

Soya Bitkisindeki Glutasyon Redüktaz Aktivitesi ve mRNA Seviyesinin Kuraklık Stresinde Salisilik Asit ile Değişimleri

*¹Esen Taşğın, ²Hayrunnisa Nadaroğlu, ³Ahmet Adıgüzel, ³M. Özkan Baltacı, ⁴Zeynep Sönmez

*¹Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, 25240 Erzurum, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, 25240 Erzurum, Türkiye

³Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 25240 Erzurum, Türkiye

⁴Atatürk Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Nano-Bilim ve Nano-Mühendislik Bölümü, Erzurum, Türkiye

Özet

Bu çalışma, kuraklık stresi ve salisilik asitin (SA) soya bitkisindeki etkilerini değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, su stresine maruz bırakılan soya bitkisindeki SA, reaktif oksijen türleri (ROS) ve glutasyon redüktaz (GR) enzimi arasındaki ilişki incelenmiştir. Soya fasulyesi (*Glycine max* L. cv.) bitkileri serada kum tepsilere ekilerek büyütülmüştür. İkinci yaprak tamamen çıktığında bitkilerin yarısı bir hafta süreyle kuraklığa maruz bırakılmıştır. Bir haftanın sonunda hem kontrol hemde kuraklık stres grupları SA (200 µmol/L) ile muamele edilmiş ve iki gün sonra tüm gruplardan kesimler alınmıştır. Kontrol, kontrol+SA, kuraklık, kuraklık+SA muameleli yapraklarda glutasyon redüktaz aktivitesi ve mRNA seviyeleri ölçülmüştür. Bu çalışmada, 200 µmol/L SA muamelesi kontrol şartlarında GR aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. Kuraklık muameleli yapraklarda, kontroller ile karşılaştırıldığında, GR enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Ancak su stresi altında SA muamelesi ile GR enzim aktivitesi önemli ölçüde azalmıştır. GR enzimini kodlayan genlerin transkripsiyon seviyeleri real-time PCR (Polimeraz zincirleme tepkimesi) kullanılarak ölçülmüştür. SA muamelesi kuraklığa maruz kalan soya yapraklarının GR-RNA seviyelerini hızlı bir şekilde azaltmıştır.

Anahtar kelimeler: Glutasyon redüktaz, kuraklık, salisilik asit, soya

Abstract

This study was carried to evaluate the effect of drought stress and salicylic acid (SA) treatments in soybean plants. Soybean (*Glycinemax* L. cv.) plants were grown to sown in trays of sand in greenhouse. When the second leaf was fully expanded, half of the plants were exposed to drought stress for one week. At the end of one week, half of the plants in the both control and drought stress groups were treated with SA (200 µmol/L) and two days later was taken cuttings from the whole. The activities of glutathione reductase (GR) and levels of mRNA have been measured in control, control-SA treatment, drought treatment and drought-SA treatment leaves. In this study, 200 µmol/L SA treatment significantly has been increased GR activity in control conditions. Drought treated leaves have been observed elevated in the activities of the GR enzyme, compared to controls. But, under medium water deficit, GR activity significantly reducing with SA treatment. The transcript levels of the genes encoding GR enzyme have been measured using quantitative real-time PCR (Polymerase Chain Reaction). SA treatment has decreased rapidly GR -RNA levels of soybean leaves exposed to drought stress.

1. Giriş

Bitkiler, büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkileyen, bitki kalitesinin ve miktarının azalmasına neden bir çok abiyotik stres faktörlerini tolere etmek ve olumsuz koşullarda hayatta kalabilmek için çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir [1,2]. Bitkilerde kuraklık stresi ile oksidatif stresin arttığı bilinmektedir. Hücresel düzeyde, hidrasyondaki bir azalmanın ve süperoksit anyonu ($O_2\bullet$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\bullet OH$) gibi reaktif oksijen türlerinde (ROS) gözlenen artışın membran ve proteinlere zarar verebileceği belirlenmiştir [3,4]. Bitkiler, hücrelerini oksidatif hasardan koruyan antioksidan sistemlere sahiptir. Bu sistemlerin başında antioksidan enzimlere gelir. Bitki hücreleri, Glutasyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) gibi enzimatik ve enzimatik olmayan kompleks bir antioksidan sistem tarafından korunur. Birçok bitki ile yapılan çalışmalarda antioksidan aktivite ve stres toleransı arasında çok yakın ilişki olduğu saptanmıştır [5,6]. Bu sıklüdeki sırasıyla ilk ve son enzim olan APX ve GR, yeşil yapraklardaki H_2O_2 detoksifikasyonundan sorumludur. GR'in stres sırasında indirgenmiş glutasyon havuzunun (GSH) korunmasında merkezi bir role sahip olduğu bilinmektedir [7]. Daha önce yapılan çalışmalarda bazı bitki türlerindeki antioksidan enzim seviyeleri kuraklık stresine bağlı olarak belirlenmek istenmiş, enzim aktivitelerinin bazı maddelerle değişimleri izlenmiştir. Soya bitkisindeki bazı antioksidan enzim seviyeleri kuraklık ve diğer stres koşullarında araştırılmış ve bu enzimlerin bazı maddelerle değişimleri izlenmiştir [3,4,8]. Daha önce farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalarda kuraklık stresi koşullarında antioksidan enzimlerin mRNA düzeyinde değişimleri belirlenmemiş olması bizi bu çalışmaya yöneltmiştir. Soya bitkisi ile yaptığımız bu çalışmada, indirgenmiş glutasyonun (GSH) korunmasında ve oksidatif reaksiyon ürünlerinin uzaklaşmasında önemli bir role sahip olduğu kabul edilen GR enziminin kuraklık stresinde, hem aktivite hemde transkripsiyon düzeyindeki değişimi araştırılarak kuraklığın GR enzim mekanizmasını nasıl etkilediği sorusuna cevap aranmak istenmiştir. Ayrıca bu süreçte bir bitki hormonu olan SA'nın rolü belirlenmeye çalışılmış ve enzim üzerindeki etkisi izlenmiştir. Soya ekonomik olarak önemli bir besindir.

Zengin bir antioksidan içeriğine sahip olan ve kullanım alanı çok geniş olan soyadaki antioksidan enzimlerin kuraklıkla indüklendiği ve arttığı bilinmektedir. Bazı bitkilerde, kuraklık, tuz, ozon, yüksek ışık ve soğuk gibi farklı stres koşullarında [9] GR enzim aktivitelerindeki değişimler belirlenmiştir. Daha önce soyadaki GR enzim aktivitesinin ve GR transkripsiyon seviyesinin kuraklıkla değişiminin hiç çalışılmamış olması ve enzim düzeylerinin kuraklıkta SA ile değişimlerinin belirlenmemiş olması ve özellikle yine kuraklık stresi koşullarında GR enziminin mRNA düzeyinde SA ile değişimlerinin belirlenmemiş olması nedeniyle bu çalışma planlanmış ve gerçekleştirilmiştir. Çalışma neticesinde, kuraklık stresine maruz bırakılan soya yapraklarında ki GR enzim aktiviteleri ve mRNA seviyelerindeki değişimler ve bu değişimlerin SA'dan nasıl etkilendiği belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitkilerin Büyütülmesi

Soya tohumları (*Glycinemax L. cv.*) belirlenen şartlarda kum ile dolu plastik kaplar içine ekildi (Büyüme şartları; 14-s ışık, gün/gece sıcaklığı 25°C/20°C, photonfluxdensity 300 $\mu M \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) [3]. Ekim sonrasında tohumlar Hoagland besi solüsyonu ile her gün sulanarak iki

gerçek yaprak çıkıncaya kadar büyütüldü ve sonra stres uygulamalarına geçildi. Stres uygulamalarında öncelikle bitkiler iki gruba ayrıldı. Bir grubu kontrol amaçlı tutuldu ve normal su ile sulanmaya devam edildi. Diğer gruptakiler ise 1 hafta süre ile susuz bırakıldılar. 1 hafta sonunda stres muameleli gruptaki bitkilerin yarısı 200 µM (mikromolar) SA muamele edildi ve 2 gün sonra tüm gruplardan kesimler alındı [10]. Kullanıma kadar derin dondurucuda muhafaza edildiler.

2.2. Glutasyon Redüktaz Aktivite Tayini

Glutasyon redüktaz (GR) (EC 1.6.4.2) aktivite tayini, NADPH'ın oksidasyonunun 340 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite ölçümü, 50 mM potasyum fosfat (pH=7) tamponu, 2 mM Na₂ EDTA, 0.15 mM NADPH, 0.5 mM GSSG ve 100 ml enzim ekstraktı içeren karışımın 1ml'sinin 3 dk 340 nm'deki değişimi ölçülerek yapıldı [10].

2.3. RNA İzolasyonu ve Kantitatif Real-Time PCR

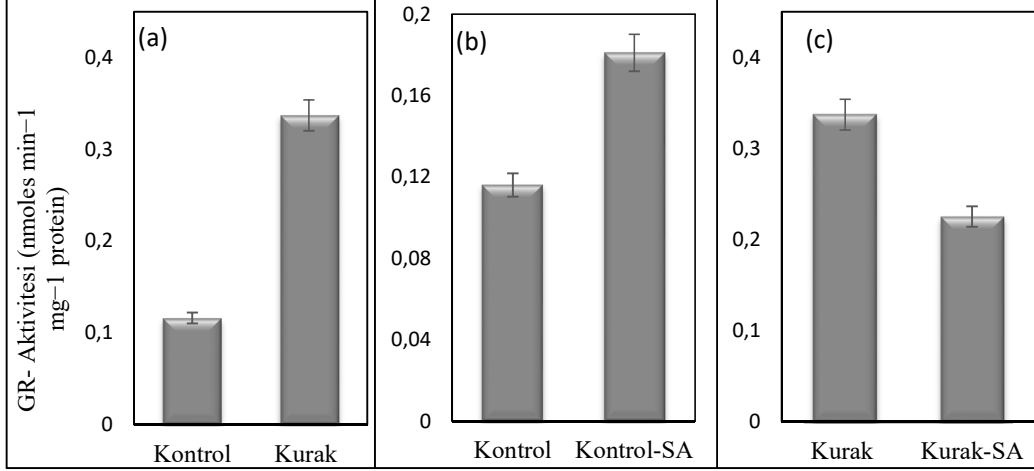
Total RNA Üreticinin kılavuzunda tanımlandığı gibi RNeasy kolonları kullanılarak (Qiagen, Hilden, Germany) bitki örneklerinden izole edildi. RNA'ların konsantrasyonları spektrofotometre (Thermo Scientific, Multiskan GO, USA) ile belirlendi. Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche) ile üretici firmanın protokolüne uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bütün cDNA'lar kullanılmaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Spesifik gen-primerleri ile real-time (RT)-PCR yapmak için üreticinin önerilerine uygun olarak Real-Time PCR belirleme sistemi kullanıldı (Qiagen, Rotor Gene Q) (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)). Master Mix optimize edilmiş bir PCR tampon içinde dNTP'leri ve Taq DNA Polimeraz (Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase) enzimini içermektedir. Örnekler, 8 pmol konsantrasyondaki ileri ve geri primerler, 12.5 µl of Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), Template DNA ≤500 ng/reaction, 25 µl nükleaz içermeyen sudan oluşan 25 µl'lik bir reaksiyon karışımı içinde çoğaltıldı.

Bütün primerler (Glutathione reductase forward primer (GR-forward), GR-reverse primer Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) forward primer, GAPDH reverse primer) Primer3 programı kullanılarak tasarlanmış (v.0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/>) ve Metabion (Germany) tarafından sentezlenmiştir (Tablo1). Her bir örnek üç kez test edilmiştir ve sonuçlar ΔΔCt hesaplamaları kullanılarak GAPDH gen referansı ile cDNA amplifikasyonuna benzer şekilde çoğaltılarak normalize edilmiştir.

3. Sonuçlar ve Tartışma

3.1. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Kontrol ve kuraklık koşullarında büyütülen soya yaprakları SA ile muamele edilmiş ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir (Şekil 1). Bir haftalık kuraklık muamelesi yapraklarda aktiviteyi kontrole göre oldukça artırmıştır (Şekil 1a). Zaten, kuraklık stresinin birçok bitkide GR aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir [6,11]. SA muamelesi kontrol şartlarında GR aktivitesini artırmıştır. Buna karşılık, kuraklık şartlarında SA muamelesi aktiviteyi azaltmıştır (Şekil 1b-c). Daha önce yapılan çalışmalarda bilindiği üzere SA'nın strese yanıtta önemli bir sinyal molekül olduğu ve stres koşullarındaki etkiyi hafiflettiği gösterilmiştir [12-13].



Şekil 1. Soya yapraklarında kuraklık (a), SA (b) ve kuraklık+SA (c) muamelelerinin GR aktivitesi üzerine etkileri.

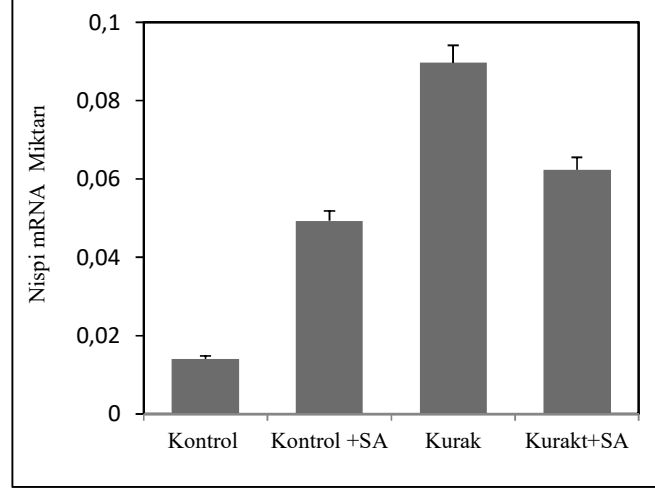
3.2. SA ve kuraklık stresine maruz kalan soya yapraklarında GR enzimine ait mRNA seviyelerinin değişimleri

Kontrol, kontrol-SA muameleli, kuraklık muameleli, kuraklık-SA muameleli yapraklarda qPCR kullanılarak transkripsiyon seviyeleri ölçüldü. İnternal kontrol olarak GAPDH geni kullanılarak benzer sonuçlar izlendi. Öncelikle bu amaç için soya bitkisine ait GR enzimi için primer amaçlı oligonükleotidler dizayn edildi (Tablo 1). PCR reaksiyon siklüsü ayarlandı. Her bir örnek için reaksiyon 3 kez tekrarlandı. $\Delta\Delta C_t$ hesaplaması kullanılarak referans gen GAPDH ile her bir örnek için değerler hesaplandı [14].

Tablo 1. Real time için kullanılan GR gen primerleri

Primer	Sequence
GAPDH-forward	5'-TCTCTCACCAACTCCGCTAC-3'
GAPDH- reverse	5'-ACCAAACGGCCAATTCTTC-3'
GR- forward	5'-AGGGTAAGTCGGGCTCTCA-3'
GR-reverse-	5'-CTTCCAGGCTCCCAACTGT-3

GR gen ekspresyonu ile kuraklıkta kontrole kıyasla mRNA seviyesinin önemli ölçüde arttığı gözlemlendi. Benzer şekilde SA muamelesinin kontrolüne kıyasla yine mRNA seviyesini arttırdığı belirlenmiştir. Ancak kuraklık koşullarında SA mRNA seviyesinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 2). Zaten yapılmış çalışmalar yüksek SA konsantrasyonlarında mRNA seviyelerinin azaldığını göstermektedir [15,16].



Şekil 2. Soya yapraklarında kuraklık ve SA muamelesinin mRNA seviyesi üzerine etkileri.

SA'nın ROS oluşumu ile ilgili olduğu ve GR gibi antioksidan enzimlerin yürüttüğü koruyucu reaksiyon serilerinde önemli bir sinyal molekül olarak rol aldığı biliniyor [16,17] Bu yüzden, bu çalışmanın sonuçlarından ve daha önceki çalışmalardan görüldüğü gibi SA'nın ROS oluşumunun engellenmesini sağlayacak bir görev üstlenebileceğini söyleyebiliriz.

Bu çalışma Bayburt Üniversitesi Araştırma Fonu (Proje No: 2013/1-3) tarafından finanse edilmiştir.

Kaynaklar

- [1] Kuşvuran Ş, Kavunlarda Kuraklık ve Tuzluluğa Toleransın Fzyolojik Mekanizmaları Arasındaki Bağlantılar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi:Fen Bilimleri Enstitüsü; 2010.
- [2] Reddy AR, Chaitanya KV, Jutur PP, Sumithra K. Differential Antioxidative Responses to Water Stress Among Five Mulberry (*Morus alba* L.) Cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 2004; 52: 33– 42.
- [3] Simaei MR, Khavari-Nejad A, Bernard F. Exogenous Application of Salicylic Acid and Nitric Oxide on the Ionic Contents and Enzymatic Activities in NaCl-Stressed Soybean Plants. *American Journal of Plant Sciences*. 2012; 3:1495-1503.
- [4] Bano A, Ullah F, Nosheen A. Role of abscisic acid and drought stress on the activities of antioxidant enzymes in wheat. *Plant Soil Environ* . 2012; 58(4): 181–185.
- [5] Taşgın E, Atıcı Ö, Nalbantoğlu B, Popova LP. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochem* 2006; 67;710-715.
- [6] Contour-Ansel D, Torres-Franklin LM, Cruz de Carvalho MH, D'arcy-Lameta A, Zuily-Fodil Y. Glutathione Reductase in Leaves of Cowpea: Cloning of Two cDNAs, Expression and Enzymatic Activity under Progressive Drought Stress. Desiccation and Abscisic Acid Treatment. *Ann of Bot* 2006; 98: 1279–1287.
- [7] Pastori G, Foyer CH, Mullineaux P. Low temperature-induced changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *J Exp Bot* 2000; 51: 107–113.
- [8] Vasconcelos ACF, Zhang X, Ervin EH, Kiehl JC. Enzymatic Antioxidant Responses to Biostimulants in Maize and Soybean Subjected To Drought, *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* 2009; 66(3):395-402.

- [9] Kaminaka H, Morita S, Nakajima M, Masumura T, Tanaka K. Gene Cloning and Expression of Cytosolic Glutathione Reductase in Rice (*Oryza Sativa* L.). *Plant Cell Physiol* 1998;39(12): 1269-1280.
- [10] Jiang M, Zhang J. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *J Exp Bot* 2002; 53(379): 2401-2410.
- [11] Cruz de Carvalho M.H., Contour-Ansel D. (h)GR, beans and drought stress. *Plant Sig& Beh* 2008; 3(10): 834-835.
- [12] Kang G, Li G, Xu W, Peng X, Han Q, Zhu Y., Guo T. Proteomics reveals the effects of salicylic acid on growth and tolerance to subsequent drought stress in wheat. *J Prot Res* 2012; 11: 6066–6079.
- [13] Zarghami M, Shoor M, Ganjali A, Moshtaghi N, Tehranifar A. Effect of salicylic acid on morphological and Ornamental characteristics of petunia hybrida at drought stress. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences* 2014; 4(3): 523-532.
- [14] Zhao YQ, Zhang C.L, Zhang W, Li LN, Zhang GM. Molecular detection of *Thielaviopsis basicola* by PCR assay. *Acta Phytopat Sin* 2009; 39: 23–29.
- [15] Miura K, Tada Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Plant Physiology* 2014; 5:1-12.
- [16] Zeshuang S, Guoying J, Yingchun L, Yuxian Z. Decrement of catalase mRNA level after salicylic acid treatment. *Chinese Sci Bull* 1998; 43:4.
- [17] Bahari AA, Sokhtesaraei R, Chaghazardi HR, Masoudi F, Nazarli H. Effect of water deficit stress and foliar Application of salicylic acid on Antioxidants enzymes activity in leaves of *Thymus daenensis subsp. Lancifolius*. *Cercetări Agronomice în Moldova* 2015; XLVIII (1): 161.