFAVHHCYQQGWKPWNLEVSLWLWR  
GVVLERGEISLGWKQVPPFPWWNEVPGHGLCFGAE  
AAGKHSGLRIHWLPTHHPAMLLKFTFMTQLSGIPTR  
LQAHGWFRCQYIHVDQQSWQSSLREVPLETNLWSQV  
SFGRRCNSSWRNQPQSCDSRLVWLYSSWHPRRLEPPH  
ADEGSGVHTYTLVFEPLAGTVTWRQDIIPHLRRA  
LAEYRNGRRFYWKWTLCVGTWISCHSCMTFKCWVTS  
KSKVMYLCYSESPSCSKLLGAPSEWTHRISQFQYSSLI  
HEFQCIRDEDYLLCCQICSWISSQALPISCRCAKCKRW  
KKDVCLGEQLYATWKDFIFVIIQARAIYPPIVECPIR  
PTCHPCYSQHLNVIRTPGVYMSMSNAANSLRCYNKH  
P Stop AVSSKLLR Stop GQEIKVAIIQSSSCEDLLC Stop IVY  
N Stop YLFKDQNWKPL Stop HVVAM Stop _ALVVCAERQN  
SSQNNIDTAFMVKKKK
```

Kabarla çilek çeşidinden CAT geni ile ilgili elde edilen dizi sonuçları GenBankasında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLASTn programında taranmıştır. Nükleotid seviyesinde yapılan homoloji araştırmasına göre CAT geni farklı türlerde ve genlerde yüksek oranda benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.2)

Çizelge 4. 2. Kabarla'dan elde edilen CAT geninin diğer türlerden izole edilen CAT genlerinin nükleotid ve amino asit sekanslarının karşılaştırılması

Gen (Nükleotid)	Benzerlik(%)
chromosome 4 (<u>Arabidopsis thaliana</u>)	98%
PCO104975 (<u>Zea mays</u>)	98%
catalase-2-like (LOC104716627)(Camelina sativa)	94%
<u>Brassica oleracea</u>	88%
catalase-2-like (LOC108840848) (Raphanus sativus)	87%
<u>Linum usitatissimum</u>	87%
<u>Malus x domestica</u>	85%
catalase 1 (CAT1)(<u>Dendrobium officinale</u>)	80%
<u>Cucumis melo</u>	78%
CAT3 (CAT3) gene(<u>Kerneria saxatilis</u>)	78%
catalase isozyme 1 (LOC113346811)(Papaver somniferum)	70%
Gen (Amino asit)	Benzerlik(%)
catalase isozyme 1 [<u>Prunus avium</u>]	47%
catalase-2 [<u>Rhinolophus sinicus</u>]	47%
<u>Arabidopsis thaliana</u>	46%
catalase-2 [<u>Camelina sativa</u>]	45%
catalase isozyme 1 [<u>Quercus suber</u>]	44%

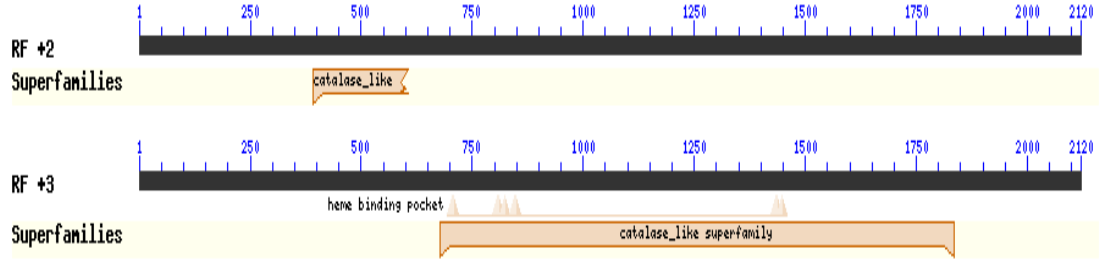
4.4.2. CAT geninin tam nükleotid sekansı

Çizelge 4. 3. CAT genine ait tam nükleotid sekans bilgileri

```
Attttcatagggcattggaccctgtcagtcagggtggaaaagcgaatta
aagattcaaaaggcattcccatgctgtttccgcgatggacctgagcaacaggaatt
ggcgagaatcgccgattctcgccaccctaagttggccatgctctgtctttgcccgctt
accccgcagtgtgtgtcccacaagataacctgctcgagaccgtaattgcaccgccc
tcgagcgccttaacgcccagaagtgttataactggaccattcatatcctccaact
cggcgccccctgtggaacaaccaacctttgagcgcccagctcagctccctcaccgtc
atatcaggcgcacgaggtctttctcccatcttctctgcatggatccttacaagtcgg
ccctcaagcgtttcaattctctttctggactacgaactccgggtgctcctgtttgaa
taataactctccctaaccgttgatctcgagatccagttctagttgaggactatcatct
ggcgggaaactaccaactctgatagagaaggtaccagagttggtcttcatgctag
ggcgccaccgcaaaggaactctgtgtccctctgatatggaacaacatactctcc
Atggcctcgttgaccagaggtctagttaccacaccgggtcatttgcggtacaccactg
ttataacaaggctggaagcctggaaccttgaggtatcgctgtggttatggagaggagt
Tgtgctcgagagaggggaaattcacttggttgaagcaagtccacctcccttctcc
gtggtggaatgaagttccggacatggtctatgctttggagcggaaagccgcaggcaaca
ttcaggtgcttgaggatccattgcttctactaccatccagccatgctactaaagt
tcaccttatgactcaattatcggtattcccacaagattacaggcacatggatggttca
ggtgtcaatacatatggtgatcaaaaagctggcaaagctcactacgtgaagttccat
tggaaccaactgtggagtcaagctcttttggaaagatgcaattcgtcttggagga
accaaccacagtcagcactcaagactgtatggctctatagcagctggcatccccgcc
gactggaaccgccacatgccgacgaggatccgggggtgcacacgtacacgctcgtttt
agccgcttccggcaccgtcactggcgtcaagatatttccactggcggccccacctgc
ggcgtgcgctcgtgaatatagaaatggacgacgttttactggaaatggacattatcg
ttggaacctggataagttgtcacagttgtatgacttcaaatgttgggtcactcaaaat
ctaaagttatgtatftatgttactcagagtcaccgtctgttcgaaactttgggtgctc
ccagtgaatggacacacagaatctcaaatccaatattcatcactgattcatgaattc
agtcatcagggatgaggattatttactttgttgcctaatatgttcgtggatctcatcg
caagcgttcccatttctgcagatgtgcaaatgtaagcgttggaaaaggatgtttgt
ttaggagaacaactttatgcaacttgaaagactttttcattttgttataatacagga
agagcatttatccgccgatcgttgaatgccctatcagaccacgtgcacctatggtat
tcgagcatctgaatgtcatacggactccaggcgtgtatgtctatgtcgaatgccgcc
aactcgttgagatgttacaataagcatccgtaggcagtgccagcaactcttgaggtag
ggacaagagatcaaagttgcgataataaatcttcatcatgtgaggatcttctgtgctaa
attgtttataattagtatctgtttaaagacaaaattggaagcccttgacatgttgtt
gccatgtaataagctctcgttgtatgtcgaaaagacagaactcgtctcaaaacaacatc
gacactgcattcatggttaaaaaaaaaa
```

4.4.3. CAT domeyn organizasyonu

Korunmuş domeyn analizine göre CAT geninin kodladığı tahmini proteininde katalaz gen ailesine ait olan iki farklı okuma çerçevesi bulunmuştur.



Şekil 4. 9. CAT genine ait Domeyn Organizasyonu

4.4.4. CAT protein parametreleri

Nükleotid düzeyinde genin karakterizasyonuna yönelik analizlere ek olarak genin amino asit dizisi ise ExPASy Tools veritabanı yardımıyla saptanmıştır. Açık okuma çerçevesindeki nükleotid dizilerinin amino asit dizisine dönüştürülmesi sonucunda 496 amino asit uzunluğunda amino asit zinciri belirlenmiş ve çizelge 4.4 de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 4. Kabarla çilek çeşidinden izole edilen CAT geninin nükleotid ve tahmini aminoasit sekansları

10	20	30	40	50	60
MDPYKSRPSS	AFNSPFWTTN	SGAPVWNNNS	SLTVGSRDPV	LVEDYHLAEK	
LTNSDREGYP					
70	80	90	100	110	120
ELVLHARGAT	AKELSGVPPD	MEQHTPPWPR	WTQRSSYHTG	SFAVHHCYQQ	
GWKPWNLEVS					
130	140	150	160	170	180
LWLWRGVVLE	RGEISLGWKQ	VPPFPWWN	EVPGHGLCFG	AEAAGKHSGG	
LRIHWLPTHH					
190	200	210	220	230	240
PAMLLKFTFM	TQLSGIPTRL	QAHGWFRCQY	IHVDQQSWQS	SLREVPLETN	
LWSQVSFGRR					
250	260	270	280	290	300
CNSSWRNQPQ	SCDSRLVWLY	SSWHPRRLEP	PHADEGSGVH	TYTLVFEPLA	
GTVTWRQDII					
310	320	330	340	350	360
PLAPHLRRAL	AEYRNGRRFY	WKWTLCVGTW	ISCHSCMTFK	CWVTSKSKVM	
YLCYSESPSC					

Çizelge 4.4. Kabarla çilek çeşidinden izole edilen CAT geninin nükleotid ve tahmini aminoasit sekansları (Devamı)

370	380	390	400	410	420
SKLLGAPSEW	THRISQFQYS	SLIHEFQCIR	DEDYLLCCQI	CSWISSQALP	ISCRCAKCKR
430	440	450	460	470	480
WKKDVCLGEQ	LYATWKDFFI	FVIIQARAIY	PIVECPIRP	TCHPCYSQHL	NVIRTPGVYM
490	SMSNAANSLR CYNKHP				

CAT geninin tam uzunluktaki tahmini protein dizisinde kodlanan amino asitlerin sayısı ve yüzdesi Çizelge 4.5’de verilmiştir. En yüksek oranda bulunan aminoasitlerin serin, lösin, prolin, arginin, olduğu ve sırasıyla 9.9%, 8.5%, 7.9%, 6.5% oranlarında bulunduğu belirlenmiştir. CATgeninin kodladığı proteinde en az oranda temsil edilen amino asit ise pyrolösin ve selenosistein olup temsil oranı %0 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4. 5. CAT geninin tam uzunluktaki tahmini protein dizisinde kodlanan amino asitlerin sayısı ve yüzdesi

Amino asit	Zincirde bulunma sayısı	Bulunma yüzdesi
Ala (A)	25	5.0%
Arg (R)	32	6.5%
Asn (N)	16	3.2%
Asp (D)	13	2.6%
Cys (C)	23	4.6%
Gln (Q)	23	4.6%
Glu (E)	23	4.6%
Gly (G)	27	5.4%
His (H)	23	4.6%
Ile (I)	20	4.0%
Leu (L)	42	8.5%
Lys (K)	18	3.6%
Met (M)	8	1.6%
Phe (F)	17	3.4%
Pro (P)	39	7.9%

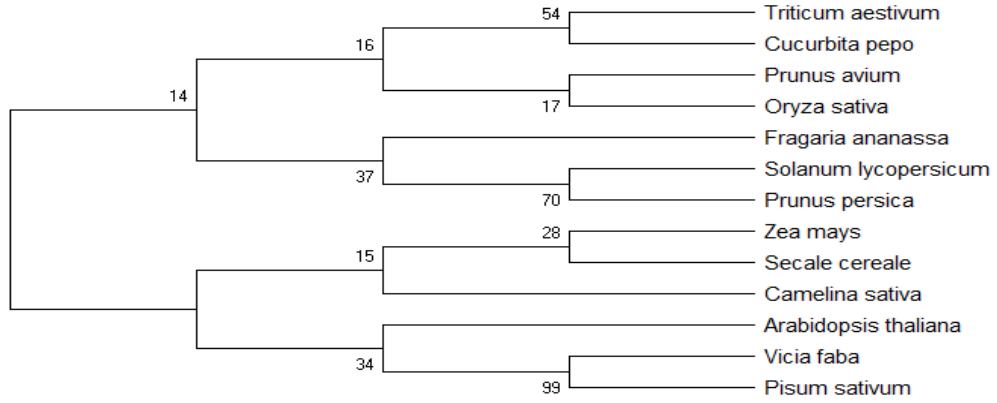
Çizelge 4.5. CAT geninin tam uzunluktaki tahmini protein dizisinde kodlanan amino asitlerin sayısı ve yüzdesi (Devamı)

Ser (S)	49	9.9%
Thr (T)	25	5.0%
Trp (W)	27	5.4%
Tyr (Y)	19	3.8%
Val (V)	27	5.4%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec	0	0.0%

CAT geni 496 amino asitlik bir proteinin kodlayan bir ORF'den (open reading frame) oluştuğu ortaya konulmuştur. Bu gene ait 5' ve 3' kodlamayan sekanslarının sırasıyla 119 ve 61 nükleotidden meydana geldiği belirlenmiştir (Çizelge 4.5.). CAT teorik olarak yaklaşık 57359.55 kDa moleküler ağırlığa ve 8.91 pI değerine sahiptir. Ayrıca CAT 36 adet negatif yüklü ve 50 adet pozitif yüklü amino asitten oluşan hidrofobik bir proteindir. Proteinin GRAVY (Grand average of hydropathicityindex) değeri-0.405 olarak hesaplanmıştır.

4.4.5. Katalaz geninin filogenetik ilişkisi

Kabarla'dan izole edilen CAT geninin filogenetik ağacını oluşturmak için yaklaşık 100 farklı CAT geni gen bankasının veri tabanında karşılaştırılmış ve %98-70 benzerlik oranları saptanmıştır. Neighbor-Joining (N-J) temelinde gerçekleştirdiğimiz filogenetik analizlere göre 13 dizi iki ana gruptan oluşmuştur ve bu ana gruplarda kendi aralarında alt gruplara ayrılmıştır. İlk ana grupta *Triticum aestivum*, *Cucurbita pepo*, *Prunus avium*, *Oryza sativa*, *Fragaria ananassa*, *Solanum lycopersicum* ve *Prunus persica* bulunurken, diğer ana grupta *Zea mays*, *Secale cereale*, *Camelina sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Vicia faba* ve *Pisum sativum* yer almıştır. *Fragaria ananassa* ile en yüksek benzerliği gösteren *Solanum Lycopersicum* ve *Prunus persica* olmuştur ve bu çeşitler aynı alt grup içerisinde yer almışlardır.



Şekil 4. 10. CAT Geninin Filogenetik Haritası

4.5. SOD Geninin Moleküler Karakterizasyonu

4.5.1. SOD genine ait nükleotid analizleri

3'-5' RACE reaksiyonları sonucunda SOD genine ait tam uzunluk cDNA nükleotid uzunluğu 381 nükleotid olarak belirlenmiştir. Nükleotid dizisinde Metionin ve ona benzer işaretli kısımlar başlama kodonunu göstermektedir. Kırmızı renk ile işaretli bölge açık okuma çerçevesini göstermektedir. Bu dizide 5'-UTR (translasyona uğramayan bölge) 21 baz çifti (bç), protein kodlama bölgesi 317 bç, 3'-UTR bölgesi 43 baz çiftinden oluşmuştur.

Çizelge 4. 6. SOD genine ait tam uzunluktaki protein dizisi

EF Stop SFSRICHIFLSLCFLIEAREKMQGRNSLYFDFCD
L VYKNPCWKVKKKEEIKTRIGKPYQISFWISLFTTERG
RHSVA AKLCEGCC IYSNVCWEITYLEFVLVLPFRFSY
TWSLLALLVSIFQLRIC M GDFYDS M KEAQFDLFYFLF
LILV M Y Y V F F D R S S E T A I E S F Y S E L I I Y R M C F V T M L S Y
LINSFLLYWFSGPTNGLHVHACDRKHYWPQAWASWF
RHVHVHAIAWIHYA WCLICCSWSTKT VIFWQC VLD
YKYGLLTKTYWRSLWEQACFTIVATFGGFWFLEIFQL
R M L I E S R R F G H F G L L H G F Y D L G T Q L E F A I G P T D Q R M C
F V T R T E Stop I I H L A I P I Y L A N K Stop S L L T D V Stop I Stop D L V
Q E H Y S A V Stop L F D S N V C S C Y W Y S F V E K K

Kabarla çilek çeşidinden SOD geni ile ilgili elde edilen dizi sonuçları Gen Bankasında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLASTn programında taranmıştır. Nükleotid

seviyesinde yapılan homoloji araştırmasına göre SOD geni farklı türlerde ve genlerde yüksek oranda benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4. 7. SOD geninin diğer genlere olan benzerlik yüzdesi

Gen (Nükleotid)	Benzerlik(%)
Fragaria vesca subsp. Vesca superoxidedismutase [Cu-Zn] 4AP (LOC101312093), Mrna	98%
Fragaria vesca subsp. Vesca superoxidedismutase [Cu-Zn] (LOC101307336), Mrna	97%
Fragaria vesca subsp. Vescasu peroxidedismutase [Mn], mitochondrial (LOC101302593), mRNA	96%
<u>Camellia sinensis Cu/Zn superoxide dismutase mRNA, partialcds</u>	93%
Rosa chinensis superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC112191514), Mrna	90%
Prunus avium superoxide dismutase [Cu-Zn] 1 (LOC110759755), Mrna	88%
Prunus persica superoxidedismutase [Cu-Zn] (LOC18772363), transcriptvariant X3, misc_RNA	88%

4.5.2. SOD geninin tam nükleotid sekansı

Çizelge 4. 8. SOD genine ait tam nükleotid sekans bilgileri

<p>GaattctagagttttccagaatctgcattatTTTTctatctctgtgtttttgatcgaagctagagaaaaaatgcagggaag gaattcattgtatttcgatttttgatcttgtgtac aagaaccatctgtaaagtaaaaaagaagaataaaaaaccggattggcaagc ttaccagattagcttctggatttctcttttactacggagcgtgggaggcattcagtagc ggctaaactatgtgagggtgtgtatctattccaatgtttgctgggaataacttatct tgagtttcttggctcctccctccccgctttcatacctggagtttggcgttgc tttggttctattttccaattgagaatctgtatgggtgattttatgatagatgaa agaggcacagtttgatttcttttactttttatttttaatttggttatgtactatgtgt ttttgatcgaagtagtgaaccgcaattgaatcttttactctgaactgatcattaca ggatgtgtttgttactatgctgtcgtattgattaactcgttttgcattattggttt caggccaactaatgggttacatgttcatgctgtgaccggaacattactggcctcaag cctgggctcatggttcgacatgttcatgttcatgctattgcttgattcattatgctt ggtgtctgctaactgttgttcttggagtacaaaacggtaatttttgcaatgcgttt tgattataaatatgggctcttgacaaagacttactggagaagcttgggaacaggctt gcttcacaattgtgctacattggcggcttttggttctggaaatttccaattgagaa tgtaattgaaagtcgtcgttttggcactttgggttctttgcacggttttatgatc tggggacacagctggaattgcaataggtcctactgatcaaggatgtg ttttgttactagaacggaataataatacatttggcaataccatatacttgg ctaacaaatgaagccttctcactgatgtatgaatatgagacttagtacaagagcattatt ccgctgtgtagttgtttgacagtaaatgtgttcatgctattggtactcttttgtg aaaaaaaaa</p>

4.5.3. SOD geninin protein parametreleri

Nükleotid düzeyinde genin karakterizasyonuna yönelik analizlere ek olarak genin amino asit dizisi ise ExPASy Tools veritabanı yardımıyla saptanmıştır. Açık okuma çerçevesindeki nükleotid dizilerinin aminoasit dizisine dönüştürülmesi sonucunda 317 aminoasit uzunluğunda amino asit zinciri belirlenmiş ve çizelge 4.9' de verilmiştir.

Çizelge 4. 9. Kabarla'dan izole edilen SOD genine ait amino asit sekansı

10	20	30	40	50	60
MQGRNSLYFD	FCDLVYKNPC	WKVKKKEEIK	TRIGKPYQIS	FWISLFTTER	GRHSVAAKLC
70	80	90	100	110	120
EGCCIYSNVC	WEITYLEFVL	VLPPRFSYTW	SLLALLLSI	FQLRICMGDF	YDSMKEAQFD
130	140	150	160	170	180
LFYFLFLILV	MYVFFDRSS	ETAIESFYSE	LIIYRMCFVT	MLSYLINSFL	LYWFSGPTNG
190	200	210	220	230	240
LHVHACDRKH	YWPQAWASWF	RHVHVHAIWA	IHYAWCLLIC	CSWSTKTVIF	WQCVLDYKYG
250	260	270	280	290	300
LLTKTYWRSI	WEQACFTIVA	TFGGFWFLEI	FQLRMLIESR	RFGHFGLLLH	GFYDLGTQLE
310					
FAIGPTDQRM	CFVTRTE				

SOD geninin tam uzunluktaki tahmini protein dizisinde kodlanan amino asitlerin sayısı ve yüzdesi Çizelge 4.10'de verilmiştir. En yüksek oranda bulunan aminoasitlerin lösin, fenilalanin, izölösin, serin olduğu ve sırasıyla 11.7%, 9.5%, 6.6%, 6.6% oranlarında bulunduğu belirlenmiştir. SOD geninin kodladığı proteinde en az oranda temsil edilen amino asit ise pyrolösin ve selenosisteinolup temsil oranı %0 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4. 10. SOD geninin tam uzunluktaki tahmini protein dizisinde kodlanan amino asitlerin sayısı ve yüzdesi

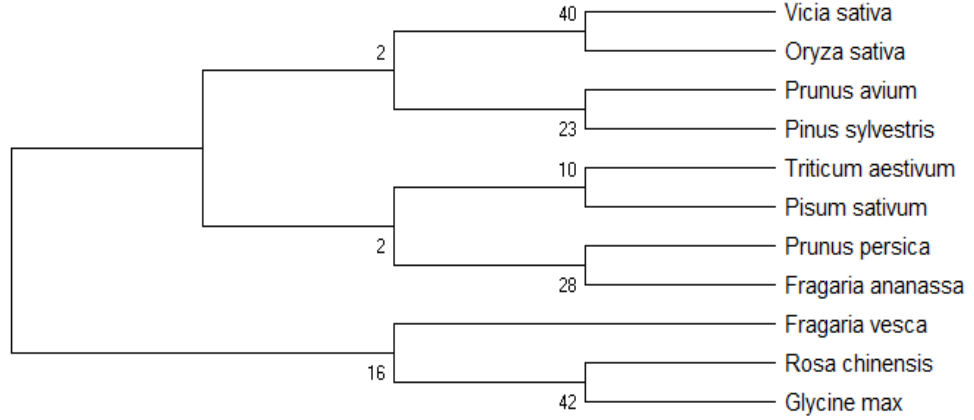
Amino asit	Zincirde bulunma sayısı	Bulunma
Ala (A)	14	4.4%
Arg (R)	16	5.0%
Asn (N)	5	1.6%
Asp (D)	10	3.2%
Cys (C)	15	4.7%
Gln (Q)	10	3.2%
Glu (E)	15	4.7%
Gly (G)	15	4.7%
His (H)	10	3.2%
Ile (I)	21	6.6%
Leu (L)	37	11.7%
Lys (K)	13	4.1%
Met(M)	8	2.5%
Phe (F)	30	9.5%
Pro (P)	7	2.2%
Ser (S)	21	6.6%
Thr (T)	18	5.7%
Trp(W)	15	4.7%
Tyr (Y)	20	6.3%
Val (V)	17	5.4%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

SOD 317 amino asitlik ORF'yi (openreadingframe) kodlayan bir proteinden oluştuğu ortaya konulmuştur. Bu gene ait 5' ve 3' kodlamayan sekanslarının sırasıyla 21 ve 43 nükleotidden meydana geldiği belirlenmiştir. SOD teorik olarak yaklaşık 37990.50 kDa moleküler ağırlığa ve 8.29 pI değerine sahiptir. Ayrıca SOD 25 adet negatif yüklü ve 29 adet pozitif yüklü amino asitten oluşan hidrofobik bir proteindir. Proteinin GRAVY (Grand average of hydropathicityindex) değeri 0.276 olarak hesaplanmıştır. GRAVY değeri sıfırdan küçük olmadığı için proteinin genel olarak hidrofilik karakterde bir protein olmadığı belirlenmiştir.

4.5.4. SOD geninin filogenetik ilişkisi

Kabarla'dan izole edilen SOD geninin diğer türlerden izole edilen SOD genleri ile filogenetik ilişkisini oluşturabilmek için gen bankasının veri tabanında bulunan yaklaşık 100 farklı SOD geni gen bankasının veri tabanında karşılaştırılmış %98-88 benzerlik oranı vardır. Neighbor-

Joining (N-J) temelinde gerçekleştirdiğimiz filogenetik analizlere göre 11 dizi iki ayna grupta toplanmıştır ve *Fragaria ananassa* ile en yüksek benzerliği gösteren *Prunus persica* olurken onu takip eden *pisum sativum*, *triticum aestivum*, *pinus sylvestris*, *Prunus avium*, *oryza sativa*, *vicia sativa* olmuştur. Diğer alt kümede bulunan; *fragariavesca*, *rosa chinensis*, *gycine max.* daha az benzerlik göstermiştir.



Şekil 4. 11. SOD Geninin Filogenetik Haritası

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Oksidatif hasarı engellemek için ökaryotik hücreler sitoplazma, mitokondri ve kloroplastta dağılmış çeşitli antioksidan ajanlar bulunmaktadır. CAT ve SOD hücreleri oksidatif strese karşı koruyan birer antioksidan enzimdir (Nishiyama vd., 2017). CAT, hidrojen peroksidi oksijene ve suya indirgeyerek aerobik organizmaları oksidatif hasara karşı koruyan, atmosfere maruz kalan hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunan önemli bir antioksidan enzimdir. CAT mRNA'ları birçok türden klonlanmış ve oksidatif stresin yararlı biyo belirteçleri olarak kullanılmıştır (Zhang vd., 2018). Antioksidan savunma sisteminin bir yan ürünü olan SOD süperoksitin hidrojen peroksit ve oksijene ayrışmasını katalize ederek aerobik organizmaları oksidatif hasardan koruyabilir. SOD aşırı reaktif oksijen türlerini (ROS) elimine etmek ve bağışıklık sisteminin redoks dengesini korumak için organizmaları koruma yeteneğindedir (Wu vd., 2017). Bu çalışmada Kabarla çilek çeşidindeki antioksidan açısından zengin CAT ve SOD genlerinden izolasyon ve karakterizasyonlarını yapılması amaçlanmıştır.

Katalaz (CAT), hidrojen peroksitin oksijene ve suya indirgenmesiyle oksidatif hasara karşı hücrel korumada önemli rol oynayan antioksidan enzimidir. Yapılan bir çalışmada; *Chilo suppressalis*'den (CsCAT) tam uzunlukta bir CAT cDNA'sını klonlanmış, karakterize edilmiş ve çevresel streslerin CsCAT ekspresyonu ve enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. 553 amino asitlik bir açık okuma çerçevesi bulunduğu ve polipeptidini kodlayan 1659-bp'lik bir uzunluğa sahip olduğu tespit edilmiştir (Bai v., 2017).

CAT'ın *Heortia vitessoides Moore* da rolünü açıklamak için *Aquilariasinensis* (Loureiro) sprenger ormanlarında en yıkıcı zararlılardan biri olan yetişkin *H. vitessoides*'in transkriptomunda bir CAT geni (HvCAT) tanımlanmıştır. Dizi analizleri sonucunda HvCAT'ın, 507 amino asit içeren bir proteini kodladığı tespit edilmiştir (Cheng vd., 2018).

Bir başka çalışmada, CAT geninin cDNA sekansını, RACE metodu ile tatlı su planaryası *Dugesia japonica*'dan (DjCAT olarak adlandırılmıştır) klonlanmıştır. Dizi

analizi sonucunda tam uzunlukta cDNA dizisinin, 506 amino asidi kodlayan 1734 nükleotitten oluştuğu tespit edilmiştir (Zhang vd., 2018)

Zostera marina'da CAT geni cDNA dizilimi, EST analizi ve RACE ile tanımlanmıştır. ZmCATgeninin nükleotit sekansı, bilinen diğer bitki CAT'lerine önemli homolojiye sahip 477 amino asit kodlayan açık okuma çerçevesi (ORF), 1.434 bp ile 1.816 bp'den oluştuğu tespit edilmiştir (Zang vd., 2018).

Locusta migratoria kaynaklı katalaz genini (LmCAT) kodlayan tam uzunlukta bir cDNA (1524bp) klonlanmıştır. LmCAT geninin 507 amino asidi kodlayan açık okuma çerçevesi, ve diğer böcek CAT'leriyle %57.8-%97.8 benzerlik olduğunu tespit edilmiştir (Zhang vd.,2016).

Önemli bir antioksidan enzim olan süperoksit dismutaz (SOD), süperoksitin hidrojen peroksit ve oksijene ayrışmasını katalize ederek aerobik organizmaları oksidatif hasardan koruyabilir. SOD'ler bazı türlerde klonlanmış ve çevresel strese karşı tepki olarak dinamik ekspresyonu veya enzimatik aktiviteleri incelenmiştir. Yapılan çalışmada tatlı su planaryan *Dugesia japonica* 'dan iki SOD'nin tam uzunlukta cDNA'sı ilk önce klonlanmıştır (sırasıyla DjCuZnSOD ve DjMnSOD olarak adlandırılmıştır). DjCuZnSOD'un cDNA'sı 186 amino asidi kodlayan 661 nükleotitten, bpDjMnSOD geninin 226 amino asidi kodlayan ve 765 nükleotidden oluşan kalıntının bir polipeptidini kodladığı belirtilmiştir (Zhang vd., 2019).

CpMnSOD olarak belirtilen *C. plicata*'nın MnSOD cDNA'sı hemositlerden klonlanmıştır. MnSOD'un tam uzunlukta cDNA'sı 223 amino asidi kodlayan 672 bp ile 1096 bp bir açık okuma çerçevesi olduğu tespit edilmiştir. CpMnSOD geninin dizi benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir (Yang vd., 2019).

Apostichopus japonicus (AjSOD1) ile yapılan; Cu/Zn SOD dağılımı ve biyolojik işlevi ilk olarak tanımlanmıştır. AjSOD1 cDNA'nın uzunluğu 1219 bp olduğu ve molekül ağırlığı 15.47kDa olan ve tahmini bir izoelektrik noktası 5.65 olan ve 152 amino asitlik bir proteini kodlayan 459 bp'lik bir açık okuma çerçevesi (ORF) içerdiği tespit edilmiştir (Wang vd., 2019).

Mytilus coruscus'tan Cu / Zn-SOD ve Mn-SOD'un bütün açık okuma çerçeveleri (ORF'ler) (McSOD ve MnSOD olarak adlandırılmıştır) homolog klonlama ile tanımlanmıştır. Dizi uzunlukları sırasıyla 157 ve 228 amino asidi kodlayan 474bp ve 687bp olduğu belirtilmiştir (Wu vd., 2017).

Bir başka çalışmada *dinoflagellate Prorocentrum*'dan yeni bir SOD geni (PmCuZnSOD) tanımlanmış ve yapısal özelliklerini, varsayılan kökenini ve gen ekspresyonu incelenmiştir. Dinoflagellate SOD geninin, 714-bp ORF (237 aa) dizisi ve 895bp uzunluğu poli (A) kuyruğu içerdiği belirtilmiştir (Abassi vd., 2019).

Zencefil (*Zingiber officinale*), antioksidan özellikleri ile bilinir, ancak, zencefil rizomlarından SOD geni hakkında çalışmalar mevcut olmadığı ve bu çalışma ile *Z. officinale* (Zo-SOD) rizomundan SOD geni saflaştırılmış ve N terminal dizilimi, amino asit analizi ve spektrometrisi ile ve ayrıca de novo dizileme yöntemleri kullanarak tam amino asit dizisini belirlenmiştir. Zo-SOD geni; Cu/Zn-SOD motifine sahip 151 amino asitten oluştuğu ve diğer Cu/Zn-SOD bitkileri ile yüksek benzerliğe sahip olduğu tespit edilmiştir (İshiyama vd., 2017).

Bazı çeşitlerde CAT ve SOD genlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmış olsa da birçok çeşitte bu genler araştırılmamıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda CAT ve SOD genlerinin bitkilerin abiyotik ve biyotik streslerle başa çıkması açısından oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında da ilk defa Kabarla çilek çeşidinden izole edilen ve antioksidan açısından zengin, moleküler olarak karakterize edilen CAT ve SOD genleri izole edilmiştir. Bu sayede CAT ve SOD genlerine ait tüm nükleotid ve sekans bilgilerine ulaşılmıştır. Elde edilen genlerin sekansları gen bankasında yer alması araştırmacılar tarafından farklı amaçlar için kullanılabilirliği söz konusu olabilecektir.

6. KAYNAKÇA

- Abdel-Maksoud, A., H. Mohammed, A., H. Raafat, R. M. & Hanan, T. Z. (2015). Cranberry Extract Enhance antioxidant Potential in Ehrlich's Ascites Carcinoma-Bearing Female Albino Mice. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 484-491.
- Aghdam, M. S. & Fard, J. R. (2017). Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (*Fragaria × anannasa cv. Selva*) by enhancing GABA shunt activity. *Food chemistry*, 221, 1650-1657. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.123>
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Asghari, M. & Hasanlooe, A. R. (2016). Methyl jasmonate effectively enhanced some defense enzymes activity and Total Antioxidant content in harvested "Sabrosa" strawberry fruit. *Food science & nutrition*, 4(3), 377-383. <https://doi.org/10.1002/fsn3.300>
- Aydoğan, Y. (2003). *Çilek üretiminde solarizasyon uygulamalarına yönelik alternatif mekanizasyon zincirinin ve ekipmanının belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi).
- Bauer, G. & Motz, M. (2016). The antitumor effect of single-domain antibodies directed towards membrane-associated catalase and superoxide dismutase. *Anticancer research*, 36(11), 5945-5956. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11182>
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S. & Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69(2). <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2012.40316>
- Chen, X. R., Brurberg, M. B., Elameen, A., Klemsdal, S. S. & Martinussen, I. (2016). Expression of resistance gene analogs in woodland strawberry (*Fragaria vesca*) during infection with *Phytophthora cactorum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(5), 1967-1978. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1232-x>
- Cheng, J., Wang, C. Y., Lyu, Z. H., Chen, J. X. & Lin, T. (2018). Identification and characterization of the catalase gene involved in resistance to thermal stress in *Heortia vitessoides* using RNA interference. *Journal of thermal biology*, 78, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.169>
- Demirsoy, L., Öztürk, A. & Serçe, S. (2012). Çileklerde (*Fragaria*) Çiçeklenme ile Fotoperiyot Arasındaki İlişkiler. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 27(2), 110-119. <https://doi.org/10.7161/anajas.2012.272.110>

- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(13), 39-40. <https://doi.org/10.4236/ijoc.2019.92009>
- Efil, L. (2018). Çanakkale İli Çilek Alanlarında Yeni Bir Zararlı *Drosophila suzukii* (Matsumura)(Diptera: Drosophilidae)'nin Yayılış Alanları ve Bulaşıklılığı. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(3), 280-284.
- Eken A, Bakır E, Baldemiş A, Cantürk F. & Yay A. (2017). Effect of *Laurocerasus officinalis* Roem. (Cherry Laurel) Fruit on Dimethoate Induced Hepatotoxicity in Rats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23 (5): 779-787. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2011.3635>
- Ertekin Filiz, B. & Seydim, A. C. (2014). Bazı Kurutulmuş Meyvelerin Antioksidan Özellikleri. *Türk Tarım Gıda Bilim Teknoloji Dergisi*, 2(3), 128-131.
- Hall, T. 2004. BioEdit version 7.0.0. Erişim Tarihi: 11.02.2019. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.
- Huang, W. Y., Zhang, H. C., Liu, W. X. & Li, C. Y. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science*, 13(2), 94-102. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1100137>
- Ibrahim, D. S. & Abd El-Maksoud, M. A. (2015). Effect of strawberry (*Fragaria × ananassa*) leaf extract on diabetic nephropathy in rats. *International Journal of Experimental Pathology*, 96(2), 87-93. <https://doi.org/10.1111/iep.12116>
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1998). Multiple Sequence Alignment with Clustal X, *Trends in Biochemistry Sciences*, 23(10), 403-405.
- Jun-jie, G., Ai-guo, Q. & Xian-chang, Y. (2009). Effects of grafting on cucumber leaf SOD and CAT gene expression and activities under low temperature stress. *Yingyong Shengtai Xuebao*, 20(1).
- Karabulut, H. & Gülay, M. Ş.(2009). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.
- Karakaya, M., Öztürk, B., İslam, A., Karakaya, O., Kaçar, E., Turga, E. & Gün, S. (2015). Ordu ekolojik koşullarında yetiştirilen bazı çilek çeşitlerinin meyve kalite özellikleri. VII. *Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, 25-29 Ağustos, Çanakkale, 25-29.
- Karakurt, Y. & Huber, D. J. (2004). Ethylene-induced gene expression, enzyme activities, and water soaking in immature and ripe watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit. *Journal of plant physiology*, 161(4), 381-388. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01221>

- Kasnak, C. & Palamutoğlu, R. (2015). Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 3(5), 226-234. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v3i5.226-234.171>
- Koca, N. & Karadeniz, F. (2003). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 16, 32-37.
- Lu, Y., Bai, Q., Zheng, X. & Lu, Z. (2017). Expression and enzyme activity of catalase in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) is responsive to environmental stresses. *Journal of economic entomology*, 110(4), 1803-1812. <https://doi.org/10.1093/jee/tox117>
- Merchante, C., Vallarino, J. G., Osorio, S., Aragüez, I., Villarreal, N., Ariza, M. T. & Botella, M. A. (2013). Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. *Journal of experimental botany*, 64(14), 4421-4439. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert257>
- Moyano, E., Martínez-Rivas, F. J., Blanco-Portales, R., Molina-Hidalgo, F. J., Ric-Varas, P., Matas-Arroyo, A. J., Rodríguez-Franco, A., Muñoz-Blanco, J. & Rodríguez-Franco, A. (2018). Genome-wide analysis of the NAC transcription factor family and their expression during the development and ripening of the *Fragaria* × *ananassa* fruits. *PloS one*, 13(5), e0196953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196953>
- Muradoglu, F., Gundogdu, M., Ercisli, S., Encu, T., Balta, F., Jaafar, H. Z. & Zia-Ul-Haq, M. (2015). Cadmium toxicity affects chlorophyll a and b content, antioxidant enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry. *Biological research*, 48(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0001-3>
- Nicholas, K.B. & Nicholas, H.B. (1997). GenDoc: A Tool for Editing and Annotating Multiple Alignments. *Embnet News*, 4, 14.
- Nishiyama, Y., Fukamizo, T., Yoneda, K. & Araki, T. (2017). Complete amino acid sequence of a copper/zinc-superoxide dismutase from ginger rhizome. *The protein journal*, 36(2), 98-107. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9700-7>
- Oviedo-Solís, C. I., Sandoval-Salazar, C., Lozoya-Gloria, E., Maldonado-Aguilera, G. A., Aguilar-Zavala, H., Beltrán-Campos, V., Pérez-Vázquez V. & Ramírez-Emiliano, J. (2017). Ultraviolet light-C increases antioxidant capacity of the strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) in vitro and in high-fat diet-induced obese rats. *Food science & nutrition*, 5(5), 1004-1014. <https://doi.org/10.1002/fsn3.487>
- Özbahçali, G. & Aslantaş, R. (2014). *Bazı Çilek Çeşitleri (Fragaria X Ananassa Duch.)'nin Erzurum Ekolojisindeki Performanslarının Belirlenmesi.* (Yüksek Lisans Tezi, Erzurum Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı).

- Özgüven, A. I. & Yılmaz, C. (2009). Bazı çilek çeşitlerinin Adana ekolojik koşullarındaki morfolojik ve pomolojik özellikleri. *alatarım*, 17.
- Özkan, Ş. (2014). 2012-2013 Yıllarında Türkiye'nin Akdeniz Bölgesinde Gelişmekte Olan "Topraksız" Tarım Ürünlerinin Bugünkü Durumu ve Gelecekte İlgili Tahminler: "Domates ve Çilek" Üretimi Üzerine Bir Araştırma (Yüksek Lisans Tezi, Giresun Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İktisat Anabilim Dalı).
- Öztürk Erdem, S. & Çekiç, Ç. (2017). Geçmişten Günümüze Çilek Islahı. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 6(3), 105-115.
- Rahman, M., Mukta, J. A., Sabir, A. A., Gupta, D. R., Mohi-Ud-Din, M., Hasanuzzaman, M., Miah M., Rahman M. & Islam, M. T. (2018). Chitosan biopolymer promotes yield and stimulates accumulation of antioxidants in strawberry fruit. *PLoS one*, 13(9), e0203769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203769>. eCollection
- Rahman, M., Sabir, A. A., Mukta, J. A., Khan, M. M. A., Mohi-Ud-Din, M., Miah, M. G., Rahman M. & Islam, M. T. (2018). Plant probiotic bacteria Bacillus and Paraburkholderia improve growth, yield and content of antioxidants in strawberry fruit. *Scientific reports*, 8(1), 2504. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20235-1>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Singh, S. & Singh, R. P. (2008). In vitro methods of assay of antioxidants: an overview. *Food reviews international*, 24(4), 392-415.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T. & Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 24673-24706. <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- Song, C., Ring L., Hoffmann, T., Huang, FC., Slovin, J. & Schwab W. (2015). *Biosynthesis of Acylphloroglucinol Glucosides in Strawberry Fruit* (Doctoral dissertation, Technische Universität München).
- Spanou, C. I., Veskoukis, A. S., Stagos, D., Liadaki, K., Aligiannis, N., Angelis, A., Al, S., Anastasiada M., Sa, H. & Kouretas, D. (2012). Effects of Greek legume plant extracts on xanthine oxidase, catalase and superoxide dismutase activities. *Journal of physiology and biochemistry*, 68(1), 37-45. <https://doi.org/10.1007/s13105-011-0117-z>
- Stothard, P. (2000). The Sequence Manipulation Suite: Javascript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. *BioTechniques*, 28(6), 1102-1104. <https://doi.org/10.2144/00286ir01>

- Strommer, J., Gregerson, R. & Vayda, M. (1993). Isolation and Characterization of Plant mRNA. Glick, B.R., Thompson, J.E. (Ed.), In *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* (49-65), CRC Press, 382p, Boca Raton.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Wang, H., Abassi, S. & Ki, J. S. (2019). Origin and roles of a novel copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) gene from the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Gene*, 683, 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.013>
- Wang, J., Song, J., Li, Y., Zhou, X., Zhang, X., Liu, T., Wang, L., Li, L. & Li, C. (2019). The distribution, expression of the Cu/Zn superoxide dismutase in *Apostichopus japonicus* and its function for sea cucumber immunity. *Fish & shellfish immunology*, 89, 745-752. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.009>
- Weydert, C. J. & Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*, 5(1), 51. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.197>
- Wu, J., Bao, M., Ge, D., Huo, L., Lv, Z., Chi, C., Liao Z. & Liu, H. (2017). The expression of superoxide dismutase in *Mytilus coruscus* under various stressors. *Fish & shellfish immunology*, 70, 361-371. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.018>
- Yang, W., Liu, W., Wen, C., Hu, B., Jian, S. & Gang, Y. (2019). A superoxide dismutase (MnSOD) with identification and functional characterization from the freshwater mussel *Cristaria plicata*. *Fish & shellfish immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.307>
- Yildiztekin, M., Tuna, A. L. & Kaya, C. (2018). Physiological effects of the brown seaweed (*Ascophyllum nodosum*) and humic substances on plant growth, enzyme activities of certain pepper plants grown under salt stress. *Acta Biologica Hungarica*, 69(3), 325-335. <https://doi.org/10.1556/018.68.2018.3.8>
- Yue-li, P. E. N. G., Xiu-feng, W. A. N. G., Piao-piao, L. I., Yu-rui, H. A. N. & Feng-juan, Y. A. N. G. (2014). Effects of different NO₃-concentrations on the growth and antioxidant enzyme systems of strawberry seedlings. *Yingyong Shengtai Xuebao*, 25(4).
- Zang, Y., Liu, J., Tang, X. X. & Zhou, B. (2018). Description of a *Zostera marina* catalase gene involved in responses to temperature stress. *PeerJ*, 6, e4532. <https://doi.org/10.7717/peerj.4532>

- Zhang, H. C., Ma, K. X., Yang, Y. J., Shi, C. Y., Chen, G. W. & Liu, D. Z. (2018). Molecular cloning, characterization, expression and enzyme activity of catalase from planarian *Dugesia japonica* in response to environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 165, 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.06.003>
- Zhang, H. C., Ma, K. X., Yang, Y. J., Shi, C. Y., Chen, G. W. & Liu, D. Z. (2019). CuZnSOD and MnSOD from freshwater planarian *Dugesia japonica*: cDNA cloning, mRNA expression and enzyme activity in response to environmental pollutants. *Aquatic Toxicology*, 208, 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.013>
- Zhang, X., Li, Y., Wang, J., Zhang, T., Li, T., Dong, W., Ma, E. & Zhang, J. (2016). Identification and characteristic analysis of the catalase gene from *Locusta migratoria*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 132, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.03.010>
- Zhao, H., Li, W., Zhao, X., Li, X., Yang, D., Ren, H. & Zhou, Y. (2017). Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) response to crude oil exposure in the polychaete *Perinereis aibuhitensis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 616-627. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7594-0>
- Zhu, X., Li, Q., Hu, J., Wang, M. & Li, X. (2015). Molecular cloning and characterization of spermine synthesis gene associated with cold tolerance in tea plant (*Camellia sinensis*). *Applied biochemistry and biotechnology*, 177(5), 1055-1068. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1796-7>
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909-950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Songül CARUS
Doğum Yeri ve Yılı : Patnos/1992
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : songulcarus35@hotmail.com

Taranmış
Fotoğraf
(3.5cm x 3cm)

Eğitim Durumu

Lise : Tire Şehit Albay İbrahim Karaoğlanoğlu Lisesi/2012
Lisans : ISUBU, Ziraat Fakültesi