

Tuz Stresi Altındaki Kişniş Bitkisinin (*Coriandrum sativum*) DNA Metilasyon Modlarının RAPD Markırları ile Belirlenmesi

Emine UYGUR GÖÇER^{1*}



¹ Iğdır Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi, Tarla
Bitkileri Bölümü, Iğdır,
Türkiye

Sorumlu Yazar

¹ Iğdır Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi, Tarla
Bitkileri Bölümü, Iğdır,
Türkiye
Email:
uyrgocer@gmail.com

Özet: Epigenetik, gen ifadesi ve fonksiyonundaki kalıtsal değişiklikleri tanımlayan bir alanı ifade eder, ancak DNA baz değişimi olmaksızın gerçekleşir. Bitkilerde en çok incelenen epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu ve histon proteinlerindeki kimyasal modifikasyonlardır. Epigenetik araştırmalarda, düşük ve yüksek işlem hacimli DNA metilasyon tespiti için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Düşük işlem hacimli tekniklerden biri, enzim tabanlı DNA sitozin metilasyonunu belirleme yaklaşımıdır. Bu yöntem, biyolojik aktiviteleri ve terapötik potansiyeli olan tuz uygulaması yapılan kişniş (*Coriandrum sativum*) fidelerinde rastgele genlerdeki DNA sitozin metilasyonunu incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu çalışma, bitki genotiplerindeki epigenetik değişiklikleri anlamamıza ve bu değişikliklerin biyolojik etkilerini değerlendirmemize olanak tanır. Bu çalışmada tuz stresine maruz kalan kişniş fidelerinden 12. ve 24. Saatlerde alınan doku örnekleri arasındaki sitozin metilasyon polimorfizmini ortaya koymak için touch-down polimeraz zincir reaksiyonları metilasyon duyarlı-rastgele arttırılmış polimorfik DNA (TD-MS RAPD) tekniği uygulanmıştır. Kişniş fidelerinden (Cemre) genomik DNA örnekleri izole edilmiş ve DNA izolatu touch- metilasyona duyarlı olan MspI restriksiyon enzimi ve metilasyona duyarlı HpaII restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Kullanılan 9 oligonükleotid primerinden üç primer (OPA 05-OPD 01-OPH 10) uygulamalar ve saatlik alınan örnekler arasında metilasyon polimorfizmleri belirlenmiştir. TD-MS-RAPD-PZR metodu, basit ve temel cihazlar gerektiren ekonomik bir yaklaşımdır. Bu yöntem, standart bir DNA termal döngü cihazı ve DNA jel elektroforezi sistemi kullanılarak kolayca uygulanabilir. Bu metotla belirlenen sitozin metilasyon polimorfizmi uygulamalar arsında oldukça düşüktür. İki farklı tuz uygulaması arasında (100mM-200mM) düşük düzeyde polimorfizm olduğu sonucuna varılmıştır. Saatlik alınan kişniş fidelerinden elde edilen doku örneklerindeki metilasyona bakıldığında ise 12'nci ve 24'üncü saatlerde alınan örnekler arasında bir metilasyon farkı tespit edilmemiştir.

Anahtar kelimeler: Kişniş, DNA metilasyonu, MspI-HpaII

Determination of DNA Methylation Modes of Coriander Plant (*Coriandrum sativum*) Under Salt Stress Using RAPD Markers

Abstract

Epigenetics pertains to heritable alterations in gene expression and function that occur without modifications to the DNA base sequence. Among the extensively researched epigenetic mechanisms in plants are DNA methylation and chemical modifications in histone proteins. In the realm of epigenetic exploration, a variety of techniques are employed for both low- and high-throughput DNA methylation detection. One low-throughput approach involves the utilization of an enzyme-based method for detecting DNA cytosine methylation. This technique was applied to investigate DNA cytosine methylation in randomly selected genes within salt-treated coriander (*Coriandrum sativum*) seedlings, renowned for their biological activities and therapeutic potential. The study facilitates comprehension of epigenetic modifications in plant genotypes and an assessment of the biological implications of these alterations. The research employed the touch-down polymerase chain reaction methylation-sensitive-randomly amplified polymorphic DNA (TD-MS RAPD) technique to unveil cytosine methylation polymorphism between tissue samples collected at 12 and 24 hours from coriander seedlings subjected to salt stress. Genomic DNA samples extracted from coriander seedlings (Cemre) underwent treatment with the methylation-insensitive MspI restriction enzyme and the methylation-sensitive HpaII restriction enzyme prior to touch-down polymerase chain reactions. Methylation polymorphisms were identified using three primers (OPA 05, OPD 01, OPH 10) out of the 9 oligonucleotide primers employed, with samples taken at hourly intervals. The TD-MS-RAPD-PCR method presents an economical approach requiring basic equipment. Implementation involves a standard DNA thermal cycler and DNA gel electrophoresis system. Notably, cytosine methylation polymorphism determined by this method exhibited minimal variance across applications. The findings indicate a low level of polymorphism between two distinct salt treatments (100mM-200mM). Moreover, when scrutinizing methylation in tissue samples obtained from coriander seedlings at hourly intervals, no discernible methylation differences were observed between the samples collected at the 12th and 24th hours.

Key words: Coriander, DNA methylation, MspI-HpaII

GİRİŞ

Apiaceae (*Umbelliferae*) familyasına ait olan kışniş (*Coriandrum sativum*) dikotiledonlu bir bitkidir. Bitkinin tüm kısımları yenilebilir ancak genellikle taze yaprakları ve kurutulmuş tohumları kullanılır (Önder, 2018). Besleyici ve tıbbi özelliklere sahip bir bitki olmasının yanı sıra en çok kullanılan baharatlardan biridir (Yılmaz ve ark., 2022). Bitkinin ilk tıbbi kullanımları eski Mısırlılar tarafından rapor edilmiştir. Kışniş başta monoterpenler, pinen, limpen, borenol, citronellol, geraniol, koriandrin, dihidrokoriandrin, kışniş A-E, flavonoidler ve uçucu yağlar olmak üzere birçok aktif madde içerir. *Coriandrum sativum*'un antifertilite, antihiperglisemik, antihiperlipidemik, antioksidan, antiproliferatif, hipotansif ve sindirim uyarıcısı gibi çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğu da rapor edilmiştir (Almasi 2021). Kışniş aynı zamanda detoks diyetinde de kullanılmaktadır. Cıva ve kurşun gibi toksik mineral kalıntılarının atılmasına yardımcı olmasının yanı sıra kan basıncını da düşürme özelliğine sahiptir (Leena ve ark., 2012). Ayrıca antibakteriyel ve antifungal etkileri de mevcuttur (Önder, 2018).

Kışniş, Güney Avrupa'ya, Kuzey Afrika'ya ve Asya'nın bazı bölgelerine (örneğin İran) özgüdür; geniş bir adaptasyonu bulunmaktadır ve farklı türdeki toprak ve iklim koşulları altında iyi büyüyen bir güce sahip bir bitkidir. Ancak bu bitkinin verimi ve fizyolojisi tuzluluktan olumsuz etkilenmektedir (Moradi ve Zauareh, 2013; Mishra ve ark., 2017; Al-Garni ve ark., 2019).

Tuzlu topraklar ve tuzlu sulama suları tıbbi bitki üretiminde ciddi sorunlara neden olmakta ve bitki büyümesini engellemektedir. Tuzluluk, bitki türlerinin üretimini olumsuz yönde etkileyen önemli bir abiyotik faktördür. Tuz stresi bitkilerde çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri etkilemektedir. NaCl, doğrudan ozmotik veya iyonik mekanizmalar yoluyla ve gen ifadesine etki ederken dolaylı olarak hücre içi etkilerini araçlar yardımıyla da gerçekleştirebilir (Türkoğlu ve ark., 2023a; Thomas ve ark., 1992). Bitkiler çevresel stresler altında oksidatif hasara maruz kalır (Türkoğlu ve ark., 2023b; Eren ve ark., 2023). Reaktif oksijen türleri (ROS), tuzluluğun bozucu etkilerine katkıda bulunan ana faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Ashraf ve Ali, 2008). ROS sitotoksik olduğundan lipitlerle, proteinlerle ve nükleik asitlerle reaksiyona girebilir ve proteinin denatüre olmasına, lipit peroksidasyonuna ve DNA mutasyonuna neden olabilir (Ashraf ve Ali, 2008; Kulak ve Aydın 2023). Plazmalemmenin peroksidasyonu hücre içi içeriğin sızmasına, hızlı kurumaya ve hücre ölümüne yol açar (Scandalios, 1993). Bitkiler, ROS'un olumsuz etkilerini azaltmak için antioksidan moleküllerle donatılmıştır. Süperoksit dismutaz, H₂O₂ üretmek için süperoksit radikaliyle reaksiyona girer. H₂O₂ katalaz ve peroksidaz tarafından temizlenir (Berwal ve Ram, 2018). Ali ve ark., (2004) bitki başına verimin, klorofil konsantrasyonunun, doğurganlık yüzdesinin, verimli kardeş sayısının, salkım uzunluğunun ve piriç salkımı başına birincil dal sayısının tuzluluk nedeniyle azaldığını bildirmiştir.

Kurak mevsim ve toprak tuzluluğu gibi iklimsel sorunlar, dünya genelinde her zaman en önemli bitkisel üretim kısıtlamaları olmuştur. Tuzluluğun bitki morfolojisi ve fizyolojisi üzerindeki etkilerinin olmasının bilinmesinin yanında metilasyonu değiştirdiği bilinmektedir. Tuz stresi altında, bitkilerde DNA metilasyon profili değişebilir. Bazı araştırmalar, tuz stresinin bitki genomundaki DNA metilasyon desenlerini etkileyebileceğini göstermiştir. Tuz stresine maruz kalan bitkilerde, belirli genlerin metilasyonu durumunda değişiklikler meydana gelebilir. Bu değişiklikler gen ekspresyonunu etkileyebilir, çünkü DNA metilasyonu gen transkripsiyonunu düzenlemede önemli bir rol oynar.

Tuz stresinin DNA metilasyonu üzerindeki etkisi, özellikle bitkilerde stresle başa çıkma mekanizmalarını düzenleyen genlerle ilgili olabilir. Bazı genlerin metilasyon durumundaki değişiklikler, bu genlerin aktivasyonunu veya inhibisyonunu etkileyebilir, bu da bitkilerin tuz stresine karşı adaptasyonunu etkileyebilir. (Al-Lawati ve ark., 2016).

Bu çalışmada, sodyum klorür (NaCl) uygulamasının bireylerdeki DNA metilasyon veya demetilasyon üzerindeki etkilerini değerlendirmenin yanı sıra, eski ve basit bir yöntem olan touch down

tabanlı metilasyona duyarlı rastgele amplifiye polimorfik DNA markör (TD-MS-RAPD-PCR) yönteminin güvenilirliğini araştırmayı amaçlamaktayız. Bu bağlamda, epigenetik bir mekanizma olan DNA sitozin metilasyonunu kışniş bitkisinde uygulayarak elde edilen veriler, NaCl stresinin genetik materyal üzerindeki etkilerini anlamamıza ve potansiyel epigenetik değişiklikleri belirlememize yardımcı olacaktır. TD-MS-RAPD-PCR yöntemi, genetik çeşitliliği belirlemek ve DNA metilasyon durumunu analiz etmek için yaygın olarak kullanılan bir moleküler teknik olup, bu çalışmada NaCl stresinin neden olduğu potansiyel değişiklikleri belirlemede güvenilir bir araç olabilir. Bu yöntem sayesinde, homozigot ve heterozigot bireyler arasındaki genetik farklılıkları ve stresin bu farklılıkları nasıl etkilediğini anlamak mümkün olacaktır. Ayrıca, kışniş bitkisinde DNA sitozin metilasyonunu uygulayarak elde edilen veriler, bu epigenetik mekanizmanın bitki stres yanıtlarında oynadığı rolü daha iyi anlamamıza imkan tanıyacaktır. Bu, NaCl stresinin bitki genomunda potansiyel değişikliklere yol açabilecek ve bitkinin adaptasyon mekanizmalarını etkileyebilecek epigenetik düzenlemeleri ortaya koymak için önemli bir adım olabilir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada kışniş (Cemre) (*Coriandrum sativum*) genotipi kullanılmış olup kontrol grubunda saf su ve deney gruplarında 100 ve 200 mM olmak üzere iki farklı NaCl konsantrasyonu uygulanmıştır. 4.2 lt hacmindeki her bir saksıya 10'ar tohum ekilmiştir. Tuz uygulaması, gerçek yapraklar çıktıktan 5 gün sonra uygulanmış ve her bir saksıya ilgili çözümden 50 ml eklenmiştir. Uygulama yapıldıktan sonra 12 ve 24'üncü saatlerde yaprak doku örnekleri alınmıştır.

DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için uygulamaların ardından elde edilen fidelerden yaprak dokusu alınmıştır. Daha sonra, Aydın ve ark. (2018) tarafından geliştirilen DNA izolasyon protokolü modifiye edilerek uygulanmış olup bu süreç sıvı nitrojen kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genomik DNA örnekleri, miktar ve kalite analizleri için spektrofotometrik değerlendirme ve agaroz jel elektroforezi yöntemleri ile detaylı bir şekilde incelenmiştir.

Restriksiyon enzim kesimi işlemi

Enzim kesim reaksiyonları 0,2 ml hacmindeki mikro tüplerde gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyon karışımı için 1 µg genomik DNA, 10 ünite *MspI* veya *HpaII* restriksiyon enzimi ve 2 µL 10x DNA tampon çözelti (Tango buffer, Thermo Scientific) içerecek şekilde hazırlanmıştır (Demirel ve ark., 2023; Türkoğlu ve ark., 2023c). Bu karışım, 37°C'de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir, bu süreç Karaca ve ark. (2005) tarafından belirtilmiştir. İnkübasyonun ardından, her numuneye 107,5 µL su eklenmiş ve bu karışım TD-MS-RAPD-PCR deneyleri için önce iyice homojenleştirilmiştir.

Touch-down Polimeraz zincir reaksiyonu (TD-PCR)

PCR işlemleri SimpliAmp (Thermo Scientific) cihazında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, 25 mikrolitrelik bir reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Bu karışım, kalıp DNA, primerler, 10x reaksiyon tamponu, MgCl₂, dört farklı dNTP ve Taq DNA polimerazını içermektedir, detayları Çizelge 1'de gösterilmiştir. RAPD PZR reaksiyonlarının spesifikliğini artırmak amacıyla, hedefleri çoğaltmak için Çizelge 2'de belirtilen bir "touch-down PZR" yöntemi kullanılmıştır. Kışniş otu örneklerinde *MspI* ve *HpaII* enzimleri (Çizelge 3'te belirtildiği gibi) ile kesilmiş olan numuneler, toplamda 9 oligonükleotid primer kullanılarak çoğaltılmıştır (Çizelge 4).

Çizelge 1. TD-MS-RAPD için PZR reaksiyon karışımı (Karaca ve ark. 2016)**Table 1.** PCR reaction mixture for TD-MS-RAPD (Karaca et al., 2016)

Kullanılan Kimyasallar		Stok	Miktar	Final
Genomik DNA			8.5 µl	100-120 ng
Steril-H ₂ O			3.5 µl	
İleri Primer ("Forward")		20 µM	3.0 µl	2.4 µM
Steril-H ₂ O			4.6 µl	
10X Reaksiyon Çözültüsü	TRIS-HCl (pH 9.1)	100 mM	3 µl	12 mM
	KCl	100 mM		60 mM
	Triton X-100	%0.1		%0.012
MgCl ₂		50 mM	1.5 µl	3 mM
dNTP		10 mM	0.7 µl	0.28 mM
Taq DNA Polimeraz		5 ünite/ µl	0.2 µl	1 ünite
Toplam Hacim			25 µl	

Çizelge 2. TD-MS-RAPD-PZR profili (Karaca ve ark. 2016)**Table 2.** TD-MS-RAPD-PZR profile (Karaca et al., 2016)

PZR Profili		Zaman	Döngü Sayısı	Aşama
Hot Start	94°C	5 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94°C	1 dakika	10 döngü	Denatürasyon
	42°C→37°C	1 dk 20 sn		Renatürasyon
	72°C	2 dakika		Sentez
PZR	94°C	2 dakika	30 döngü	Denatürasyon
	37°C	1 dk 20 sn		Renatürasyon
	72°C	2 dakika		Sentez
Final	72°C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	4°C	1 saat		

Çizelge 3. CCGG bölgelerindeki metilasyona MspI ve HpaII restriksiyon enzimlerinin tepkileri**Table 3.** Response of MspI and HpaII restriction enzymes to methylation at CCGG sites

Hedef Bölge	Msp I	Hpa II	Metilasyon Durumu
CCGG/GGCC	Keser	Keser	İki DNA sarmalında da metil grubu yoktur.
C ^m CGG/ GG ^m CC	Keser	Kesmez	İçteki Sitozin bazları tamamen metillidir
^m C ^m CGG/ GGCC	Kesmez	Keser	Bir DNA sarmalı tamamen metillidir.
^m CCGG/GGCC	Kesmez	Keser	Bir DNA sarmalı yarı metillidir
^m C ^m CGG/GG ^m C ^m C	Kesmez	Kesmez	Her iki DNA sarmalında tam metillidir

Çizelge 4. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primer dizileri (Aydın ve Özden 2021)

Table 4. Oligonucleotide primer sequences used in the study (Aydın ve Özden 2021)

NO	Primer ID	Primer sequence 5'→3'	100Mm (12.saat)	100Mm (24.saat)	200Mm (12.saat)	200Mm (24.saat)
1	OPA-05	AGGGGTCTTG	2	2	2	4
2	OPC-08	TGGACCGGTG	2	2	2	4
3	OPC-09	CTCACCGTCC	2	2	2	2
4	OPD-01	ACCGCGAAGG	6	6	6	6
5	OPD-02	GGACCCAACC	4	4	4	4
6	OPF-16	GGAGTACTGG	7	7	6	7
7	OPG-04	AGCGTGTCTG	2	2	2	2
8	OPH-07	CTGCATCGTG	4	4	4	4
9	OPH-10	CCTACGTCAG				

Analizlerin ardından, ürünler %2 çözünürlüklü agaroz jellere yüklendikten sonra 3-6 saat boyunca sabit voltajda (5 V/cm) elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

Sitozin metilasyon skorlaması

Msp I ve Hpa II enzimleri ile kesilmiş olan genomik DNA'larının farklarını belirlemek amacıyla, iki ayrı uygulama ve farklı saatlerdeki örnekler üzerinde yapılan TD-MS-RAPD-PCR analizleri "var" (1) ve "yok" (0) olarak skorlanmıştır. Bu PZR markörlerinin yokluğu, her iki hedef dizisinde de (5'-CCGG-3'/3'-GGCC-5') metil içermediğini göstermektedir. Öte yandan uygulanan bu PZR yöntemine ait markörlerin olması her iki hedef dizisinin metilli (5'-mCmCGG-3'/3'-GGmCmC-5') olduğunu söylemektedir. Diğer durumlar ise MspI' de var, HpaII' de yok olması durumunda, DNA zincirinin tamamen metillenmiş (5'-mCmCGG-3'/3'-GGCC-5') ya da yarı metillenmiş (5'-mCCGG-3'/3'-GGCC-5') olduğu düşünülmüştür. MspI kullanılan TD-MS-RAPD-PCR markörlerinde, markör bulunmazken; ancak aynı markör HpaII kullanıldığında, içteki sitozin bazlarının tamamen metillendiği kabul edilmiştir (5'-CmCGG-3'/3'-GGmCC-5'). Bu çalışmada, 1 ve 0 puanlama sistemi uygulanmış olup, 1 puan hedefin enzim tarafından kesilmediğini; 0 puan ise hedefin enzim tarafından kesildiğini ifade etmektedir (Çizelge 3).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, kontrol ve tuz uygulamasına maruz kalan kışniş fidelerinde DNA sitozin metilasyonunu belirlemek amacıyla TD-MS-RAPD-PCR tekniği kullanılmıştır. TD-MS-RAPD-PCR tekniği, MspI ve HpaII enzimleri aracılığıyla uygulanan, aynı tanıma bölgelerine sahip ancak DNA metilasyonuna karşı farklı hassasiyet gösteren izoşizomerleri içeren bir yöntemdir. Bu metodoloji, DNA'nın spesifik bölgelerindeki metilasyon durumunu yüksek çözünürlükle belirleyerek genetik materyalin epigenetik modifikasyonlarını analiz etmeyi mümkün kılmaktadır (Karaca ve ark. 2019). Bu çalışma, metilasyon profillerinin belirlenmesindeki yüksek hassasiyetiyle önemli bilgiler sunmaktadır. Kontrol ve tuz stresine maruz kalan kışniş fidelerindeki genetik değişiklikleri ve bitki yanıtlarını anlamak ve tarım alanında kullanışlı uygulamalar geliştirmek için kapsamlı bir anlayış sağlamaktadır. Bu enzimler, belirli bir tanıma dizisi olan 5'-CCGG-3' üzerinde etkileşim gösterirler. HpaII enzimi, tek bir DNA zincirinde metilasyon gerçekleştiğinde (hemimetillenmiş durumda), dıştaki sitozinleri algılar ve keser. Öte yandan, MspI enzimi, her iki DNA zinciri de tamamen metillendiğinde içteki sitozinleri tanır ve böyle durumlarda hedef diziyi keser. Ancak, her iki DNA zinciri de metillenmediğinde, her iki enzim de hedef tanıma dizisini etkiler.

Bu enzimatik özellikler, DNA'nın metilasyon durumuna bağlı olarak kesme aktivitesindeki değişiklikleri vurgular. MspI ve HpaII enzimleri, genetik materyal üzerindeki metilasyonun incelenmesinde kullanılarak, epigenetik düzenlemelerin anlaşılmasına ve genetik ifadenin karmaşıklığının çözülmesine katkıda bulunur (Demirel et al., 2023; Türkoğlu et al., 2023c). Çizelge 3 *MspI* ve *HpaII*'nin kesme özelliklerini anlatmaktadır. Farklı uygulamalara veya değişen doz uygulamalarına maruz bırakılan bitki fidelerine ait genomik DNA örnekleri, MspI ve HpaII enzimleri ile işlendiğinde, 5'-CCGG-3' hedef bölgelerinde çeşitli metilasyon paternlerine sahip olabilir. Bu durum, genetik materyalin çevresel streslere tepkisi veya farklı uygulama koşullarının bitkilerin epigenetik düzenlemeleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için değerli bir araç sağlar. Hedef dizilerin tamamen metillenmiş veya metillenmemiş olduğu durumlarda, MspI ve HpaII'nin kesme aktiviteleri arasındaki farklar belirgin olmayabilir. Bu durumda, her iki enzimin de hedef diziyi benzer şekilde kesmesi, metilasyon paterninde benzerliklere işaret edebilir (Salmon ve ark., 2008).

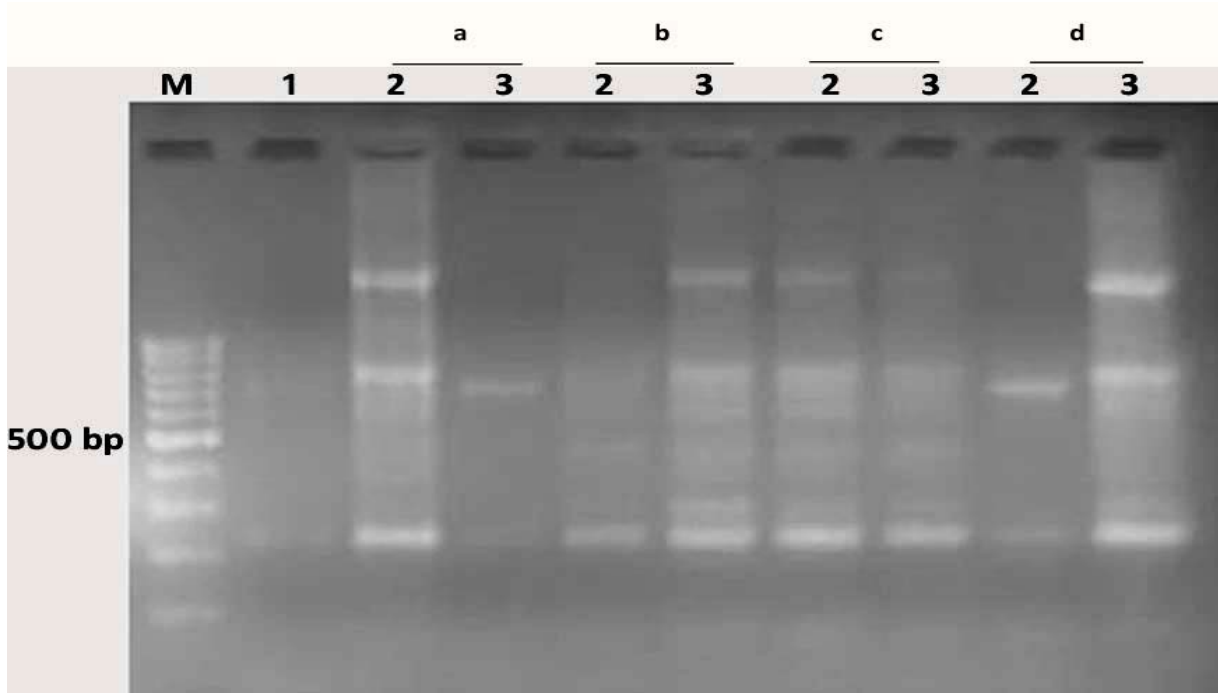
Bu araştırmada, MS-RAPD-PCR markırlarının amplifikasyonu, artefak olarak isimlendirilen spesifik olmayan bölgelerin amplifikasyon oranını düşürmek bir touch-down PZR profili (TD-MS-RAPD-PCR olarak adlandırılır) kullanılmıştır. RAPD tekniğinde, farklı laboratuvarlarda veya farklı zamanlarda tekrarlandığında tekrarlanabilirlik sorunlarına yol açabildiği için ve hedeflenmeyen DNA bölgelerinin de amplifikasyonunu içerir ve istenmeyen bantların oluşmasına neden olduğu için RAPD tekniğinin dezavantajlarından (Karaca ve ark., 2019).

Doğru bir şekilde yorumlanabilecek çoğaltılmış ürün sayısı 9 primerde farklılık göstermiştir (Çizelge 4). Örneğin OPA-05 oligonükleotid primeri 2 TD-MS RAPD-PCR markırı üretirken OPF 16 markırı en yüksek değeri yedi (7) üretmiştir. Bu çalışmada iki farklı tuz uygulaması ve iki farklı saatlerde alınan örnekler arasında TD-MS-RAPD-PCR markırların sayısında değişiklik göstermiş olup toplam 100mM NaCl ve 12. saatte alınan örnekte 26, 100mM NaCl ve 24. Saatte 26, 200mM NaCl ve 12. Saatte 25, 200mM NaCl ve 24. Saatte 33 markır tespit edilmiştir.

Kullanılan 9 primerden sadece üçünde (OPA 05-OPD 01-OPH 10) Şekil 1 'de gösterildiği gibi tuz uygulaması yapılan kişniş fideleri arasında metilasyona duyarlı polimorfizmler saptanmıştır. Primer OPA 05 ile amplifiye edilmiş lokus 100 mM 12. saat, 100 mM 24. saat ve 200 mM 12. saatte bant oluşturmadığı için bu uygulamaların her iki DNA sarmalının metilsiz (CCGG/GGCC) olduğu düşünülürken diğer uygulamada (200 mM 24. saat) içteki sitozin bazlarının tamamen metilli (CCmGG/GGCmC) olduğu tespit edilmiştir (Fu ve ark., 2012). Aynı durum OPC-08 lokusunun 200 mM tuz uygulamasının 24. saat örnekleri içinde geçerlidir. MspI ve HpaII enzimleri ile kesilen kontrol tuz (100mM ve 200mM) uygulaması olan kişniş fide genomik DNA'lar ile OPC-09 primeri PZR işlemine tabi tutulmuştur. OPC-08 lokusunun PZR sonucunda hem MspI hem de HpaII enzimi tüm uygulamalarda kesim yapmış olduğu için jel görüntüsünde bantlar görülmemektedir (0 0). Bu durum CCGG/GGCC bölgesinin (her iki sarmalda) sitozinlerinin metillenmediğini ispatlamıştır. Uygulamalar arasında da değişiklik olmayıp ne NaCl metillenmeyi arttırmış ne de örneklerin alındığı saatler metillenme durumunu değiştirmiştir.

MS-RAPD-PCR markırı olan OPD-01 lokusunda 1. allelde tuz uygulamasından sonra farklı saatlerde alınan örneklerde metilasyon polimorfizmi ortaya çıkmıştır (Şekil 1). Metilasyon polimorfizmi görülen diğer bir lokusumuz OPD 02 markırının 200 mM tuz uygulamasında 24. saatteki örnek dışında diğer uygulama ve saatlerde allelin görülmemesi durumu MspI ve HpaII enzimlerinin aktivitesi ile açıklanmaktadır. Bu durum CCGG/GGCC bölgesinin (her DNA iplikçisinde de) sitozinlerinin metil grubu içermediğini göstermektedir. 200mM tuz uygulamasından sonra ki örnekte hem Msp I hemde HpaII enziminin kesmemesi her iki DNA sarmalının da tam metilli olduğunu göstermektedir.

OPH lokusu için ayrı ayrı uygulamalara ve uygulama sonrası süreler bakıldığında 100mM ve 200mM tuz uygulamalarının 12. saatteki örnekleri hem *MspI* hemde *Hpa II* tarafından kesilmemesi tam metilli olduklarını gösterirken 24. saatteki örneklerin hem *MspI* hem de *HpaII* enzimleri tarafından kesilmeleri her iki sarmaldaki sitozinlerin metillendiğini göstermektedir. Diğer lokuslarda ise kontrol ve uygulamalar arasında farklılık görülmemiştir.



Şekil 1. 100Mm NaCl ve 12.saat, b) 100Mm NaCl ve 24.saat, c) 200Mm NaCl ve 12.saat, d) 200Mm NaCl ve 24.saat Genomik DNA'larının *MspI* ve *HpaII* enzimleri ile kesim sonrası OPD-01 primeri ile TD-MS-RAPD-PCR sonucu 1) Kontrol, 2) *MspI* enzim metilasyon desenleri, 3) *HpaII* enzim metilasyon desenleri.

SONUÇ

Bu araştırma çerçevesinde, kişniş genotipine (Cemre) uygulanan 100mM ve 200mM tuz seviyelerinin, 12. ve 24. saatler arasında 5'-CCGG-3' sekans bölgesindeki DNA sitozin metilasyon farklılıklarını belirlemek amacıyla TD-MS-RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır. Hedef genomik DNA örnekleri, tuz uygulamalarının ardından elde edilen kişniş (Cemre) fidelerinden çıkarılmıştır. Kullanılan 9 oligonükleotid primer arasından, epigenetik polimorfizmlerle özdeşleşen yalnızca üç primer seçilmiştir (OPA 05, OPD 01, OPH 10). Bu sonuçlar, kişniş genomlarının 5'-CCGG-3' bölgelerini yüksek oranda içermediğini doğrulamıştır. İncelenen 5'-CCGG-3' bölgelerinin çoğu, kişniş fidelerinden elde edilen genomik DNA örneklerinde yüksek düzeyde DNA sitozin metilasyonları göstermemekte olup, bu bölgelerin farklı şekillerde metillenmediği anlaşılmıştır. Ancak, kontrol ve NaCl uygulamaları arasında yapılan karşılaştırmada, NaCl uygulamasının metilasyonu artırdığı gözlemlenmiştir. TD-MS-RAPD-PCR yöntemi, geniş bir kullanıcı kitlesine hitap eden özelliklere sahiptir. Bu metodoloji, ekonomik olmasıyla birlikte, laboratuvar bütçelerini zorlamadan erişilebilir bir seçenektir. Ayrıca, basit ve temel enstrümantasyon talepleri ile öne çıkar, bu da kullanıcıların karmaşık ekipmanlarla uğraşmak zorunda kalmadan bu yöntemi kullanmalarını kolaylaştırır. TD-MS-RAPD-PCR'nin kolay kullanılabilir yapısı, kullanıcıların hızlı ve güvenilir sonuçlar elde etmelerini sağlar. Bu özellik, herhangi bir laboratuvarında bu yöntemin yaygın olarak benimsenmesine olanak tanımaktadır. Sonuç olarak, ekonomik, basit, ve standart ekipmanlarla kullanılabilir olması, TD-MS-RAPD-PCR metodolojisinin geniş bir araştırma ve analiz alanında tercih edilen bir seçenek haline gelmesine olanak tanımaktadır. Bu çalışmanın sonuçları, NaCl uygulamasının DNA metilasyon seviyelerini artırdığını belirten polimorfizm seviyeleri ile doğrulanmıştır.

TEŞEKKÜRLER

Makaleyi geliştirmek için yaptıkları katkılardan dolayı isimsiz hakemlere teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Ali, Y., Aslam, Z., Ashraf, M., & Tahir, G. R. (2004). Effect of salinity on chlorophyll concentration, leaf area, yield and yield components of rice genotypes grown under saline environment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1(3), 221-225.
- Al-Lawati, A., Al-Bahry, S., Victor, R., Al-Lawati, A. H., & Yaish, M. W. (2016). Salt stress alters DNA methylation levels in alfalfa (*Medicago spp*). *Genetics and Molecular Research*, 15(1), 15018299.
- Arzani, A., & Ashraf, M. (2016). Smart engineering of genetic resources for enhanced salinity tolerance in crop plants. *Critical Review Plant Science*, 35, 146-189.
- Ashraf, M., & Ali, Q. (2008). Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus L.*). *Environmental and Experimental Botany*, 63, 266-273.
- Aydın, A., & Özden, E. (2021). Bazı Tef Genotiplerinde RAPD Markırları Kullanılarak Genetik Varyasyonun Belirlenmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(özel sayı), 3496-3506.
- Aydın, A., İnce, A. G., Uygur Gocer, E., & Karaca, M. (2018). Single cotton seed DNA extraction without the use of enzymes and liquid nitrogen. *Fresenius Environmental Bulletin and Advances in Food Sciences*, 27, 6722-6726.
- Berwal, M. K., & Ram, C. (2018). Superoxide dismutase: a stable biochemical marker for abiotic stress tolerance in higher plants. In A. De Oliveira (Ed.), *Abiotic and Biotic Stress in Plants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82079>
- Demirel, F., Türkoğlu, A., Haliloğlu, K., Eren, B., Özkan, G., Uysal, P., ... & Bocianowski, J. (2023). Mammalian sex hormones as steroid-structured compounds in wheat seedling: Template of the cytosine methylation alteration and retrotransposon polymorphisms with iPBS and CRED-iPBS techniques. *Applied Sciences*, 13(17), 9538.
- Eren, B., Türkoğlu, A., Haliloğlu, K., Demirel, F., Nowosad, K., Özkan, G., ... & Bocianowski, J. (2023). Investigation of the influence of polyamines on mature embryo culture and DNA methylation of wheat (*Triticum aestivum L.*) using the machine learning algorithm method. *Plants*, 12(18), 3261.
- Karaca, M., Aydın, A., & İnce, A. G. (2019). Cytosine methylation polymorphisms in cotton using TD-MS-RAPD-PCR. *Modern Phytomorphology*, 13, 13-19.
- Karaca, M., İnce, A. G., Uygur-Gocer, E., & Aydın, A. (2016). Bisulfite primer pairs for analysis of cotton (*Gossypium spp.*) DNA methylation. *Journal of Scientific and Engineering Research*, 3, 656-662.
- Karaca, M., İnce, A. G., Elmasulu, S. Y., Onus, A. N., & Turgut, K. (2005). Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants. *Analytical Biochemistry*, 34, 353-355.
- Kulak, M., & Aydın, A. (2023). Role of beneficial elements in epigenetic regulation of plants in response to abiotic stress factors. In *Beneficial Chemical Elements of Plants: Recent Developments and Future Prospects* (pp. 22-37).
- Leena, M. A., & Kakoli, R. (2012). Centralized database security in cloud. *International Journal of Advanced Research in Computer and Communication Engineering*, 1(8), 50-68.
- Mishra, D., Gunasekaran, A., Papadopoulos, T., & Hazen, B. (2017). Green supply chain performance measures: a review and bibliometric analysis. *Sustainable Production and Consumption*, 10, 85-99.
- Moradi, P., & Zavareh, M. (2013). Effects of salinity on germination and early seedling growth of chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 2(3), 70-74.

- Önder, A. (2018). Coriander and its phytoconstituents for the beneficial effects. In H. A. El-Shemy (Ed.), Potential of Essential Oils. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78656>
- Salmon, A., Clotault, J., Jenczewski, E., Chable, V., & Manzaneres-Dauleux, M. J. (2008). Brassica oleracea displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Science*, 174(1), 61-70.
- Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101(1), 7.
- Sheldon, A. R., Dalal, R. C., Kirchof, G., Kopittke, P. M., & Menzies, N. W. (2017). The effect of salinity on plant-available water. *Plant Soil*, 418, 477-491.
- Adams, P., Thomas, J. C., Vernon, D. M., Bohnert, H. J., & Jensen, R. G. (1992). Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant and Cell Physiology*, 33(8), 1215-1223.
- Türkoğlu, A., Haliloğlu, K., Demirel, F., Aydın, M., Çiçek, S., Yiğider, E., ... & Niedbała, G. (2023c). Machine learning analysis of the impact of silver nitrate and silver nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum* L.): Callus induction, plant regeneration, and DNA methylation. *Plants*, 12(24), 4151.
- Türkoğlu, A., Haliloğlu, K., Tosun, M., Bujak, H., Eren, B., Demirel, F., ... & Niedbała, G. (2023b). Ethyl methanesulfonate (EMS) mutagen toxicity-induced DNA damage, cytosine methylation alteration, and iPBS-retrotransposon polymorphisms in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*, 13(7), 1767.
- Türkoğlu, A., Haliloğlu, K., Tosun, M., Szulc, P., Demirel, F., Eren, B., ... & Niedbała, G. (2023a). Sodium azide as a chemical mutagen in wheat (*Triticum aestivum* L.): Patterns of the genetic and epigenetic effects with iPBS and CRED-iPBS techniques. *Agriculture*, 13(6), 1242.
- Yilmaz, A., Yilmaz, H., Turan, S., Celik, A., Nadeem, M. A., Demirel, F., ... & Arslan, M. (2022). Biotechnological advancements in coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*(35), 203-220.