

## MOLECULAR AND SPECTROSCOPIC EVALUATION OF THE EFFECTS OF COUMARIN ON LENTIL

B. YUKSEL<sup>1\*</sup>, O. AKSOY<sup>2</sup>, T. KUTLUK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Kocaeli University, Vocational School of Kocaeli Health Sciences Umuttepe, Izmit, 41380, Kocaeli Turkey

<sup>2</sup> Kocaeli University, Faculty of Letters and Sciences, Umuttepe, Izmit, 41380, Kocaeli Turkey

<sup>3</sup> Faculty of Engineering, Umuttepe, Izmit, 41380, Kocaeli Turkey

E-mail: burcu.yuksel@yahoo.com, odalgic@yahoo.com, togay71@gmail.com

*This study examines the genotoxic effects of coumarin (2H-1-benzopyran-2-one) on Lens culinaris Medik cv Sultan in terms of DNA polymorphism and protein quantification. Effective concentration values were calculated according to a probit model, which is a type of regression where the dependent variable can take only two values, i.e., life or death, after 48 or 72 hours of treatment. Based on this analysis, the effective concentration value of EC50 identified as approximately 278 μM, and then adjusted to 300 μM. The bulb roots were treated with 300 μM (EC50), 600 μM (2X EC50) concentrations and the Hoagland was used in the control group. 10 RAPD primers were used and as a result of the analysis, it was observed that 2 monomorphic and 8 polymorphic band profile primers for treatment of 600 μM and 300 μM, coumarin concentration according to the control group. Total of 39 polymorphic bands were detected from total of 97 bands and the percentage of polymorphism was detected as 48.75 %. SDS-PAGE analysis for total protein profile showed that there were differences between the treatment groups. In addition to PCR analysis, the root samples were examined by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in order to determine the effects of coumarin on the quantity of biomolecules structure of L. culinaris One-way analysis of variance (ANOVA) was used in the calculation of statistical differences between the groups (P < 0.05).*

**Key words:** Lentil, Coumarin, RAPD-PCR, SDS-PAGE, FT-IR.

### МОЛЕКУЛЯРНА ТА СПЕКТРОСКОПІЧНА ОЦІНКА ВПЛИВУ КУМАРИНУ НА СОЧЕВИЦЮ

Мета дослідження полягала у вивченні генотоксичного впливу кумарину (2H-1-бензопиранон-2-он) на *Lens culinaris* Medik cv Sultan у розрізі поліморфізму ДНК та кількісного визначення білку. Значення ефективної концентрації визначали згідно з пробіт-моделлю – типом регресії, коли залежна змінна може приймати лише два значення, тобто

життя чи загибель, після 48 або 72 год обробки. На основі цього аналізу було встановлено, що значення ефективної концентрації EC50 становить близько 278 мкм, що було округлено до 300 мкм. Бульбочки обробляли за допомогою 300 мкм (EC50), 600 мкм (2X EC50) концентрацій, а у контрольній групі застосовували розчин Хогланда. Після застосування 10 RAPD праймерів результати аналізу показали праймери профілю 2 мономорфних і 8 поліморфних смуг для обробки за допомогою концентрації кумарину в 600 мкм та 300 мкм порівняно з контрольною групою. Загалом, 39 з 97 смуг було визначено як поліморфні, а встановлений відсоток поліморфізму склав 48,75 %. SDS-PAGE аналіз для профілю загального білку показав відмінності між групами, в яких проводили обробку. Окрім проведення ПЛР аналізу, зразки коренів вивчали за допомогою інфрачервоної спектроскопії із застосуванням перетворення Фур'є (FT-IR), щоб становити вплив кумарину на кількісне вираження структури біомолекул *L.culinaris*. Однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) застосували для розрахунку статистичних відмінностей між групами (P < 0,05).

**Ключові слова:** сочевиця, кумарин, RAPD-PCR, SDS-PAGE, FT-IR.

### REFERENCES

- Ana AS, Penélope GA, Hugo M, et al. (2011) The use of FTIR spectroscopy to monitor modifications in plant cell wall architecture caused by cellulose biosynthesis inhibitors Plant Signaling and Behavior 6:1104–1110. doi: 10.4161/psb.6.8.15793
- Atienza FA, Conradie M, Evenden AJ et al. (1999) Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene Env Tox Che 18:2275–2282. doi: 10.1002/etc.5620181023
- Atienzar FA, Venier P, Jha AN et al. (2002) Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations Mut Res Gen Tox Env Mut 521:151–163. doi: 10.1016/S1383-5718(02)00216-4
- Atienzar FA, Jha AN. (2006) The Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review Mut Res Rev 613:76–102. doi: 10.1016/j.mrrev.2006.06.001
- Barun SG, Bjørn PJ, Tao G et al (1999) Application of ATR-FTIR Spectroscopy to Compare the Cell Materials of Wood Decay Fungi with Wood Mo-uld Fungi Int J Spectroscopy 2015:1–8. doi: 10.1155/2015/521938

- Borgaud F, Hehn A, Larbat R et al. (2006) Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes *Phytochem Rev* 5:293–308. doi: 10.1007/s11101-006-9040-2
- Damjanovich S, Gáspár R, Panyi G. (2004) An alternative to conventional immunosuppression: small-molecule inhibitors of Kv1.3 channels *Mol Int* 4: 250–254. doi: 10.1124/mi.4.5.4
- De Wolf H, Blust R, Backeljau T. (2004) The use of RAPD in ecotoxicology *Mut Res* 566(3):249–262. doi: 10.1016/j.mrrev.2003.10.003
- Gnonlonfin GB, Sanni A, Brimer L. (2012) Review scopoletin – a coumarin phytoalexin with medicinal properties *Cri Rev Plant Sci* 31:47–56. doi: 10.1080/07352689.2011.616039
- Kawase M, Sakagami H, Motohashi N et al. (2005) Coumarin derivatives with tumor-specific cytotoxicity and multidrug resistance reversal activity *in vivo*. <https://iv.iarjournals.org/content/19/4/705>
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Liu W, Yang YS, Zhou Q et al. (2007) Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers *Chem* 67:1155–1163. doi: 10.016/j.chemosphere.2006.11.011
- Malaiyandi V, Sellers EM, Tyndale RF. (2005) Implications of CYP2A6 genetic variation for smoking behaviors and nicotine dependence *Cli Phar Ther* 77:145–158. doi: 10.1016/j.clpt.2004.10.011
- Nei M. (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. 106:283–292. doi: 10.1086/282771
- Ozek N, Bal I, Sara Y et al. (2014) Structural and functional characterization of simvastatin-induced myotoxicity in different skeletal muscles, *Biochimica et Biophysica Acta* 1840:406–415. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.09.010
- Plumas J, Drillat P, Jacob M et al. (2003) Extracorporeal photochemotherapy for treatment of clonal T cell proliferations *Bul du Cancer* 90:763–770
- Turker S, Dogan FT, Severcan F. (2007) The characterization and differentiation of higher plants by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Spectr*. 61:300–308
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ et al. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *Nucl Acids Res* 18:6531–6535. doi: 10.1093/nar/18.22.6531
- Wulff H, Rauer H, Düring T et al. (1998) Alkoxyypsoralens, novel nonpeptide blockers of Shaker-type K<sup>+</sup> channels: synthesis and photo reactivity *J Med Chem* 41:4542–4549. doi: 10.1021/jm981032o
- Yuksel B, Aksoy O. (2017) Cytological effects of coumarin on the mitosis of *Lens Culinaris* Medik *Fresenius Env Bull* 26:6400–6407
- Yuksel B, Aksoy O. (2019) Analysis of the effects of coumarin on *Lens culinaris* Medik by some biochemical parameters using real-time polymerase chain reaction *Legume Res An Int J* 42:640–645. doi: 10.18805/LR-439

Received October 04, 2019

Received June 01, 2020

Accepted May 18, 2021