

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SİNOP İLİNDE YETİŞEN *SARCOPOTERIUM SPINOSUM* L. SPACH'ın ÇEŞİTLİ
ORGANLARINDA DNA METİLASYON ANALİZİ**

YAZAR
YÜCEL GÖKGÖZ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. HÜLYA SİPAHİ

SİNOP – 2021

ETİK BEYANI

Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

YÜCEL GÖKGÖZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER	i
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
TEŞEKKÜR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın Sistematigi, Morfolojisi, Dağılımı ve Geleneksel Kullanımı	4
2.2. Epigenetik ve DNA Metilasyonu	6
2.2.1. Bitkilerde Metilasyon Çalışmalarından Örnekler	10
2.2.2. DNA Metilasyon Desenlerinin Tespiti	14
2.2.2.1. Metilasyona Özgü Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MSP)	15
2.2.2.2. Bisülfid Dizileme	15
2.2.2.3. Southern Blot ve COBRA Prosedürü	17
2.2.2.4. Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm (MSAP)	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1 Materyal	20
3.2 Yöntem	21
3.2.1 Yapraktan Genomik DNA İzolasyonu	21
3.2.2 Kök, Gövde ve Meyve Organlarından Genomik DNA İzolasyonu	22
3.2.3 MSAP Yöntemi	24
3.2.3.1 Genomik DNA' nın Kesim İşlemi	25
3.2.3.2 Adaptörlerin Bağlanması	26
3.2.3.3 Ön Çoğaltım	27
3.2.3.4 Seçici Çoğaltım	28
3.2.4 MSAP Analiz Sonuçlarının Skorlanması	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	30
5. SONUÇ	37
6. KAYNAKLAR	38
7. EKLER	47
Ek 1. <i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın yaprak organı EcoRI/MspI kesim paterni ile (E)– AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	47
Ek 2. <i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın yaprak organı EcoRI/HpaII kesim paterni ile (E)– AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	49
Ek 3. <i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın meyve organı EcoRI/MspI kesim paterni ile (E)– AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	50
Ek 4. <i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın meyve organı EcoRI/HpaII kesim paterni ile (E)– AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	51

Ek 5.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın kök organı EcoRI/MspI kesim paterni ile (E)– AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	53
Ek 6.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın kök organı EcoRI/HpaII kesim paterni ile (E)– AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	55
Ek 7.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın gövde organı EcoRI/MspI kesim paterni ile (E)– AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	57
Ek 8.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın gövde organı EcoRI/HpaII kesim paterni ile (E)– AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	60
Ek 9.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın yaprak organı EcoRI/ MspI kesim paterni ile (E)– ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	61
Ek 10.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın yaprak organı EcoRI/ HpaII kesim paterni ile (E)– ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	62
Ek 11.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın meyve organı EcoRI/ MspI kesim paterni ile (E)– ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	63
Ek 12.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın meyve organı EcoRI/ HpaII kesim paterni ile (E)– ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	64
Ek 13.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın kök organı EcoRI/ MspI kesim paterni ile (E)– ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	66
Ek 14.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın kök organı EcoRI/ HpaII kesim paterni ile (E)– ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	67
Ek 15.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın gövde organı EcoRI/ MspI kesim paterni ile (E)– ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	68
Ek 16.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın gövde organı EcoRI/ HpaII kesim paterni ile (E)– ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları	69
8.	ÖZGEÇMİŞ	70

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

SEMBOLLER

bç	Baz çifti
°C	Celsius
dk	Dakika
kb	Kilobaz
kg	Kilogram
g	gram
M	Molarite
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ng	Nanogram
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
s	Saniye
sa	Saat
ul	Mikrolitre
V	Volt

KISALTMALAR

AFLP	Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi
5-AzaC	5-azasitidin
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
AP-2	Transkripsiyon Faktör
BsiSI	Restriksiyon Enzimi
c-myc/ myn	Transkripsiyon Faktör
mC	Metilsitozin
CpG	Sitozin-Fosfat-Guanin
CH3	Metil grubu
COCH3	Asetil grubu
COBRA	Kombine Bisülfid Kesim Enzim Analizi
CREB	cAMP Yanıt Elementi Bağlama Proteini
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromide
CTF	Transkripsiyon Faktör
DMRs	Farklı Metillenen Bölgeler
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT	DNA Metiltransferaz
DNMT1	DNA metiltransferaz
DNMT2	DNA metiltransferaz
DNMT3A	DNA metiltransferaz
DNMT3B	DNA metiltransferaz
DNMT3L	DNA metiltransferaz
E2F	Transkripsiyon Faktör
EcoRI	Restriksiyon Enzimi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GC	Guanin-Sitozin
H1	Histon proteini
H2A	Histon proteini
H2B	Histon proteini
H3	Histon proteini
H4	Histon proteini
H19	Tümör Baskılayıcı Gen (Imprinted Maternally Expressed Transcript)

HAT	Histon Asetil Transferaz
HCl	Hidroklorik asit
HDAC	Histon Deasetilaz
HDM	Histon Demetilaz
HMT	Histon Metiltransferaz
HpaII	Restriksiyon Enzimi
ddH ₂ O	Ultra Saf Su
KLHL6	Kelch-like (KLHL) gen ailesine ait bir gen
ICRs	Damgalama Kontrol Bölgeleri
Igf2	İnsülin benzeri büyüme faktörü 2
Igf2r	İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 reseptörü
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MIK	Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
MspI	Restriksiyon Enzimi
MSP	Metilasyona Özgü Polimorfizm
MSAP	Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
NaAcO ₄	Sodyum asetat
NaCl	Sodyum klorür
NF-κB	Nükleer Faktör-Kappa B
NH ₄	Amonyum
NO ₂	Azot dioksit
NO ₃	Nitrat
PVP40	Polivinilpirolidin
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RINm	İnsülin Salgılayan RAT Hücresi
RISC kompleksi	RNA Aracılı Susturma Kompleksi
RNA	Ribonükleik Asit
RNaseA	Ribonukleaz A Enzimi
RNAi	RNA İnterferaz
mRNA	Mesajcı RNA

miRNA	Mikro RNA
lncRNAs	Uzun Kodlamayan RNA
ncRNA	Kodlamayan RNA
piRNA	Piwi etkileşimli RNA
rRNA	Ribozomal RNA
siRNA	Susturucu RNA
snRNA	Küçük Nüklear RNA
snoRNA	Küçük Nükleolar RNA
tRNA	Taşıyıcı RNA
SAM	S-Adenozil Metyonin
Sp1	Transkripsiyon Faktör
SUMO	Küçükubiquitin benzeri modifier
SYK	Tirozin-protein kinaz geni
TE tamponu	Tris-EDTA tamponu
TEAC Yöntemi	Troloks Eşiti Antioksidan KapasiteYöntemi
Tsix	X inaktivasyonuna özgü transkript geni
Xi	İnaktif X kromozomu
Xic	X İnaktivasyon Merkezi
Xist	X inaktivasyonuna özgü transkript geni

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ

ŞEKİLLER	Sayfa
Şekil 2.1. Kış ve bahar mevsiminde <i>Sarcopoterium spinosum</i> görünümü	4
Şekil 2.2. <i>Sarcopoterium spinosum</i> 'un Türkiye genelindeki dağılımı	5
Şekil 2.3. Sitozin metilasyonu ve demetilasyonu	8
Şekil 2.4. Metilasyona özgü PZR yöntemi	15
Şekil 2.5. Bisülfid genomik dizilemede kullanılan metilasyon analizinin prensipleri	16
Şekil 2.6. MSAP tekniğinin şematik gösterimi	18
Şekil 3.1. Yaz mevsiminde <i>Sarcopoterium spinosum</i> görünümü	20
Şekil 3.2. <i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın yaprak, meyve, gövde ve kök DNA'larının %1'lik agaroz jel görünümü	24
Şekil 4.1. <i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın yaprak, meyve, gövde ve kök organlarına ait ön çoğaltımı yapılan DNA'ların %0,8'lik agaroz jel görünümü	30
Şekil 4.2. <i>Sarcopoterium spinosum</i> L. Spach'ın yaprak, meyve, gövde ve kök organlarına ait seçici çoğaltımı yapılan DNA'larının %0,8'lik agaroz jel görünümü	31
Şekil 4.3. MSAP analizinde kullanılan skorlama verilerinin excel formatında gösterimi	32

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1.	İzoşizomer enzimlerin metilasyon duyarlılığı ve kesim deseni	19
Çizelge 3.1.	Bitki materyalinin toplandığı güne ait meteoroloji verileri	20
Çizelge 3.2.	Genomik DNA izolasyonunda kullanılan stok çözeltiler	23
Çizelge 3.3.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> (L) Spach'ın organ DNA'larına ait nanodrop spektrofotometrede saflık ve konsantrasyon değerleri	24
Çizelge 3.4.	MSAP analizlerinde kullanılan adaptör ve primerler listesi	28
Çizelge 4.1.	<i>Sarcopoterium spinosum</i> (L) Spach'a ait dört organın metilasyon oranları	33

ÖZET

SİNOP İLİNDE YETİŞEN *SARCOPOTERIUM SPINOSUM* L. SPACH'ın ÇEŞİTLİ ORGANLARINDA DNA METİLASYON ANALİZİ

Bitki organlarında, genomun CCGG dizilerindeki sitozinlerin farklı metilasyon profilleri, ilgili organlarda genlerin ekspresyonundaki artış veya azalma ile ilişkilidir. Bu çalışmada, köklerinden, gövdelerinden ve yapraklarından halk ilacı olarak kullanılan *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın dört organındaki metillenmiş sitozin düzeyleri Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm (MSAP) tekniği ile incelenmiş ve organlar arası karşılaştırılmıştır. Tüm organlarda, CCGG dizisindeki en yaygın metilasyonun, internal sitozinin tam veya hemi-metillenmiş durumu (Tip I, (CG)) olduğu saptanmıştır. Sadece CG metilasyon tipinde, tek bir monomorfik bölge saptandı. Organlar ikili olarak karşılaştırıldıklarında, yaprak-gövde 14 (% 4.8), yaprak-meyve 4 (% 1.4), yaprak-kök 5 (% 1.7), meyve-gövde 6 (% 2.1), meyve-kök 2 (% 0.7) ve gövde-kök organları arasında 5 (% 1.7) monomorfik bölge tespit edildi. Bu sonuçlar, organlarda, CG ve CHG metilasyon düzeylerinin farklı olduğuna işaret etmiştir. MSAP oranı, meyvede en düşük (% 23.9), gövde ve kökte ise en yüksek (% 38.4) seviyede olmuştur. Organlarda belirlenen farklı metilasyon düzeyleri ve modelleri, hücre farklılaşması ve gelişimi ile ilgili dokuya özgü genlerin ekspresyonlarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir. Ancak, bu sonuçları doğrulamak için organlara özgü DNA fragmentlerinin klonlanması, dizilenmesi ve işlevlerinin ortaya çıkarılması gerekir. MSAP yöntemi özellikle, metillenmiş sitozin oranı yüksek olan ve genom dizisi bilinmeyen *S. spinosum* gibi bitkilerde, sitozin metilasyonunun büyük ölçekli tespiti için oldukça etkili bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Sitozin, metilasyon, MSAP, *Sarcopoterium spinosum*

ABSTRACT

THE ANALYSIS OF DNA METHYLATION IN VARIOUS ORGANS OF *SARCOPOTERIUM SPINOSUM* L. SPACH GROWN IN SINOP PROVINCE

In plant organs, different methylation profiles of cytosines in CCGG sequences of the genome are associated with an increase or decrease in the expression of genes in the relevant organs. In this study, the levels of methylated cytosine in the four organs of *Sarcopoterium spinosum* L. Spach, used as a folk remedy from its roots, stems, and leaves, were investigated by Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) technique, and compared among organs. In all organs, the full or hemi-methylated internal cytosine at CCGG sequences (Type II, (CG)) was common. Only one monomorphic region was detected only in the CG methylation type. When organs are compared binary, the leaf-stem has monomorphic regions of 14 (4.8%), leaf-fruit 4 (1.4%), leaf-root 5 (1.7%), fruit-stem 6 (2.1%), fruit-root 2 (0.7%), stem-root 5 (1.7%). These results indicated that CG and CHG methylation levels in organs were different. The MSAP ratio was the lowest in the fruit (23.9%) and the highest (38.4%) in the stem and root. Different methylation levels and patterns determined in organs may result from differences in the expression of organ-specific genes involved in cell differentiation and development. However, cloning, sequencing, and uncovering the functions of organ-specific fragments are needed to verify these results. MSAP method has been found to be very effective for large-scale detection of cytosine methylation especially in plants such as *S. spinosum* with a high rate of methylated cytosine and whose genome sequence is unknown.

Key Words: Cystosine, methylation, MSAP, *Sarcopoterium spinosum*

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca tezime yaptığı katkılarından, aktardığı tecrübelerinden ve gösterdiği sabırdan dolayı değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hülya SİPAHİ' ye çok teşekkür ederim.

Tezim konusunda samimi yardımlarını gördüğüm meslektaşım Yeliz ASLAN' a, bu Yüksek Lisans çalışmasının hazırlanmasında bana sabır gösteren, bu süre zarfında manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Yeliz GÖKGÖZ, kızlarım Devin Deniz ve Arsen'e çok teşekkür ederim.

Yücel GÖKGÖZ

1. GİRİŞ

Genomlar, türlerin biyolojik özelliklerini ve davranışlarını belirleyen temel genetik bilgiyi içerdiklerinden nispeten kararlı olmalıdırlar. Ancak, çevre koşulları değiştiğinde, nükleotid dizisi değişmeden genomlar çeşitli değişiklikler geçirebilirler ve bu değişiklikler mitoz ve mayoz bölünme ile kalıtılabilir. Epigenetik olarak adlandırılan bu kalıcı değişime yol açan başlıca mekanizmalardan bazıları, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kodlama yapmayan RNA lar aracılığı ile mRNA'nın ekspresyonunun kontrolü sayılabilir.

Bitkilerde DNA metilasyonu, hareketli genetik elementlerin (transpozonların) aktivitesini kontrol ederek genomik bütünlüğün sağlanmasına, gen ifadesinin kontrolüne, hücre farklılaşmasına, gelişme ve biyotik-abiyotik streslere karşı tepkinin oluşturulmasına katkıda bulunur. Ayrıca, sitozin metilasyonu ile oluşan genomik damgalanma, çiçekli bitkilerin tohumlarında ebeveyn genlerinin farklı ifadesini kontrol düzenleyici bir mekanizmadır (Finnegan ve ark., 2000).

Stres koşullarında, metil transferazla DNA metilasyonu ve RNA interferans gibi mekanizmalar, bitki genomik DNA'sını hızlı ve geri dönüştürülebilir şekilde değiştirirler (Li ve ark., 2008). Stres deneyiminden sonra bitki somatik hücreleri epigenetik mekanizmalarla kazandığı deneyimi hatırlar (Peng ve ark., 2008). Guanin-Sitozin (GC) içeriği zengin dizilerin metilasyonu, transkripton ekspresyonunu baskılayabilir, bitkinin metabolizması yavaşlar ve çevresel streslere karşı direnç için enerji muhafaza edilir. Tersine, dayanıklılıkla ilişkili genlerin azaltılmış metilasyonu ise streslere karşı uzun süreli veya kalıcı dayanıklılık sağlanır.

Sitozinin hipometilasyonu veya hipermetilasyonu bitki gelişimi ilişkili genlerin ifadesini kontrol etmektedir (Pavet ve ark., 2006; Cao ve ark., 2011). DNA metilasyonunun değişimi, verim, meyve olgunlaşması, tohum büyüklüğü, çiçeklenme zamanı ve patojen dayanıklılığı gibi önemli özellikleri etkilerler (Finnegan ve ark., 1998; Manning ve ark., 2006; Hauben ve ark., 2009; Zhong ve ark., 2013). Bütün organlar aynı genoma sahip olmalarına rağmen farklı genleri ifade ederler ve bunun neticesinde organlarda fenotipik çeşitlilik görülür. Organa özgü genlerin ifadesi sitozin metilasyonu ile kontrol altında tutulur. Dolayısıyla organlarda belirlenen metilasyon düzeylerinin farklılığı organa özgü genlerin ifadeleriyle ilişkilidir (Osabe ve ark., 2014). Pamukta (Osabe ve ark., 2014), pirinçte (Xiong, 1999),

Arabidopsis'te (Ruiz-Garcia ve ark., 2005), mısırdı (Lu ve ark., 2008) ve sorgumda (Zhang ve ark., 2011), farklı organlarda toplam metilasyon düzeyi % 16 ila 45 arasında bulunmuştur.

Bitki genomlarında, sitozin metilasyonunu değerlendirmede çeşitli metodolojik yaklaşımlar bulunmaktadır. 'Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm (MSAP)' bunlardan biridir. MSAP, aynı örneğin *EcoRI/HpaII* ve *EcoRI/MspI* gibi metilasyona duyarlı enzimlerle kesimleri ve seçici çoğaltımları sonucunda elde edilen DNA parçacıklarının varlığında veya yokluğundaki farklılıklarla epigenetik çeşitlilik tespit edilmektedir (Guevara ve ark., 2017).

Sarcopoterium spinosum L. Spach, rosaceae ailesinden olup, küre şeklinde, çok dallı, küçük çiçekli, çok yıllık, dikenli ve otsu bir çalıdır. Ülkemizde "Abdest bozan", "Geren dikenli" veya " Çetir dikenli" gibi isimlerle anılmaktadır. *S. spinosum* Akdeniz, İran-Orta Asya vejetasyon zonları arasında, yarı kurak ekotondan yarı nemli Akdeniz bölgelerine kadar geniş iklim koşullarında görülür (Litav and Orshan 1971; Zohary 1973). Ortadoğu ülkelerinden Suriye, Lübnan, İsrail, Türkiye, Girit, Yunanistan, Arnavutluk, Dalmaçya, Malta, Tunus ve İtalya'nın bazı izole yerlerinde rastlanmaktadır (Lanteri ve ark., 2012). Türkiye'de ise Akdeniz, Ege ve Marmara bölgeleri (Akdeniz iklim bölgesi) ile Karadeniz kıyı şeridinde Sinop yöresinin çalılı meralarında yaygın olarak bulunmaktadır (Kaya ve Aladağ, 2009).

Çalı halindeki bu bitki süpürge, minder, çit ve koyun ağılı yapımında kullanılmaktadır. Uzun yıllardan beri halk arasında tedavi amacıyla da kullanıldığı bilinmektedir (Henkin ve ark. 2014). Tıbbi faydalarından biri kök kabuklarının diyabete karşı tedavi edici olması ve böbrek taşlarını çözdürücü olmasıdır (Yaniv ve ark. 1987). Bitkinin diyabet için kullanımı doğu Akdeniz bölgesinde yaygındır (Reher ve ark. 1991 a, b). Geleneksel olarak ağrı kesici olarak bilinmekte ve ruhsal korkulara karşı da yapraklarından elde edilen iksir kullanılmaktadır. Tuzlanmış, baharatlanmış ve tükürüğe batırılmış yeşil yaprakların göz şikâyetlerine karşı iyi geldiği bildirilmektedir (Bachrach, 2007). Ayrıca *S. spinosum*'un kök kabuklarından izole edilen triterpenler de kan şekeri düzeyini düşürmektedir.

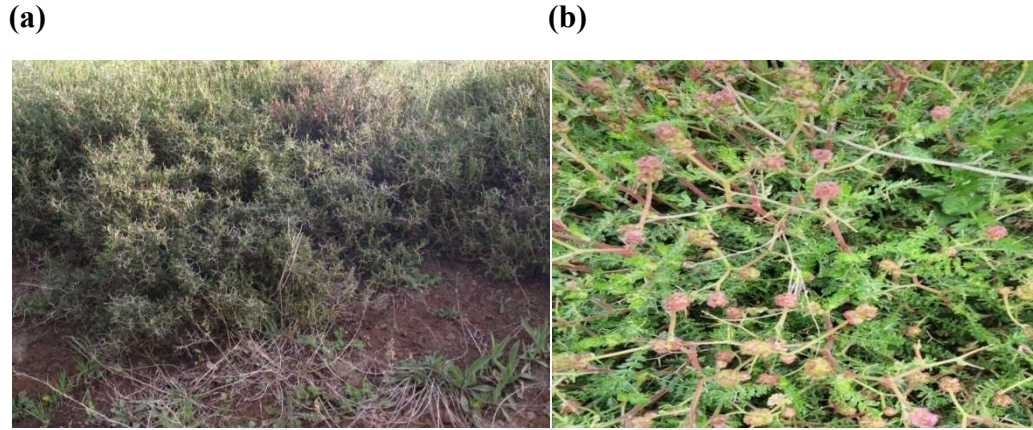
Bu tez çalışmasında *Sarcopoterium spinosum*'un yaprak, kök, gövde ve meyve gibi farklı organlarında CCGG bölgelerinde metilasyon düzeyini belirlemek, metilasyon modelini tanımlamak ve farklı organlarda mukayese etmek amaçlanmıştır. Bu çalışma bu tür hakkında yapılan moleküler işaretleyici çalışmalarının ilkidir. Elde edilen MSAP moleküler işaretleyicileri benzer çalışmalarda diğer işaretleyicilerin uygunluğunu ve etkinliğini

değerlendirmek için ideal bir referans olacaktır. Bu çalışma sonucunda, farklı organlarda farklı şekilde metillenmiş olduğu tespit edilen DNA parçacıkları daha ileriki çalışmalarda izole edilebilir, dizilenebilir ve gen ifadesinin kontrolünde metilasyonun rolünün araştırılmasında faydalı olabilir. Ayrıca metilasyon modelleri mukayese edilerek, türün ülkemizdeki diğer yetiştirme alanlarındaki metilasyon modelleri ile karşılaştırılıp, türün moleküler evrimi ve ekolojik adaptasyonu incelenebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın Sistematığı, Morfolojisi, Dağılımı ve Kullanımı

Sarcopoterium spinosum(L) Spach, Rosaceae familyasının bir üyesi olup, 1 m boya kadar ulaşabilen, kümeler halinde bulunan, küçük, dikenli çalı formunda bir türüdür (Şekil 2.1). Yurdumuzda “abdestbozanotu”, “çayırdikeni”, “çetirdikeni” gibi isimlerle bilinir (Zeybek, 1985).

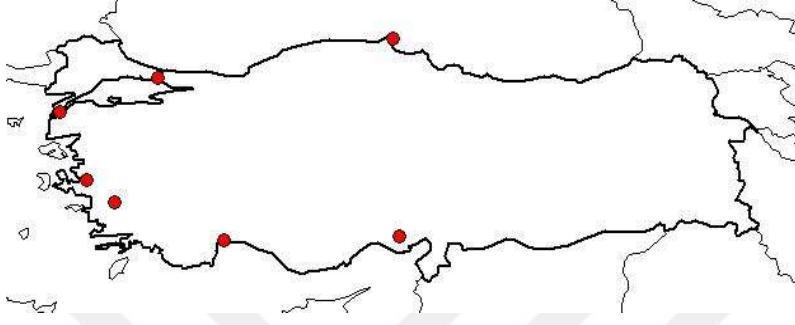


Şekil 2.1. Kış (a) ve bahar (b) mevsiminde *Sarcopoterium spinosum* görünümü

S. spinosum taksonomisi; Alem: Plantae, Şube: Tracheophyta, Sınıf: Magnoliopsida, Takım: Rosales, Family: Rosaceae, Cins: *Sarcopoterium*, Tür: *S. spinosum* Spach.'tır (Anonim, 2017)

Sarcopoterium cinsi tek tür ile temsil edilir. *S. spinosum* diploid bir bitki olup kromozom sayısı $2n: 28$ dir (Smirin ve ark., 2010). Çiçeklenmesi Mart ayında, meyve oluşumu ise Mayıs ayında gerçekleşir (Cullen, 1972). Sürgün ve dallarının uçları, dallanmış dikenlerle sonlanır. Yaprakçık sayısı 11-25 adettir ve tepede tek terminal yaprakla sonlanır. Yaprığın alt ve üst epidermisinde salgı tüyleri bulunmaktadır, örtü tüylerine ise sadece alt epidermiste rastlanmaktadır. Yaprakta stomalar sadece alt epidermiste bulunur (Bozkurt,2005). Çiçeklerinde çanak yaprakları yeşil, çoğunlukla beyaz kenarlı, oval-dikdörtgensel; yaklaşık 2mm boyundadır. Çiçekleri tek eşeyli olup alttakiler çoğunlukla erkek, üsttekiler ise dişi çiçeklerdir (Cullen, 1972). 4 adet çanak yaprak, çok sayıda stamen, 2 tane de meyve yaprağı (karpel) vardır. Meyveler üzüme benzer tiptedirler (Cullen, 1972). Meyve içlerinde 2–4 arası tohum görülmektedir (Bozkurt,2005).

S. spinosum'un genel yayılış alanı Doğu Akdeniz havzası olup, ülkemizde Çanakkale, İstanbul, Sinop, İzmir, Aydın, Antalya, Adana çevresinde yayılış gösterir (Cullen, 1972) (Şekil 2.2). Doğu Karadeniz'den İstanbul'a kadar tüm Karadeniz kıyı şeridi boyunca ise sadece Sinop'ta gözlenir (Elmas, 2017). Bunun nedeni, tüm Karadeniz kıyı boyunca sıcak ve yağışlı bir Akdeniz ikliminin görüldüğü tek yerin Sinop olmasıdır (Elmas ve ark.,2015). *S. spinosum*, Sinop Boztepe Yarımadası'nın baskın bir türüdür (Elmas, 2017).



Şekil 2.2. *Sarcopoterium spinosum* 'un Türkiye genelindeki dağılımı (Tubives, 2017)

Birçok kaynakta, *S. spinosum*'dan uzun yıllardan beri halk arasında tıbbi yönden yararlanıldığı bildirilmiştir. Hippocrate ve Dioscorides, bitkinin göğüs bölgesinde yakı olarak, meyve ve yapraklarından da dizanteri tedavisinde kullanıldığından bahsetmişlerdir. Ayrıca bitkinin köklerinden kan şekerini düşürücü preparatlar hazırlanmıştır (Şener ve ark., 1987). Filistin'de yapılan çalışmalarda *S. spinosum*'un antimikrobiyal aktivitesinin görüldüğü, halk arasında ise antienflamatuar, analjezik, diş ağrısı ve hemoroit tedavisinde, antidiabetik, mide ağrılarına karşı, diüretik, böbrek taşlarına karşı kök, meyve ve yapraklarının kullanıldığı rapor edilmiştir (Al-Kurdi ve ark., 2000).

S. spinosum'un etil asetat ekstresinin *Salmonella chloresuis arizonae*' e ve *Morganella morgani*' e karşı, toprak üstü organlarından hazırlanan kloroform ekstresinin ise *S. chloresuis arizonae*'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Bozkurt, 2005).

Smirin ve ark. (2010), *S. spinosum* ekstraktının, insülin salgılayan RAT hücrelerinde (RINm) bazal ve glukoz/forskolin kaynaklı insülin salınımını ve hücre canlılığını artırdığını, bitki özütünün farelerde diyabetin ilerlemesi üzerinde önleyici (hipoglisemik aktivite) bir etkiye sahip olduğunu ve insülini taklit eden, antidiabetik aktivite için temel sağlayan etkilere sahip olduğunu açıklamışlardır.

Bozkurt (2005), *S. Spinosum* örneklerindeki ortalama E vitamini miktarlarının %0.025966 ila %0.037212 aralığında bulunduğunu tespit etmiştir. Tespit edilen bu miktarın ilaç sanayinde halen E vitamini kaynağı olarak kullanılmakta olan soya fasulyesinde belirlenen (%0.0051–0.0111) orana göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek oranda α - tokoferol içermesi nedeniyle alternatif E vitamini kaynağı olarak değerlendirilebileceğini bildirmiştir. *S. spinosum* bitkisinin sitotoksik aktivitesinin tespiti için n-hegzan, etanol, metanol, etil asetat ekstraktlarına Brine Shrimp metodunu uygulamış ve sitotoksik özellikte olmadığını tespit etmiştir. Bitkinin sitotoksik aktivite göstermemesi ise halk arasındaki kullanım güvenliği için önemlidir. *S. spinosum* bitkisinin antioksidan etkisini TEAC yöntemi ile incelemiş; etanol ve metanol ekstraktlarında farklı oranlarda antioksidan etkisi bulmuştur. Bitki üzerinde yaptığı bu araştırmalar neticesinde *S. spinosum*'un Türk Farmakopesi'nde yer alması gerektiğini rapor etmiştir.

Bitki vejetatif organlarında farklı uçucu bileşikler içermektedir. Bitkinin uçucu yağ esas bileşenleri, gövdede oxygenated monoterpenler (%20.7), aromatik bileşikler (%33) ve aldehitler (%39.6), yapraklarda oxygenated sesquiterpenler (%25.7), alifatik hidrokarbonlar (%21.2), aldehitler (%42.5), köklerde aromatik bileşikler (%48.4) ve aldehitlerdir (%51.6) (Sipahi ve ark. 2017). Hekzan ekstraktlarında ise aromatik bileşikler (gövdede %68.0, yapraklarda %73.1) ve ketonlar (gövdede %27.5, yapraklarda %22.3) baskın olarak bulunur. Yaprakların hekzan ekstratı, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* için, gövdenin hekzan ekstratı ise *S. aureus* için, gövde ve yaprakların metanol ekstratı *S. aureus* (MRSA), *S. aureus* ve *Micrococcus luteus* için antimikrobiyaldir. Bitkinin tüm organlarının uçucu yağı ise *Candida krusei*, *C. parapsilosis*, MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, Vancomycin Resistant *Enterococcus* (VRE) ve *B. cereus*'un gelişimlerini inhibe etmiştir (Sipahi ve ark. 2017).

2.2. Epigenetik ve DNA metilasyonu

Genomik DNA, canlılarda ortaya çıkan metabolik özellikleri kodlar ve bu özelliklerin yeni nesillere kalıtsal olarak aktarılmasını sağlar. Canlı sistemlerin düzenli çalışabilmesi için genomun kararlı yapısının korunması ve gen ifadesinin değişikliğe uğramaması gerekir. Kimyasallar ve zararlı ışınlar gibi doğal olmayan nedenlerle oluşan mutasyon ve modifikasyonlar, sitotoksik-kanserojen gibi etkilere yol açarken, doğal metabolik süreçler ve çevresel etkiler sonucu oluşan bazı modifikasyonlar ise canlı sistemlerin çalışmasına

bazen olumlu bazen de olumsuz yönde etki eder. Doğal olan veya olmayan modifikasyonlar aracılığıyla gen ifadesinde oluşan değişiklikler epigenetik disiplini altında incelenir (Eser ve ark., 2016).

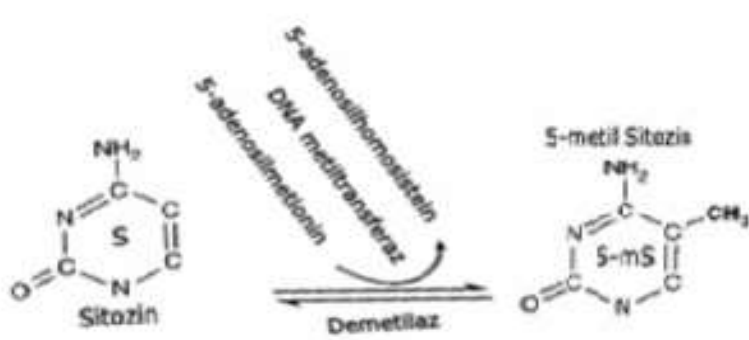
Genetik üzeri veya genetik ötesi (epi: üst, üstünde, genesis: köken) anlamına gelen epigenetik terimi, fenotipin oluşumundan sorumlu genler ile bu genlere ait ürünler arasındaki ilişkiyi ve gelişim esnasında genotipin, fenotipi nasıl etkilediğini inceleyen biyoloji disiplini olarak ilk defa 1942’de Conrad Waddington tarafından kullanılmıştır (Gürel ve ark., 2016). Günümüzde epigenetik, DNA ve histonların kimyasal modifikasyonlarının, kromatin yeniden düzenlenmelerinin ve kodlama yapmayan RNA’ların, hücre ve organa özgü gen ifadesini nasıl değiştirdiğini araştıran bilim dalıdır. Epigenom ise bir hücrenin belli bir anındaki mevcut olan epigenetik modifikasyonlarının motifini ifade eder. Epigenetik karakter, mitoz ve mayoz ile kalıtılabilen kararlı bir fenotip olup, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın gen ifade motifindeki değişiklikler sonucu ortaya çıkar. Genom dizisi bütün hücrelerde aynı olmasına rağmen, gen ifade motifleri hücrelere özgüdür (Klug ve ark., 2018).

Farklı çevre koşullarına maruz kalan bireylerin metilasyon desenlerinin değişmesi neticesi edindikleri epigenetik mirası, DNA dizilerinde farklılık oluşmamasına rağmen yavrularına aktarabildikleri bulunmuştur. Tek yumurta ikizleri ya da bakteri klonları gibi DNA’larındaki baz dizileri aynı olan bireylerde, epigenetik varyasyonlar aracılığıyla fenotipik farklılıklar görülebilmektedir (Coolen ve ark., 2011). Fenotipik çeşitliliği neyin belirlediği, organizmanın farklı organ hücrelerinin aynı genom dizisine sahip olmasına rağmen nasıl bağımsız gen anlatımına ve fonksiyonlarına sahip olduğu bu farklılaşmanın nasıl gerçekleştiği, çevresel faktörlerin gen anlatımına etkisi ve kalıtımı gibi konular epigenetiğin araştırma alanına girer (Goldberg ve ark., 2007). Ayrıca, epigenetik alanında yapılan son araştırmalar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlama yapmayan RNA (ncRNA)’ların ilgili olduğu epigenetik mekanizmaların çiçeklenme süresi, meyve gelişimi, çevresel faktörlere verilen yanıtlar ve bitki bağışıklığı gibi bitki yaşamının hemen her alanında rol aldıklarını gösterir. Epigenetik çalışmalar; pestisitlere, hastalıklara, biyotik-abiyotik streslere karşı dirençli ekinlerin oluşturulması ve bitki ıslahıyla yüksek verimlilikte gıdaların elde edilmesi gibi sürdürülebilir tarım uygulamalarında ümit vaat etmektedir.

Epigenetik mekanizmalar, gen ifadesini doğrudan ve dolaylı yoldan kontrol eden mekanizmalar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Doğrudan gen ifadesine etkileyen mekanizmalar, genlerin sessizleşmesine neden olurlar. Bu mekanizmalar da DNA

düzeyindeki modifikasyonlar ve kromatin düzeyindeki modifikasyonlar olarak ikiye ayrılır. DNA metilasyonu, DNA düzeyindeki modifikasyonlalararasında en bilinen ve en işlevsel olanıdır. Kromatin düzeyindeki modifikasyonlar arasında en çok bilineni ise histon modifikasyonlarıdır. Bunlar; histon asetilasyonu, histon metilasyonu, histon fosforilasyonu, histon ubiquitinizasyonu, histon sumoilasyonu gibi modifikasyonlardır. Dolaylı yoldan gen ifadesine etkiyen mekanizmalar post-transkripsiyonel mekanizmaları özellikle de kodlama yapmayan RNA'nın, mRNA üzerine etki ederek protein sentezini engellemesini içerir (Anonim, 2020).

DNA metilasyonu, DNA düzeyinde en çok bilinen ve çalışılan epigenetik modifikasyon tipidir (Güngör ve ark., 2015). DNA metilasyonu, bir metil (-CH₃) grubunun, DNA metil transferaz (*DNMT*) enzimleri aracılığı ile bir CpG (sitozin-fosfat-guanin) dinükleotidindeki sitozinin 5. karbon atomuna kovalent şekilde eklenmesiyle oluşur (Şekil 2.3). S-adenosil metionin (SAME), bu reaksiyon için genel metil vericisidir.



Şekil 2.3. Sitozin metilasyonu ve demetilasyonu

Canlılarda birçok metil transferazın varlığı bildirilmekte olup, ökaryotlarda tanımlı 5 farklı DNA metiltransferaz (*DNMT*) bulunmaktadır. Bunlar, *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *DNMT3L*'dir. Gametogenez, embriyogenez ve vücut organlarının gelişimi sırasında metilasyon desenlerinin oluşturulmasından *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *DNMT3L* enzimleri sorumludur. *DNMT3A* ve *DNMT3B* enzimleri *de novo* metilasyonu gerçekleştirirler. *De novo* DNA metilasyonun gerçekleştirilmesinde substrat olarak metillenmemiş DNA kullanılır. *DNMT3L*, diğer *de novo* metil transferazlara yardımcı bir proteindir. Diğer DNA metil transferaz enzimleri gibi aktif bölge motiflerine sahip olmadığından ancak diğer metil transferazlarla beraber bulunduğu anda aktive olabilmektedir. *DNMT1* enzimi, replikasyon sırasında tek zinciri metillenmiş DNA'nın diğer zincirinin de metillenmesini sağlar. Yani, *DNMT1*, kalıp DNA iplikçığının metilasyon deseninin

sentezlenecek yeni zincirde de oluşmasını sağlar. Böylelikle DNA metilasyon desenleri epigenetik bir işaret olarak mitoz ve mayoz bölünme süreçleriyle dölden dölle aktarılabilir. *DNMT2* enziminin ise moleküler yapısından dolayı DNA hasarlarının tespitinde, DNA rekombinasyonunda ve oluşabilecek mutasyon tamirlerinde görev aldığı düşünülmektedir (Toparslan ve ark., 2015).

Çoğu hayvan ve bitkinin DNA'sı, büyük oranda sitozin nükleotiti olmak üzere, metillenmiş bazlar içerir. Ökaryot DNA'sındaki sitozin bazlarının yaklaşık %5'i metil gruplarına sahiptir (Can ve ark., 2016). İnaktif durumdaki memeli X kromozomları, aktif durumdaki transkripsiyon geçiren DNA ile karşılaştırıldığında çok büyük oranda metillenmiş olduğu görülmüştür. Farklı organlarda bulunan aynı genler karşılaştırıldıklarında ise, bu genlerin ifade edilmediği hücrelerde yoğun biçimde metillendikleri görülür. İnaktif genler demetile (metil gruplarının uzaklaştırılması) olduklarında ise aktif duruma geçerler (Can ve ark., 2016).

Canlılar ve organları arasında birbirinden farklı olarak metillenen bölgeler DMRs (Differentially methylated regions) olarak ifade edilmektedir. Tüm genomun ortalama %1'i kadar metillenmiş sitozin, genlerin promotör bölgeleriyle ilişkilidir. Promotör bölgeleri, gen ifadesinin düzenlenme mekanizması olan transkripsiyonun başlayıp başlamamasını belirler. Metillenme olmadığında promotör bölgelerdeki sitozinlere transkripsiyon faktörleri bağlanabildiğinden transkripsiyon gerçekleşebilir. Tersisi durumda ise promotör bölgelerde CpG adacıklarına bağlanan metil grupları, baz ya da baz eşleşmelerini etkilemeseler de dışarı doğru çıkıntı oluşturarak transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engeller. Sonuç olarak da transkripsiyon ve translasyon gerçekleşemez ve gen ifadesi baskılanmış olur. Farklı metillenen bölgelerdeki (DMRs) DNA metilasyon desenlerinin tespiti, gen ifadesinin kontrolünde oldukça önemlidir (Toparslan ve ark., 2015).

Embriyodaki hücre farklılaşması esnasında gerçekleşen genlerin inaktivasyonunda, DNA metilasyonu önemli bir mekanizmadır. Genler, metilasyona uğradıklarında, takip eden hücre bölünmeleri boyunca metillenmiş halde varlıklarını sürdürebilirler. Metilasyonda görevli enzimler, yeni metillenmiş DNA ipliği üzerinde çalışır ve DNA replikasyonunun ardından, kardeş ipliği doğru şekilde metillerler. Metilasyon kalıpları bu yolla kalıtılır ve özelleşmiş organ hücreleri, embriyonik gelişim boyunca oluşan değişimlerin kimyasal kaydını saklarlar.

Yüksek yapılı canlılarda DNA metilasyonu, gen ifadesinin farklılık göstermesi, inaktif kromatin oluşumu, kromozom replikasyonunun zamanlaması, X kromozomu inaktivasyonu, genomik damgalama (ebeveyne özgü gen transkripsiyon motifinin oluşturulması) ve karsinogenez gibi farklı hücresel aktivitelerde rol oynar. Metilasyon ile gen ifadesi değişerek hücre fonksiyonları farklılaşır. DNA metilasyonu gibi mekanizmalar, sadece biyotik ve abiyotik streslere tepkide canlılar üzerinde kısa süreli değil aynı zamanda kromatin yapısında neden olduğu değişikliklerle de kalıcı etkilidir (Peng ve ark. 2008). Genetik yönden özdeş bireyler arasındaki fenotipik farklılıkları ve bu farklılıkların kalıtsal nitelik kazanmasında, metilasyon mekanizmaları etkilidir (Toparlan ve ark. 2015).

2.2.1. Bitkilerde Metilasyon Çalışmalarından Örnekler

Bitkilerde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, damgalanmış genler ve DNA demetilasyonu rollerinin tespit edildiği örnekler mevcuttur. Damgalı genlerin alelleri, erkek veya dişi ebeveynden kalıtıldığına bağlı olarak farklı şekillerde ifade edilir. Arabidopsis'te *MEDEA*, *FWA*, *FIS2* ve *PHERES* genlerinin damgalanmış olduklarını bilinmektedir. İlk üç gen maternal olarak kalıtılır ve endosperm oluşumu sırasında patern alelleri damgalanır (Gehring ve Henikoff, 2008).

Tarımsal öneme sahip buğday, çeltik, domates, mısır, fasulye ve meyve gibi ürünler üzerinde epigenetik mekanizmalar üzerine çalışmalar sürdürülmektedir. Reyna-Lopez ve ark. (1997) tarafından geliştirilen Metilasyona Duyarlı Amplifiye Polimorfizm (MSAP) ve bisulfit dizileme tekniklerinin kullanılmaya başlanmasından sonra, kültür bitkileri ve yabani formlarda metilasyon varyasyonu ve bu varyasyonun biyotik ve abiyotik streslere dayanıklılık ile verim arasındaki ilişkinin anlaşılması hakkında çok sayıda çalışma yayınlanmıştır.

Bitki ve hayvanlardaki çalışmalarda sitozin metilasyonunun yoğun olarak CpG dinükleotit bölgelerinde olduğu rapor edilmiştir. Bazı bitki türlerinde bulunan yüksek 5-metilsitozin metilasyonunun CpG dizileriyle sınırlı olmadığı, sitozinin CNG (N= C, G, A, T) ve düşük oranlarda da CNN dizilerinde gerçekleştiği gösterilmiştir (Gruenbaum, 1981). Bugüne kadar birçok bitki türünde yapılan DNA metilasyonu çalışmalarında genellikle tahıl bitkileri CpG ve CHG dizilerinde yüksek oranlarda metillenme göstermişlerdir (Bartels ve ark. 2018). Buğday grubu bitkilerde meydana gelen sitozin metilasyonunun yaklaşık %50'sinin CG metilasyonu olduğu, CHG ve CHH metilasyon seviyelerinin ise türler arasında CG metilasyonundan daha fazla varyasyon gösterdiği rapor edilmiştir. *B. vulgaris*

metilasyonunun %81,2'i CHG ve %18,9'i CHH tipi metillenme gösterirken, *Vitis vinifera* metilasyonunun %46.0'sının CG metilasyonu, %20.4'ünün CHG metilasyonu ve %1.2'si CHH tipi metilasyon gösterdiği bildirilmiştir. Turpgillerde ise tam tersi olarak CG ve CHG tipi metilasyonunun düşük, CHH tipi metilasyonunun oranının yüksek olduğu ve bazı buğdaygil türlerinde CHH tip metilasyona rastlanılmadığı bildirilmiştir (Niederhurth ve ark., 2016; Bartels ve ark., 2018).

Farklı türler ve aynı türe ait bireyler arasında geniş bir DNA metilasyon varyasyonu bulunmaktadır. Aynı bitkinin farklı organlarına ait metilasyon seviyelerinin de yüksek varyasyon gösterdiği birçok çalışmada ifade edilmiştir. Ayrıca bitki doku ve organlarındaki DNA metilasyon seviyelerinin, gelişim dönemlerine göre de değişim gösterdiği bulunmuştur. Örneğin, domates protoplast hücreleri ve olgunlaşmamış organlardaki metilasyon seviyeleri (ortalama %20), olgun polen ve tohum organlarındaki metilasyon seviyelerine (ortalama %25) göre önemli ölçüde düşük bulunmuştur. Polen genomuna ait CpG bölgelerinde (*MspI/HpaII*) kesimiyle tespit edilen) %55 oranında metilasyon seviyesi görülürken CHG bölgelerinde (*BstNI/EcoRI* kesimiyle tespit edilen) %85 metillenme seviyesi tespit etmişlerdir (Messeguer ve ark., 1991). *Silene latifolia* bitkisinde yapılan çalışmada, tohum çimlenmesi ve bitki sürgünlerine ait apikal meristem organ gelişimi sırasındaki DNA metilasyonundaki değişiklikler incelenmiştir (Zluovave ark., 2001). Veriler, tohum çimlenmesi sırasında önce endosperm organında ve ardından gelişen hipokotilde DNA metilasyon seviyesinde hızlı bir düşüşün gerçekleştiğini göstermektedir. Sürgünlere ait apikal meristem kısımlarının, vejetatif büyüme dönemi boyunca yüksek oranda metillenme gösterdiği ve bu bölgelerde düşük oranda hücre bölünmesi görülmüştür. Bununla birlikte, sürgün apikal meristeminden çiçek tomurcuğu gelişimi sırasında, meristem organdaki yüksek metilasyon seviyesinin azaldığı ve hücrelerindaha hızlı bölünmeye başladığı tespit edilmiştir. Arabidopsis organları arasındaki DNA metilasyon seviyesini analiz etmek için MSAP yöntemi kullanılmış ve üreme organlarının vejetatif organlara, vejetatif organların da kotiledonlara oranla daha yüksek metilasyon seviyesi gösterdikleri rapor edilmiştir (Ruiz-Garcia ve ark., 2005).

Tan (2010) mısır fidelerine PEG (Polyethyleneglycol) ve NaCl uygulaması sonucu ortaya çıkan metilasyon değişikliklerini belirlemek için MSAP tekniğini kullanarak yaptığı çalışmada, stresle ilişkili 25 adet DNA fragmentini klonlayıp sekanslamış, iki adet fragmentin GagePol Retrotranspozon protein genlerine homolog olduklarını ve ozmotik stresin retrotranspozonların metilasyonunu arttırdığını rapor etmiştir. Wang ve ark. (2016),

NaCl uygulanan pamuk bitkisinde global DNA metilasyon seviyesinin önemli ölçüde arttığını rapor etmişlerdir.

Kuraklık stresi altındaki *Oryza sativa*'nın, farklı organlarına ait gelişim aşamalarında toplam %12.1'e varan metilasyon farklılıkları tespit edildi. Aynı gelişim aşamasında köklerin, yapraklardan daha düşük metilasyon seviyesi gösterdiği ve kuraklık stresi altında köklerin önemi gösterilmiştir (Suji ve John, 2010). Kuraklığa duyarlı ve kuraklığa dayanıklı çeltik çeşitlerinde yapılan diğer bir çalışmada kuraklığa duyarlı çeşitlerin hipometilasyona uğrarken, toleranslı çeşitler hipermetilasyona göstermiştir (Gayacharan, 2013).

Zhang ve ark. (2015), ıspanak bitkisinde DNA metilasyonunun büyüme üzerindeki etkisini araştırmak için ıspanak tohumlarını bir demetilasyon reaktifi olan 5-AzaC(5-azasitidin) ile muamele etmişlerdir. 30 μ M 5-azaC ile muamele edilen ıspanak tohumlarında, gelişimi ve çimlenme artarken 100-1000 μ M arası 5-azaC ile muamele edilenlerde gelişim ve çimlenme oranında azalma gösterdiğini açıklamışlardır.

Arabidopsis yabanıl genotiplerinde, vernalizasyon uygulaması sonucu DNA metilasyon seviyeleri azalmakta ve bu durum erken çiçeklenmeye neden olmaktadır. Finnegan ve ark. (1998), metil transferaz (*MET1*) antisens transgeninin sebebiyet verdiği düşük DNA metilasyonu sonucunda, vernalizasyona gerek duyulmadan, çiçeklenmenin teşvik edildiğini saptamışlardır. Çiçeklenmenin artmasının, *MET1* antisens hatlarındaki metilasyon seviyelerindeki düşüşle doğru orantılı olduğu bulunmuştur. Erken çiçeklenme fenotipinin, antisens transgeni segregasyonla kaybedildiğinde de sonraki nesile kalıtıldığını tespit ettiler. Yabanıl genotiplerde olduğu gibi soğukla indüklenen erken çiçeklenme sinyalinin, *MET1* antisens genine sahip bitkilerin sonraki döllerinde de sıfırlandığını gördüler. *MET1* antisens geninin neden olduğu demetilasyonun, bazı vernalizasyon özelliklerini açıklayabildiğini, ancak her yeni nesilde yeniden vernalizasyon sinyaline duyulan ihtiyacın sebebinin açıklayamadıklarını bildirmişlerdir.

Manning ve ark. (2006), domateste meyve olgunlaşmasını düzenleyen süreçteki faktörün, *Cnr* lokusunda yer alan renklenme ve olgunlaşmayla ilgili bir gen olabileceğini tespit ettiler. *Cnr* mutasyonu, meyvelerde bir hücreden diğerine geçebilen önemli renk kaybına neden olur. Konumsal klonlama ve virüs kaynaklı gen susturma yöntemlerini kullanarak, *SBP-box* (SQUAMOSA promoter bağlayıcı protein benzeri) geninin *Cnr* lokusunda bulunduğunu ve *Cnr* fenotipinin *SBP-box* promotöründeki epigenetik değişiklikten kaynaklandığını tespit

ettiler. Çalışmalarında, bir SBP-box geninin normal bir bitki gelişiminde ve meyve olgunlaşmasında kritik olduğunu ve epiallellerin süreçteki önemini vurgulamışlardır.

Bitkilerde tohum verimi gibi nicel özellikler, genetik olarak özdeş bireylerden oluşan bir popülasyon içinde dahi normal olarak dağıtılır. Bitkilerde, yerel toprak kalitesi, mikro iklim ve ekim derinliği gibi çeşitli faktörler, izogenik popülasyonların bireyleri arasındaki büyüme farklılıklarını etkiler. Bu fiziksel faktörlerin yanı sıra, epigenetik faktörler de büyüme ve verimdeki farklılıklara katkıda bulunur. Ürün verimini düzenleyen süreçler hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bu süreçlerin, epigenetik faktörler sahip olması beklense de ürün verimini artırmak için epigenomu şekillendirmenin mümkün olup olmayacağı belirsizdir. Hauben ve ark. (2009), kanola bitkisinde (*Brassica napus*) yaptıkları çalışmada, tohum veriminin belirlenmesinde enerji kullanım verimliliğinin önemli bir faktör olduğunu ve epigenetik bir özellik sayesinde yapay olarak seçilebileceğini göstermişlerdir. Solunum yoğunluğuna göre, izogenik bir kanola popülasyonundan, farklı fizyolojik ve agronomik özelliklere sahip popülasyonlar oluşturmuşlardır. Bu popülasyonların genetik olarak özdeş, ancak epigenetik olarak farklı oldukları bulunmuştur. Ayrıca, seçilen hatların hem DNA metilasyon modellerinin hem de fizyolojik özelliklerinin kalıtsal olduğu tespit etmişlerdir. Enerji kullanım verimliliğine göre seçilip ana hatlardan türetilen melezlerde, heterozisli bireylerden elde edilenin %5 üzerinde verim artışı elde etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarla, belirli epigenomik özelliklere sahip popülasyonları seçerek yapılan yapay seçilimin verim potansiyelini artırdığını göstermişlerdir.

Cao ve ark. (2011), genomda meydana gelen hipometilasyonun veya hipermetilasyonun bitki gelişimini ve abiyotik strese duyarlı genlerin ekspresyonunu düzenlediğini göstermiştir. Bitkilerdeki tuzlu su ve alkali gibi bazı stres kombinasyonları, uyarlanmak istenen evrimlerine katkıda bulunabilecek yanıtlar oluşturabilir. Pamukta, tuz (NaCl 'nin Na_2SO_4 'e 9: 1 molar oranı, pH: 6.96) ve alkali (NaHCO_3 'ün Na_2CO_3 'e 9: 1 molar oranı, pH: 9.21) stres koşullarında, kök ve yaprak organlarında, DNA metilasyon modelleri MSAP yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Demetilasyon olaylarının hem yaprak hem de kök örneklerinde, metilasyon olaylarından daha fazla meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca tuz stresi altında toplam metilasyondaki varyasyon oranı, yapraklarda %1.38, köklerde ise %2.2 bulunmuştur. Bununla birlikte alkali stresin, tuz stresine kıyasla daha fazla değişikliği tetiklediği ve DNA metilasyon seviyesini önemli ölçüde düşürdüğü tespit edilmiştir. Alkali stres koşullarında yapraklar ve köklerdeki CCGG bölgelerinde skorlanan metilasyon oranı, sırasıyla %2.59 ve %12.44 civarında düşüş göstermiştir. Sonuçlar, tuz ve alkali stresleri

altındaki pamuk kök organının, stres toleransının metilasyon değişiklikleriyle daha iyi uyarlanabildiğini ve daha kompleks gen ekspresyon değişikliklerinin meydana gelebileceğini göstermiştir.

Epigenetik modifikasyonlar, doğal varyasyonların oluşumu ve tür evriminde önemli role sahip olabilir. Kalıtsal epigenetik varyasyonun yapısı ve yerel popülasyonların adaptasyonu üzerindeki etkisi hakkında çok az şey bilinmektedir. Venetsky ve ark. (2015), kalıtsal metilasyona dayalı epigenetik varyasyonun yapısı ve kapsamını *Triticum turgidum ssp*'nin doğal popülasyonlarında değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, transpoze elementlerin (TE'ler) ve genomik CCGG bölgelerinin metilasyon durumlarını değerlendirmek için MSAP ve transpozon metilasyonu görüntüleme (TMD) teknikleri kullanılmıştır. Her iki teknik de İsrail'in coğrafi olarak izole edilmiş beş farklı bölgesinden toplanan 50 emmer buğday genotipi DNA'sına uygulanmıştır. Kalıtsal epigenetik varyasyonun değerlendirilebilmesi için, tüm genotipler iki nesil boyunca ortak arazi koşullarında yetiştirilmiştir. Tüm genotiplerde, TE'leri çevreleyen CCGG bölgeleri de dahil olmak üzere tüm CCGG bölgelerinin metilasyon seviyelerindeki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Genotipler arasında CCGG bölgelerinin metilasyon seviyeleri %46 ile %76 arasında değiştiğini tespit etmişlerdi. Fakat beş farklı bölgeden toplanan genotiplerin metilasyon desenleri, popülasyona özgü ve popülasyonlar arasında istatistiksel olarak farklılıklar gösteriyordu. Popülasyona özgü ve anlamlı istatistiksel farklar içeren metilasyon desenlerindeki epigenetik çeşitliliğin coğrafik ve kısmen iklim ve toprak faktörleri tarafından düzenlenebileceğini belirtmişlerdir.

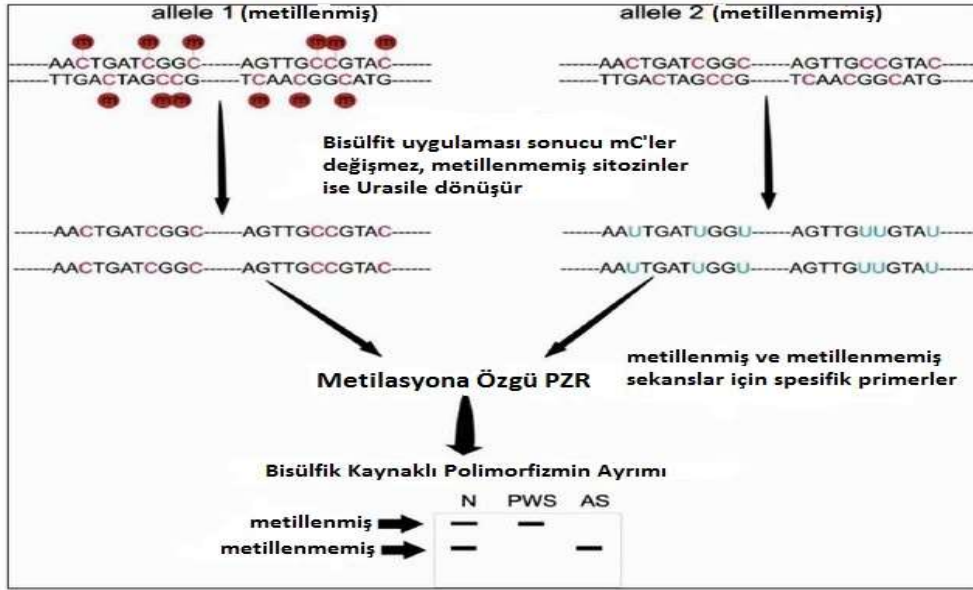
2.2.2. DNA Metilasyon Desenlerinin Tespiti

DNA metilasyon desenlerinin tespitinde kullanılan yöntemler, metilasyon desenlerinin nesiller boyunca nasıl kalıtıldığı konusunda bilgi verir. Ayrıca metilasyon desenlerinin tespitinde kullanılan bu teknikler kullanılarak normal olmayan allellerdeki mutasyonun tespiti, alleller arasındaki metilasyon farklılıklarının tespiti, kromatin yapılarının evrimleşmesi, kanser oluşumu tespiti ve genomların metil haritalarının oluşturulması gibi olaylar gerçekleştirilebilir.

Metilasyon desenlerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden bazıları Metilasyona Özgü Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Bisülfid Dizileme ile Southern Blotlama ve Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm (MSAP) dir.

2.2.2.1. Metilasyona Özgü Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MSP)

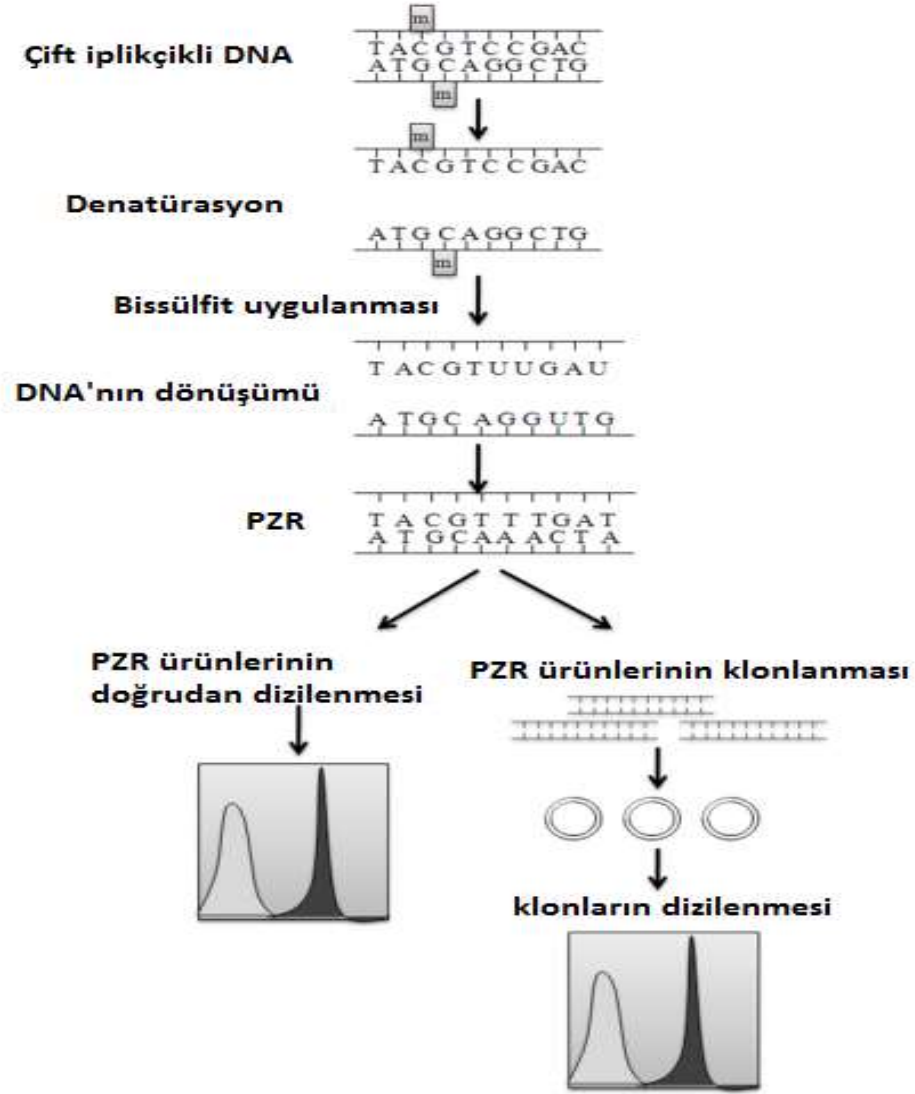
İlk olarak Herman ve ark. (1996) tarafından tanımlanan yöntemde metilasyon deseni belirlenecek olan bölgelerin sekans bilgisine gereksinim duyulmaktadır. DNA izolasyon işleminden sonra bisüflitle muamele edilen DNA'nın ilgili bölgelerinin metilasyon durumuna göre, CpG alanlarına uygun tasarlanmış primer setleri ile PZR işlemi yapılmaktadır. Kullanılan primer setlerinin çoğaltım gerçekleştirip, gerçekleştirilmemesine bakılarak metilasyon deseni tespit edilebilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Metilasyona özgü PZR yöntemi (Puiu ve Cucu 2011'den çeviri)

2.2.2.2. Bisüflit Dizileme

İlk olarak Frommer ve ark. (1992) tarafından geliştirilen bisüflit genomik dizileme yöntemi, sodyum bisüflit kullanılarak genomik DNA'nın dönüştürülmesine dayanır. Bisüflit genomik dizileme, DNA metilasyonunun tespiti için en ideal teknoloji olarak kabul edilir, çünkü tek bazlık 5-metilsitozinin bile bulunabilmesi için etkili bir yaklaşımdır. Bu bağlamda, sodyum bisüflit, metillenmemiş sitozinlerin hidrolitik deaminasyonuna yol açarak sitozinleri urasile dönüştürür. Metillenmiş sitozinler ise bu dönüşüme dirençlidir. Bisüflit uygulanmasından sonra metilasyona özgü primerler kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilir. Metilasyon sinyali sekans farklılığına yol açar. Mevcut metilasyon durumu, PZR ürünlerinin doğrudan dizilenmesi veya alt klonların dizilenmesi ile belirlenebilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Bisülfite genomik dizilemede kullanılan metilasyon analizinin prensipleri (Sodyum bisülfite ile muamele edildikten sonra, metillenmemiş sitozinler Urasile dönüştürülürken, 5-metilsitozinler (5mC) etkilenmez. PZR amplifikasyonundan sonra, urasil kalıntıları Timine dönüşür. DNA metilasyon durumu, doğrudan PZR sekanslama veya oluşturulan klonların sekanslaması ile belirlenebilir.) (Li ve ark., 2011'den çeviri)

Kesim bölgelerindeki metillenmiş sitozini spesifik olarak tanıyabilen restriksiyon enzimlerinin duyarlılığına dayanan DNA metilasyon yaklaşımları ile karşılaştırıldığında, bisülfite temelli DNA metilasyon analizi daha nicel doğruluk, yüksek hassasiyet ve verimliliğe sahiptir. Ayrıca, bisülfite dizi analizi DNA'nın sadece tek iplikçisindeki metilasyon durumunu belirtmekle kalmaz, aynı zamanda komplementer iplikçinin metilasyon modellerini de saptar. Çünkü dönüştürülmüş DNA iplikçikleri artık birbirinin komplementeri değildir ve amplifikasyon ürünleri ayrı ayrı analiz edilebilir (Li ve Tollefsbol, 2011).

2.2.2.3. Southern Blot ve COBRA Prosedürü

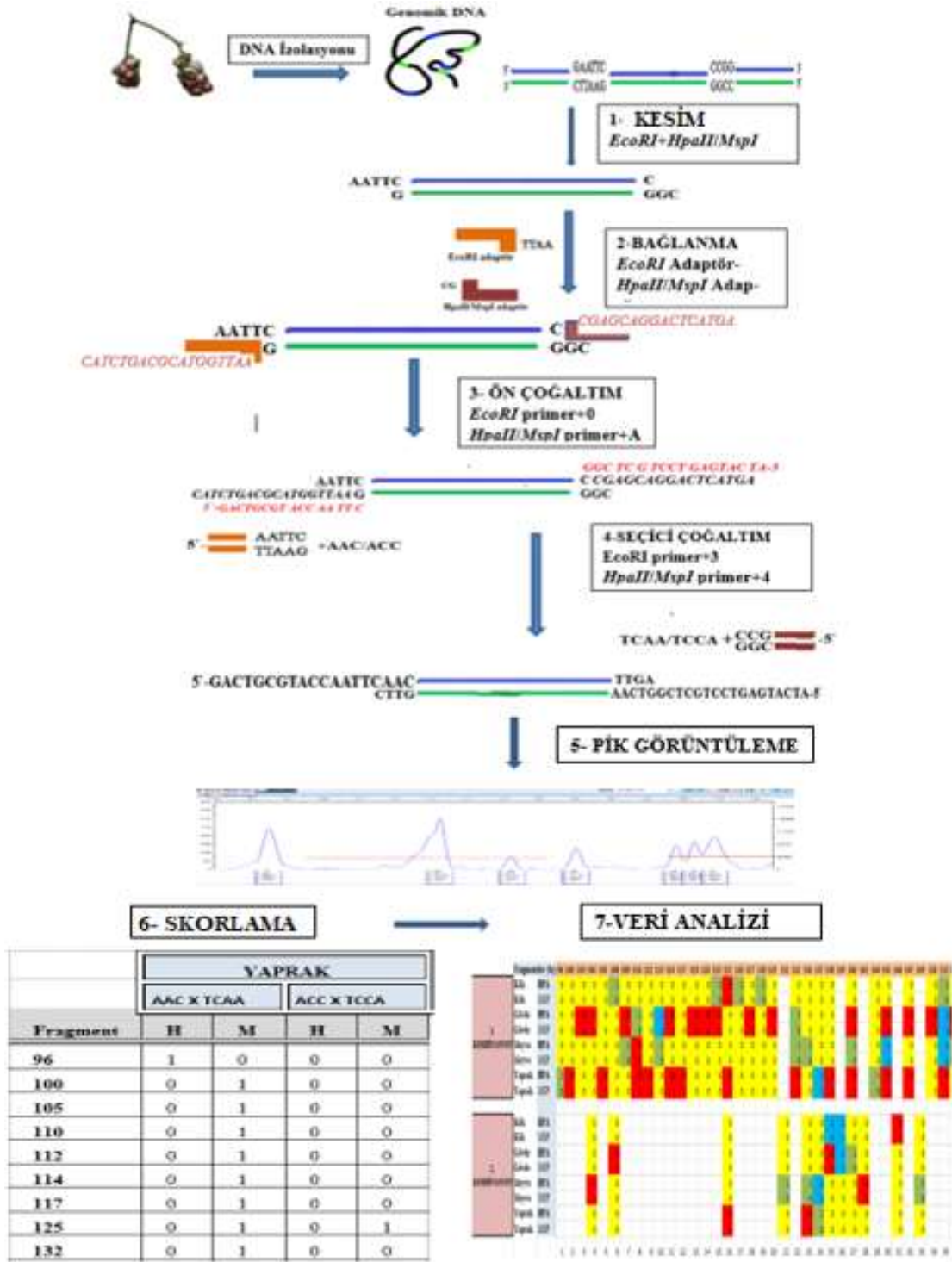
Bu iki yöntemin esası, metilasyona duyarlı ve metilasyona duyarsız kesim endonükleaz enzimlerinin kullanımına dayanır. Southern Blot yönteminde, DNA izolasyon işleminden sonra genomik DNA'nın metilasyona duyarlı ve duyarsız enzimlerin kesimi ile oluşan fragmentler değerlendirilir. Elde edilen fragmentlere özgü floresan probalar ile hibridizasyon yapılarak fragmentlerin ayrımı gerçekleştirilir.

Birleştirilmiş Bisülfite Kesim Enzimi Yöntemi (COBRA – Combined bisulfite restriction enzyme assay) prosedüründe, DNA izolasyon aşamasının ardından bisülfite muamelesi ve PZR çoğaltımı yapılır. PZR çoğaltımı sonunda, DNA dizisinin metillenmiş bölgelerindeki sitozinler değişmeden kalacağı için bu bölgelere tanımlı restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim gerçekleştirilmekte ve metilasyon desenleri belirlenmektedir (Toparslan ve ark., 2015).

2.2.2.4. Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm (MSAP)

Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm (MSAP), özellikle baz dizisi belirlenmiş referans genomu olmayan türlerde sitozin metilasyonu farklılaşmasını araştırmak için kullanılan etkili bir tekniktir (Schrey ve ark., 2013). MSAP, yabancı bitki popülasyonlarındaki metilasyon değişikliği ve epigenetik yapıyı belirlemek, ekolojik koşulların fenotipik özelliklere ve belirli lokuslardaki metillenme seviyesi arasındaki ilişkiyi tespit etmek için kullanılmıştır (Alonso ve ark., 2015). Ayrıca MSAP, genomların metilasyon haritalarının oluşturulmasında ve farklı şekillerde metillenen genlerin tespitinde de tercih edilen bir yöntemdir.

MSAP tekniği, aynı kesim bölgesini tanıyan ancak metilasyona farklı duyarlılık gösteren iki veya daha fazla endonükleaz izoşizomerinin kullanıldığı, AFLP yönteminin farklı bir modifikasyonudur. MSAP'ta, öncelikle yaygın kesici restriksiyon enzimi (*EcoRI*) ile DNA örneklerinin tam bir kesimi sağlanarak farklı boyutlarda fragmentler üretilir. Daha sonra bu fragmentler, *HpaII* ve *MspI* endonükleaz enzimleri ile yeniden kesilirler. *HpaII* ve *MspI*, aynı diziyi (CCGG) tanırlar ve keserler, ancak bu dizideki sitozinlerin farklı metilasyon durumlarına farklı duyarlılık gösterirler. Sitozin metilasyonuna duyarlı endonükleazlar ile kesim sonucu oluşan fragmentlerin, polimeraz zincir reaksiyonu ile ön ve seçici çoğaltılması sonucu DNA parçacıklarından elde edilen modellerin karşılaştırılması yapılır (Schulz ve ark., 2013). *EcoRI*+*HpaII* ve *EcoRI*+*MspI* arasındaki DNA fragmentlerinin varlığı/yokluğu şeklindeki bir fark, *HpaII* ve *MspI* tarafından tanınan CCGG dizisindeki sitozinlerinde metilasyonun farklı durumlarına işaret eder (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. MSAP tekniğinin şematik gösterimi (1-Genomik DNA'nın önce *EcoRI* sonra *HpaII* ve *MspI* enzimleriyle kesimi. 2-*EcoRI* ve *HpaII/MspI* adaptörlerinin fragment uçlarına bağlanması. 3-Adaptörlere özgü komplementer primerler kullanarak fragmentlerinin ön çoğaltımı. Amplifikasyondan sonra %0,8'lik agaroz jelde gözlenen smear bantların yoğunluk durumuna göre numuneler seyreltilir. 4- 3' uçlarında +2/+3 nükleotitik primerlerin kullanıldığı seçici çoğaltım. 5-Peak Scanner Software programında fragment boyutlarını belirten piklerin görüntülenmesi. 6-DNA fragmentlerinin skorlanması. 7-Verilerin yorumlanması.)

CCGG dizisinde her iki sitozinin metillenmediği durumlarda, iki enzim de kesim yapar (Tip 1). *MspI* enzimi, içteki (internal) sitozin tek veya çift eksende (hemi veya full) metillendiğinde kesim yapabilir (Tip 2). *HpaII* enzimi ise dıştaki (external) sitozin tek eksende metillendiği zaman kesim yapabilir (Tip 3) (Schulz ve ark. 2013). Eksternal sitozinlerin veya her iki sitozinin full metilasyonunda her iki enzim de kesemez (Tip 4) (Çizelge 2.1). Bu durumda MSAP tekniği ile bu iki metilasyon durumu birbirinden ayırt edilemez. Bu nedenle bitkilerdeki gerçek metilasyon düzeyi, MSAP ile tespit edilenden daha yüksektir. MSAP bant desenlerinin değerlendirilmesinde 1 fragmentin varlığını, 0 yokluğunu gösterir ve dört olasılıklı sonuç vardır (11, 10, 01, 00). Çizelge 2.1 de gösterilen tabloda MSAP yöntemiyle oluşan ürünlerde meydana gelebilecek 4 farklı bant deseni ve bunların yorumlanıp skorlanması gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. İzosizomer enzimlerin metilasyon duyarlılığı ve kesim deseni

Tipler	Metilasyon Durumu		Bant Modeli <i>EcoRI/HpaII / EcoRI/MspI</i>	Yorum	Skor
Tip 1	5'-CCGG GGCC-5'	Metillenmemiş sitozinler	1 / 1	Metillenmemiş sitozinler	0
Tip 2	5'-C ^m CGG GG ^m CC-5' 5'-C ^m CGG GGCC-5'	İnternal sitozinin full veya hemi metilasyonu	0 / 1	İnternal sitozin full veya hemi metillenmiş	1
Tip 3	5'- ^m CCGG GGCC-5'	Eksternal sitozinin hemi metilasyonu	1 / 0	Eksternal sitozin hemimetillenmiş	1
Tip 4	5'- ^m C ^m CGG GG ^m C ^m C-5'	Her iki sitozinin full ve hemi metilasyonu	0 / 0	Bilgi Yok	-
	5'-CCTG GGNC-5'	Mutasyon			
	5'- ^m CCGG GGC ^m C-5'	Eksternal sitozinin full metilasyonu			

(“^mC” sembolü ile belirtilen sitozinler, metillenmiş sitozinlerdir.)

Genomdaki kesim bölgelerinin dağılımı ve CG, CHG, CHH nükleotitlerinin nisbi sıklığı, türler arasında (Matassi ve ark., 1992; Feng ve ark., 2010) ve aynı türün genomik bölgeleri arasındaki farklılığı göstermektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın doğal popülasyonundan alınan bitkiye ait yaprak, meyve, gövde ve kök organları kullanılmıştır. Bu organlarda DNA metilasyon modeli, Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm (MSAP) metodu ile belirlenmiştir.

3.1. Materyal

Bu araştırmada kullanılan *Sarcopoterium spinosum* L. Spach bitkisi Sinop ili, Boztepe Yarımadası, Zeytinlik Mevkiinden (42° 01' 24" N, 35° 10' 3" E) alınmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Yaz mevsiminde *Sarcopoterium spinosum* görünümü

Araştırmada kullanılan yaprak, meyve, gövde ve kök organları 25.05.2017 tarihinde aynı bitkiden toplanmıştır. Bitki materyalinin toplandığı 25.05.2017 gününe ait meteoroloji verileri çizelge 3.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Bitki materyalinin toplandığı güne ait meteoroloji verileri

Günlük Yağış Miktarı (kg/m ²)	Günlük Minimum Sıcaklık (°C)	Günlük Maksimum Sıcaklık (°C)	Günlük Ortalama Sıcaklık (°C)	Günlük Ortalama Nem Miktarı (%)	Genel Görünüm
0,0	12,5	18,0	14,6	84,4	Parçalı Bulutlu

(Günlük hava durumu verileri Sinop Meteoroloji Müdürlüğü'nden alınmıştır).

Bitki örneklerinin kök, meyve, gövde ve yaprak organları saf su ile yıkandıktan sonra %80'lik etanol içerisinde 5-10 dk bekletilip, tekrar steril su ile yıkanmıştır. Bu organlar DNA izolasyon aşamasına kadar -80 °C de saklanmıştır.

3.2. Yöntem

Bitki organlarından, MSAP analizlerine uygun miktar ve saflıkta DNA elde edebilmek amacıyla yaprak organı için ayrı, meyve, gövde ve kök için ayrı olmak üzere 2 farklı izolasyon protokolü kullanılmıştır.

3.2.1. Yaprak Organından Genomik DNA İzolasyonu

Yapraklardan genomik DNA izolasyonu, Lade ve ark. (2014) tarafından geliştirilen yöntemle göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

- 1- 0,5 g bitki yaprağı, 1 ml CTAB tamponu ilave edilerek havan içerisinde öğütülmüştür (Sıvı azot kullanılmaz).
- 2- Elde edilen öğütten 2 ml'lik ependorf tüplere yaklaşık 750 µl özüt konularak üzerlerine 1 µl RNazA eklenip vorteksledikten sonra karışım 37 °C'de 15 dk inkübe edilmiştir.
- 3- Tüplere 10 µl proteinaz K eklenip, su banyosunda 70 °C'de 1 sa inkübe edilmiştir.
- 4- Oda sıcaklığına getirilmiş tüplere eşit hacimde kloroform izoamil alkol (24:1) eklendikten sonra yavaşça yaklaşık 5 dk tersyüz edilerek karıştırılmıştır.
- 5- 12.000 rpm 15 dk santrifüj edilerek elde edilen süpernatant, 2 ml'lik yeni ependorf tüplere aktarılmıştır.
- 6- Tüplere aktarılan süpernatantın yarı hacminde 5 M NaCl eklenip iyice karıştırılmıştır. Buz içerisinde 15 dk bekletilmiştir.
- 7- Süpernatantın 1/10 hacminde (60-70 µl) sodyum asetat (NaAcO₄) ve 2/3 hacminde (500 µl kadar) soğuk izopropanol alkol eklenmiştir. DNA'yı çöktirmek için tüpler 2-3 defa yavaşça tersyüz edilmiştir.
- 8- Ependorf tüpler -20 °C'de 30 dk bekletilmiştir.
- 9- 11.000 rpm 5 dk santrifüj edildikten sonra oluşan süpernatant dikkatlice tüplerden atılmıştır.

10- Pellet içeren tüpler, filtre kağıdının üzerine ters çevrilerek 10 dk kurumaya bırakılmıştır.

11- Tüplerdeki pelletler 500 µl %70'lik etanol ile yıkandıktan sonra 11.000 rpm 10 dk santrifüj edilmiştir. Yıkama işleminden sonra pelletin belirginleştiği gözlenmiştir.

12- %70'lik etanol tüplerden boşaltılıp filtre kağıdının üzerinde ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır.

13- Pelletler 100 µl TE tamponu içerisinde çözülmüş ve -20 °C'de bekletilmiştir.

3.2.2. Kök, Gövde ve Meyve Organlarından Genomik DNA İzolasyonu

Kök, gövde ve meyve organlarından genomik DNA izolasyonu, Khan ve ark. (2007) tarafından geliştirilen izolasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

1- Kök, gövde ve meyve organ örnekleri 1 mm boyutlarında kesilmiştir.

2- 2 g kök, gövde ve meyve organ örnekleri havan içerisinde sıvı azotla öğütülüp toz haline getirilmiştir.

3- Toz haline getirilen örnekler, 8 ml CTAB tamponu eklenip öğütücünden geçirildikten sonra havan eliyle ezilmiştir.

4- Karışım, her bir ependorf tüpe yaklaşık 750 µl paylaştırılmıştır.

5- Tüpler su banyosunda 70 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir.

6- Oda sıcaklığına soğutulan tüplere karışımla eşit hacimde (750 µl) kloroform izoamil alkol (24:1) eklenip tüpler tersyüz edilerek karıştırılmıştır.

7- 12.000 rpm, 25 °C'de 10 dk santrifüj edilmiştir.

8- Üst fazlar yeni ependorf tüplere aktarıldı ve aktarılan faz hacminin 0,6 katı kadarı soğuk isopropanol eklenip tüpler tersyüz edilerek karıştırılmıştır. -20 °C'de 30 dk saklanmıştır.

9- 9000 rpm +4 °C'de 10 dk santrifüjlenmiştir.

10- Üst fazlar dikkatlice çökeltiden ayrılmış ve pellet 500 µl %80'lik etanolla yıkanmıştır.

11- Tüpler 37 °C'de 12 dk kurutulmuş ve pelletler 100 µl TE tamponu içerisinde çözülmüştür.

12- Tüplere 1 µl RNazA (10 mg/ml stok) eklendi, 10 dk 37 °C'de inkübe edilmiştir.

13- Ependorf tüplere 200 µl kloroform izoamil alkol (24:1) eklenip 8000 rpm, +4 °C'de, 10 dk santrifüjlenmiştir.

14- Üst fazlar yeni tüplere alınıp, üzerlerine 500 µl soğuk izopropanol eklendikten sonra yavaşça tersyüz edilerek karıştırılmıştır.

15- 30 dk -20 °C'de bekletilmiştir.

16- 8000 rpm +4 °C'de 5 dk santrifüj yapıp üst faz dikkatlice tüplerden boşaltılmıştır.

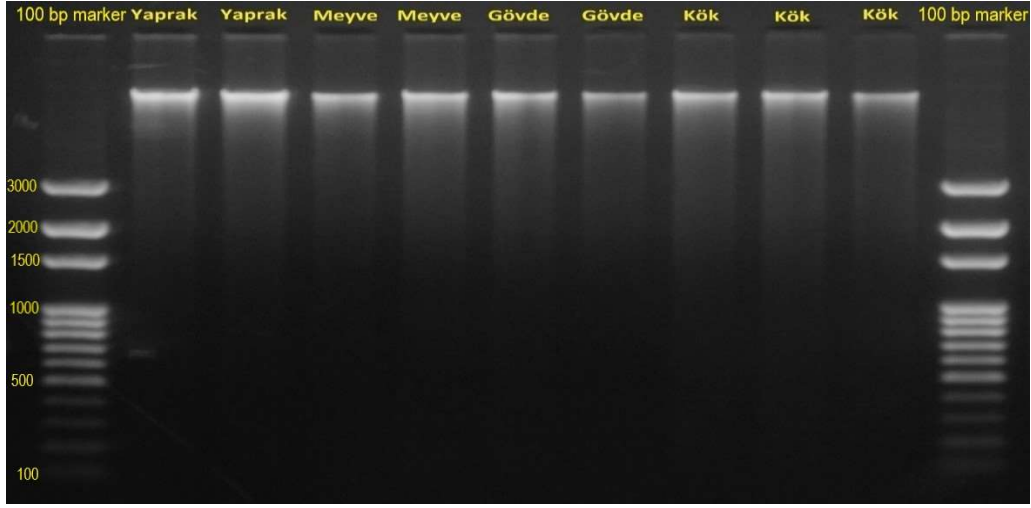
17- Pelletler 500 µl %80'lik etanolle 2 kez yıkandıktan sonra 37 °C'de kurutulmuştur.

18- DNA pelleti 70 µl TE tamponunda çözölmüş ve kullanılarına kadar +4 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan stok çözeltiler

Çözeltili adı	İçeriği	Konsantrasyon	Katalog No:
%2 CTAB Tamponu (Ph: 5.0)	CTAB Tris-HCl (pH: 8.0) NaCl EDTA(pH:8.0) ddH ₂ O Polivinilpirolidin (PVP ₄₀)	%2 (2 g) 1 M (10 ml) 5 M (28 ml) 0,5 M (4 ml) 40 ml 1g	Sigma-H6269 Sigma- T2694 Sigma-S9888 Sigma-E9884 Sigma- W4502 Sigma-PVP40
%3 CTAB Tamponu	CTAB Tris-HCl (pH: 8.0) NaCl EDTA (pH: 8.0) β-mercaptoetanol Polivinilpirolidon (PVP ₄₀)	%3 (3 g) 100 Mm (10 ml) 5 M (40 ml) 25 mM (5 ml) 4 ml 5 g	Sigma-H6269 Sigma- T2694 Sigma-S9888 Sigma-E9884 Sigma- M3148 Sigma-PVP40
TE tamponu	Tris-HCl (pH: 8.0), EDTA	10mM 1 mM	Sigma- T2694 Sigma-E9884

Genomik DNA ların kalitatif analizi için, DNA lar %1'lik agaroz jelde 80 V 1 sa 40 dk yürütölmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın yaprak, meyve, gövde ve kök organı DNA'larının %1'lik agaroz jel görünümü (100 bç DNA markırı kullanılmıştır)

DNA konsantrasyonları Nano Drop Spectrofotometre cihazı kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge3.3).

Çizelge 3.3. *Sarcopoterium spinosum* (L) Spach'ın organ DNA'larına ait nanodrop spektrofotometrede saflık ve konsantrasyon değerleri

Organ	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
Yaprak	1170	23,4	12,3	1,9	1,72
Meyve	1359,9	27,19	14,29	1,9	1,81
Gövde	1552,7	31	16,34	1,9	1,65
Kök	1554,3	31,08	16,37	1,9	1,63

3.2.3. MSAP Yöntemi

Vos ve Zabeau (1995) tarafından geliştirilmiş olan restriksiyon enzim kesimi, adaptör bağlanması, ön çoğaltım ve seçici çoğaltım basamaklarını içeren MSAP analizleri *EcoRI*, *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzim kombinasyonları kullanılarak gerçekleştirildi.

DNA metilasyonu, metilasyona duyarlı çoğaltılmış polimorfizmi (MSAP) tekniği kullanılarak incelenmiştir. MSAP analizi, Baurens ve ark. (2008) tarafından geliştirilen yöntemle yapılmıştır. Bu teknikte, farklı organ örneklerinden elde edilen genomik DNA'lar önce *EcoRI* enzimiyle, daha sonra metilasyona farklı duyarlılık gösteren *HpaII* ve *MspI*

endonükleaz izoşizomer enzimlerince kesilir. Sonrasında özgün adaptörlerden oluşan DNA fragmentlerine bağlanır. Adaptör bağlanmış fragmentler, spesifik primerler kullanılan ön çoğaltım ve seçici çoğaltım PZR deneylerinde kalıp olarak kullanılırlar (Çizelge 3.4).

3.2.3.1. Genomik DNA' nın Kesim İşlemi

Çift iplikli DNA'yı kesmek için altı bazda bir kesim yapabilen sık kesici olan ve yapışkan uçlar üreten *EcoRI* (Thermo Fisher, ER0271) enzimi kullanıldı. Genomik DNA öncelikle aşağıda belirtilen ölçülerde hazırlanan karışım içerisinde *EcoRI* enzimiyle kesilmiştir. Tüpler kesim esnasında 6-8 saat arası 37 °C de inkübe edilmiştir.

*EcoRI*Enzimi ile Kesim İşlemi

ddH ₂ O	33 µl
<i>EcoRI</i> (10 U/µl)	1 µl
10 × <i>EcoRI</i> tamponu	4 µl
<u>Genomik DNA (200 ng)</u>	<u>2 µl</u>
Toplam:	40 µl

Kesimi tamamlanan tüpler, enzim inaktivasyonu için 65 °C de 20 dk bekletildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. *EcoRI* enzimi ile kesmi tamamlanan DNA, *MspI* ve *HpaII* (Thermo Fisher, ER0541) enzimlerince kesim için iki ayrı tüpe eşit oranda bölünmüştür.

MspI ve *HpaII* Enzimi ile Kesim İşlemi

ddH ₂ O	20µl
<i>MspI</i> veya <i>HpaII</i> (10 U/µl)	1 µl
10 × Tango tamponu	4 µl
<u><i>EcoRI</i> ile kesilmiş DNA</u>	<u>15 µl</u>
Toplam:	40 µl

Tüpler kesim esnasında 6-8 saat arası 37 °C de inkübe edilmiştir. *MspI* ve *HpaII* kesiminden sonra enzim inaktivasyonu için tüpler, 80°C de 20 dk bekletilip oda sıcaklığına soğutulduktan sonra -20 °C de saklanmıştır.

3.2.3.2. Adaptörlerin Bağlanması

Adaptör dizileri, *EcoRI* enziminin kesim yerlerinde oluşan yapışkan uçlara tamamlayıcı nükleotid dizileri içerir. *EcoRI* ve *HpaII/MspI* adaptör karışımları aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır. Kullanılan adaptörlere ait bilgiler çizelge 3.4 de belirtilmiştir.

EcoRI Adaptör Karışımı (10 µM)

ddH ₂ O	74 µl
<i>EcoRI</i> adaptör 1 (100 µM)	10 µl
<i>EcoRI</i> adaptör 2 (100 µM)	10 µl
Tris (1 M, pH:8)	1 µl
<u>NaCl (5 M)</u>	<u>5 µl</u>
Toplam:	100 µl

HpaII/MspI Adaptör Karışımı (10 µM)

ddH ₂ O	74 µl
<i>HpaII/MspI</i> adaptör 1(100 µM)	10 µl
<i>HpaII/MspI</i> adaptör 2(100 µM)	10 µl
Tris (1 M, pH:8)	1 µl
<u>NaCl (5 M)</u>	<u>5 µl</u>
Toplam:	100 µl

Adaptör parçalarının birbirine bağlanması için hem *EcoRI* adaptörü hem de *HpaII/MspI* adaptörleri 100°C’de 5 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına soğumaya bırakılır.

Adaptörlerin Bağlanması

<i>EcoRI</i> Adaptörü	5µl
<i>HpaII/MspI</i> Adaptörü	5µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
10 × T ₄ DNA Ligaz tamponu	5µl
ddH ₂ O	9µl
<u>DNA</u>	<u>25µl</u>
Toplam:	50µl

Hazırlanan adaptör karışımları, yukarıda verilen bileşenler ile birlikte kesim reaksiyonu gerçekleştirilen tüplere eklenerek +4 °C’de tüm gece boyunca inkübe edilir.

3.2.3.3. Ön Çoğaltım

DNA parçalarına adaptörlerin bağlanmasıyla oluşan ürünlerin farklı primer kombinasyonlarıyla çoğaltılmasından önce, miktarlarının artırılması gerekir. Adaptör dizilerinin tamamlayıcısı olan primer çiftleri kullanılarak ön çoğaltım işlemi gerçekleştirilir. Ön çoğaltım için adaptör bağlanan DNA örnekleri, 1/5 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Kullanılan primerlere ait bilgiler çizelge 3.4 de verilmiştir.

Ön Çoğaltım Karışımı

Seyreltik DNA (1/5)	5 µl
<i>HpaII</i> primer (2 µM)	5 µl
<i>EcoRI</i> primer (2 µM)	5 µl
10 × PZR tamponu	5 µl
MgCl ₂	4 µl
dNTP	3 µl
Taq DNA Polymeraz (1u/µl)	1 µl
<u>ddH₂O</u>	<u>22 µl</u>
Toplam:	50 µl

Ön çoğaltım karışımı hazırlanan örneklerin çoğaltılmasında kullanılan PZR koşulları 94°C 5 dk denatürasyon; 94°C 30 s, 59°C 1 dk, 72°C 1 dk 20 döngü boyunca; 72°C 5 dk şeklindedir. Ön çoğaltım ürünleri %0,8’ lik agaroz jelde 80V 1,5 sa yürütülüp ultraviyole transilluminatör aracılığı ile görüntülenmiştir (Şekil 4.1).

3.2.3.4. Seçici Çoğaltım

Ön çoğaltım ürünü DNA'lar 1/20 oranında distile su ile seyreltilerek seçici çoğaltımda kullanılır.

Seçici Çoğaltım Karışımı

Ön Çoğaltım DNA (1/20)	5 µl
<i>HpaII/MspI</i> selektif primer (2 µM)	1 µl
<i>EcoRI</i> selektif primer (2 µM)	2 µl
10 × PZR tamponu	2 µl
MgCl ₂	0,4 µl
dNTP	1 µl
Taq DNA Polymeraz (1 U/µl)	1 µl
<u>ddH₂O</u>	<u>7,6 µl</u>
Toplam:	20 µl

Seçici çoğaltım karışımı hazırlanan örneklerin çoğaltılmasında kullanılan PZR koşulları 94°C 5 dk denatürasyon; 94°C 30 s, 65°C 1 dk (her döngüde 0,7 °C azalarak), 72°C 1 dk 12 döngü boyunca; 94°C 30 s, 56°C 1 dk, 72°C 1 dk 23 döngü boyunca; son adımda 72°C 5 dk olarak gerçekleştirilmiştir. Seçici çoğaltım ürünü örnekler %0,8'lik agaroz jele yüklenerek 1,5 saat yürütülmüş ve ultraviyole transilluminatör görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.2).

Seçici çoğaltım reaksiyonlarında kullanılan primerler ve oluşturulan kombinasyonlarının harf ve rakam ile gösterimi çizelge 3.4 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. MSAP analizlerinde kullanılan adaptör ve primerler listesi

Adaptörler			
EcoRI – adaptör 1		5' CTCGTAGACTGCGTACC	
EcoRI – adaptör 2		5' AATTGGTACGCAGTCTAC	
HpaII/ MspI – adaptör 1		5' GATCATGAGTCCTGCT	
HpaII/ MspI – adaptör 2		5' CGAGCAGGACTCATGA	
Ön çoğaltım primerleri			
EcoRI – primer	5' GACTGCGTACCAATTC	HpaII/ MspI – primer	5' ATCATGAGTCCTGCTCGG
Seçici çoğaltım primerleri			
FAM -EcoRI – AAC	5' GACTGCGTACCAATTCAAC	HpaII/ MspI – TCAA	5' ATCATGAGTCCTGCTCGGTCAA
HEX -EcoRI – ACC	5' GACTGCGTACCAATTCACC	HpaII/ MspI – TCCA	5' ATCATGAGTCCTGCTCGGTCCA

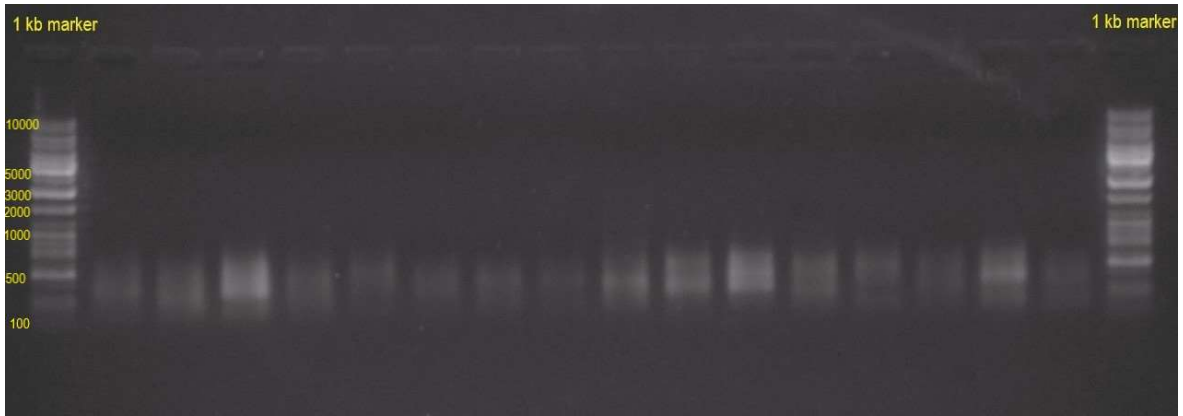
3.2.4. MSAP Analiz Sonuçlarının Skorlanması

Seçici çoğaltımı yapılan PZR ürünlerinin varlığı agaroz jelde onaylandıktan sonra, PZR ürünlerinin fragment boyutlarının belirlenmesi için ABI DNA sequencer cihazında analizleri yapılmıştır. Fragmentlerin görüntülenmesi Peak Scanner Software programında yapılmıştır. Her bir fragment bantı (alel) grafikte kendisini pik olarak göstermiştir. Sonrasında elde edilen piklere skorlama yöntemine göre 0 ve 1 değerleri verilerek her bir organ için ayrı skor çizelgesi hazırlandı. Skor çizelgesinde belirli bir alandaki CCGG bölgesi için, PZR’de kullanılan her bir primer kombinasyonunda *MspI* veya *HpaII* hattından sadece birinde pik varsa “metillenmiş”; her iki hatta da pik varsa “metillenmemiş”; her iki hatta da pik yok ise “bilinmeyen” olarak sınıflandırıldı. Analizlerde boyutlarına göre elde edilen DNA fragmentleri profillenerek, organlar arasında farklılık gösteren bantların tespitleri yapıldı. Her bir organ için metillenme yüzdesi hesaplandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

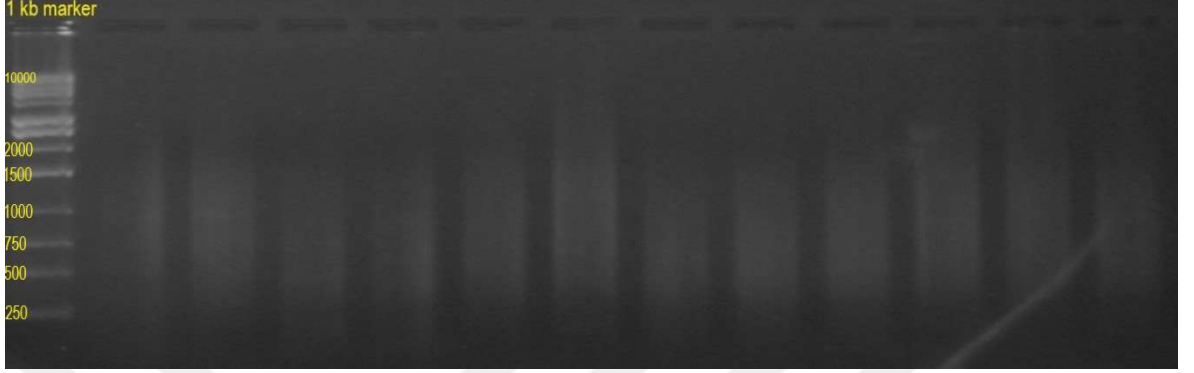
MSAP, metilasyona duyarlı enzimlerin kullanılmasıyla, AFLP yönteminin değiştirilmiş bir versiyonudur. Bu yöntemde DNA, nadir kesici *EcoRI* endonükleazı ile kesildikten sonra CCGG dizisinde sitozin nükleotidlerindeki metillenmelere farklı duyarlılık gösteren iki izoşizomer *HpaII* ve *MspI* endonükleazları ile kesilir. Kesim sonucunda elde edilen restriksiyon fragmentlerinin, ön ve seçici çoğaltımları yapılır. İncelenen örneklerdeki varyasyon, elde edilen fragmentlerin sayı ve boyutlarındaki farklılıklara bağlıdır. Ayrıca, *EcoRI/HpaII* ve *EcoRI/MspI* ile kesim ve çoğaltım sonucunda elde edilen fragmentlerin varlığı ve yokluğu açısından belirlenen varyasyon, CCGG dizilerindeki sitozin metilasyon durumu ve düzeyiyle ilişkilidir. MSAP ile CG ve CHG metilasyon içeriğindeki değişiklikler belirlenebilir. CG metilasyon durumu, *EcoRI/MspI* de fragmentlerin varlığı, *EcoRI/HpaII*'de yokluğu ile belirlenir (Tip 2). CHG ise bu durumun tersidir, yani *EcoRI/MspI* de fragmentlerin yokluğu, *EcoRI/HpaII*'de varlığıdır (Tip 3) (Çizelge 2.1).

Bu çalışmada, *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın yaprak, meyve, gövde ve kök organlarında, CCGG dizilerindeki sitozin modifikasyonunun iki tipi (Tip 2 (CG) ve Tip 3 (CHG)) tanımlanmıştır. Organlar arasındaki toplam metilasyon düzeyleri hesaplanmış ve mukayese edilmiştir. Bu amaçla öncelikle, organlara ait genomik DNA izole edilmiştir. Bu DNA'lar *EcoRI/HpaII* ve *EcoRI/MspI* enzimleriyle kesildikten sonra oluşan yapışkan uçlara tamamlayıcı adaptör ve ön çoğaltım primerleri bağlanarak fragmentlerin ön çoğaltımları yapılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın yaprak, meyve, gövde ve kök organlarına ait ön çoğaltımı yapılan DNA'ların %0,8'lik agaroz jel görünümü (1kb DNA markırı kullanılmıştır)

Ön çoğaltım sonrasında, FAM ve HEX etiketli 2 *EcoRI* primeri (-AAC ve-ACC) ve 2 etiketsiz *HpaII/MspI* primeri (-TCAA ve -TCCA) ile oluşturulan kombinasyonlarla (Çizelge 3.4), seçici fragment çoğaltımları yapılmıştır. Seçici çoğaltım sonuçları, %0,8'lik agaroz jel yapılarak kontrol edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın yaprak, meyve, gövde ve kök organlarına ait seçici çoğaltımı yapılan DNA'larının %0,8' lik agaroz jel görünümü (1kb DNA markırı kullanılmıştır)

Seçici çoğaltım sonucunda elde edilen fragmentlerin boyutlarının belirlenmesi için ABI DNA sequencer cihazında örneklerin analizleri yapılmıştır. Peak Scanner Software programında organlara ait belirlenen fragmentlerin boyutları görüntülenmiştir (Ekler 1-16). Fragment büyüklüklerine göre elde edilen elektroferogram görüntülerinin değerlendirilmesi, organlarda belirli baz büyüklüğündeki piklerin varlığı 1, yokluğu 0 şeklinde yapılmıştır. Organlara ait skor verileri excel formatına yerleştirilmiştir (Şekil4.3).

Fragmentler (bp)		96	100	103	104	105	108	109	110	112	113	114	117	119	120	123	125	126	127	128	129	131	132	136	137	138	139	140	142	144	145	146	147	149	150	152	153	155	156	157	158	159	160	161	163	164	169	170	172	173
1. KOMBİNASYON	Kök HPA	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kök MSP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gövde HPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gövde MSP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Meyve HPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Meyve MSP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Yaprak HPA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Yaprak MSP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Yaprak HPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Yaprak MSP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. KOMBİNASYON	Kök HPA																																																	
	Kök MSP																																																	
	Gövde HPA																																																	
	Gövde MSP																																																	
	Meyve HPA																																																	
	Meyve MSP																																																	
	Yaprak HPA																																																	
	Yaprak MSP																																																	
	Yaprak HPA																																																	
	Yaprak MSP																																																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49

Şekil 4.3 de gösterildiği üzere sitozin metilasyon modifikasyonunun iki tipi tanımlanmıştır. Bunlar; Tip 2 CG metilasyonu: *EcoRI/HpaII* ile kesilemez, *EcoRI/MspI* ile kesilir (0,1) ve Tip 3 CHG metilasyonu: *EcoRI/HpaII* ile kesilir, *EcoRI/MspI* ile kesilemez (1,0) (Vergeer ve ark., 2012). Ayrıca, dört organ için CG, CHG ve toplam metilasyon düzeyleri (MSAP %) hesaplanmış (Çizelge 4.1) ve organlar arasında karşılaştırılmalar yapılmıştır.

Çizelge 4.1. *Sarcopoterium spinosum* (L) Spach’a ait dört organın metilasyon oranları

Organ	Metillenmemiş CCGG Bölgeleri		Metillenmiş CCGG Bölgeleri				Toplam Metilli Bant (c)	MSAP (%) (d)
	Tip 1 Fragment	Oran (%)	Tip 2 Full Metilli CG bölgesi (a)	Oran (%)	Tip 3 Hemi-metilli CHGbölgesi (b)	Oran (%)		
Yaprak	9	3,1	61	21,1	35	12,1	96	33,2
Meyve	28	10,4	12	4,1	57	19,7	69	23,9
Gövde	16	5,5	94	32,5	17	5,9	111	38,4
Kök	6	2,1	58	20,1	53	18,3	111	38,4

(a)-Full metilasyon *EcoRI/HpaII* ile kesilemez, *EcoRI/MspI* ile kesilir; (b)-Hemimetilasyon *EcoRI/HpaII* ile kesilir, *EcoRI/MspI* ile kesilemez; (c)-Toplam metillenmiş bant= a+b; (d)-MSAP (%)= c/Toplam çoğaltılmış bant x 100

Tüm organlarda toplamda 289, her bir organda ise 97 ila 127 arasında fragment tespit edilmiştir. Fragmentlerin çoğu 100 bç ve 400 bç boyutları arasında çıkmıştır. 1000 bç den daha büyük olduğu gözlenen birkaç fragment değerlendirilmeye alınmamıştır. CCGG bölgelerindeki metilasyon türleri incelendiğinde, meyve dışında üç organda en fazla fragment sayısı Tip 2’de (CG) bulunmuştur, bu nedenle *S. spinosum* genomunda internal sitozinin tam veya hemi metilasyonu daha yaygın olduğu belirlenmiştir. MSAP oranının ise %23,9 ila %38,4 arasında değiştiği belirlenmiştir. Sorgumda yapılan bir çalışmada benzer şekilde, iki saf hat genotipine ait yedi organ ve bunların F₁ hibritlerine ait beş organda Tip 2 (CG) metilasyon oranının, Tip 3 (CHG) metilasyon oranından daha yüksek olduğu bulunmuştur (Zhang ve ark., 2011). Ancak, araştırmacılar Tip 2 (%15.1-19.6), Tip 3 (%7.2-9) ve MSAP (%24.1 ila %28.2) oranlarını bu çalışmada tespit edilenden genellikle daha düşük belirlemişlerdir. Sorgumun yedi organında, en düşük CG oranı ve toplam (CG + CHG) metilasyon oranı endospermde belirlenmiş olup, bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Benzer şekilde mısır bitkisinde püskül, brakte ve koçan yapraklarının metilasyon analizinde, internal sitozinin tam metilasyonunun (Tip 2, CG) en yaygın

metilasyon modeli olduğu ve MSAP oranlarının (%24.1 ila %28.2) bu çalışmada tespit edilenlerden düşük olduğu bulunmuştur (Lu ve ark., 2008). MSAP, en yüksek yapraklarda en düşük gövde organlarında bulunmuştur. Ayrıca, mısırın farklı organlarında farklı şekillerde metillendiği tespit edilen 9 fragmentin dizileme ve blast analizleri sonucunda, sitozin metilasyonunun kodlanan ve kodlanmayan tekrarlı dizilerin her ikisinde de bulunduğu ortaya çıkmıştır. Saf hatlar ve melez bireyler arasında, nispi metilasyon seviyeleri bakımından farkın önemsiz bulunması ($p > 0.05$), saf ebeveynlere ait metilasyon durumlarının, mayotik kalıtım ile kararlı şekilde F_1 melezlerine aktarıldığına işaret etmiştir. Şeker kamışında yapılan bir çalışmada ise altı farklı alt türde (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi* ve *Erianthus sp.*), 1341 MSAP lokusundan 1117'si (%83.29) genotipler arası çeşitlilik göstermiş ve dış sitozin metilasyonu (Tip 3) daha yüksek oranda bulunmuştur (Martins ve ark., 2020). MSAP lokuslarına dayalı olarak hesaplanan farklılaşma indeksine göre, genotiplerin iki alt popülasyona ayrıldığı belirlenerek, metilasyonun tür içi evrimleşmede etkisi tespit edilmiştir. Rastgele seçilen polimorfik 4 metillenmiş fragmentin dizileme ve şeker kamışı veri tabanında BLAST analizleri, sitozin metilasyonunun transkripsiyon bölgeleri yakınındaki CpG adalarında meydana geldiğini ve stres adaptasyonu ile ilişkili olduğunu, varsayılan diziler içinde tandem tekrarlandığını, dolayısıyla metillenmiş lokusların biyolojik süreçlerle olan ilgisini göstermiştir. Türkiye, Suriye, Lübnan ve İsrail'i içine alan "Verimli Hilal" bölgesinden alınan 87 adet yabancı gernik buğday (*T. dicoccoides*) ve 3 adet makarnalık buğday (Svevo, Karakılçık ve Çeşit4) genotiplerinde yapılan bir çalışmada ise, metilasyon seviyeleri %49.74 ila %90.48 arasında değiştiği ve Tip II metilasyon durumunun makarnalık buğdayda, Tip III metilasyon durumunun ise yabancı gernik genotiplerinde daha yüksek olduğu saptanmıştır (Gökçe, 2020). Sitozin metilasyonu seviyesinin, yabancı buğdaylarda, kültür buğdaylarına göre daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Orjinlerine göre popülasyonların metilasyon seviyeleri birbirine yakın bulunmasına rağmen metilasyon modellerinin farklılık gösterdikleri görülmüştür.

Bu çalışmada, *S. spinosum*'un organlarında, metilasyona duyarlı çoğaltım polimorfizm (MSAP) oranı, en düşük (23.9%) meyvede, en yüksek (38.4%) ise kök ve gövde de tespit edilmiştir. Benzer şekilde, birçok bitkide organlara ait farklı metilasyon seviyeleri gösterilmiştir. Örneğin *Arabidopsis*'te fide yapraklarına oranla olgun yapraklarda (Finnegan ve ark. 1998), pirinçte bayrak yaprağına oranla fide yapraklarında (Xiong ve ark. 1999) ve pamukta koçan yaprağına oranla brakte yapraklarda (Lu ve ark., 2008) daha yüksek

metilasyon oranları gözlenmiştir. Ülkemizde de yapılan bir çalışmada, Afyon yöresinde ekilen haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinde kapsül, gövde ve yaprağın MSAP profillerinin ve oranlarının farklı olduğu, MSAP profillerine göre oluşturulan filogenetik ağaçta kapsül ve gövdenin, yapraktan net bir ayrım gösterdiği saptanmıştır (Bulut ve ark., 2020). Morfin yolağında metilasyonun etkisinin araştırıldığı çalışmada, incelenen 4 çeşitte tespit edilen 194 fragmentin, 113 tanesinin (%75) polimorfik metillendiği, 6 tanesinin de (%14) metillenmediği bulunmuştur (Bulut ve ark., 2020).

DNA'nın baz dizisinde değişim olmaksızın, genellikle histon modifikasyonları ve sitozin metilasyonu aracılığıyla, bazen de snRNA'lar ve kodlanmayan RNA'ların müdahalesiyle gerçekleşen epigenetik süreçler (Henderson ve Jacobsen, 2008), gen ifadesinin değişimini teşvik etmektedir. Gen ifadesinin değişimi sonucunda, fenotipik varyasyonlar belirir ve bu varyasyonlar, adaptasyon süreçlerinde ve popülasyonun farklılaşmasında önemli roller oynar (Perez-Figueroa, 2013). Sitozin metilasyonu, gen ekspresyonunu etkileyerek ve zararlı genetik elementleri baskılayarak, genom stabilitesinin korunmasında rol oynar. Sitozin metilasyonu, gelişim süreci boyunca gerçekleşen dinamik bir süreçtir. İç ve dış çevresel faktörler arasındaki ilişkiye aracılık edebilecek, genetik varyasyona ek bir varyasyon sağlayan mekanizmadır (Morán ve Pérez-Figueroa, 2011). Genlerde en değişken metilasyon durumu, CG metilasyonu ile ilişkilidir. Promotor CpG adacıklarının hipermetilasyonu ve demetilasyonu, genleri susturabilir veya aktive edebilir. Metil-sitozin seviyesi ve DNA boyunca dağılımı, türün bireyleri arasında, aynı bireye ait farklı organlarda ve hücre tiplerinde dağılımı çeşitlilik gösterir. Çeşitli organlarda ve gelişim evrelerinde, DNA metilasyon seviyelerindeki farklılıkları ortaya çıkarmada, DNA metilasyonunun gen ifadesi üzerindeki düzenleyici rolünün etkili olabileceği bildirilmiştir (Lu ve ark., 2008; Sharma ve ark., 2009). Bazı genlerin, farklı organlarda farklı metilasyon durumlarına sahip olduklarından dolayı organa özgü ifade edildiği bildirilmiştir (Futscher ve ark., 2002; Vanyushin, 2005; Lu ve ark., 2008; Sharma ve ark., 2009).

MSAP yöntemi organlardaki metilasyon düzeylerini belirleme kullanılan etkili bir araçtır. Bu çalışmada MSAP yöntemi ile farklı organların metilasyon durumları karşılaştırılmıştır. *EcoRI/HpaII* ve *EcoRI/MspI* fragment deseninin tip 2 (0, 1) ve tip 3 (1, 0) açısından, dört organdaki monomorfik durumu (0, 1, 0, 1, 0, 1, 0, 1 veya 1, 0, 1, 0, 1, 0, 1, 0), organlardaki metilasyon benzerlik durumlarına işaret etmektedir. *S. spinosum*'un incelenen dört organı içinde, sadece Tip 2 de, bir monomorfik bölge tespit edilmiştir (Şekil 4.3., 662 bç.lik fragment). Bu durum, dört organın birbirinden çok farklı metilasyon durumlarına sahip

olduklarını göstermiştir. Organlar, Tip 2 ve Tip 3 metilasyon durumları açısından ikili karşılaştırıldıklarında, yaprak-gövde arasında 14 (%4.8), yaprak-meyve arasında 4 (%1.4), yaprak-kök arasında 5 (%1.7), meyve-gövde arasında 6 (%2.1), meyve-kök arasında 2 (%0.7) ve gövde-kök arasında 5 (%1.7) monomorfik bölge belirlenmiştir. Bu sonuç, organlara ait metilasyon benzerlik düzeylerinin oldukça düşük olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmadaki sonuçların aksine, 18 kırmızı ve 18 beyaz kendileşmiş mısıra ait püskül, brakte ve koçan yaprağı organlarında, organlara özgü metilasyonun varlığını ancak organlardaki metilasyon desenlerinin %80 benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Lu ve ark., 2008). Püskül ve koçan yaprağı arasındaki metilasyon benzerliği %14.32-19.35, püskül ve brakte yaprak arasında %28.57-33.87 ve brakte yaprak ile koçan yaprağı arasında %45.16-53.06 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar bu sonuçların nedenini, brakte ve koçan yaprakların vejetatif organlar olmasına ve dolayısıyla benzer görevlere sahip olmasına, püsküllerin ise çiçeklenme, dölleme ve meyve verme gibi farklı işlevlere sahip bir üreme organı olmasına bağlamışlardır. Çalışmamızda kullandığımız organlar arasındaki metilasyon durumlarının farklı olması, bu organların görev ve yapı bakımından birbirlerinden yüksek oranda farklılaştıklarını göstermiştir.

5. SONUÇ

Tez çalışmamıza konu olan ve “abdestbozan otu”, “çayır diken”, “çetir diken” gibi isimlerle bilinen *Sarcopoterium spinosum* L. Spach bitkisi Ege ve Marmara Bölgelerinin kıyı şeridi boyunca yayılım gösteren frigananın Rosaceae familyasına ait bir çalı türüdür. *S. spinosum*, Doğu Karadeniz bölgesinden İstanbul’a kadar olan alanda yalnızca Sinop’ta bulunmaktadır. Eski çağlardan günümüze birçok kaynakta *S. spinosum*’dan halk arasında tıbbi yönden yararlanıldığından bahsedilmiştir. Hippocrate ve Dioscorides tarafından, bitkinin, göğüs bölgesinde yakı olarak, meyve ve yapraklarından ise dizanteri tedavisinde kullanıldığından bahsedilirken, günümüzde, kök kabuğunun diyabeti iyileştirmek (Smirin ve ark.,2010) ve böbrek taşlarını çözmek için, yapraklarının ise korkuları gidermek için (Henkin ve ark., 2014) kullanıldığı bildirilmiştir. Bu bitkinin ana kimyasal bileşenlerinden biri olan tormentik asidin, farklı kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif aktiviteye sahip olduğu (Loizzo ve ark., 2013), yaprakların ve gövdenin hekzan özütü ile gövde ve yaprağının metanol özütünün antimikrobiyal aktivitesinin varlığı da tespit edilmiştir (Ali-Shtayeh ve ark.,1998; Ali-Shtayeh ve ark., 2013; Masadeh ve ark., 2013; Sipahi ve ark., 2017).

Bu çalışmada, *S. spinosum* genomunun CCGG bölgelerindeki sitozin metilasyonu, dört organa, floresan MSAP tekniği kullanılarak araştırılmış ve organların farklı metilasyon göstermelerinden kaynaklanan farklı MSAP fragmentleri tanımlanmıştır. Sonuçlar, MSAP’ın, sitozin metilasyonunun büyük bir kısmını tespit edebilen ve özellikle *S. spinosum* gibi genom dizisi bilinmeyen ve yüksek metilasyon polimorfizmine sahip bitkiler hakkında araştırmalara ışık tutacak bir metot olduğunu göstermiştir. DNA metilasyonu bakımından, dört organın MSAP modellerindeki farklılıklar, muhtemelen organlardaki hücre farklılaşması ve gelişimi ile ilgili organa özgü genlerin ekspresyonundaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte gözlenilen sonuçların doğrulanabilmesi için klonlama, dizileme ve organa özgü fragmentlerin fonksiyonlarının ortaya çıkartılması gibi daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Al-Kurdi, R., Khlaif, H., Al-Eissawi, D. 2000. Effectiveness of selected plant extracts in inhibiting *Agrobacterium tumefaciens* in vitro and in suppressing tumor formation on tomato roots in greenhouse. *Dirasat-Agricultural- Sciences*, 27: 10–19.
- Ali-Shtayeh, M. S., Reem, M. R., Faidi, Y. R., Salem, K., Al-Nuri, M.A. 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folklorik medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*, 60: 265–271.
- Ali-Shtayeh, M.S., Al-Assalý, A.A., Jamous, R.M., 2013. Antimicrobial activity of Palestinian medicinal plants against acne-inducing bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 7(21): 2560-2573.
- Alonso, C., Perez, R., Bazaga, P., Medrano, M., Herrera, C. M., 2015. MSAP markers and global cytosine methylation in plants: A literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. *Molecular Ecology Resources*, 16: 80–90.
- Anonim, 2017. <http://www.gbif.org/species/3001879> (Eriřim tarihi: 25.04.2017).
- Anonim, 2017. www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=3664 (Eriřim tarihi: 25.04.2017).
- Anonim, 2020. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Epigenetik>. (Eriřim tarihi: 31.05.2020).
- Bachrach, Z. Y. 2007. Ethnobotanical studies of *Sarcopoterium spinosum* in Israel. *Israel Journal of Plant Sciences*, 55: 111-114.
- Bartels, A., Han, Q., Nair, P., Stacey, L., Gaynier, H., Mosley, M., Huang, Q.Q., Pearson, J.K., Hsieh, T., An., Y.C., Xiao, W. 2018. Dynamic DNA methylation in plant growth and development. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(7): 2144.
- Baurens, F. C., Causse, S., Legavre, T. 2008. Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP) protocol to assess CpG and CpNpG methylation in the banana genome. *Fruits*, 63: 117–123.
- Bozkurt, B. 2005. *Sarcopoterium spinosum* L. (Rosaceae) Türünden Hazırlanan Droğların Kalite Kontrolü ve E Vitamini Açısından Değ erlendirmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 114 s.

- Bulut, B., Aydın, Z., Türkteş-Erken, M., 2020. MSAP analysis reveals diverse epigenetic statuses in *Opium poppy* varieties with different benzyisoquinoline alkaloid content. Turk J Biol., 44: 103-109.
- Can, M. İ., Aslan, A. 2016. Epigenetik mekanizmalar ve bazı güncel çalışmalar. Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi, 6(2):445-452.
- Cao, D., Gao, X., Liu, J., Kimatu, J. N., Geng, S., Wang, X. P., Zhao, J., Shi, D. C. 2011. Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) reveals that alkali stress triggers more DNA hypomethylation levels in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) roots than salt stress. African Journal of Biotechnology, 82: 18971-18980.
- Coolen, M. W., Statham, A. L., Qu, W., Campbell, M. J., Henders, A. K., Montgomery, G. W., Martin, N. G., Clark, S. J. 2011. Impact of the genome on the epigenome is manifested in DNA methylation patterns of imprinted regions in monozygotic and dizygotic twins. PLoS ONE, 6(10): 1-12.
- Cullen, J. 1972. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. 4. P. H. Davis (Editor), Edinburg at the University Press, Edinburg, 76-77.
- Elmas, E. 2017, Sözlü görüşme, Sinop Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 57000, Sinop, eelmas@sinop.edu.tr.
- Elmas, E., Kutbay, H.G. 2015. Plant functional types in mediterranean enclaves in western Black Sea Region of Turkey. Turkish Journal of Botany, 39: 30-39.
- Eser, B. E., Yazgan, Ü. C., Gürses, S. A., Aydın, M. 2016. Diabetes mellitus ve epigenetik mekanizmalar. Dicle Tıp Dergisi, 43 (2): 375-382.
- Feng, S., Cokus, S. J., Zhang, X., Chen, P., Bostick, Goll, M. G., Hetzel, J., Jain J., Strauss, S. H., Halpern, M. E., Ukomadu, C., Sadler, K. C., Pradhan, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S. E. 2010. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. PNAS, 107(19): 8689–8694.
- Finnegan, E. J., Genger, R. K., Kovac, K., Peacock, W. J., Dennis, E. S. 1998. DNA Methylation and the promotion of flowering by vernalization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 5824–5829.

- Finnegan, E. J., Peacock, W. J., Dennis, E. S. 2000. DNA Methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 10: 217–223.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F. W., Grigg, G. W., Molloy, P. L., Paul, C. L. 1992. A Genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-Methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1827-1831.
- Futscher, B. W., Marc M., Oshiro, R. J. W., Holtan, N., Hanigan, C. L., Duan, H., Domann, F. E. 2002. Role for DNA methylation in the control of cell type, specific maspin expression. *Nature Genetics*, 31:175–179.
- Gayacharan, A. J. 2013. Epigenetic responses to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(3): 379-387.
- Gehring, M., Henikoff, S., 2008. DNA Methylation and demethylation in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, 2008(6); e0102.
- Goldberg, A., Allis, C.D., Bernstein, E. 2007. Epigenetics: A Landscape takes shape. *Cell*, 128, 635-638.
- Gökçe, M. A., 2020. Yabani Makarnalık Buğdayda (*Triticum dicoccoides*) DNA Metilasyon Çeşitliliğinin MSAP (Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism) Tekniğine Göre Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Gruenbaum, Y., Naveh-Man, T., Cedar, H., Razin, A. 1981. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature*, 292: 860–862.
- Güngör, Ö. F., Ünal, N. 2015. Epigenetik ve genomik baskılanma. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Dergisi*, 55 (2) 73-81.
- Gürel, Ç., Nursal, A. F., Yiğit, S. 2016. Epigenetik ve kanser. *Türkiye Klinikleri*, 2 (1): 45-51.
- Hauben, M., Haesendonckx, B., Standaert, E., Van Der Kelen, K., Azmi, A., Akpo, H., Breusegem, F. V., Guisez, Y., Bots, M., Lambert, B., Laga, B., De Block, M. 2009. Energy use efficiency is characterized by an epigenetic component that can be directed through

artificial selection to increase yield. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106: 20109– 20114.

Henderson, I. R., Jacobsen, S. E. 2008. Tandem Repeats Upstream of the Arabidopsis Endogene SDC Recruit non-CG DNA Methylation and Initiate siRNA Spreading. Genes and Development, 22: 1597-1606.

Henkin, Z., Resenzweig, T., Yaniv, Z. 2014. *Sarcopoterium spinosum*. (Editörler: Z. Yaniv, N. Dudai), Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East, Medicinal and Aromatic Plants of the World 2, Spiringer Science, Dordrecht, 151-163.

Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., Baylin, S. B. 1996. Methylation-Specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 9821-9826.

Kaya, B., Aladağ, C. 2009. Maki ve garig topluluklarının Türkiye'deki yayılış alanları ve ekolojik özelliklerinin incelenmesi. Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 22: 67-80.

Khan, S., Qureshi, M. İ., Alam, K. T., Abdin, M. Z. 2007. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. African Journal of Biotechnology, 6 (3): 175-178.

Klug, W. S., Cummings, M.R., Spencer, C. A., Palladino, M. A. 2018. Genetik Kavramlar. (Editörler: E. Sağlar, Y. Doğan), Kromozomlarda DNA'nın Organizasyonu, Palme Yayınevi, 11. Baskı, İzmir, 288-302.

Klug, W. S., Cummings, M.R., Spencer, C. A., Palladino, M. A. 2018. Genetik Kavramlar. (Editörler: A. O. Beldüz), Modern Genetikte Özel Konular. Epigenetik, Palme Yayınevi, 11. Baskı, İzmir, 674-682.

Lade, B. D., Patil, A. S., Paikrao, H. M., 2014. Efficient genomic DNA extraction protocol from medicinal rich *Passiflora foetida* containing high level of polysaccharide and polyphenol. SpringerPlus, 3:457.

Lanteri A., Guglielmo A., Pavone P., Salmeri C. 2012. Seed germination in *Sarcopoterium spinosum* (L.) Spach from South-Eastern Sicily. Plant Biosystems, 147(1): 60-63.

- Li, Y., Shan, X., Liu, X., Hu, L., Guo, W., Liu, B. 2008. Utility of the Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) marker for detection of DNA methylation polymorphism and epigenetic population structure in a wild barley species (*Hordeum brevisubulatum*). The Ecological Society of Japan, 23: 927–930.
- Li, Y., Tollefsbol, T. O. 2011. DNA Methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis. National Institutes of Health Public Access, Methods Mol Biol., 791: 11–21.
- Litav, M., Orshan, G. 1971. Biological Flora of Israel. 1. *Sarcopoterium spinosum* (L.) Spach. Isr. J. Bot., 20: 48–64.
- Loizzo, M.R., Bonesi, M., Passalacqua, N.G., Saab, A., Menichini, F., Tundis, R. 2013. Antiproliferative Activities on renal, prostate and melanoma cancer cell lines of *Sarcopoterium spinosum* aerial parts and its major constituent tormentic acid. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 13 (5): 768-776.
- Lu, Y., Rong, T., Cao, M. 2008. Analysis of DNA methylation in different maize tissues. Journal of Genetics and Genomics, 35: 41–48.
- Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A. J., King, G. J., Giovannoni, J. J., Seymour, G. B. 2006. A Naturally Occurring Epigenetic Mutation in a Gene Encoding an SBP-Box Transcription Factor Inhibits Tomato Fruit Ripening. Nature genetics, 38: 948–952.
- Martins, A. A., Da Silva, M. F., Pinto L. R., 2020. Epigenetic Diversity of *Saccharum* spp. Accessions Assessed by Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP). 3 Biotech, 10: 265.
- Masadeh, M.M., Alkofahi, A.S., Tumah, H.N., Mhaidat, N.M., Alzoubi, K.H. 2013. Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants grown in Jordan. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 26(2): 267-270.
- Matassi, G., Melis, R., Kuo, K. C., Macaya, G., Gehrke, C. W., Bernardi, G. 1992. Large-Scale Methylation Patterns in the Nuclear Genomes of Plants. Gene, 122(2): 239-245.
- Messeguer, R., Ganai, M. W., Steffens, J. C., Tanksley, S. D., 1991. Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. Plant Mol. Biol., 16: 753–770.

- Morán, P., Perez-Figueroa, A. 2011. Methylation changes associated with early maturation stages in the Atlantic salmon. *BMC Genetics*, 12:86.
- Osabe, K., Clement, J. D., Bedon, F., Pettolino, F. A., Ziolkowski, L., Llewellyn, D. J., Finnegan, E. J., Wilson, I. W. 2014. Genetic and DNA methylation changes in cotton (*Gossypium*) genotypes and tissues. *PLoS One*, 9(1): 1-11.
- Pavet, V., Quintero, C., Cecchini, N. M., Rosa, A. L., Alvarez, M. E. 2006. Arabidopsis Displays Centromeric DNA Hypomethylation and Cytological Alterations of Heterochromatin Upon Attack by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 9 (6): 577-587.
- Peng, J. C., Karpen, G. H. 2008. Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18: 204–211.
- Perez-Figueroa, A., 2013. Msap: A Tool for the Statistical Analysis of Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism Data. *Molecular Ecology Resources*, 13: 522–527.
- Puiu, M., Cucu, N. 2011. Advances in the Study of Genetic Disorders. In: Kenji Ikehara (Editor), Prader–Willi Syndrome, From Molecular Testing and Clinical Study to Diagnostic Protocols. In Tech, Rijeka, pp. 409-129.
- Reher, G., Reznicek, G., Baumann, A. 1991 a. Triterpenoids from *Sarcopoterium spinosum* and *Sanguisorba minor*. *Planta Med.*, 57(5): 506.
- Reher, G., Slijepcevic, M., Kraus, L. 1991 b. Hypoglycemic Activity of Triterpenes and Tanins from *Sarcopoterium spinosum* and two *Sanguisorba* species. *Planta Med.*, 57: A57–A58.
- Reyna-Lopez, G., Simpson, J., Ruiz-Herrera, J. 1997. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Mol Gen Genet*, 253(6): 703–10.
- Ruiz-Garcia, L., Cervera, M. T., Martinez-Zapater, J. M. 2005. DNA methylation increases throughout Arabidopsis development. *Planta*, 222: 301–306.
- Salmon, A., Clotault, J., Jenczewski, E., Chable, V., Manzanares-Dauleux, M., 2008. *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Sci.*, 174:61–70.

Schrey, A. W., Alvarez, M., Foust, C. M., Kilvitis, H. J., Lee, J. D., Liebl, A. L., Martin, L. B., Richards, C. L., Robertson, M. 2013. Ecological Epigenetics: Beyond MS-AFLP. Integrative and Comparative Biology, 53(2): 340–350.

Schulz, B., Eckstein, R. L., Durka, W. 2013. Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies. Molecular Ecology Resources, 13: 642–653.

Sharma, R., Mohan, S. R. K., Malik, G., Deveshwar, P., Tyagi, A. K. 2009. Rice cytosine DNA methyltransferases-gene expression profiling during reproductive development and abiotic Stress. FEBS Journal, 276: 6301–6311.

Sipahi, H., Korkmaz B., Avşar, C., Fandaklı, S., Elmas, E., 2017. Volatile profiles, antioxidant, and antimicrobial activities of essential oils and extracts of different parts from *Sarcopoterium spinosum* L. Spach growing wild in Sinop (Turkey). Journal of Essential Oil Bearing Plants, 20 (3): 688-700.

Smirin, P., Taler, D., Abitbol, G., Brutman-Barazani, T., Kerem, Z., Sampson, S.R., 2010. *Sarcopoterium spinosum* extract as an antidiabetic agent: In vitro and in vivo study. Journal of ethnopharmacol, 129: 10-17.

Suji, K. K., John, A. 2010. An epigenetic change in rice cultivars underwater stress conditions. Electronic Journal of Plant Breeding, 1: 1142-1143.

Şener, B., Ergun, F. 1987. *Sarcopoterium spinosum* (L.) Spach. (Rosaceae) Bitkisinin farmakognozideki yeri. Marmara Üniv. Eczacılık Dergisi, 91-97.

Tan, M. P., 2010. Analysis of DNA Methylation of Maize in Response to Osmotic and Salt Stress Based on Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism. Plant Physiol Biochem., 48(1): 21-26.

Tarım ve Orman Bakanlığı Meteoroloji Genel Müdürlüğü Sinop Meteoroloji Müdürlüğü, 2020. (Resmî Yazı Tarihi: 27.03.2020)

Toparslan, E., Mercan, L., Kuran, M. 2015. Kalıtımın epigenetik boyutunda DNA metilasyon desenleri. Hayvansal Üretim Dergisi, 56 (2): 38-42.

Vanyushin, B. F. 2005. Enzymatic DNA Methylation Is an Epigenetic Control for Genetic Functions of the Cell. Biochemistry (Moscow), 70(5): 488-499.

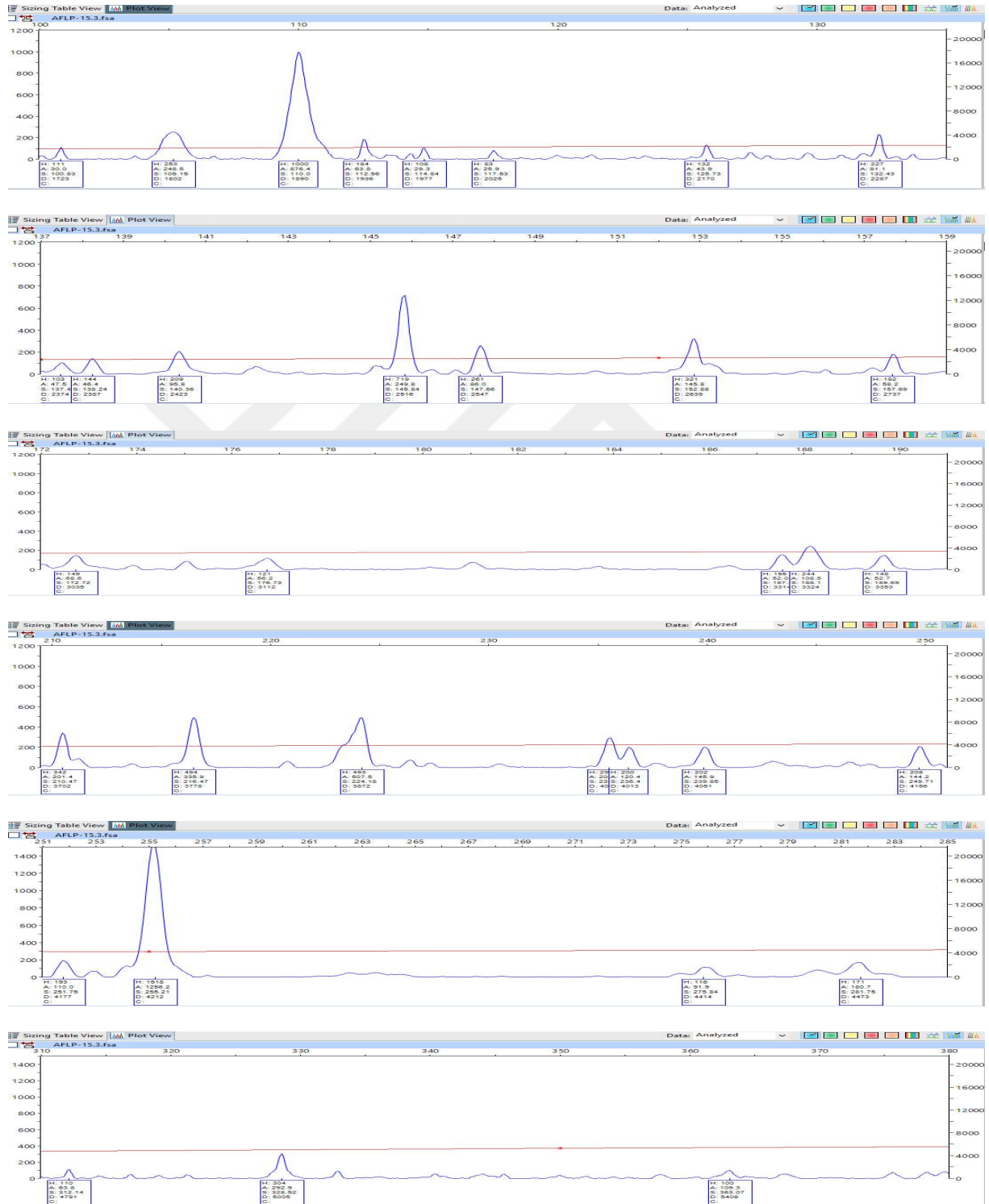
- Venetsky, A., Levy-Zamir, A., Khasdan, V., Domb K., Kashkush K. 2015. Structure and Extent of DNA Methylation-Based Epigenetic Variation in Wild Emmer Wheat (*T. turgidum* ssp. *dicoccoides*) Populations. *BMC Plant Biol*, 15: 200.
- Vergeer, P., Wagemaker, N., Ouborg, N. J. 2012. Evidence for an epigenetic role in inbreeding depression. *Biology Letters*, 8: 798–801.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, M., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Xiong, L. Z., Xu, C. G., Saghai Maroof, M. A., Zhang, Q. 1999. Patterns of Cytosine Methylation in an Elite Rice Hybrid and its Parental Lines, Detected by a Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism Technique. *Molecular Genetics and Genomics*, 261: 439–446.
- Yaniv, Z., Dafni, A., Friedman, J. P. 1987. Plants Used for the Treatment of Diabetes in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 19 (2): 145-151.
- Zeybek, Z., 1985. *Farmasötik Botanik Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematigi ve Önemli Maddeleri*. Ege Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları, İzmir, 208.
- Zhang, M., Xu, C., Wettstein, D., Liu, B. 2011. Tissue-specific differences in cytosine methylation and their association with differential gene expression in sorghum bicolor. *Plant physiology*, 156: 1955–1966.
- Zhang, E. T., He, Y., Grob, P., Fong, Y. W., Nogales, E., Tjian, R., 2015. Architecture of the human XPC DNA repair and stem cell coactivator complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112: 14817-14822.
- Zhong, S., Fei, Z., Chen, Y. R., Zheng, Y., Huang, M., Vrebalov, J., McQuinn, R., Gapper, N., Liu, B., Xiang, J., Shao, Y., Giovannoni, J. J. 2013. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nature Biotechnology*, 31: 154–159.
- Zluvova, J., Janousek, B., Vyskot, B. 2001. Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *J. Exp. Bot.*, 52: 2265– 2273.

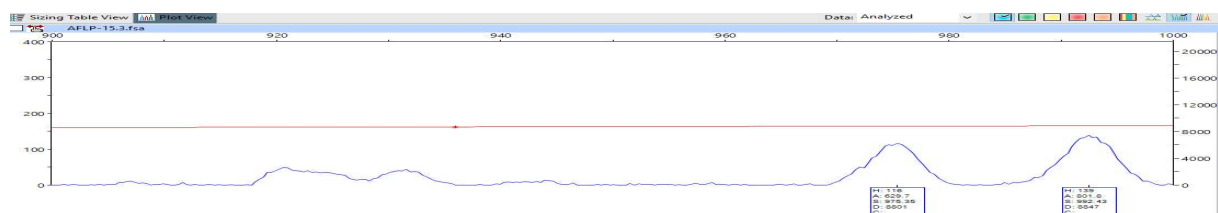
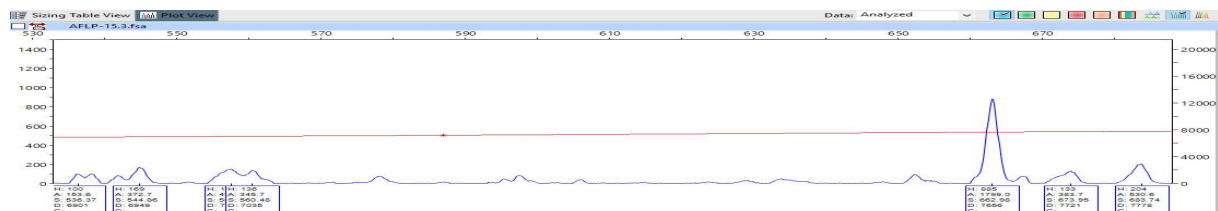
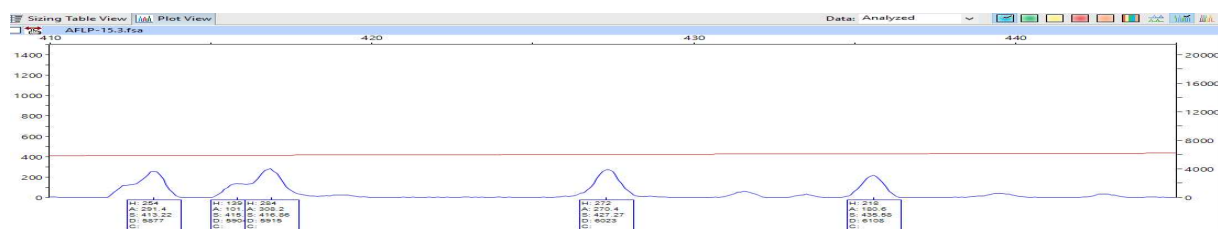
Zohary, M. 1973. Geobotanical Foundations of the Middle East. 1. In: Verlag, G. F. (Editor)
Swets and Zeitlinger, Stuttgart/Amsterdam, 738 s.



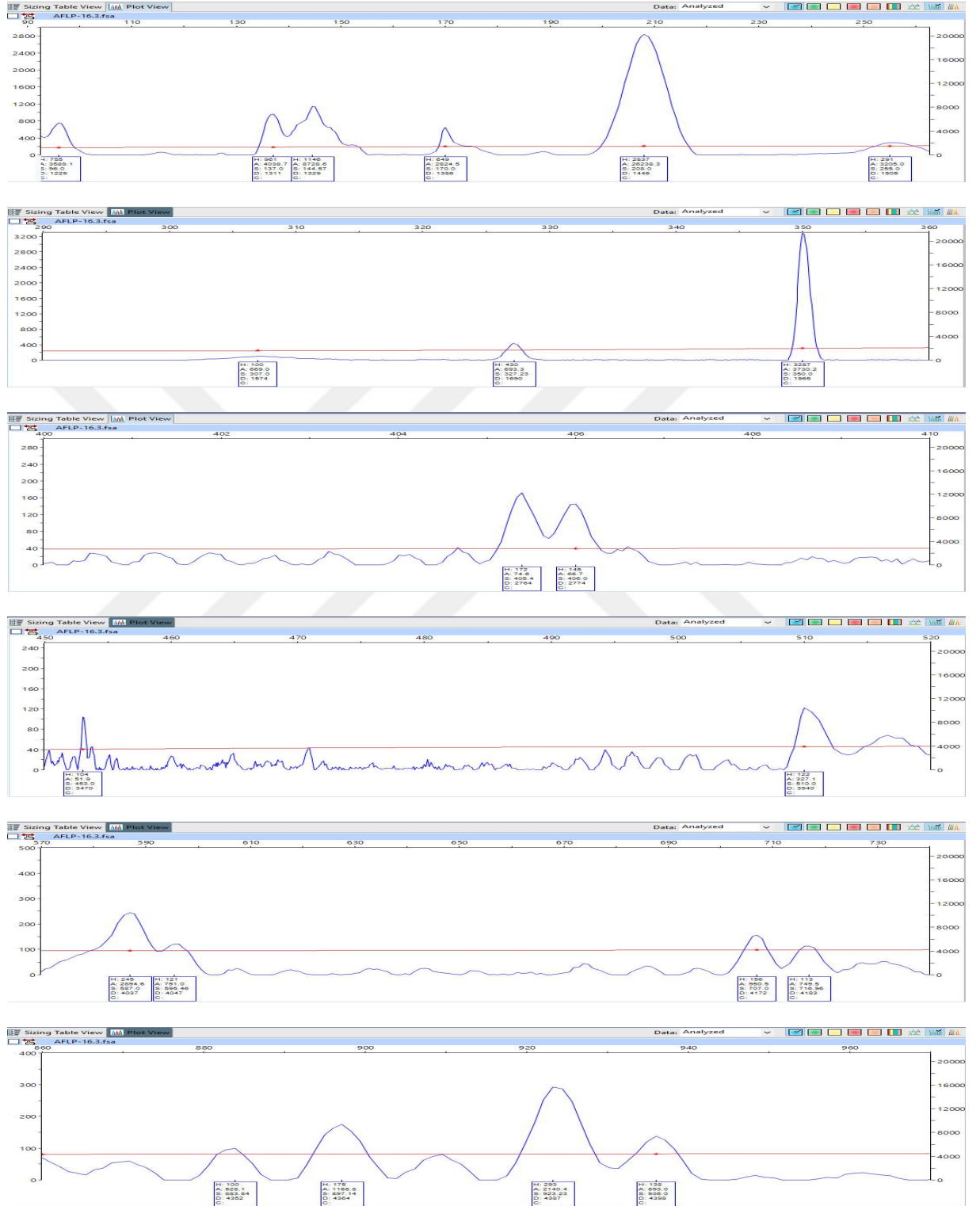
EKLER

Ek 1. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın yaprak organı *EcoRI/MspI* kesim paterni ile (E)–AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları

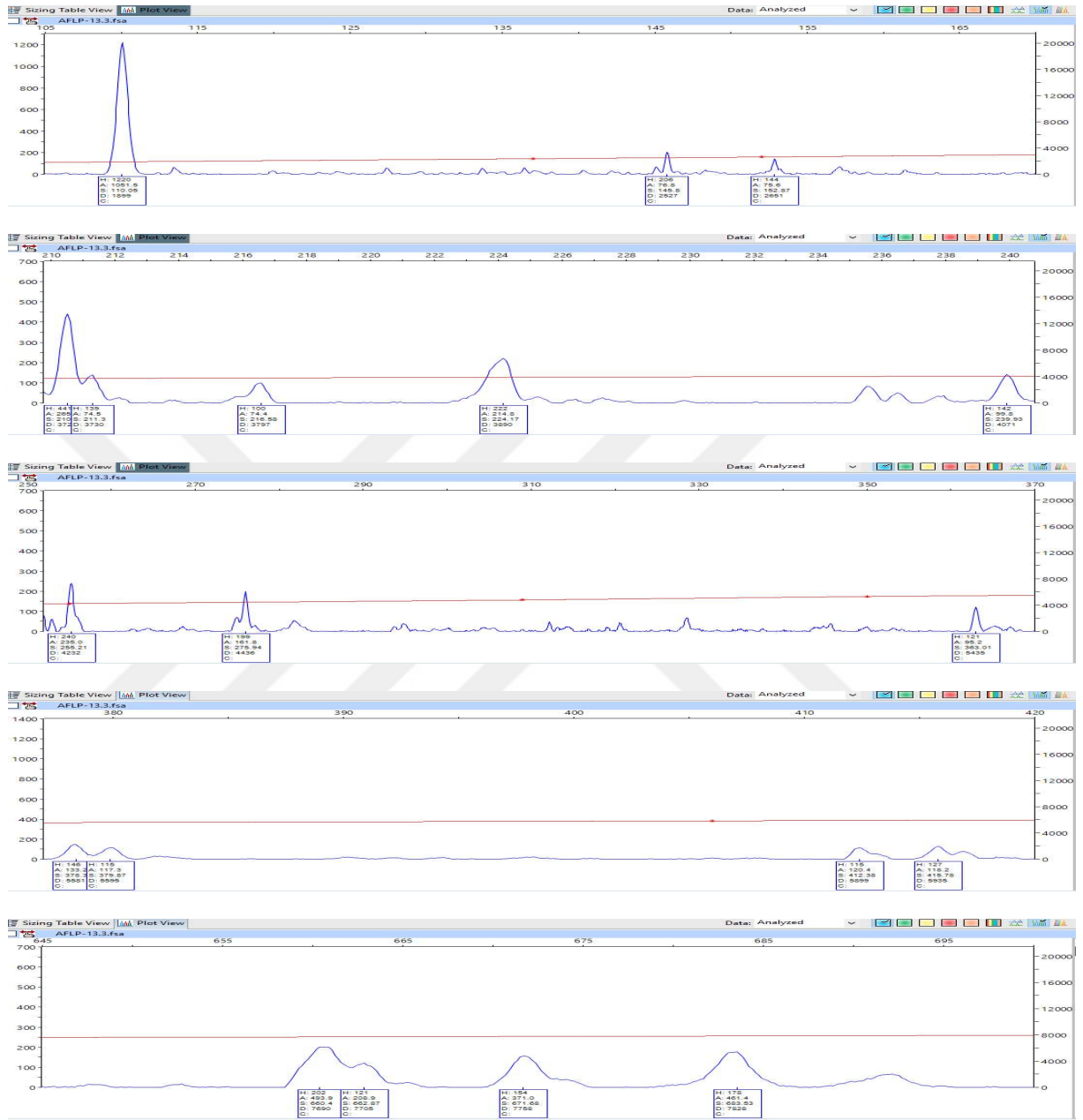




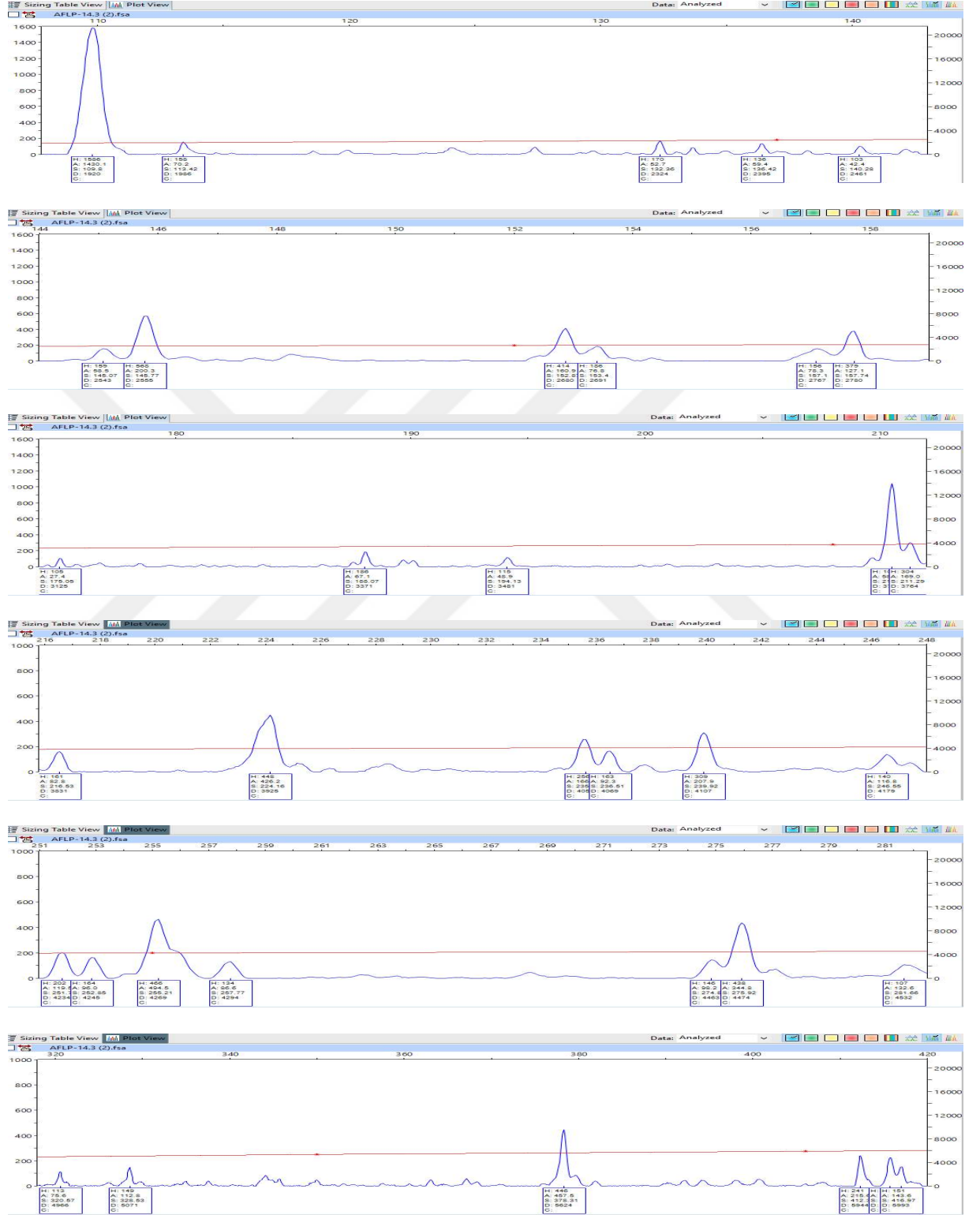
Ek 2. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın yaprak organı *EcoRI/HpaII* kesim paterni ile (E)– AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları

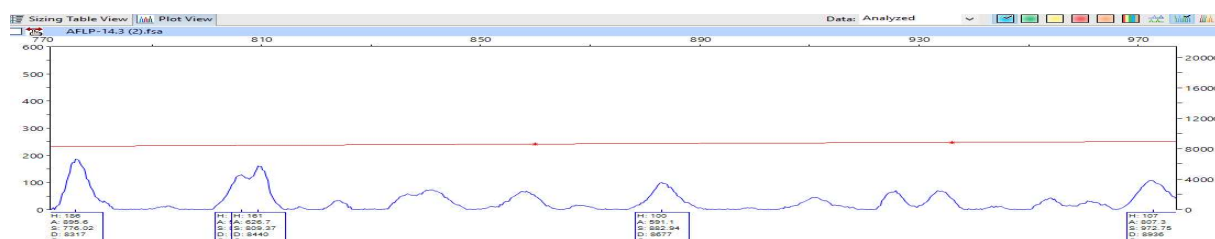
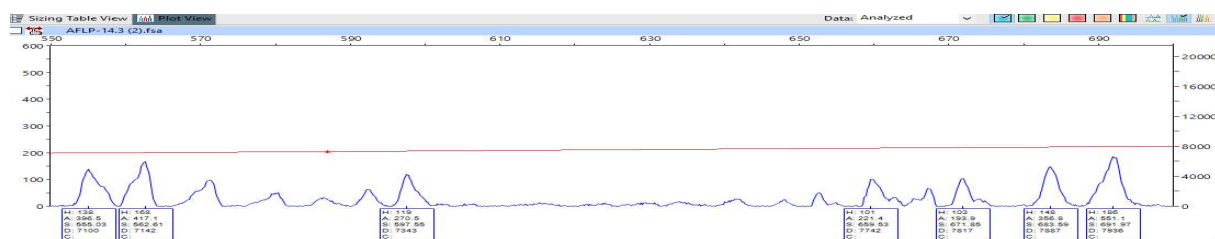
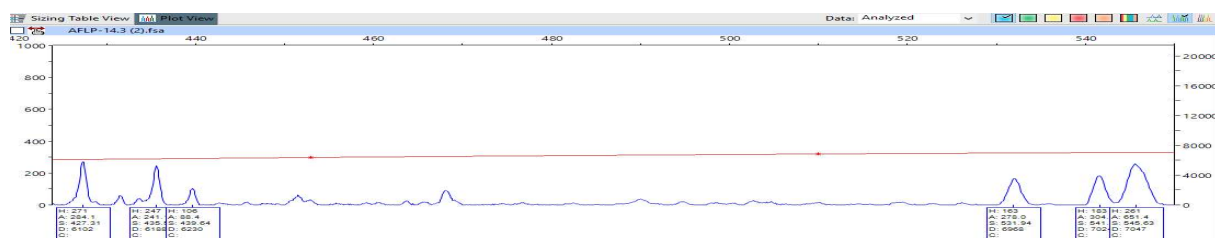


Ek 3. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın meyve organı *EcoRI/MspI* kesim paterni ile (E)–AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları

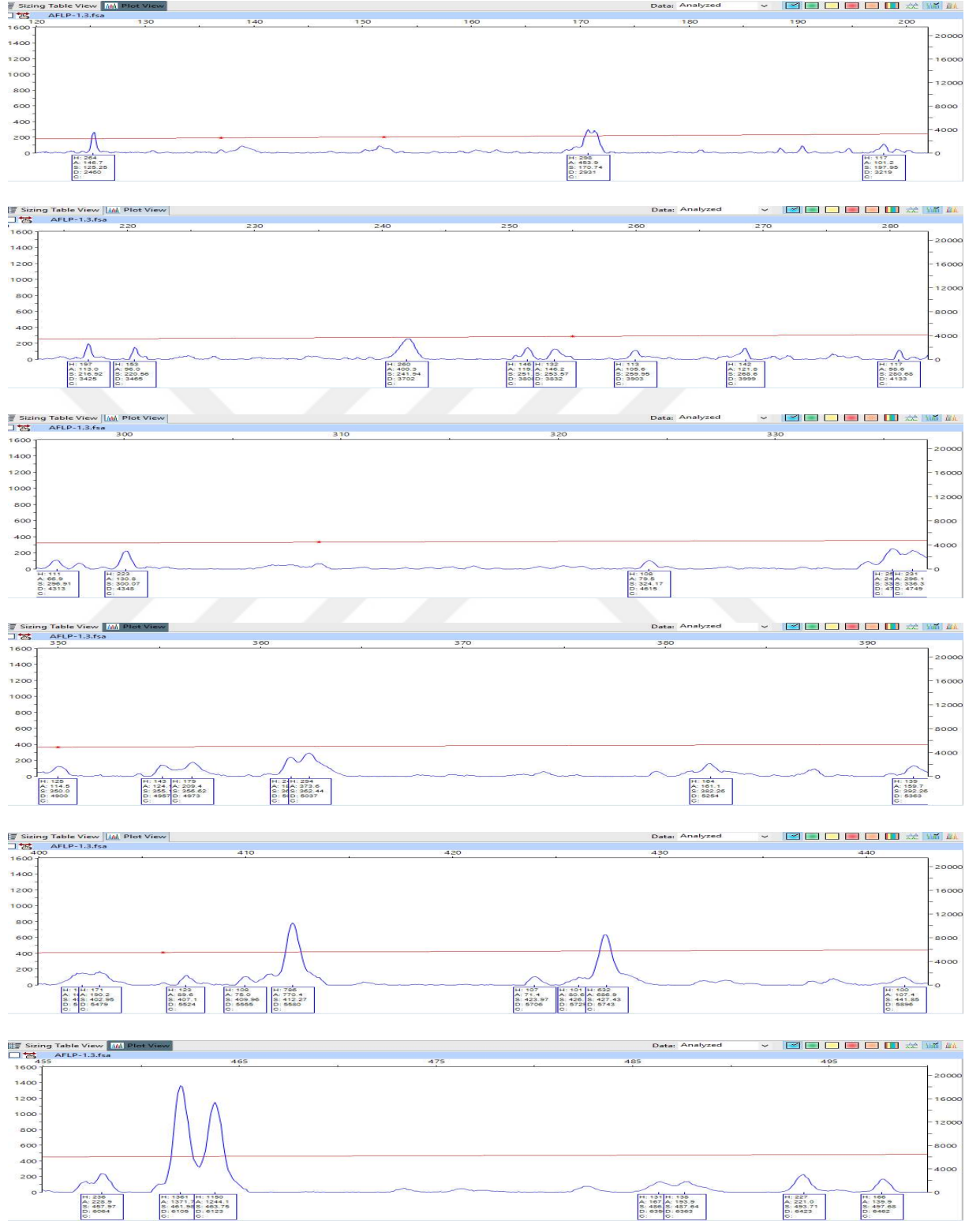


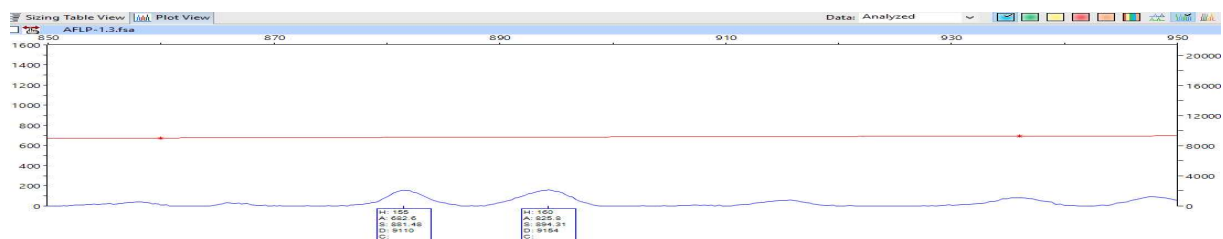
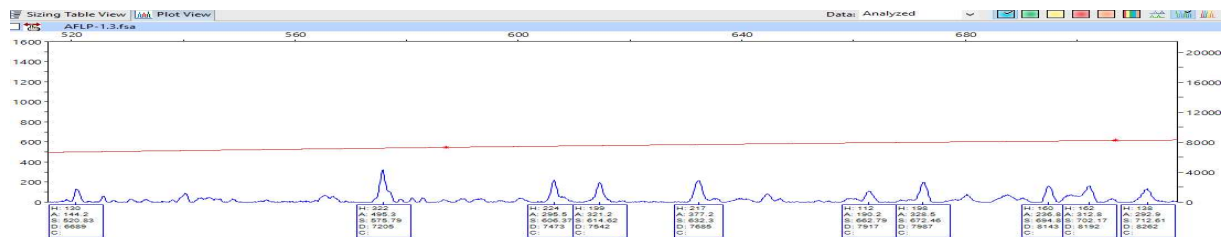
Ek 4. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın meyve organı *EcoRI/HpaII* kesim paterni ile (E)– AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları



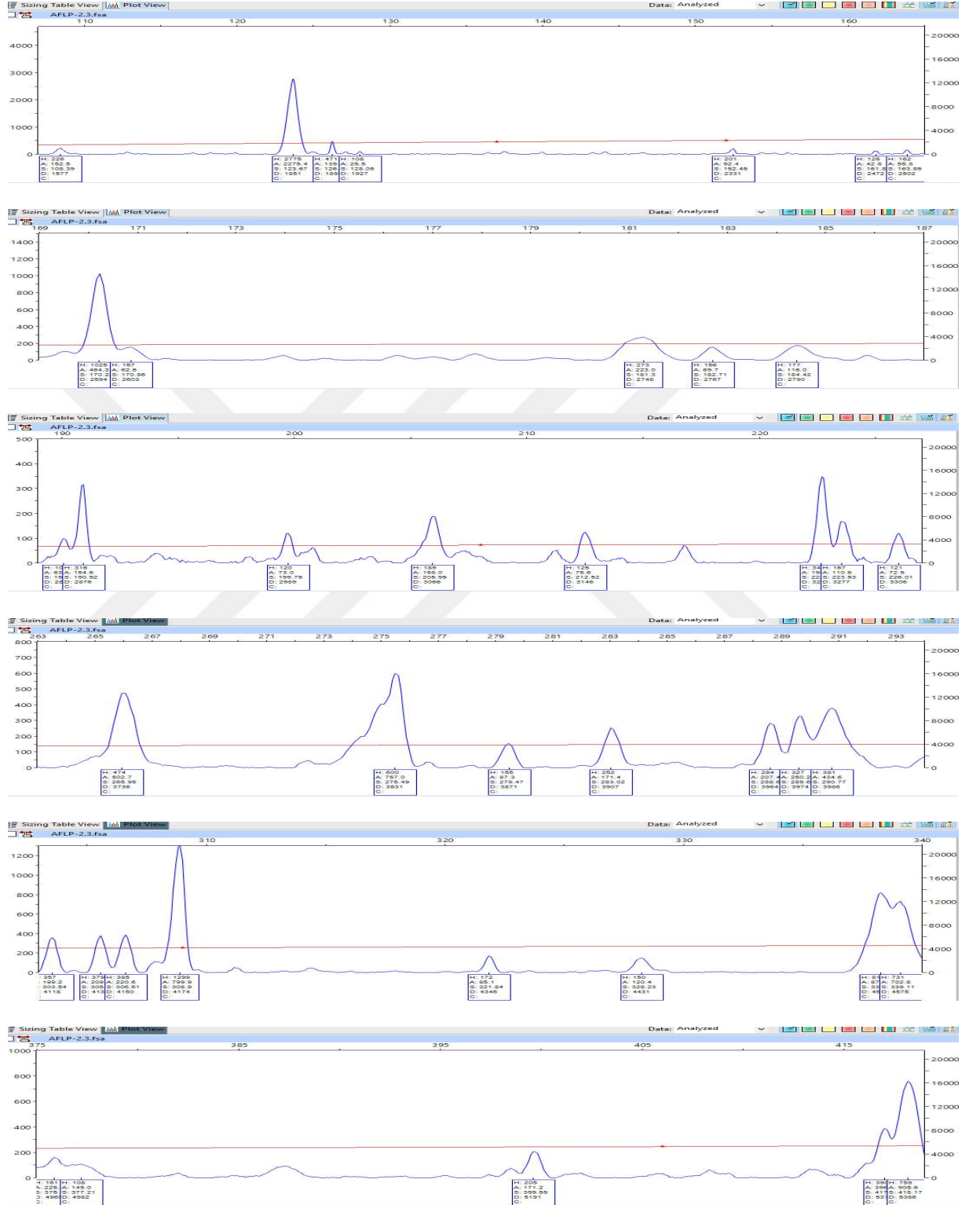


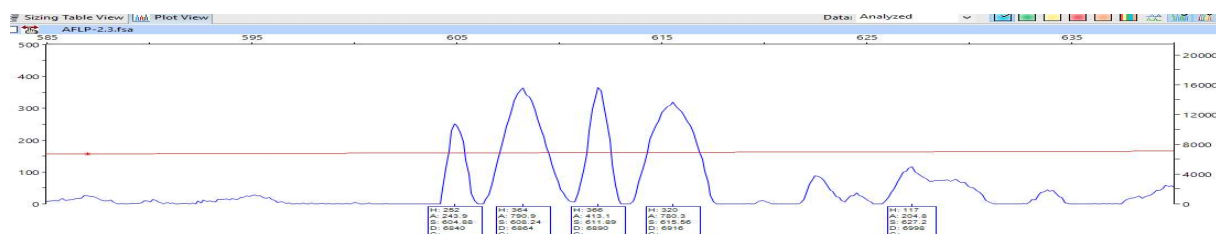
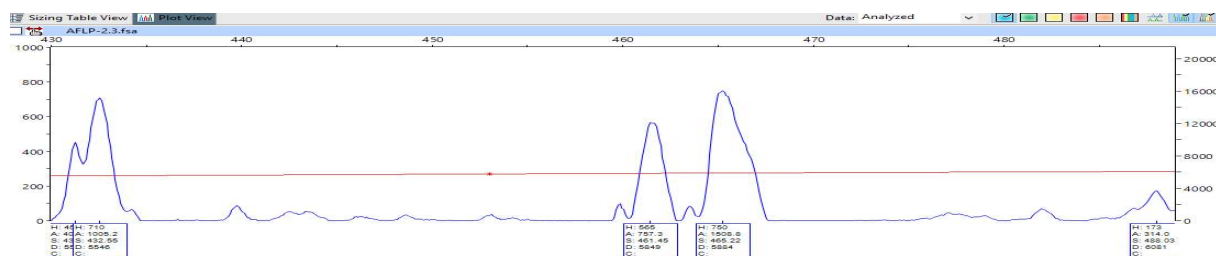
Ek 5. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın kök organı *EcoRI/MspI* kesim paterni ile (E)–AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları



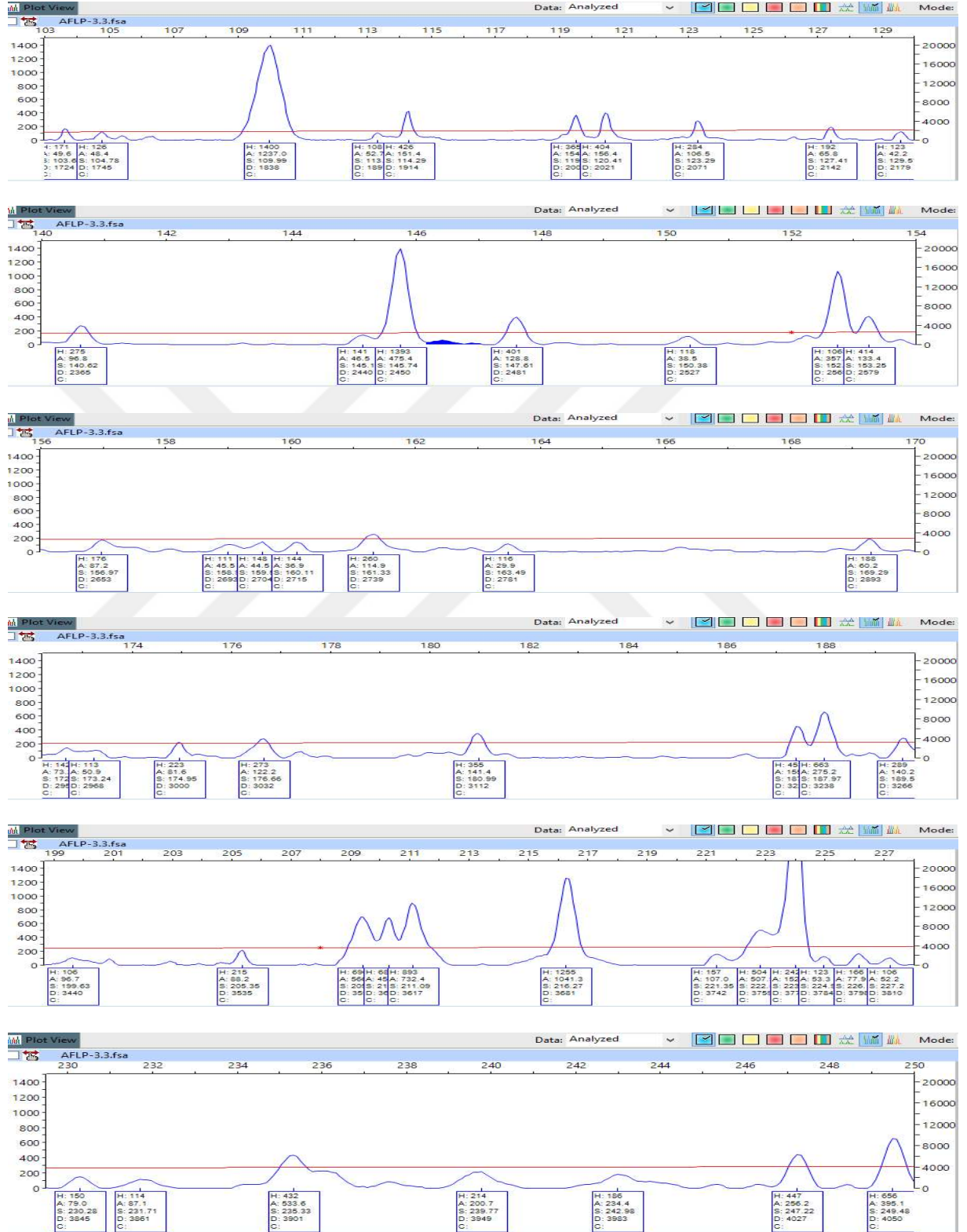


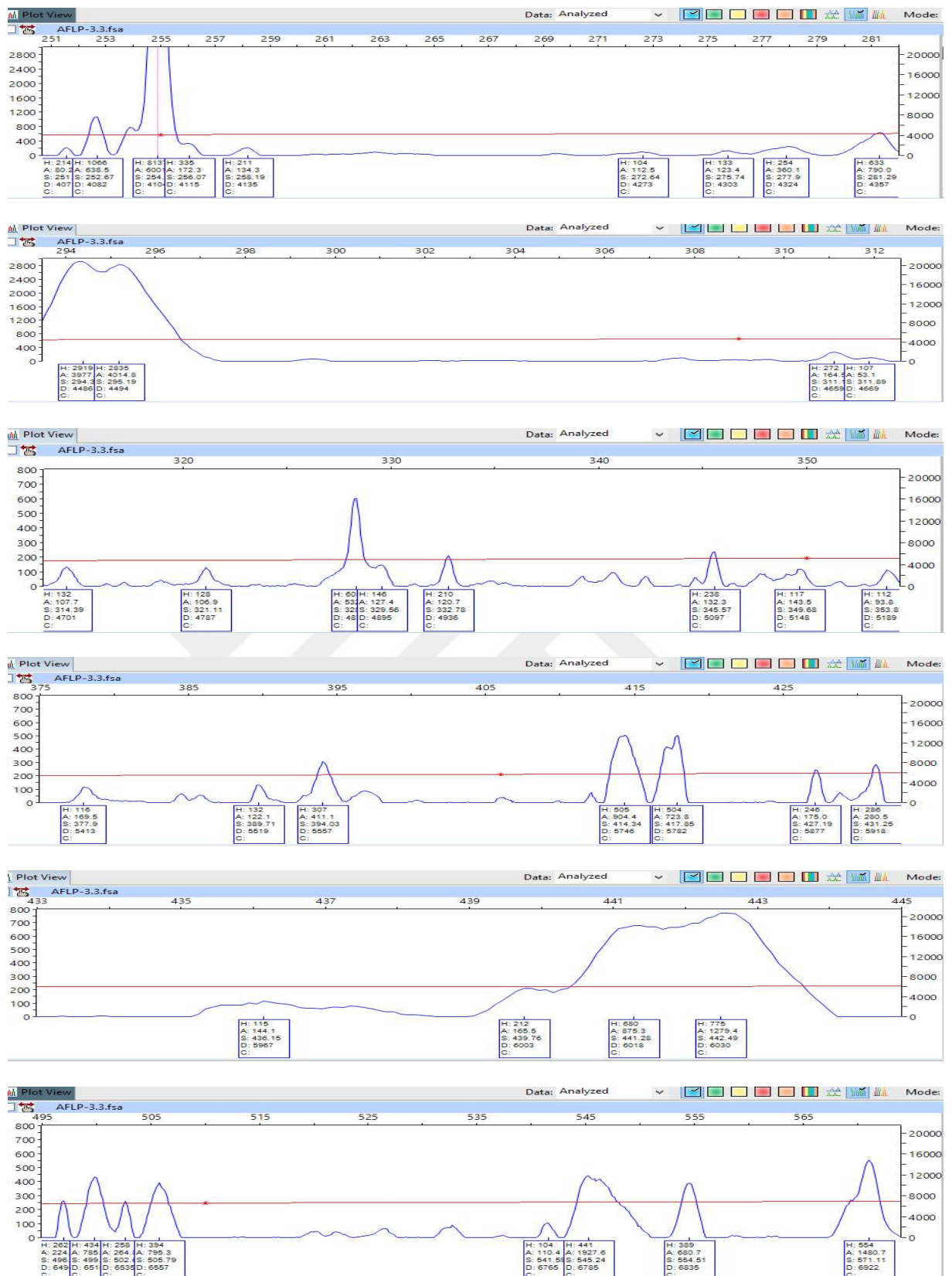
Ek 6. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın kök organı *EcoRI/HpaII* kesim paterni ile (E)–AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları

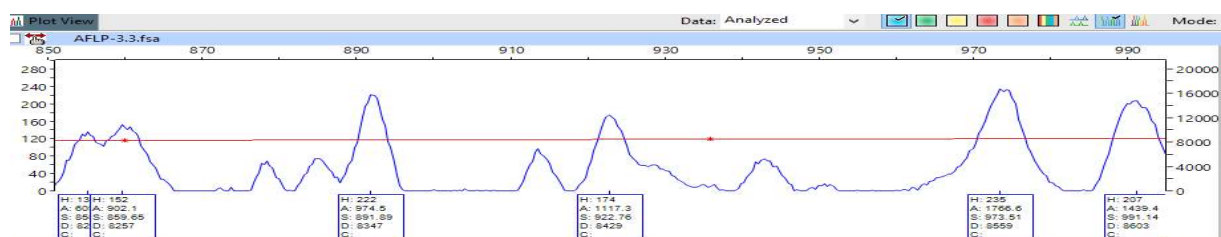
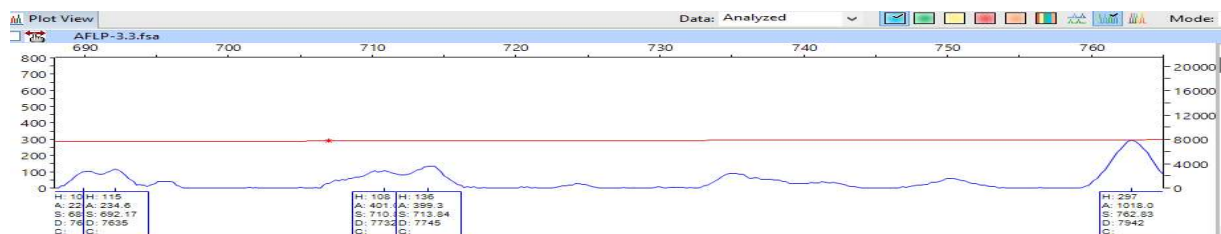
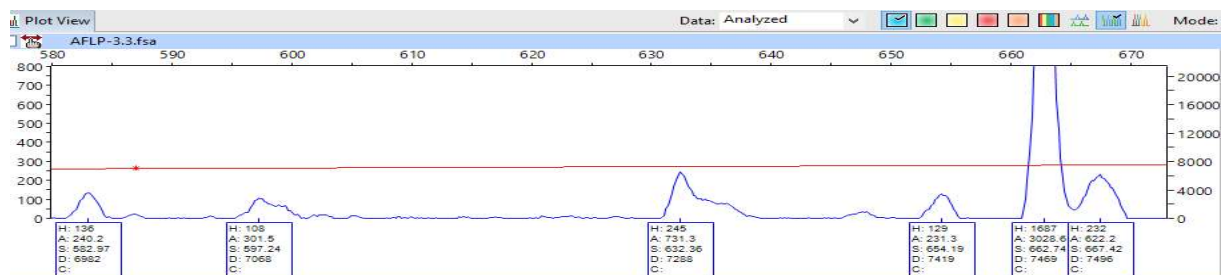




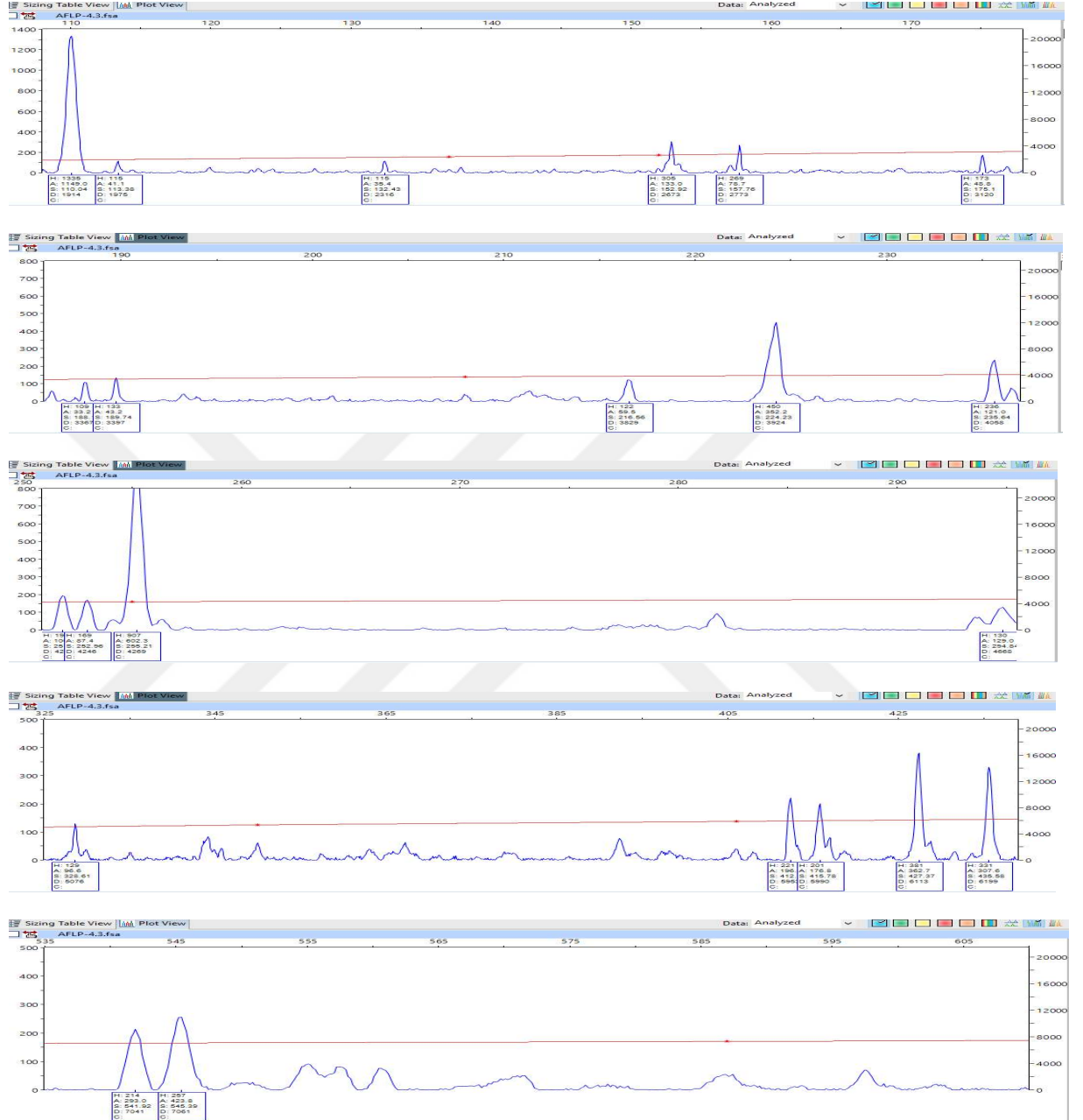
Ek 7. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın gövde organı *EcoRI/MspI* kesim paterni ile (E)–AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları



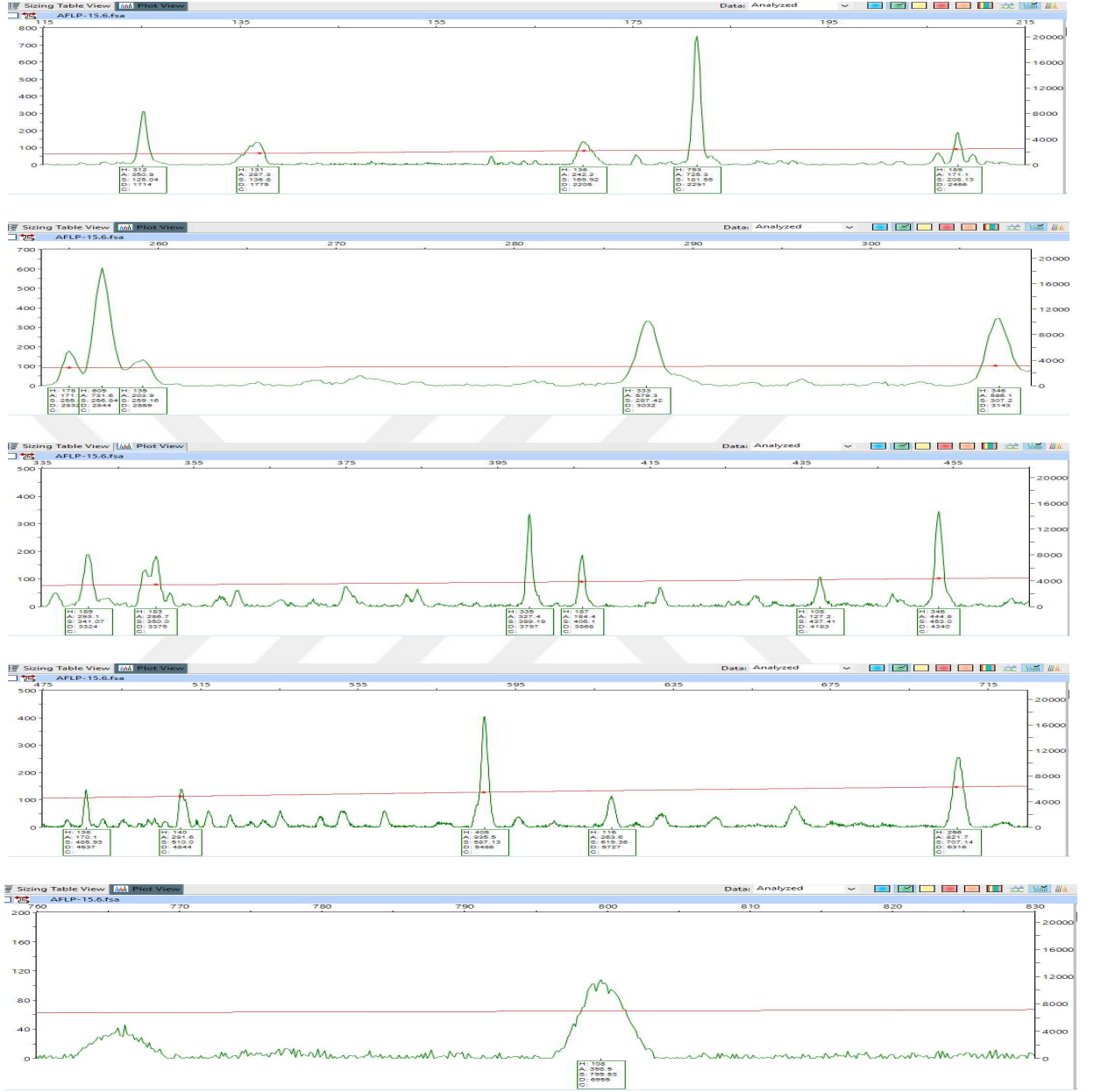




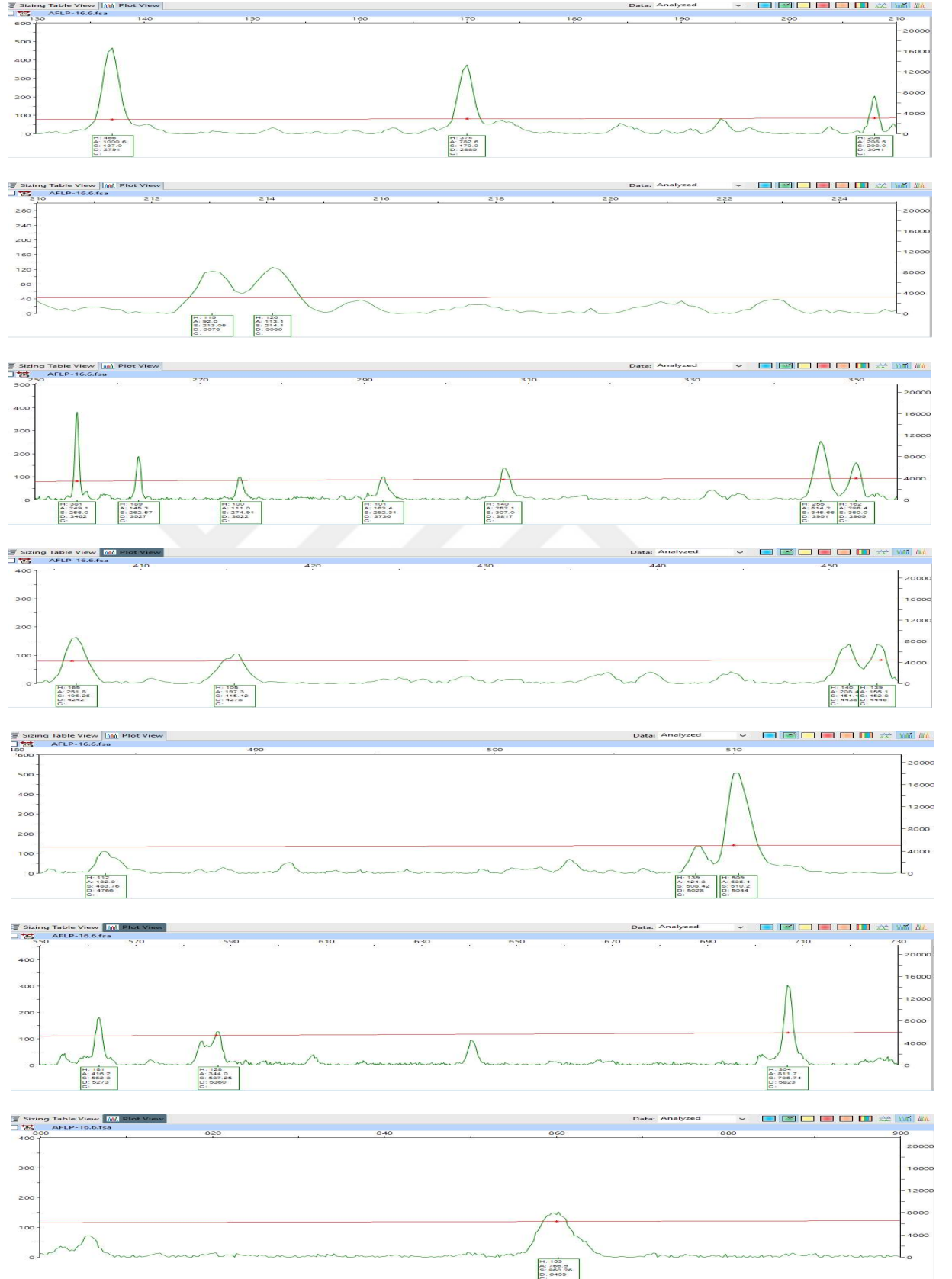
Ek 8. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın gövde organı *EcoRI/HpaII* kesim paterni ile (E)–AAC/(HM)– TCAA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları



Ek 9. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın yaprak organı *EcoRI/MspI* kesim paterni ile (E)–ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları



Ek 10. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın yaprak organı *EcoRI/HpaII* kesim paterni ile (E)– ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları



Ek 11. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın meyve organı *EcoRI/MspI* kesim paterni ile (E)– ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları

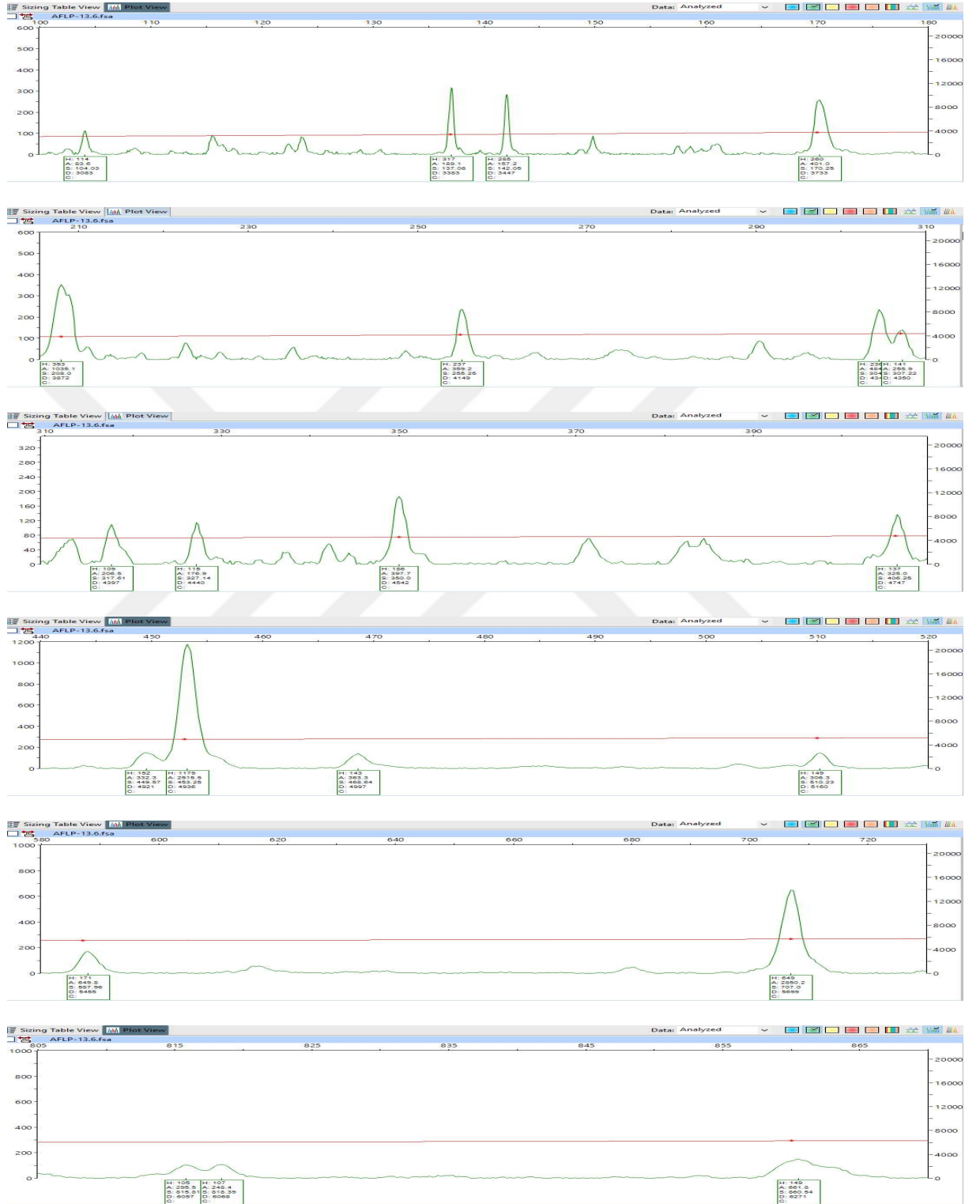
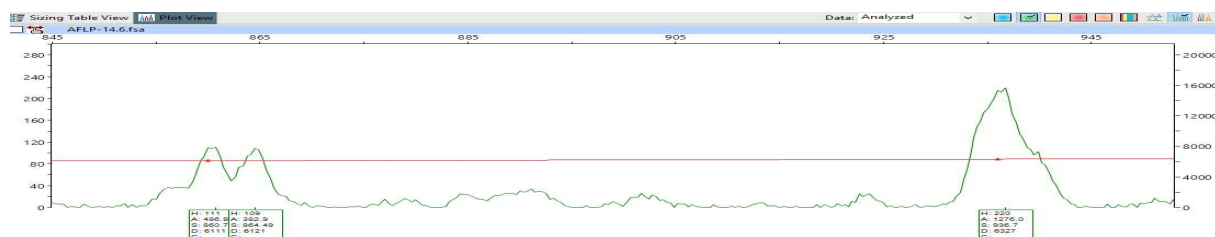
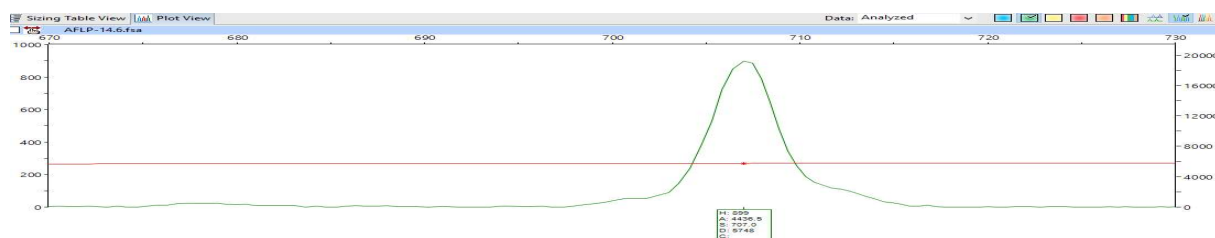
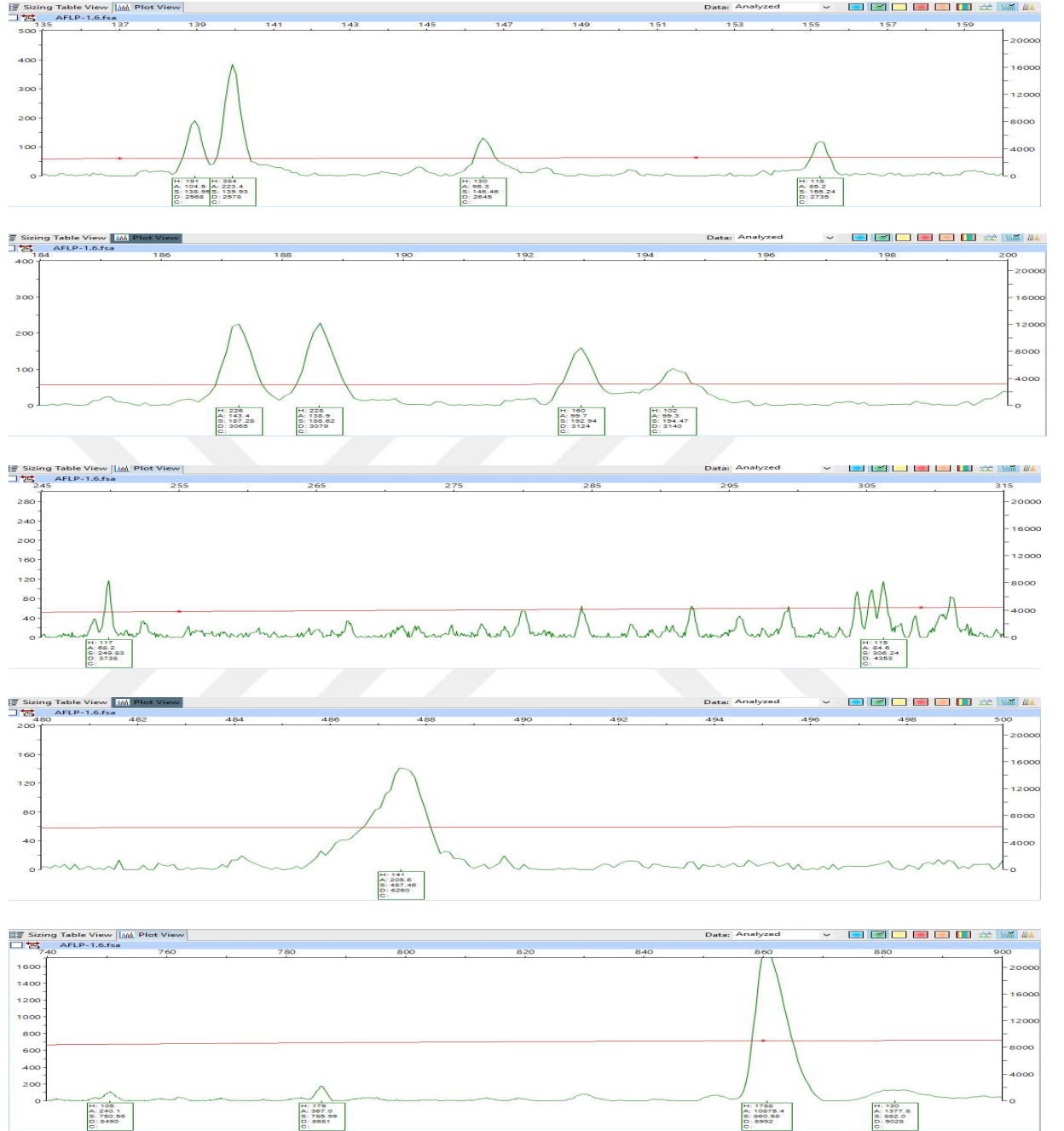


Figure 1 displays five panels of mass spectra for the AFLP-14.6 fragment, showing relative intensity versus m/z. The panels are labeled 'AFLP-14.6.fsa' and 'Data: Analyzed'.

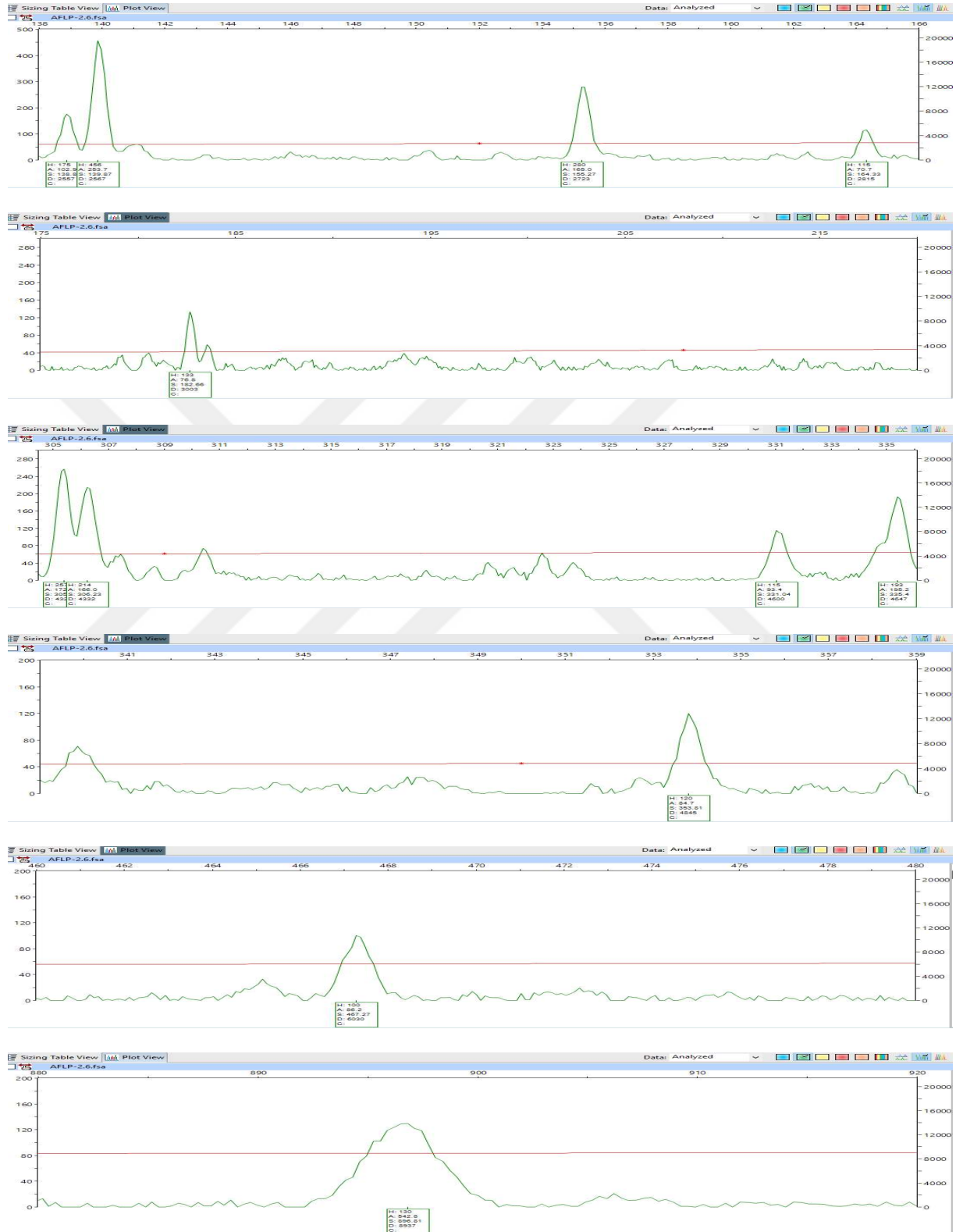
- Panel 1 (m/z 109-127):** Shows a prominent peak at m/z 124. Other labeled peaks include m/z 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175.
- Panel 2 (m/z 149-175):** Shows a prominent peak at m/z 161. Other labeled peaks include m/z 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175.
- Panel 3 (m/z 190-260):** Shows a prominent peak at m/z 214. Other labeled peaks include m/z 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260.
- Panel 4 (m/z 310-350):** Shows a prominent peak at m/z 324. Other labeled peaks include m/z 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350.
- Panel 5 (m/z 385-475):** Shows a prominent peak at m/z 414. Other labeled peaks include m/z 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475.



Ek 13. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın kök organı *EcoRI*/*MspI* kesim paterni ile (E)–ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları



Ek 14. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın kök organı *EcoRI*/*HpaII* kesim paterni ile (E)–ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları



Ek 15. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın gövde organı *EcoRI/ MspI* kesim paterni ile (E)– ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları



Ek 16. *Sarcopoterium spinosum* L. Spach'ın gövde organı *EcoRI*/*HpaII* kesim paterni ile (E)– ACC /(HM)– TCCA primer kombinasyonu seçici çoğaltım elektroferogramları



ÖZGEÇMİŞ

1. Kişisel Bilgiler

Ad Soyad

Doğum Tarihi

Doğum Yeri

E-posta Adresi

2. Eğitim Bilgileri

Lisans Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji-Tezsiz

3. İş Deneyimi

Aralık 2005-Nisan 2014 Emniyet Genel Müdürlüğü (Polis Memuru)

Mayıs 2014-Nisan 2020 Sinop Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi
(Bilgisayar İşletmeni)

Mayıs 2020- Sinop Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar
Uygulama ve Araştırma Merkezi (Biyolog)

4. Yayınlar, Çalışmalar

Makale Yücel Gökgöz, Hülya Sipahi. 2021. Assessment of DNA Methylation Levels in the Different Organs of *Sarcopoterium spinosum* (L.) Spach. Journal of Applied Biological Sciences (JABS), 15 (1): 12-19.