

İn vitro Bitki Doku Kültürü Kaynaklı Epigenetik Değişimler, Özellikle DNA Metilasyonu ve Somaklonal Varyasyon Ekseninde

Ahmet Say¹

Onur Okumuş²

Ahmet Sümbül³

Özet

İn vitro bitki doku kültürü süreçlerinde ortaya çıkan epigenetik yeniden programlama, bitki genomunun metilasyon dinamiklerini değiştirerek somaklonal varyasyonun (SV) temel belirleyicilerinden biri haline gelir. DNA metilasyonu, CG, CHG ve CHH bağlamlarında MET1, CMT3 ve DRM2/RdDM yolları aracılığıyla düzenlenir ve gen ifadesi, transpozon baskılanması ve genom stabilitesinin korunmasında kritik rol üstlenir. Doku kültürü mikroçevresindeki stres faktörleri (antioksidatif dengesizlikler, sürekli alt kültürlenme, bitki büyüme düzenleyicileri ve kültür süresi) epigenetik instabiliteyi tetikler. Bu süreç, geçici veya kalıcı metilasyon değişiklikleri ile hücresel yeniden programlanmayı etkileyerek fenotipik sapmalar oluşturur. Epigenetik kökenli bu değişimler, ticari mikroçoğaltma sistemlerinde klonal sadakat sorunlarına yol açsa da, ıslah programları için değerli bir varyasyon kaynağı oluşturur. Metilasyon değişimlerinin izlenmesinde MSAP ve metAFLP gibi hızlı tarama yöntemleri ile bisülfid dizileme gibi yüksek çözünürlüklü yaklaşımlar birlikte kullanılmaktadır. Epigenetik stabilitenin yönetimi; kültür koşullarının optimizasyonu, stres yönetimi ve epigenetik profil izlemesiyle mümkün olup kontrollü varyasyon üretimi açısından stratejik önem taşır.

- 1 Dr. Öğr. Üyesi, Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kayseri, Türkiye ahmetsay@erciyes.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0001-5259-7580>
- 2 Arş. Gör., Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Kayseri, Türkiye okumus@erciyes.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0001-6957-3729>
- 3 Dr. Öğr. Üyesi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Suşehri Timur Karabal Meslek Yüksekokulu, Sivas, Türkiye asumbul3188@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9510-0992>

1. Giriş

Bitki doku kültürü (BDK) tekniklerinin ortaya çıkışı, modern bitki bilimi araştırmalarında ve tarımsal üretimde, özellikle ticari mikroçoğaltma (mikropropagasyon), ıslah programları, germplazm (genetik materyal) koruma ve patojensiz bitki üretimi gibi alanlarda en önemli araçlardan biri haline gelmiştir (Ghosh et al., 2021; Krishna et al., 2016). Bu yöntemler, klonlama yoluyla çok sayıda, genetik ve fizyolojik açıdan benzer bitkinin kısa sürede ve yıl boyunca üretilmesine olanak tanır (Ghosh et al., 2021). Bitki hücrelerinin totipotens (tek bir hücreden tüm bir organizmayı yeniden oluşturma yeteneği) ve gelişimsel plastisite (farklı çevresel koşullara uyum sağlama yeteneği) kavramlarına dayanarak bitki rejenerasyonunu sağlar (Fehér, 2019; Thorpe, 2007).

Ancak, her ne kadar doku kültürü rejenerantlarının klonal olarak özdeş olması amaçlansa da, durum her zaman böyle değildir (Ghosh et al., 2021). Laboratuvar ortamındaki yapay mikroçevre koşullarındaki dalgalanmalar ve sürekli alt kültüre maruz kalma, bitki hücrelerinde strese neden olarak genetik ve epigenetik istikrarsızlıkları tetikler (Cassells & Curry, 2001; Ghosh et al., 2021). Bu durum, rejenerantlarda Doku Kültürü Kaynaklı Varyasyon (TCIV) olarak bilinen moleküler ve fenotipik değişikliklere yol açar. Bu fenomene, genellikle indükleyici ortamı kategorik olarak belirtmek için Somaklonal Varyasyon (SV) adı verilir (Larkin & Scowcroft, 1981; Ghosh et al., 2021). SV, kromozom sayısındaki veya yapısındaki değişiklikler, DNA dizi varyasyonları ve transpozon aktivasyonu gibi genetik değişiklikleri içerebilir (Kaeppeler et al., 2000; Larkin & Scowcroft, 1981). Bununla birlikte, mevcut kanıtlar, DNA metilasyonu modelindeki bozulmalar gibi epigenetik varyasyonların, doku kültürü sürecinde genetik mutasyonlardan çok daha sık meydana geldiğini göstermektedir (Ghosh et al., 2021; Miguel & Marum, 2011).

Epigenetik mekanizmalar, DNA dizisini değiştirmeden gen ifadesindeki kalıtsal değişikliklerdir (Law & Jacobsen, 2010). Bitkilerde DNA metilasyonu CG, CHG ve CHH bağlamlarında gerçekleşir ve düzeyi/dağılımı tür ile dokuya göre farklılık gösterir (Ghosh et al., 2021; Bednarek & Orłowska, 2020). Bu metilasyon değişiklikleri, in vitro ortamdaki hücre farklılaşması ve yeniden programlanması (dediferansiyasyon ve rediferansiyasyon) sırasında dinamik olarak değişir ve bu durum, tür içi fenotipik çeşitliliğe önemli katkıda bulunabilen kalıtsal metilasyon değişikliklerine neden olabilir (Huang et al., 2012; Ghosh et al., 2021). TCIV/SV'nin neden olduğu klonal uygunluk kaybı, ticari mikroçoğaltma sistemleri için ciddi bir darboğaz teşkil ederken, diğer yandan bu varyasyon havuzu, dar genetik tabana

sahip türlerin ıslah programlarında, stres direnci veya geliştirilmiş tarımsal özellikler gibi istenen varyantların seçimi için değerli bir kaynak sunmaktadır (Ghosh et al., 2021; Krishna et al., 2016). Bu nedenle, BDK kaynaklı DNA metilasyonunun moleküler temelini hassas ve kapsamlı bir şekilde anlamak, hem mikroçoğaltma sistemlerinin darboğazlarını aşmak hem de bu varyasyon potansiyelini bitki ıslahında kontrollü bir şekilde kullanmak için stratejiler geliştirmeye yardımcı olacaktır (Ghosh et al., 2021).

2. Epigenetik Kavramı ve Bitkilerde Epigenetik Düzenleme

2.1. Epigenetik Mekanizmaların Tanımı ve Kapsamı

Epigenetik, DNA dizilimini değiştirmeyen, ancak gen ekspresyonundaki kalıtsal değişiklikleri düzenleyen dinamik bir mekanizma grubunu ifade eder (Law & Jacobsen, 2010; Miguel & Marum, 2011). Bu epigenetik olaylar, kromozomal bölgelerin, gen aktivite durumlarını kaydetmek, sinyal vermek veya sonraki nesillere aktarmak üzere yapısal adaptasyonunu temsil eder (Bird, 2007; Miguel & Marum, 2011). Epigenetik varyasyonlar, DNA dizisindeki mutasyonlardan bağımsız olarak ortaya çıkar ve Bitki Doku Kültürü (BDK) sırasında gözlemlenen Somaklonal Varyasyon (SV) veya Doku Kültürü Kaynaklı Varyasyon (TCIV) fenomenlerinin altında yatan ana nedenlerden biri olarak kabul edilir (Ghosh et al., 2021; Kaeppler et al., 2000; Krishna et al., 2016).

Epigenetik düzenleme, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA interferansı (RNAi) gibi temel mekanizmaların karmaşık etkileşimiyle kromatin yapısını kritik olarak etkiler (Henderson & Jacobsen, 2007; Huettel et al., 2007; Miguel & Marum, 2011). Bu mekanizmalar, hüresel gen ekspresyonunu çevresel strese, sıcaklığa, ışığa ve hormonlara yanıt olarak modüle eder (Chen & Tian, 2007; Miguel & Marum, 2011; Fortes & Gallusci, 2017).

BDK'nın temelini oluşturan, farklılaşmış somatik hücrelerin totipotens durumuna geçebilme yeteneği (gelişimsel plastisite), epigenetik mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir (Fehr, 2019; Miguel & Marum, 2011). BDK rejenerasyonu sırasında hücreler yeniden programlama sürecinden (dediferansiyasyon ve rediferansiyasyon) geçer ve bu süreç, epigenetik belirteçlerin dinamik olarak yeniden düzenlenmesini zorunlu kılar (Lee & Seo, 2018; Miguel & Marum, 2011). Mevcut kanıtlar, DNA metilasyonu modelindeki değişiklikler gibi epigenetik varyasyonların, doku kültürü sürecinde genetik mutasyonlardan çok daha sık meydana geldiğini ve SV'nin başlıca moleküler temeli olduğunu göstermektedir (Ghosh et al.,

2021; Kaeppler & Phillips, 1993; Miguel & Marum, 2011; Bednarek & Orłowska, 2020).

2.2. DNA Metilasyonu: Bitkilerdeki Temel Epigenetik Markör

DNA metilasyonu, sitozin kalıntılarının metil grubu (-CH₃) ile modifiye edilmesiyle gerçekleşir ve bitki gelişiminde, genomik damgalanmada (genomic imprinting), transpozon susturmada ve gen regülasyonunda hayati bir rol oynar (Ghosh et al., 2021; Law & Jacobsen, 2010; Zhang et al., 2018). Bu modifikasyon sonucu 5-metilsitozin (5-mC) oluşur ve bu, yüksek bitkilerde baskın olan metillenmiş bazdır (Ghosh et al., 2021; Wion & Casadesús, 2006). Bitki genomlarında sitozin metilasyon oranı, memelilere göre oldukça yüksektir ve %30'un üzerine çıkabilir (Ghosh et al., 2021; Law & Jacobsen, 2010).

Metilasyon Dizilim Bağlamları: Bitkilerde DNA metilasyonu, üç farklı dizilim bağlamında meydana gelir (Ghosh et al., 2021; Law & Jacobsen, 2010):

1. Simetrik CG (CpG) Bağlamı: Sitozin ve ardından Guanin (CG). Bu bağlam, bitkilerde metilasyonun en yüksek sıklıkta olduğu yerdir (Ghosh et al., 2021).
2. Simetrik CHG Bağlamı: Sitozin, ardından herhangi bir nükleotid (A, T veya G olarak H) ve Guanin (CHG) gelir.

2.3. Metilasyonun Kurulması ve Sürdürülmesi

Metilasyon paternlerinin kurulması (*de novo* metilasyon) ve hücre bölünmeleri sırasında korunması (bakım metilasyonu), farklı DNA metiltransferaz (DMT) enzimleri tarafından sağlanır (Ghosh et al., 2021; Law & Jacobsen, 2010; Zhang et al., 2018):

1. *De Novo* Metilasyon (DRM2): Domains Rearranged Methyltransferase 2 (DRM2), tüm CG, CHG ve CHH bağlamlarında yeni metilasyonun kurulmasından sorumludur (Cao & Jacobsen, 2002; Ghosh et al., 2021). DRM2, özellikle RNA'ya Bağımlı DNA Metilasyonu (RdDM) yolu için kritik bir role sahiptir (Ghosh et al., 2021; Zhang & Zhu, 2011).
2. CG Bakımı (MET1): DNA Methyltransferase 1 (MET1), DNA replikasyonundan sonra hemimetillenmiş CG bağlamını tanır ve metilasyonun korunmasını sağlar (Ghosh et al., 2021; Law & Jacobsen, 2010).
3. CHG Bakımı (CMT3): Chromomethylase 3 (CMT3), esas olarak CHG metilasyonunun bakımını yürütür (Ghosh et al., 2021). CMT3, histon modifikasyonları ile ilişkilidir.

RNA'ya Bağımlı DNA Metilasyonu (RdDM) Yolu:

RdDM, bitkilere özgü bir *de novo* metilasyon yoludur ve özellikle transpozon aktivitesinin baskılanmasında, biyotik ve abiyotik stres tepkilerinde ve CHH metilasyonunun bakımında hayati rol oynar (Ghosh et al., 2021; Zhang & Zhu, 2011). Bu karmaşık süreç şunları içerir:

- RNA polimeraz IV (POL IV) ve RNA polimeraz V (POL V) gibi RNA polimerazların, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz 2 (RDR2), Dicer-like 3 (DCL3) ve Argonaute (AGO) proteinlerinin iş birliği (Ghosh et al., 2021; Gallego-Bartolomé, 2020; Pikaard & Scheid, 2014).
- POL IV ve RDR2'nin ürettiği çift sarmallı RNA'lar, DCL3 tarafından 24-nükleotid küçük müdahale eden RNA'lara (siRNA'lar) kesilir (Ghosh et al., 2021).
- RdDM temelli DRM2 etkinliği özellikle CHH bağlamında yeni metilasyon işaretlerinin oluşumuna aracılık eder; bu süreç doku kültürü stresleriyle ilişkili olarak değişebilir (Ghosh et al., 2021; Bednarek & Orłowska, 2020).

2.4. Histon Modifikasyonları ve Kromatin Dinamikleri

DNA metilasyonu, genellikle Histon Modifikasyonları ile birlikte çalışarak kromatin yapısını ve gen ekspresyonunu düzenler. Histon proteinlerinin (H3, H4) kuyrukları, asetilasyon ve metilasyon gibi kovalent modifikasyonlara uğrar (Kouzarides, 2007; Miguel & Marum, 2011; Cheng, 2014).

• Asetilasyon: Histon Asetiltransferazlar (HAT) tarafından katalizlenen hiperasetilasyon, genellikle aktif gen ekspresyonu (ökromatin) ile ilişkilidir (Hebbes et al., 1988; Miguel & Marum, 2011).

• Metilasyon: H3K4 üzerindeki metilasyon aktif transkripsiyonu gösterirken, H3K9 üzerindeki metilasyon ise transkripsiyonel baskılama (heterokromatin) ile bağlantılıdır (Shilatifard, 2006; Miguel & Marum, 2011). Özellikle H3K27me3 (Histon 3 Lizin 27 trimetilasyonu), bitkilerde çok sayıda geni susturan önemli bir baskılama mekanizmasıdır (Zhang et al., 2007; Miguel & Marum, 2011).

• Çapraz Etkileşim: CMT3, kromodomenleri aracılığıyla metillenmiş histonlara bağlanarak (H3K9me2) DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu arasında önemli bir bağlantı kurar (Pikaard & Scheid, 2014; Law & Jacobsen, 2010).

BDK sırasında hücreler dediferansiyasyona uğradığında, kromatin yapısında değişimler gözlenir; örneğin *Arabidopsis* protoplastlarında

heterokromatinin ökromatine dönüştüğü rapor edilmiştir (Tessadori et al., 2007; Lee & Seo, 2018).

2.5. BDK Çevresi ve Somaklonal Epigenetik Varyasyonun Kaynakları

BDK ortamındaki yapay koşullar (PGR'ler, sürekli alt kültür, besin kısıtlaması, oksidatif stres), hücreleri travmatik strese sokar ve bu stres, somaklonal varyasyonu (SV) indükler (Cassells & Curry, 2001; Krishna et al., 2016; Ghosh et al., 2021). DNA metilasyonundaki değişiklikler, SV'nin altında yatan ana faktör olarak kabul edilir (Ghosh et al., 2021; Miguel & Marum, 2011; Kaeppler et al., 2000).

- PGR Etkisi: Eksogenöz olarak uygulanan Bitki Gelişim Düzenleyicileri (PGR'ler), PGR konsantrasyonu ve oranı, hücre döngüsü bozulmasına ve genetik/epigenetik anormalliklere yol açabilir (Peschke & Philips, 1992; Krishna et al., 2016). Örneğin, 2,4-D (auxin) gibi PGR'ler, sitozin metilasyon seviyelerini artırabilir (LoSchiavo et al., 1989; Huang et al., 2012; Sales & Butardo, 2014). Oksin seviyeleri, *Coffea canephora*'da somatik embriyogenez sırasında IAA konsantrasyonunun dinamik olarak değişmesine neden olur (Ayil-Gutiérrez et al., 2013).

- Oksidatif Stres: BDK ortamındaki stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine neden olarak DNA'da hasara ve metilasyon paternlerinde değişikliklere yol açar (Cassells & Curry, 2001; Krishna et al., 2016).

- Kültür Süresi ve Yöntemi: İn vitro kültür süresinin ve alt kültür döngüsü sayısının artması, SV olasılığını artırır (Bairu et al., 2006; Sun et al., 2013; Clarindo et al., 2012). Kallus fazından geçen dolaylı rejenerasyon, direkt rejenerasyona göre daha yüksek SV oranlarıyla ilişkilidir (Zayova et al., 2010; Krishna et al., 2016).

- Kalıtlılabilirlik: BDK sırasında indüklenen DNA metilasyon değişiklikleri, epiallel olarak bilinen kalıtsal epigenetik varyasyonlara yol açabilir (Ghosh et al., 2021; Springer, 2013). Bu epialleller, sonraki generasyonlara mitotik veya mayotik olarak aktarılabilir ve istenen tarımsal özelliklerin (örneğin, muzda hastalığa direnç) seçilmesi için bir çeşitlilik kaynağı sunar (Ghosh et al., 2021; Krishna et al., 2016).

3. Bitki Doku Kültüründe DNA Metilasyonu Mekanizması

DNA metilasyonu, bitkilerde epigenetik gen düzenlemesinin temel mekanizmalarından biridir ve çoğunlukla sitozin kalıntılarının 5. karbonuna metil grubunun eklenmesiyle gerçekleşir (Miguel & Marum, 2011). Bitki

genomlarında metilasyon üç farklı bağlamda gözlenir: CG, CHG ve CHH (H = A, T veya C) (Ghosh et al., 2021). Bu bağlamlar farklı metiltransferaz enzim grupları tarafından düzenlenmekte olup, söz konusu enzimler MET1 (METHYLTRANSFERASE 1), CMT'ler (CHROMOMETHYLASE) ve DRM'ler (DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE) olarak sınıflandırılır (Miguel & Marum, 2011; Ghosh et al., 2021).

MET1 yolu, çoğunlukla CG metilasyonunun korunmasından sorumludur. DNA eşlenmesi esnasında metillenmiş kalıptan metilsiz yeni zincire metil grubunun kopyalanmasını sağlayarak epigenetik hafızayı korur (Miguel & Marum, 2011). Bu yönüyle MET1, hücre bölünmesi sırasında epigenetik stabilitenin anahtarıdır.

CMT yolu, CMT3 başta olmak üzere CHG bağlamındaki metilasyonu sürdürür ve genellikle H3K9me2 histon işaretleriyle koordineli çalışır (Bednarek & Orłowska, 2020). Bu yol, heterokromatin bölgelerinde transpozon sessizliğinin sürdürülmesinde kritik öneme sahiptir.

DRM yolu ise de novo metilasyon sürecinden sorumludur ve RNA-yönlendirmeli DNA metilasyonu (RdDM) mekanizması ile ilişkilidir (Miguel & Marum, 2011). RdDM'de küçük interferans RNA'lar (siRNA), genomdaki tekrarlı dizileri ve transpozonları hedef alarak DRM2 enzimini bu bölgelere yönlendirir ve yeni metilasyon işaretleri oluşturur (Bednarek & Orłowska, 2020).

İn vitro doku kültürü sırasında bu metilasyon yolları yeniden programlama süreçleri nedeniyle yoğun biçimde aktifleştirilmektedir. Özellikle kallus oluşumu ve somatik embriyogenez sırasında CG ve CHG metilasyonunun geçici olarak azalırken, CHH bağlamındaki metilasyonun artabildiği ve bunun stres koşullarına adaptif bir yanıt olduğu bildirilmiştir (Ghosh et al., 2021). Aynı zamanda, RdDM yolunun aktifleşmesiyle transpozon baskılama dinamikleri değişmekte, bu da somaklonal varyasyonun epigenetik temelini oluşturmaktadır (Bednarek & Orłowska, 2020).

Bu mekanizmaların ortak işleyişi, doku kültürü koşullarında görülen DNA metilasyon paternlerinin neden genomun bazı bölgelerinde kaybolduğunu, bazılarında ise yeniden oluştuğunu açıklamaktadır. Bu nedenle, DNA metilasyon mekanizmasının anlaşılması, hem epigenetik stabilitenin korunmasına yönelik stratejiler hem de kontrollü varyasyon üretimi açısından büyük önem taşır (Ghosh et al., 2021).

4. DNA Metilasyonunun Tespiti: MSAP, metAFLP ve Bisülfıt Dizileme Yaklaşımları

DNA metilasyonunun belirlenmesi, doku kültürü kaynaklı epigenetik varyasyonların çözümlemesinde kritik öneme sahiptir. İn vitro rejenerasyon süreçleri sırasında metilasyon paternlerinin değişimi, gen ekspresyonu, genom stabilitesi ve somaklonal varyasyon düzeyi üzerinde doğrudan etkili olduğundan, bu değişimlerin kantitatif ve kalitatif olarak izlenmesi gereklidir (Ghosh et al., 2021). Bitkilerde DNA metilasyonunun belirlenmesine yönelik yaklaşımlar, hedeflenen çözünürlük düzeyine göre moleküler belirteç temelli, enzimatik duyarlılığa dayalı ve dizileme tabanlı yöntemler olarak sınıflandırılabilir (Bednarek & Orłowska, 2020).

4.1 Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP)

MSAP, HpaII ve MspI gibi metilasyona duyarlı restriksiyon enzimlerinin farklı kesim paternlerinden yararlanan, genomik metilasyon farklılıklarını saptamaya yönelik modifiye edilmiş bir AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) yöntemidir (Ghosh et al., 2021). Bu enzimler, aynı tanıma dizisini (5'-CCGG-3') hedef alır ancak sitozin metilasyonuna farklı duyarlılıklar gösterir. Böylece, metilasyonlu ve metilasyonsuz bölgeler arasında ayırt edici bant desenleri elde edilir (Bednarek & Orłowska, 2020). MSAP yöntemi, genellikle genom dizisi bilinmeyen türlerde dahi uygulanabilir olması nedeniyle özellikle tarla bitkilerinde yaygın kullanıma sahiptir. Bobadilla Landey ve ark. (2013), Coffea arabica embriyo kültürlerinden elde ettikleri rejenerantlarda MSAP yöntemiyle yalnızca %0,07–0,18 oranında epigenetik polimorfizm tespit ederek mikroçoğaltma sürecinin epigenetik açıdan oldukça stabil yürütüldüğünü bildirmiştir.

4.2 metAFLP Tekniğı

MSAP metodunun daha gelişmiş bir formu olan metAFLP (methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism), hem DNA dizisi değişimlerini hem de metilasyon paternlerini aynı anda saptamaya olanak sağlar (Orłowska & Bednarek, 2020). Bu yöntemde, metilasyona duyarlı restriksiyon çiftleri ile klasik AFLP analizleri birlikte yürütülür ve “toplam doku kültürü kaynaklı varyasyon” (TTCIV) metrikleri hesaplanır. Hordeum vulgare (arpa) rejenerantları üzerinde yapılan çalışmalarda, metAFLP yöntemiyle tespit edilen metilasyon değişikliklerinin %5–10 aralığında olduğu, bu değişimlerin büyük bölümünün asimetric (CHH) bağlamda meydana geldiği belirlenmiştir (Orłowska & Bednarek, 2020). Böylece metAFLP, doku kültürü koşullarının optimize edilmesinde (ör. Cu²⁺, Ag⁺ konsantrasyonları, kültür süresi gibi faktörlerde) kullanılan istatistiksel

yaklaşımlarla birlikte epigenetik optimizasyon için etkin bir araç haline gelmiştir.

4.3 Bislfit Dizileme (Whole-Genome Bisulfite Sequencing, WGBS)

Bislfit dizileme, DNA'daki metillenmemiş sitozinlerin sodyum bisülfit ile urasile dönüştürülmesi esasına dayanır. Ardından yapılan dizileme ile metillenmiş (C olarak kalır) ve metillenmemiş (T'ye dnşmiş) bazlar ayırt edilerek baz çözünürlüğünde metilasyon haritaları oluşturulur (Ghosh et al., 2021). Bu yöntem, hem simetrik hem de asimetrik bağlımlarda metilasyon tespitini mümkün kılar ve diğer yöntemlere kıyasla en yüksek çözünürlük düzeyini sağlar. Ancak yüksek maliyet ve biyoinformatik analiz gereksinimleri nedeniyle, çoėu doku kültürü çalışmasında MSAP veya metAFLP gibi daha ekonomik teknikler tercih edilmektedir (Bednarek & Orłowska, 2020).

Genel olarak, bu yöntemlerin birlikte kullanımı bitki doku kültürü süreçlerinde epigenetik değişimlerin hem lokal (gen/tekrarlı bölge bazında) hem de genomik düzeyde değerlendirilmesine olanak tanır. Böylece, DNA metilasyonundaki değişimlerin somaklonal varyasyonla ilişkisi bütüncül bir yaklaşımla ortaya konulabilmektedir (Ghosh et al., 2021; Orłowska & Bednarek, 2020).

5. Epigenetik Yeniden Programlama ve Somaklonal Varyasyonun İlişkisi

Bitki doku kültürü rejenerasyonu sırasında gözlenen varyasyonların önemli bir bölümü, DNA dizisi değişikliklerinden çok epigenetik yeniden programlama ile ilişkili olup, özellikle DNA metilasyon paternlerinin bozulması bu süreçte belirleyici rol oynar (Miguel & Marum, 2011; Ghosh et al., 2021). İ*n vitro* ortamda eksplantların dediferansiye olup kallus oluşturması ve ardından yeniden organize olarak bitki rejenerantına dönüşmesi, yoğun bir epigenetik düzenleme gerektirir. Bu süreçte MET1, CMT3 ve DRM2 gibi metiltransferazların düzenlediği metilasyon döngülerinde geçici instabiliteler meydana gelir (Ghosh et al., 2021). Bu değişimler, genom bölgeleri arasında hipermetilasyon veya hipometilasyon gibi iki yönlü metilasyon kaymalarına yol açabilir (Bednarek & Orłowska, 2020).

Somaklonal varyasyon (SV), bu epigenetik instabilitenin fenotipik çıktısı olarak tanımlanabilir (Krishna et al., 2016). Genomda yer alan tekrarlı DNA dizileri ve transpozon bölgeleri, doku kültürü sırasında metilasyon kaybına en duyarlı bölgelerdir (Miguel & Marum, 2011). Özellikle CHH bağlımlı artan de novo metilasyon, doku kültürü stresine karşı bir savunma yanıtı

iken, bazı bölgelerdeki metilasyon kaybı genomik yeniden düzenlemelere yol açabilmektedir (Ghosh et al., 2021). Orłowska ve Bednarek'in (2020) Arpa anter kültüründe metAFLP ve Taguchi istatistikleriyle TTCIV'nin ~%7–10 aralığında yönlendirilebildiği gösterilmiştir. Benzer şekilde Bobadilla Landey et al. (2013), *Coffea arabica* rejenerantlarının çoğunda genetik stabilitenin korunduğunu ancak metilasyon temelli epigenetik farklılıkların düşük seviyede dahi olsa tespit edilebildiğini belirtmiştir.

Epigenetik değişimlerin bir kısmı geçici ve geri dönüşebilir nitelik taşıırken, bazı değişiklikler stabil olarak kalıtsal hale gelebilir (Miguel & Marum, 2011). Bu özellik, SV'nin hem mikroçoğaltma sistemlerinde klonal sadakat kaybının nedeni hem de bitki ıslahı için yeni varyasyon kaynağı olmasını sağlamaktadır (Krishna et al., 2016). Nitekim SV ile elde edilen fenotipler arasında tuzluluk toleransı, artan antioksidan aktivite veya sekonder metabolit artışı gibi tarımsal açıdan avantajlı özellikler de rapor edilmiştir (Ghosh et al., 2021; Orłowska et al., 2024).

6. Sonuç

Bitki doku kültürü sırasında ortaya çıkan epigenetik yeniden programlama, somaklonal varyasyonun temel belirleyicilerinden biri olup, bu süreçte DNA metilasyonu merkezi bir rol oynar. CG, CHG ve CHH bağlamalarında gerçekleşen metilasyon değişimleri; gen ekspresyonu, transpozon aktivitesi ve kromatin dinamiği üzerinde derin etkiler oluşturarak fenotipik çeşitliliği artırır. Bu durum ticari mikroçoğaltma sistemleri için istenmeyen klonal sapmalara neden olsa da, bitki ıslahı açısından stratejik bir varyasyon kaynağı sunmaktadır. Epigenetik varyasyonun kontrol altına alınması, optimize edilmiş kültür ortamı, antioksidatif ortam düzenlemesi ve metilasyon profili takibi gibi yaklaşımlarla mümkün olabilmektedir (Bednarek & Orłowska, 2020). Bu nedenle epigenetik süreçlerin anlaşılması, sadece doku kültürü genetiğinin değil, aynı zamanda modern bitki biyoteknolojisi ve ıslah stratejilerinin de temelini oluşturmaktadır.

Kaynakça

- Bairu, M. W., Fennell, C. W., & van Staden, J. (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (Musa AAA cv. 'Zelig'). *Scientia Horticulturae*, 108(4), 347–351.
- Bednarek, P. T., & Orłowska, R. (2020). Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 140, 245–257.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447, 396–398.
- Bobadilla Landey, R., Cenci, A., Georget, F., Bertrand, B., Camayo, G., Herrera, J. C., Santoni, S., Lashermes, P., Simpson, J., & Etienne, H. (2013). High genetic and epigenetic stability in *Coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. *PLoS ONE*, 8(2), e56372.
- Cassells, A., & Curry, R. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(2), 145–157.
- Chen, Z. J., & Tian, L. (2007). Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769, 295–307.
- Cheng, X. (2014). Structural and functional coordination of DNA and histone methylation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, a018747.
- Clarindo, W. R., Carvalho, C. R., & Mendonça, M. A. C. (2012). Ploidy instability in long-term in vitro cultures of *Coffea arabica* L. monitored by flow cytometry. *Plant Growth Regulation*, 68(3), 533–538.
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, 10, 536.
- Fortes, A., & Gallusci, P. (2017). Plant stress responses and phenotypic plasticity in the epigenomics era: perspectives on the grapevine scenario, a model for perennial crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 82.
- Gallego-Bartolomé, J. (2020). DNA methylation in plants: mechanisms and tools for targeted manipulation. *New Phytologist*, 227, 38–44.
- Ghosh, A., Igamberdiev, A. U., & Debnath, S. C. (2021). Tissue culture-induced DNA methylation in crop plants: A review. *Molecular Biology Reports*, 48, 823–841.

- Hebbes, T. R., Thorne, A. W., & Cranerobinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO Journal*, 7(5), 1395–1402.
- Henderson, I. R., & Jacobsen, S. E. (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature*, 447, 418–424.
- Huang, H., Han, S., Wang, Y., Zhang, X., & Han, Z. (2012). Variations in leaf morphology and DNA methylation following in vitro culture of *Malus xiaojinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111(2), 153–161.
- Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Bucher, E., van der Winden, J., Matzke, A. J. M., & Matzke, M. (2007). RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769, 358–374.
- Kaeppeler, S. M., & Phillips, R. L. (1993). Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 8773–8776.
- Kaeppeler, S. M., Kaeppeler, H. F., & Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 43(2/3), 179–188.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705.
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., & Sadh, R. K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6(1), 54.
- Larkin, P., & Scowcroft, W. (1981). Somaclonal variation—A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60(4), 197–214.
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11, 204–220.
- Lee, K., & Seo, P. J. (2018). Dynamic epigenetic changes during plant regeneration. *Trends in Plant Science*, 23(3), 235–247.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., & Terzi, M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*, 77, 325–331.
- Miguel, C., & Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: Somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3713–3725.
- Orłowska, R., & Bednarek, P. T. (2020). Precise evaluation of tissue culture-induced variation during optimisation of in vitro regeneration regime in barley. *Plant Molecular Biology*, 103, 33–50.

- Orłowska, R., et al. (2024). An insight into tissue culture-induced variation origin... *BMC Plant Biology*, 24, 43.
- Peschke, V. M., & Philips, R. L. (1992). Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics*, 30, 41–75.
- Pikaard, C. S., & Scheid, O. M. (2014). Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(12), a019315.
- Sales, E. K., & Butardo, N. G. (2014). Molecular analysis of somaclonal variation in tissue culture derived bananas using MSAP and SSR markers. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, 8, 63–610.
- Shilatifard, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 243–269.
- Springer, N. M. (2013). Epigenetics and crop improvement. *Trends in Genetics*, 29, 241–247.
- Sun, S., Zhong, J., Li, S., & Wang, X. (2013). Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in torenia (*Torenia fournieri* Lindl.). *Botanical Studies*, 54(1), 36.
- Tessadori, F., Chupeau, M.-C., Chupeau, Y., Knip, M., Germann, S., van Driel, R., Fransz, P., & Gaudin, V. (2007). Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated Arabidopsis cells. *Journal of Cell Science*, 120(7), 1200–1208.
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180.
- Wion, D., & Casadesús, J. (2006). N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA–protein interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 183–192.
- Zayova, E., Vassilevska-Ivanova, R., Kraptchev, B., & Stoeva, D. (2010). Somaclonal variations through indirect organogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Biodiversity and Conservation*, 3, 1–5.
- Zhang, H., & Zhu, J. K. (2011). RNA-directed DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(2), 142–147.
- Zhang, H., Lang, Z., & Zhu, J. K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 489–506.
- Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y. V., Pellegrini, M., Goodrich, J., & Jacobsen, S. E. (2007). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis. *PLoS Biology*, 5(6), e129.