



# Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

## *Arabidopsis thaliana*'da yaprak senesensi sırasında SA (Salisilik Asit) uygulamasının gen anlatımı üzerine etkisinin incelenmesi

Nihal Gören Sağlam\*, Gül Öz

*Botanik Anabilim, Dalı, Fen Fakültesi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye*

\* Sorumlu yazarın e-posta adresi: [gorenn@istanbul.edu.tr](mailto:gorenn@istanbul.edu.tr)

### ÖZET

Yaprak senesensi birçok iç ve dış faktör tarafından kontrol edilen önemli bir gelişimsel süreçtir. İç faktörlerden özellikle hormonların yaprak senesensi üzerine etkisi çok önemlidir. Salisilik Asit (SA) senesensi teşvik ettiği bilinen ve bitki savunma mekanizmasında görev alan önemli bir bitki büyüme düzenleyicisidir. Bu çalışmada, SA'nın yaprak senesensi üzerindeki etkisi gen anlatımı açısından incelenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla *Arabidopsis thaliana* yapraklarına 27., 31. ve 35. günlerde SA uygulaması yapılmış ve günlük floresans değişimleri takip edilmiştir. Gen anlatımını tespit edebilmek için uygulamalardan 4 saat sonra hasat edilen 8. yapraklarda mikroarray analizi yapılmıştır. Elde edilen veriler SA'nın senesens sırasında gen anlatımında yaptığı değişiklikleri ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Yaprak senesensi, Gen anlatımı, Salisilik Asit (SA), Arabidopsis thaliana*

## Investigation of the effect of SA (Salicylic Acid) application on gene expression during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*

### ABSTRACT

Leaf senescence is an important developmental process controlled by many internal and external factors. The effects of internal factors, especially hormones on leaf senescence is very important. Salicylic Acid (SA) is an important plant growth regulator known to promote senescence and it is involved in plant defense mechanism. In this study, the effect of SA on leaf senescence was investigated in terms of gene expression. For this purpose, salicylic acid was applied to the leaves of *Arabidopsis thaliana* on the 27th, 31st and 35th days and fluorescence changes were determined daily. In order to determine gene expression, microarray analysis was performed in the 8th leaves harvested 4 hours after the applications. The data obtained reveal the changes of SA in gene expression during senescence.

**Keywords:** *Leaf senescence, Gene expression, Salicylic Acid (SA), Arabidopsis thaliana*

## I. GİRİŞ

Yaprak senesensi, yaprağın yaşı, hormon seviyeleri, karanlık ve çevresel streslere maruz kalma gibi çeşitli iç ve dış faktörlerden etkilenen önemli bir gelişimsel safhadır [1, 2]. Kloroplastların dejenerasyonu ve hidrolizi, makromoleküllerin yıkımı ve taşınması ile başlayan ve ardından mitokondrinin ve çekirdeğin dejenerasyonu ile devam eden düzenli olaylar dizilimine sahiptir [3-5]. Senesensin ilk belirtileri fotosentez oranındaki düşüş ve solunum hızındaki artıştır. Bunları takiben kloroplast membranının parçalanması, klorofil kaybı ve proteinlerin ve lipidlerin parçalanması meydana gelir [3]. Kloroplastlar bol miktarda protein, Rubisco, klorofil a / b bağlayıcı proteinler ve membran lipidlerini içerir. Yaprak sensensi sırasında ilk önce kloroplastlar bozulurken, mitokondri ve peroksizomlar işlevsel kalır. Nukleus da işlevseldir ve transkripsiyonel olarak aktif haldedir, erken ribozomal bozulma ile toplam RNA seviyeleri düşse de, bu durum senesensin sonuna kadar tamamlanmaz [6].

Hormonlar, çevresel faktörlerin senesensi düzenleyici etkilerine aracılık eden içsel bileşenlerdir. Etilen, absisik asit (ABA), jasmonik asit (JA) ve salisilik asit (SA) gibi bazı hormonlar senesensi teşvik ederken, sitokininler ve gibberellinler senesensin geciktirilmesinde önemli rol oynamaktadır [7-11].

Salisilik asit (SA), hemen hemen tüm bitki türleri tarafından üretilen fenolik bir maddedir. Konsantrasyonu türden türe ve dokudan dokuya değişiklik göstermektedir. Bitkilerde, SA patojenlere karşı bitki savunmasına karışan bir sinyal moleküldür ve senesensde de rol oynamaktadır. SA, bitki patojenlerine karşı oluşturduğu cevaba ek olarak, ozon, UV ışık, sıcak stresi, soğuk ve kuraklık ile tuz ve ozmotik stresler gibi abiyotik streslere karşı oluşan bitki cevaplarında da rol oynar [12]. İçsel SA konsantrasyonunun senesense uğrayan yapraklarda senesens olmayan yapraklardan 4 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [7].

Yaprak senesensi bitki yaprak gelişimindeki önemli evrelerden biri olup senesens ile ilgili genlerin (SAG= Senescence Associated Genes) anlatımını içermektedir. Moleküler seviyede yapılan çalışmalar, SA, JA ve etilen'in, SAG'ların anlatımını düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin anlatımını teşvik ettiğini göstermiştir [13, 8, 14]. Son yıllarda yaprak senesensi ile ilgili yapılan mikroarray analizi çalışmaları, senesense uğramış yapraklarda anlatımı artan binlerce genin tanımlanmasını ve izole edilmesini kolaylaştırmıştır [15-19]. Senesens sırasında, SAG olarak adlandırılan birçok genin anlatımının teşvik olduğu, fotosentezle ilişkili genler gibi genlerin anlatımının ise baskılandığı rapor edilmiştir [20]. Çeşitli SAG'lar farklı dokularda ve hormonlar, SA, ozon, karanlık gibi farklı senesens teşvik edici faktörlere karşı farklı anlatımlar göstermektedir [21]. Senesens sırasında, makromolekül bozulmasına neden olan yoğun katabolik süreçler ortaya çıkar ve SAG'ların bazıları proteazlar ve nükleazlar gibi hidrolitik enzimleri kodlar [22, 15]. Senesens sürecini anlamak ve gelişimsel senesens ile strese neden olan senesens arasındaki farkları belirlemek için senesens tarafından teşvik edilen genlerin fonksiyonlarını açıklığa kavuşturmak önemlidir.

Klorofil floresans ölçümü, yapraklardaki fotosentetik performansı değerlendirmek için yararlı ve invazif olmayan bir tekniktir. Senesensin erken evresi gözle görülebilir değildir ancak PSII etkinliğinin göstergesi olarak klorofil floresans ölçümünün kullanılması metabolizma ve bitki büyümesindeki değişiklikleri saptamak için daha hassas bir metottur [23,17]. Teknolojideki ilerlemeler ve klorofil florometrisinin anlaşılması, klorofil floresans ölçümünün hücresel ve hücre altı seviyelerde fotosentetik aktiviteyi gerçek zamanlı olarak ve düşük ışık seviyelerinde ölçmek için daha yaygın

olarak kullanılan bir teknik olmasına neden olmuştur [24, 25]. Fv/Fm oranı fotosentetik aygıtların senesens ile ilişkili yıkımının bir parametresi olarak kullanılmaktadır [26]. Bu çalışmada senesens sırasında gen ifadesi üzerine SA'nın rolünü incelemek için klorofil floresans ölçümü ve mikroarray analizi yapılmıştır.

## II. MATERYAL VE YÖNTEM

### *A. BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ*

Bu çalışmada kullanılan yabani tip *Arabidopsis thaliana* tohumları NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center) dan temin edilmiştir. *Arabidopsis thaliana* bitkisinin tohumları 4°C'de 2 gece bekletildikten sonra *Arabidopsis* için özel olarak hazırlanmış olan toprak karışımına (Levingstons F2:kurutulmuş siliks kum:vermikülit, 6:1:1) ekilmiştir. Bitkiler 16 saat ışık 8 saat karanlık periyotta 22°C'de %70 nem ve 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ışık altında yetiştirilerek otomatik sulama sistemi ile sulanmıştır. İklim odasında yetişen bitkiler 11. günde bireysel saksılara alınmıştır. Ekimden sonraki 24. günde sağlıklı fideler seçilerek 8. yaprakları bitkiye zarar vermeyecek şekilde yaprak sapından bağlanarak işaretlenmiştir.

### *B. SA UYGULAMASI*

Yapılan ön çalışmalar ve literatür taramalarıyla belirlenmiş olan konsantrasyondaki SA (1 mM) çözeltisi ve distile su (kontrol) 27., 31. ve 35. günlerde özellikle yapraklar olmak üzere tüm bitkiye püskürtülmüştür. 27., 31. ve 35. günlerin seçilmesindeki amaç, senesens başlamadan önceki (27. gün), ilk başlangıç (31. gün) ve ilerlemiş senesens (35. gün) evreleri olmak üzere senesensin farklı evrelerini içermesidir. Bir grup bitki klorofil floresans görüntüleme sonuçları için günlük takibe alınmıştır. 27., 31. ve 35. günlerde distile su (kontrol) ve SA 4 saat sonra hasat edilen yapraklar RNA ekstraksiyonu yapılanaya kadar -80 °C'de bekletilmiştir.

### *C. KLOROFİL FLORESANS GÖRÜNTÜLEME*

Klorofil Floresans Görüntüleme sonuçları Barbagallo ve diğ., [23] ve Baker ve Rosenqvist [27]'de tanımlandığı şekli temel alınarak CI Imager klorofil floresans görüntüleme sistemi (Technologica Ltd., Colchester, UK) kullanılarak elde edilmiştir. Bitkiler minimum floresans (Fo) dan önce 15 dakika karanlığa adapte edilmişlerdir, minimal floresans zayıf ölçüm sinyalleri kullanılarak ölçülmüştür. Fo sırasında tüm fotosistem II (PSII) merkezleri açık durumdadır. Daha sonra, maksimal floresans (Fm) 800 ms ışınlama sırasında yaklaşık 6000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sn}^{-1}$  doyurma sinyaline kadar ölçülmüştür. Fm sırasında tüm PSII merkezleri kapalı konumdadır. Fm ölçümünü takiben bitkiler 5 dakika 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sn}^{-1}$  aktinik PPF (Photosynthetically Active Photon Flux Density= Fotosentetik olarak aktif foton akış yoğunluğu) ye maruz bırakılmışlardır ve F' aralıksız gözlenmiştir. F', Fo ve Fm arasında herhangi bir noktadaki floresans sinyalini belirtmektedir. 5 dakikadan sonra aktinik ışıktaki yapraklardan gelen maksimal floresans doyurulan ışık sinyali kullanılarak ölçülmüştür. Bitkilerin klorofil floresans sonucunu görebilmek için 27., 31. ve 35. günlerden itibaren 42. güne kadar tüm gruplardaki bitkilerin 8. yaprağı seçilerek günlük seyir incelenecek şekilde ölçüm yapılmıştır. Elde edilen veriler FlorImager yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Veriler hesaplamaların yapılabilmesi ve grafiklerin çizilebilmesi için Microsoft Excel (Microsoft Corporation) programına aktarılmışlardır.

#### *D. RNA EKSTRAKSİYONU VE MİKROARRAY*

Mikroarray hibridizasyonu için, hormon uygulamasından 4 saat sonra hasat edilen 8. yapraklar sıvı azot ve TRIzol (Invitrogen) kullanılarak havanda ekstre edildi. İzole edilen total RNA, Qiagen RNA saflaştırma kiti (Qiagen) kullanılarak kit protokolüne göre saflaştırıldı. RNA'nın konsantrasyonu Nanodrop spektrofotometre, kalitesi ise Agilent Bioanalyzer Sistem kullanılarak tespit edildi. 1 µg total RNA-MessageAmp II aRNA amplification kiti (Ambion) kullanılarak kit protokolüne göre amplifiye edildi. Amplifikasyon işleminden sonra CATMA dizin protokolü Buchanan-Wollaston ve diğ., [15]'e göre uygulanmıştır. Elde edilen mikroarray slaytları Affymetrix 428 array tarayıcıda 532 nm (Cy3) ve 635 nm (Cy5) dalga boylarında taranmıştır. Tarama sonucu elde edilen veriler Imagene version 4.2 (BioDiscovery) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Imagene programından alınan veriler GeneSpring version 5.1 (Silicon Genetics) programı kullanılarak analiz edilmiştir. 27, 31 ve 35. günlerde SA uygulamasından 4 saat sonra toplanan ve Cy3 ve Cy5 ile etiketlenen örneklerden iki biyolojik tekrar oluşturulmuştur. Sonuçta ortaya çıkan örnekler, her biri iki teknik tekrara (boya değişim) sahip 2 biyolojik tekrarı temsil etmektedir. GeneSpring analizi sonucunda anlatımında en az iki kat anlamlı değişiklik gösteren genler tanımlanmıştır. Farklı olarak anlatım gösteren genler Virtual Plant programı kullanılarak analiz edilmiş ve gen ontolojileri tanımlanmıştır.

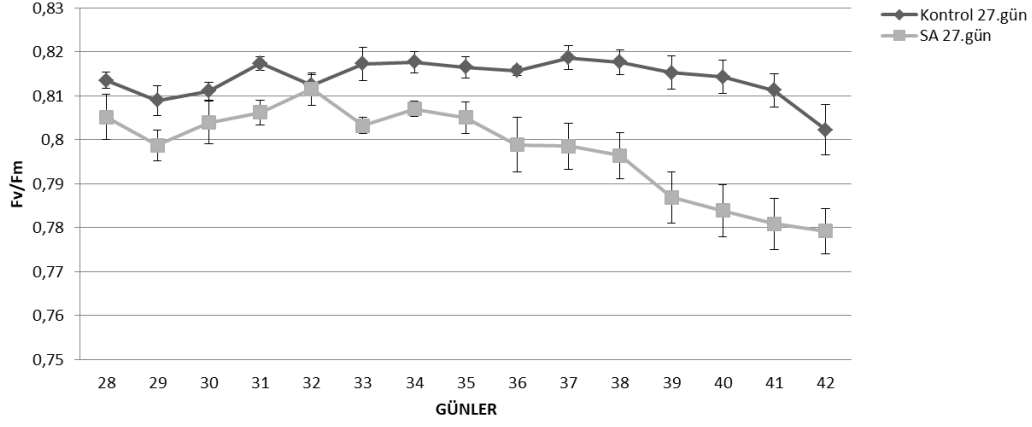
### III. BULGULAR VE TARTIŞMA

Senesens bir hücrenin, organın veya organizmanın ölümüyle sonuçlanan gelişimsel bir süreçtir. Azot, kükürt, fosfor ve potasyum gibi önemli besinlerin yeniden taşınması ve geri dönüşümü göz önüne alındığında, senesensin bitki yaşam döngüsü için hayati önemi açıkça görülmektedir. Bu besinler senesense uğrayan yapraklardan aktif olarak büyüyen dokulara taşınırlar, böylece bitkinin büyümesi ve çoğalması sağlanır [6]. Yaprığın fotosentetik kapasitesi, senesens sırasındaki klorofil kaybına bağlı olarak aniden düşer. Karbonhidratlar, amino asitler ve diğer moleküllerin üretimi, protein, lipidler ve nükleik asitler (DNA ve RNA) gibi makromoleküllerin ayrışması ile yer değiştirir ve serbest kalan besinler, yeni tomurcuklar, genç yapraklar, gelişmekte olan meyveler, tohumlar gibi bitki kısımlarına taşınırlar [28].

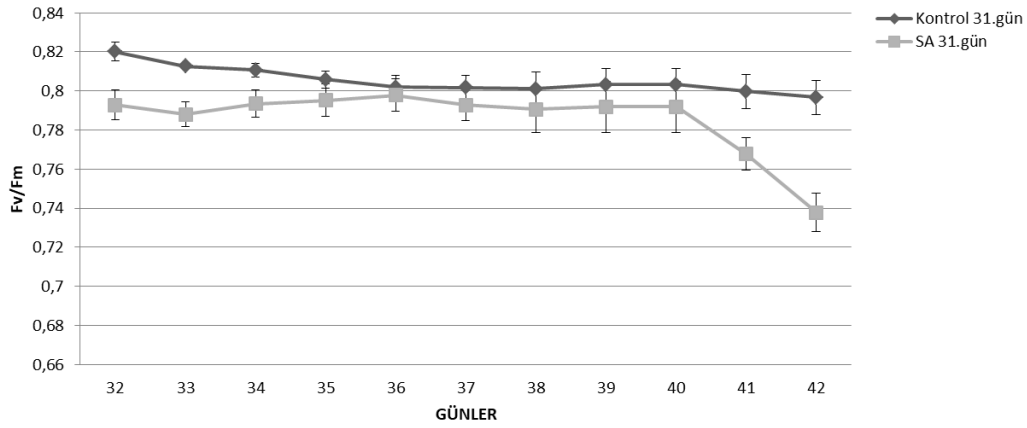
Yaprak senesensi, iç ve dış faktörlerden etkilenen, bitki yaprak gelişiminde önemli bir aşamadır ve çok sayıda senesens ile ilişkili genin (SAG) anlatımını içerir. Bitki hormonları, yaprak senesensini düzenleyen en önemli iç faktörlerdendir. Moleküler seviyedeki çalışmalar SA'nın SAG anlatımını düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin anlatımını arttırdığını göstermiştir [13].

Fizyolojik ve ekofizyolojik çalışmalarda bitkilerdeki stres ve fotosentetik verimliliği incelemek için klorofil floresans ölçüm yöntemi kullanılmaktadır [29]. Senesensin erken evresi gözle görülebilir değildir ancak PSII etkinliğinin göstergesi olarak klorofil floresans ölçümünün kullanılması metabolizma ve bitki büyümesindeki değişiklikleri saptamak için daha hassas bir yöntemdir [23, 17]. Fv/Fm oranı, fotosentetik aygıtların senesens ile ilişkili yıkımının bir parametresi olarak kullanılmaktadır [26]. PSII'nin maksimum etkinliğini ölçebilmek amacıyla, 27., 31. ve 35. günden itibaren kontrol ve SA uygulanan bitkilerin 8. yapraklarındaki günlük klorofil floresans değişimleri incelenmiştir. Bu yöntemdeki en önemli özellik görüntüleme esnasında bitkiye zarar verilmediği için aynı yapraktaki floresans değişiminin takip edilmesine olanak sağlamasıdır. SA uygulamasından sonraki günlük Fv/Fm değişimleri sırasıyla Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3'de gösterilmiştir. Kontrol ile yapılan kıyaslamalarda, 27. ve 31. günde SA püskürtülen yapraklarda Fv/Fm etkinliğinin kontrole

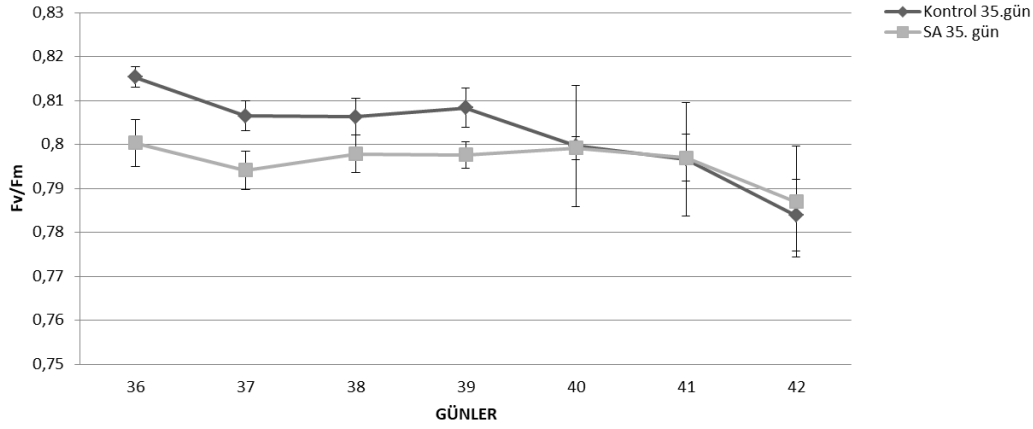
kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir (Şekil 1 ve Şekil 2). Ancak, Şekil 3'e bakıldığında 35. gün uygulamasında Fv/Fm etkinliğinin 40. günden itibaren kontrol ile paralel seyrettiği ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında, 27. 31. ve 35. gün uygulamalarını kendi içlerinde kıyasladığımızda en düşük etkinliğin 31. günde olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4).



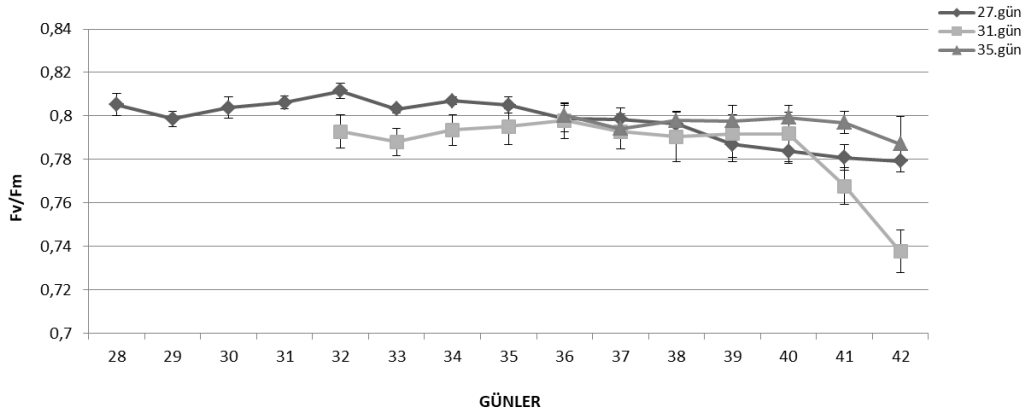
**Şekil 1.** 27. günde kontrol bitkileri ve SA püskürtülen bitkilerin sekizinci yapraklarındaki klorofil floresans değerlerinin günlük değişimi



**Şekil 2.** 31. günde kontrol bitkileri ve SA püskürtülen bitkilerin sekizinci yapraklarındaki klorofil floresans değerlerinin günlük değişimi



**Şekil 3.** 35. günde kontrol bitkileri ve SA püskürtülen bitkilerin sekizinci yapraklarındaki klorofil floresans değerlerinin günlük değişimi



**Şekil 4.** 27., 31. ve 35. günlerde SA püskürtülen bitkilerin sekizinci yapraklarındaki klorofil floresans değerlerinin günlük değişimi

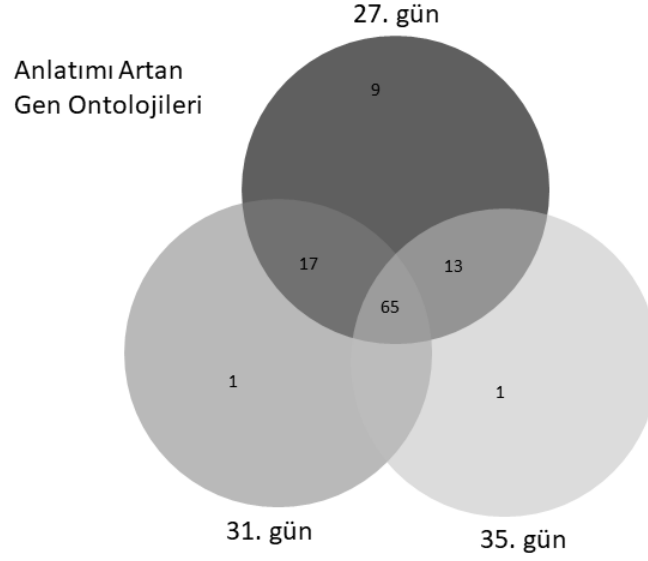
Senesens sırasında gen anlatımının düzenlenmesi karmaşık bir süreç olarak görülmektedir. Bu süreçte çok fazla sayıda gen farklı anlatımlar göstermektedir [30]. Gen anlatımının tanımlanması için, 27., 31. ve 35. günlerde SA uygulaması yapıldıktan 4 saat sonra bitkiler hasat edilmiş ve RNA izolasyonunu takiben mikroarray analizi yapılmıştır. Mikroarray analizi, 3 farklı zamanda (27., 31. ve 35. günler) SA uygulamasını takiben yapraklarda kapsamlı diferansiyel gen anlatımı olduğunu göstermiştir. Özetle, 27. günde SA uygulaması 592 genin anlatımının anlamlı olarak en az iki kat artmasına, 817 genin anlatımının ise azalmasına neden olmuştur. 31. gün uygulamasında ise, 1637 genin anlatımı artarken 2233 genin anlatımı artmıştır. 35. gün SA uygulaması da 1773 genin anlatımını artırırken 2576 genin anlatımının azalmasına neden olmuştur.

**Tablo 1.** 27., 31.ve 35. günlerde hormon uygulamasından 4 saat sonra hasat edilen yapraklardaki anlatımı azalan ve artan genlerin ontolojileri. Parantez içi p-değerini göstermektedir.

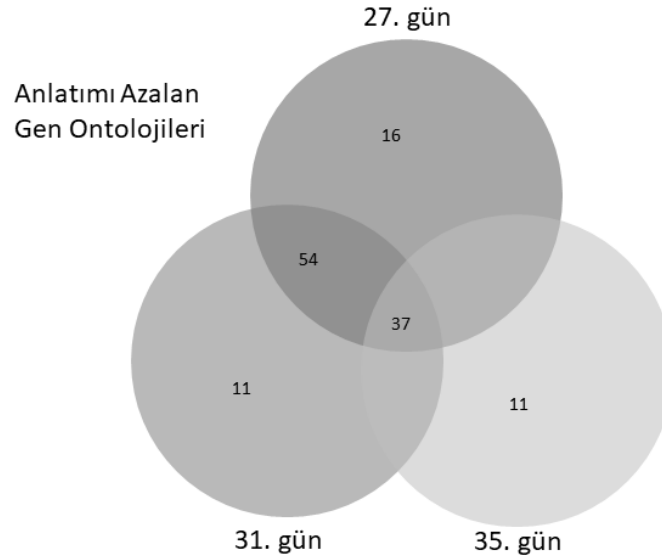
SA	27. gün	31. gün	35. gün
Anlatımı Artan Gen Ontolojileri	<p>Strese cevap (<math>10^{-29}</math>)                      Kitine cevap (<math>10^{-23}</math>)                      Savunma cevabı (<math>10^{-19}</math>)                      İmmün sistem süreci (<math>10^{-17}</math>)                      İmmün cevap (<math>10^{-14}</math>)                      Katalitik aktivite (<math>10^{-10}</math>)                      SA aracılıklı sinyal yolağı (<math>10^{-9}</math>)                      Oksidatif strese cevap (<math>10^{-8}</math>)                      SA uyarısına cevap (<math>10^{-8}</math>)                      Hücre Ölümü (<math>10^{-8}</math>)                      Ölüm (<math>10^{-8}</math>)                      Isıya cevap (<math>10^{-7}</math>)                      Programlanmış hücre ölümü (<math>10^{-6}</math>)                      İmmün cevabın düzenlenmesi (<math>10^{-5}</math>)                      JA uyarısına cevap (<math>10^{-4}</math>)</p>	<p>Uyarıya cevap (<math>10^{-27}</math>)                      Strese cevap (<math>10^{-22}</math>)                      Savunma cevabı (<math>10^{-19}</math>)                      İmmün sistem süreci (<math>10^{-14}</math>)                      İmmün cevap (<math>10^{-12}</math>)                      Kitine cevap (<math>10^{-11}</math>)                      SA uyarısına cevap (<math>10^{-9}</math>)                      Hücre Ölümü (<math>10^{-7}</math>)                      Ölüm (<math>10^{-7}</math>)                      SA aracılıklı sinyal yolağı (<math>10^{-7}</math>)                      Katalitik aktivite y (<math>10^{-6}</math>)                      Programlanmış hücre ölümü (<math>10^{-6}</math>)                      Isıya cevap (<math>10^{-6}</math>)                      Fosforilasyon (<math>10^{-5}</math>)</p>	<p>Strese cevap (<math>10^{-15}</math>)                      Savunma cevabının düzenlenmesi (<math>10^{-13}</math>)                      İmmün sistem süreci (<math>10^{-11}</math>)                      Kitine cevap (<math>10^{-10}</math>)                      Hücre ölümü (<math>10^{-8}</math>)                      Ölüm (<math>10^{-8}</math>)                      Programlanmış hücre ölümü (<math>10^{-7}</math>)                      Oksidatif strese cevap (<math>10^{-6}</math>)                      SA uyarısına cevap (<math>10^{-6}</math>)                      SA aracılıklı sinyal yolağı (<math>10^{-6}</math>)                      İmmün sistem sürecinin düzenlenmesi (<math>10^{-6}</math>)                      Protein kinaz aktivitesi (<math>10^{-6}</math>)</p>
Anlatımı Azalan Gen Ontolojileri	<p>Plastit (<math>10^{-73}</math>)                      Kloroplast (<math>10^{-72}</math>)                      Organel (<math>10^{-36}</math>)                      Fotosentetik membran (<math>10^{-20}</math>)                      Katalitik aktivite (<math>10^{-11}</math>)                      Apoplast (<math>10^{-9}</math>)                      Fotosentetik elektron transport zinciri (<math>10^{-6}</math>)                      Klorofil metabolik süreç (<math>10^{-6}</math>)                      Kloroplast fotosistem II (<math>10^{-5}</math>)                      Fotosistem II (<math>10^{-5}</math>)</p>	<p>Plastit (<math>10^{-45}</math>)                      Kloroplast (<math>10^{-45}</math>)                      Fotosentetik membran (<math>10^{-17}</math>)                      Katalitik aktivite (<math>10^{-14}</math>)                      Apoplast (<math>10^{-11}</math>)                      Klorofil metabolik süreç (<math>10^{-7}</math>)                      Azotlu bileşiklerin biyosentetik süreci (<math>10^{-6}</math>)                      Fotosentetik elektron transport zinciri (<math>10^{-6}</math>)                      Kloroplast fotosistem II (<math>10^{-6}</math>)                      Fotosistem II (<math>10^{-6}</math>)                      Fotosistem (<math>10^{-5}</math>)</p>	<p>Sitoplazmik kısım (<math>10^{-13}</math>)                      Plastit (<math>10^{-12}</math>)                      Kloroplast (<math>10^{-12}</math>)                      Uyarıya cevap (<math>10^{-10}</math>)                      Organel (<math>10^{-8}</math>)                      Yaraya cevap (<math>10^{-7}</math>)                      Membran (<math>10^{-6}</math>)</p>

Elde edilen ham veriler işlendikten sonra anlatımı artan ve azalan genlerin ontolojileri belirlenmiş ve Tablo 1’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde uygulama günü fark etmeksizin anlatımı artan genlerin “strese cevap”, “uyarıya cevap” ve “savunma cevabı” gibi stres ve savunma mekanizmasına ait gen grupları olduğu görülmektedir. Bunun yanında, anlatımı azalan gen ontolojileri ise yine günlerden bağımsız olarak “plastit”, “kloroplast” ve “fotosentetik membran” gibi hücre sel yapılar a ait olduğu görülmektedir. Gen ontoloji analizleri yapıldıktan sonra bu gruplar içindeki genlerin senesens ile ilişkileri araştırılmıştır.

Üç uygulama gününün gen ontolojilerinin çakışması, anlatımı artan ve azalan gen ontolojileri göz önüne alınarak Şekil 5 ve Şekil 6’da sırasıyla verilmiştir. Bu verilere göre gen ontolojisi bağlamında en fazla çakışmanın 27. gün ile olduğu ancak 31. ve 35. günlerin kendi aralarında bir çakışma olmadığı görülmektedir.



**Şekil 5.** 27., 31. ve 35. günlerde SA uygulamasından 4 saat sonra hasat edilen yapraklarda mikroarray analizi sonucu anlatımı artan gen ontolojilerinin çakışma diyagramı



**Şekil 6.** 27., 31. ve 35. günlerde SA uygulamasından 4 saat sonra hasat edilen yapraklarda mikroarray analizi sonucu anlatımı azalan gen ontolojilerinin çakışma diyagramı

Lipidlerin yıkımında senesens sırasında aktif hale geçmektedir [31]. Lipidlerin yıkım ürünleri senesense uğrayan yapraklardan yer değiştirebilmesi için metabolize edilir ve floemde taşınan sukrozlara dönüştürülür [31,32]. Fosfolipaz D'nin fitohormonların teşvik ettiği senesensin düzenlenmesine karıştığı bilinmektedir [33]. Mikroarray analizi sonucunda SA uygulamasından sonra Fosfolipaz D'nin ve diğer lipid metabolizmasıyla ilgili genlerin anlatımının arttığı görülmüştür.



Senesens programı başlar başlamaz, hücrel yapıların bozulması ve besinlerin parçalanması süreçleri meydana gelir. Birçok proteolitik olayların yaprak senesensi sırasında aktif hale geldiği bilinmektedir [34, 35]. Yaprak senesens sürecinde poliubiquitin genlerinin anlatımının ve ubiquitin-konjugasyon aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir [35]. Bu süreçte 20S proteazom aktivitesi de tespit edilmiştir [36]. Bu çalışmada ise, 27. ve 31. günlerde SA uygulaması 20S proteazom geninin anlatımını arttırmıştır.

Yapılan mikroarray analizleri yaprak senesensi sırasında 96 transkripsiyon faktör geninin anlatımının en az üç kat arttığını göstermiştir [15]. Aralarındaki en geniş transkripsiyon faktör grupları NAC, WRKY, C2H2 tip zinc finger, AP2/EREBP ve MYB proteinleridir [13, 30, 37, 15, 3]

NAC genlerinin de senesens sırasında anlatımının arttığı bildirilmiştir [30, 15, 17]. NAC domain ilk olarak petunia NAM (NO APICAL MERISTEM) ve Arabidopsis ATAF1 ve CUC2 (CUP-SHAPED COTYLEDON2) genleri tarafından tanımlanmıştır. NAC transkripsiyon faktörlerini kodlayan toplam 20 gen yaprak senesensi sırasında artmış bir anlatım göstermiştir [30]. NAC ailesine ait genler embriyo ve gövde meristem gelişiminde, yanal kök formasyonu oluşumunda, oksin sinyalinde, savunma ve abiyotik stres cevaplarında rol oynamaktadır [38]. Elde ettiğimiz sonuçlarda hormon uygulaması sonucunda NAC ve NAM ailesine ait genlerin anlatımının arttığı bulunmuştur.

WRKY transkripsiyon faktörü ailesinin çok sayıda üyesi yaprak senesensi ile ilişkilidir [39]. Arabidopsis geni olan WRKY53, senesensin başlangıcında teşvik edilmektedir [40]. Son yıllarda elde edilen bulgular WRKY53 ün senesensde JA ve SA arasındaki sinyal yolunda bir role sahip olduğunu işaret etmektedir [41]. Bir başka Arabidopsis transkripsiyon faktörü olan WRKY6'nın yaprak senesensi ve patojen savunması sırasında anlatımı artmaktadır [42]. Bizim çalışmamızda da tüm hormon uygulamasından sonra her üç günde de WRKY transkripsiyon ailesine ait çok sayıda genin anlatımının arttığı görülmüştür.

Senesens ile ilgili yapılan araştırmalarda, mikroarray analizleri yaprak senesensi sırasında anlatımı artan genleri tanımlamak için kullanılmaktadır [15]. Yabani tip ve mutant bitkilerle yapılan çalışmalar senesens-arttırıcı transkripsiyonu düzenleyen iki genin varlığına işaret etmektedir. Bunlardan biri HSF (Heat stress transcription factor) ailesine ait bir gen olan HSF4'dür. Diğeri ise zn finger proteini kodlayan bir gendir (AN1-like zinc finger) [17]. Bizim çalışmamızda SA uygulamasından sonra bu iki genin anlatımında artış olduğu görülmüştür. HSF'lerin temel rolleri sıcaklık ve diğeri kimyasal streslere karşı oluşan cevaplarda gen anlatımını kontrol etmektir. Zn finger proteinler de bitki gelişiminin pek çok evresinde önemli rol oynarlar [17]. Bu çalışmada da özellikle 27. ve 31. gün hormon uygulaması sonucunda HSF'lerin ve zn finger proteinlerin anlatımlarının arttığı saptanmıştır.

SA bitkilerde önemli bir sinyal molekül olarak görev yapar [30] ve biyotik ve abiyotik streslere karşı spesifik cevapların ortaya çıkmasına karışır [43]. Bazı senesens arttırıcı genler SA sinyaline ihtiyaç duymaktadırlar [15]. Özellikle 31. gün SA uygulamasında AAA-tip ATPaz'ların anlatımında artış olduğu görülmektedir. SA uygulamasının AAA tip ATPaz'ların anlatımını arttırdığı Buchanan-Wollaston ve diğ., [15]'nin daha önce yaptığı bir çalışmada da gösterilmiştir. AAA proteinler hücre siklusunun düzenlenmesi, protein yıkımı, organel biyogenez, veziküler taşınmayı içeren çeşitli hücrel fonksiyonlarda görev almaktadır.

## IV. SONUÇ

Sonuç olarak, farklı senesens evrelerinde, senesens başlamadan (27. gün), yeni başlamış (31. gün) ve nispeten ilerlemiş (35. gün), SA uygulamasının gen anlatımı üzerinde farklılıklar oluşturduğu görülmüştür. Anlatımı artan ve azalan genlerdeki bu farklılıklar yaprağın gelişimsel evrelerine göre SA uygulamasına gen anlatımı düzeyinde verdiği cevapların farklılığını göstermektedir.

**TEŞEKKÜR:** Bu çalışma Nihal Gören-Sağlam'ın doktora tezinin bir kısmını içermektedir. Çalışmanın yapılması sırasındaki desteklerinden dolayı Vicky Buchanan-Wollaston'a teşekkür ederiz.

## V. KAYNAKLAR

- [1] M. Sharabi-Schwager, A. Samach, R. Porat, "Overexpression of the CBF2 transcriptional activator in Arabidopsis suppresses the responsiveness of leaf tissue to the stress hormone ethylene," *Plant Biology*, vol. 12, no. 4, pp. 630-638, 2010.
- [2] Y. Yamada, S. Furusawa, S. Nagasaka, K. Shimomura, S. Yamaguchi, M. Umehara, "Strigolactone signaling regulates rice leaf senescence in response to a phosphate deficiency," *Planta*, vol. 240, no. 2, pp. 399-408, 2014.
- [3] P. O. Lim, H. J. Kim, H. Gil Nam, "Leaf senescence," *Annual Reviews of Plant Biology*, vol. 58, pp. 115-136, 2007.
- [4] P. L. Gregersen, A. Culetic, L. Boschian, K. Krupinska, "Plant senescence and crop productivity," *Plant Molecular Biology*, vol. 82, no.6, pp. 603-622, 2013.
- [5] H. Ueda, M. Kusaba, "Strigolactone regulates leaf senescence in concert with ethylene in Arabidopsis," *Plant Physiology*, vol. 169, no.1, pp. 138-147, 2015.
- [6] S. Balazadeh, J. Schildhauer, W. L. Araújo, S. Munné-Bosch, A. R. Fernie, S. Proost, B. Mueller-Roeber, "Reversal of senescence by N resupply to N-starved Arabidopsis thaliana: transcriptomic and metabolomic consequences," *Journal of Experimental Botany*, vol. 65, no.14, pp. 3975-3992, 2014.
- [7] K. Morris, S. A. H. Mackerness, T. Page, C. F. John, A. M. Murphy, J. P. Carr, V. Buchanan-Wollaston, "Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence," *The Plant Journal*, vol. 23, no. 5, pp. 677-685, 2000.
- [8] Y. He, H. Fukushige, D. F. Hildebrand, S. Gan, "Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence," *Plant Physiology*, vol. 128, no. 3, pp. 876-884, 2002.
- [9] P. O. Lim, H. G. Nam, "Aging and senescence of the leaf organ," *Journal of Plant Biology*, vol. 50, no.3, pp. 291-300, 2007.

- [10] R. Jibrán, D. A. Hunter, P. P. Dijkwel, “Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals,” *Plant Molecular Biology*, vol. 82, no.6, pp. 547-561, 2013.
- [11] Y. Yamada, M. Umehara, “Possible roles of strigolactones during leaf senescence,” *Plants*, vol. 4, no.3, pp. 664-677, 2015.
- [12] S. Munné-Bosch, “Aging in perennials,” *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 26 no.3, pp. 123-138, 2007.
- [13] G. H. Chen, L. T. Huang, M. N. Yap, R. H. Lee, Y. J. Huang, M. C. Cheng, S. C. G. Chen, “Molecular characterization of a senescence-associated gene encoding cysteine proteinase and its gene expression during leaf senescence in sweet potato,” *Plant and Cell Physiology*, vol. 43, no.9, pp. 984-991, 2002.
- [14] M. E. Ghanem, A. Albacete, C. Martínez-Andújar, M. Acosta, R. Romero-Aranda, I. C. Dodd, F. Pérez-Alfocea, “Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.),” *Journal of Experimental Botany*, vol. 59, no.11, pp. 3039-3050, 2008.
- [15] V. Buchanan-Wollaston, T. Page, E. Harrison, E. Breeze, P. O. Lim, H. G. Nam, C. J. Leaver, “Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*,” *The Plant Journal*, vol. 42, no. 4, pp. 567-585, 2005.
- [16] E. van der Graaff, R. Schwacke, A. Schneider, M. Desimone, U. I. Flügge, R. Kunze, “Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence,” *Plant Physiology*, vol. 141, no.2, pp. 776-792, 2006.
- [17] E. Breeze, E. Harrison, T. Page, N. Warner, C. Shen, C. Zhang, V. Buchanan-Wollaston, “Transcriptional regulation of plant senescence: from functional genomics to systems biology,” *Plant Biology*, vol. 10, pp. 99-109, 2008.
- [18] E. Breeze, E. Harrison, S. McHattie, L. Hughes, R. Hickman, C. Hill, C. Zhang, “High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation,” *The Plant Cell*, vol. 23, no. 3, pp. 873-894, 2011.
- [19] R. Hickman, C. Hill, C. A. Penfold, E. Breeze, L. Bowden, J. D. Moore, A. Mead, “A local regulatory network around three NAC transcription factors in stress responses and senescence in *Arabidopsis* leaves,” *The Plant Journal*, vol. 75, no. 1, pp. 26-39. 2013.
- [20] R. De Michele, E. Vurro, C. Rigo, A. Costa, L. Elviri, M. Di Valentin, F. L. Schiavo, “Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures,” *Plant Physiology*, vol. 150, no.1, pp. 217-228, 2009.
- [21] S. Farage-Barhom, S. Burd, L. Sonogo, R. Perl-Treves, A. Lers, “Expression analysis of the BFN1 nuclease gene promoter during senescence, abscission, and programmed cell death-related processes,” *Journal of Experimental Botany*, vol. 59, no.12, pp. 3247-3258, 2008.

- [22] F. A. M. ischer, S. Gan, "Nutrient remobilization during leaf senescence," *Annual Reviews of Senescence Processes in Plants*, vol. 26, pp. 87-107, 2007.
- [23] R. P. Barbagallo, K. Oxborough, K. E. Pallett, N. R. Baker, "Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging," *Plant Physiology*, vol. 132, no. 2, pp. 485-493, 2003.
- [24] P. Haldimann, Y. Fracheboud, P. Stamp, "Photosynthetic performance and resistance to photoinhibition of *Zea mays* L. leaves grown at sub-optimal temperature." *Plant, Cell & Environment*, vol. 19, no.1, pp. 85-92, 1996.
- [25] R. H. Li, P. G. Guo, B. Michael, G. Stefania, C. Salvatore, "Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley," *Agricultural Sciences in China*, vol. 5, no. 10, pp. 751-757, 2006.
- [26] E. Niewiadomska, L. Polzien, C. Desel, P. Rozpadek, Z. Miszalski, K. Krupinska, "Spatial patterns of senescence and development-dependent distribution of reactive oxygen species in tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves," *Journal of Plant Physiology*, vol.166, no. 10, pp. 1057-1068, 2009.
- [27] N. R. Baker, E. Rosenqvist, "Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities," *Journal of Experimental Botany*, vol. 55, no. 403, pp. 1607-1621, 2004.
- [28] E. Himelblau, R. M. Amasino, "Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence," *Journal of Plant Physiology*, vol. 158, no. 10, pp. 1317-1323, 2001.
- [29] N. R. Baker, "Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo," *Annual Reviews of Plant Biology*, vol. 59, pp. 89-113, 2008.
- [30] Y. Guo, Z. Cai, S. Gan, "Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence," *Plant, Cell & Environment*, vol.27, no. 5, pp. 521-549, 2004.
- [31] J. E. Thompson, C. D. Froese, E. Madey, M. D. Smith, Y. Hong, "Lipid metabolism during plant senescence," *Progress in Lipid Research*, vol. 37, no. 2, pp. 119-141, 1998.
- [32] M. T. Kaup, C. D. Froese, J. E. Thompson, "A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence," *Plant Physiology*, vol. 129, no. 4, pp. 1616-1626, 2002.
- [33] L. Fan, S. Zheng, X. Wang, "Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid-and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves," *The Plant Cell*, vol. 9, no. 12, 2183-2196, 1997.
- [34] L. D. Noodén, J. J. Guiamét, I. John, "Senescence mechanisms," *Physiologia Plantarum*, vol. 101, no. 4, pp. 746-753, 1997.
- [35] W. R. Belknap, J. E. Garbarino, "The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses," *Trends in Plant Science*, vol. 1, no.10, pp. 331-335, 1996.

- [36] I. N. Roberts, C. Caputo, M. V. Criado, C. Funk, "Senescence-associated proteases in plants," *Physiologia Plantarum*, vol. 145, no. 1, pp. 130-139, 2012.
- [37] J. F. Lin, S. H. Wu, "Molecular events in senescing Arabidopsis leaves," *The Plant Journal*, vol. 39, no. 4, pp. 612-628, 2004.
- [38] A. N. Olsen, H. A. Ernst, L. L. Leggio, K. Skriver, "NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse," *Trends in Plant Science*, vol. 10, no. 2, pp. 79-87, 2005.
- [39] T. Eulgem, P. J. Rushton, S. Robatzek, I. E. Somssich, "The WRKY superfamily of plant transcription factors," *Trends in Plant Science*, vol. 5, no. 5, pp. 199-206, 2000.
- [40] K. Hinderhofer, U. Zentgraf, "Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence," *Planta*, vol. 213, no. 3, pp. 469-473, 2001.
- [41] Y. Miao, U. Zentgraf, "The antagonist function of Arabidopsis WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium," *The Plant Cell*, vol. 19, no. 3, pp. 819-830, 2007.
- [42] S. Robatzek, I. E. Somssich, "A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence-and defence-related processes," *The Plant Journal*, vol. 28, no. 2, pp.123-133, 2001.
- [43] A. Krantev, R. Yordanova, T. Janda, G. Szalai, L. Popova, "Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants," *Journal of Plant Physiology*, vol. 165, no. 9, pp. 920-931, 2008.