

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

*¹Esen Taşğın, ²Hayrunnisa Nadaroğlu, ³Ahmet Adıgüzel, ³M. Özkan Baltacı, ⁴Zeynep Sönmez
¹ Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, 25240 Erzurum
 esent25@atauni.edu.tr
²Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, 25240 Erzurum
 hnisa25@atauni.edu.tr
³Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 25240 Erzurum
 adiguzel@atauni.edu.tr, ozkanbaltaci@atauni.edu.tr
⁴Atatürk Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Nano-Bilim ve Nano-Mühendislik Bölümü, Erzurum
 zeynepsonmez@atauni.edu.tr
 Geliş Tarihi: 2017-02-09 Kabul Tarihi: 2017-06-30

Öz

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 glutatyon 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 glutatyon 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: Glutatyon redüktaz, kuraklık, salisilik asit, soya

Glutathione Reductase Activity in Soybean Plants and Changes in mRNA Levels with Salicylic Acid in Drought Stress

*¹Esen Taşğın, ²Hayrunnisa Nadaroğlu, ³Ahmet Adıgüzel, ³M. Özkan Baltacı, ⁴Zeynep Sönmez
¹ Ataturk University, Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, 25240 Erzurum
 esent25@atauni.edu.tr
²Atatürk University, Erzurum Vocational School, Department of Food Technology, 25240 Erzurum
 hnisa25@atauni.edu.tr
³Ataturk University, Faculty of Science, Department of Molecular Biology and Genetics, 25240 Erzurum
 adiguzel@atauni.edu.tr, ozkanbaltaci@atauni.edu.tr
⁴Atatürk University, Faculty of Engineering, Department of Nano-Science and Nano-Engineering, Erzurum
 zeynepsonmez@atauni.edu.tr
 Received date: 2017-02-09 Accepted date: 2017-06-30

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

*Sorumlu yazar: Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, 25240 Erzurum, esent25@atauni.edu.tr

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.

Keywords: Glutathione reductase, drought, salicylic acid, soybean

1. Giriş

Bitkiler, büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkileyen, bitki kalitesinin ve miktarının azalmasına neden birçok 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 (O₂•), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikali (•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, glutatyon 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 sıklıdaki enzimlerden APX ve GR, yeşil yapraklardaki H₂O₂ detoksifikasyonundan sorumludur. GR'in stres sırasında indirgenmiş glutatyon 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 glutatyonun (GSH) korunmasında ve oksidatif reaksiyon ürünlerinin uzaklaşmasında önemli bir role sahip olduğu kabul edilen GR enziminin kuraklık stresinde, hem aktivite hem de 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 µM·m⁻²·s⁻¹) [3]. Ekim sonrasında ilk 10 gün boyunca tohumlar bir 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 SA ile muamele edildi ve 2 gün sonra tüm gruplardan kesimler alındı [10]. Kullanıma kadar derin dondurucuda muhafaza edildiler (-20 oC).

2.2. Glutatyon Redüktaz Aktivite Tayini

Glutatyon redüktaz (GR) (EC 1.6.4.2) aktivite tayini, NADPH'nin oksidasyonununun 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 1 ml'sinin 3 dk 340 nm'deki değişimi ölçülerek yapıldı [10].

2.3. RNA İzolasyonu ve Kantitatif Real-Time PCR

Kontrol, kontrol-SA muameleli, kuraklık muameleli, kuraklık-SA muameleli yapraklarda qPCR

kullanılarak transkripsiyon seviyelerini belirlemek için öncelikle soya bitkisine ait GR enzimi için primer amaçlı oligonükleotidler dizaynedildi (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 [17].

Tablo 1. Real time için kullanılan GR gen primerleri

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

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 FirstStrand cDNA Sentez Kiti (Roche) ile üretici firmanın protokolüne uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bütün cDNA'lar kullanılmaya kadar -80 oC'de muhafaza edildi. Spesifik gen-primerleri ile real-time (RT)-PCR yapmak için üreticinin önerilerine uygun olarak Real-Time PCR belirleme sistemi kullanıldı (Qiagene, Rotor Gene Q) (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)) [11]. Master Mix optimize edilmiş bir PCR tampon içinde dNTP'leri ve Taq DNAPolimeraz (Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase) enzimini içermektedir. Örnekler, 8 pmol konsantrasyondaki ileri ve geriprimerler, 12.5 µl Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), Template DNA \leq 500 ng/reaction, 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 reverseprimer) Primer3 software 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 $\Delta\Delta C_t$ hesaplamaları kullanılarak GAPDH gen referansı ile cDNA amplifikasyonuna benzer şekilde çoğaltılarak normalize edilmiştir.

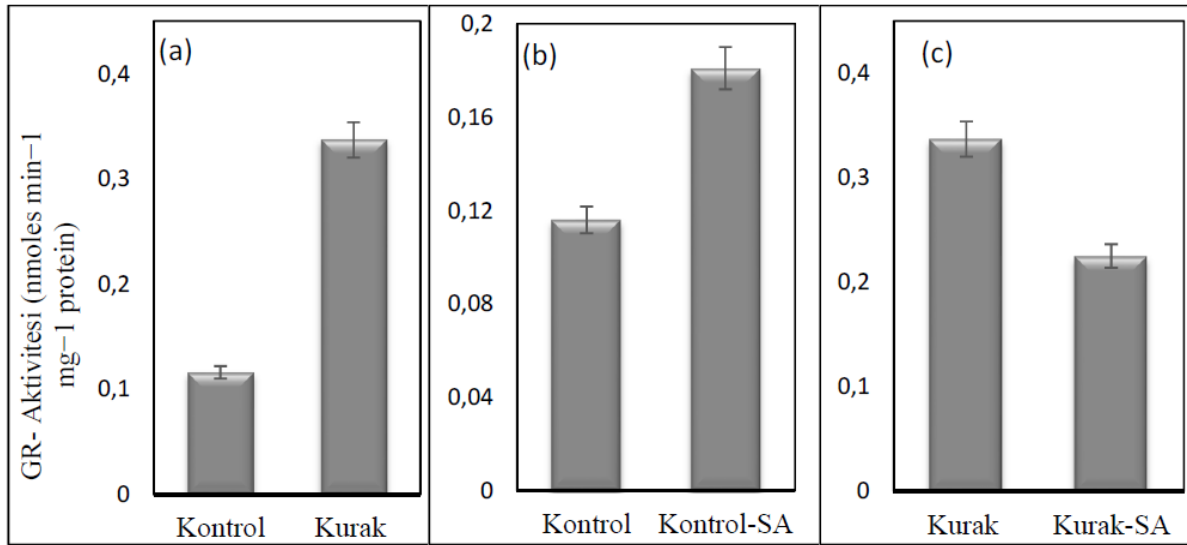
Veriler, ortalamalar arasında anlamlı farklılıkların olup olmadığını belirlemek için ANOVA (tamamen randomize) kullanılarak analiz edildi.

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 [6,12]. Kuraklık muamelesi Thymus daenensis (subsp. lancifolius) fidelerinde reaktif oksijen türlerinin seviyesinde (ROS) ve eş zamanlı olarak ta katalaz, peroksidaz, glutatyon reduktaz ve polifenol oksidaz enzimlerinin aktivitelerinde artışa sebep olmuştur. Benzer başka bir çalışmada da yine kuraklık stresi uygulanan genç domates yapraklarında askorbat peroksidaz, glutatyon reduktaz ve katalaz aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir [13,14].

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 [15,16].

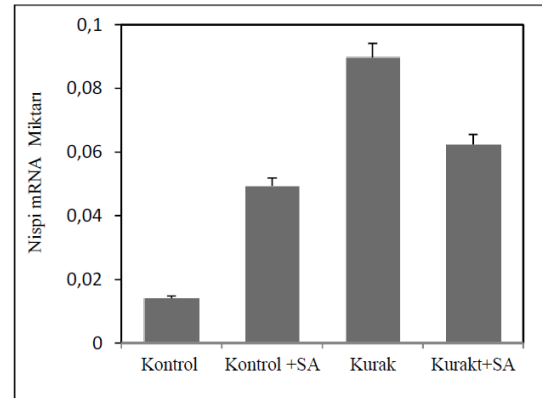


Şekil 1. Soya yapraklarında kuraklık (a), SA (b) ve kuraklık+SA (c) muamelelerinin GR aktivitesi üzerine etkileri (P < 0.05).

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 ölçülmüş ve ayrıca internal kontrol olarak GAPDH geni kullanılarak ta benzer sonuçlar izlenmiştir. GR gen ekspresyonu ile kuraklıkta kontrole kıyasla mRNA seviyesinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde SA muamelesinin kontrolüne kıyasla yine mRNA seviyesini arttırdığı belirlenmiştir. Ancak kuraklık koşullarında SA mRNA seviyesinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 2). Yapılan çalışmalarda salisilik asitin gen ekspresyonunu önemli değişimlere sebep olduğu gösterilmiştir. Arpada yapılmış bir çalışmada SA'nın katalaz aktivitesi ve gen ekspresyonu üzerindeki etkileri incelenmiş ve yüksek SA konsantrasyonunun katalaz aktivitesini inhibe ettiği, mRNA seviyelerini de önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [18,19].

SA'nın ROS oluşumu ile ilgili olduğu ve GR gibi antioksidan enzimlerin yürüttüğü koruyucu reaksiyon serilerinde önemli bir sinyal molekül olarak rol aldığı biliniyor [13,19]. Bu yüzden, bu çalışmanın sonuçlarından ve daha önceki çalışmalardan görüldüğü gibi SA'nın ROS oluşumunun engellenmesini sağlayacak bir görev üstlenebileceğini söyleyebiliriz. Sonuç olarak bu çalışma ile, bitkileri etkileyen birçok stres faktörü gibi kuraklığın da soyada sebep olduğu fizyolojik değişimler izlenmiş ve SA'in kuraklık stresine yanıtı gösterilmiştir.



Şekil 2. Soya yapraklarında kuraklık ve SA muamelesinin mRNA seviyesi üzerine etkileri (P < 0.05).

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

4. 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.

*Sorumlu yazar: Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, 25240 Erzurum, esent25@atauni.edu.tr

- [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] Tasgin 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]. <http://frodo.wi.mit.edu>, erişim tarihi Ocak, 2017.
- [12] Cruz de Carvalho M.H., Contour-Ansel D. (h)GR, beans and drought stress. *Plant Sig&Beh* 2008; 3(10): 834-835.
- [13] Bahari AA, Sokhtesaraei R, Chaghazardi HR, Masoudi F, Nazarlı 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.
- [14] Ünyayar S, Çekiç FO. Changes in Antioxidative Enzymes of Young and Mature Leaves of Tomato Seedlings under Drought Stress, *Turk J Biol* 2005; 29:211-216.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Zhao YQ, Zhang CL, Zhang W, Li LN, Zhang GM. Molecular detection of *Thielaviopsis basicola* by PCR assay. *Acta Phytopat Sin* 2009; 39: 23–29.
- [18] Miura K, Tada Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Plant Physiology* 2014; 5:1-12.
- [19] Zeshuang S, Guoying J, Yingchun L, Yuxian Z. Decrement of catalase mRNA level after salicylic acid treatment. *Chinese Sci Bull* 1998; 43:4.