T.C.

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

EPİGENETİK DÜZENLEMELERİN HAŞHAŞ (Papaver somniferum L.*) BİTKİSİNDE TEBAİN YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ*

Zehra AYDINLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Doç.Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN

Çankırı – 2020

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EPİGENETİK DÜZENLEMELERİN HAŞHAŞ (*Papaver somniferum* L.) BİTKİSİNDE TEBAİN YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Zehra AYDINLI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI

2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Zehra AYDINLI tarafından hazırlanan **"**'Epigenetik düzenlemelerin afyon haşhaşı (*Papaver somniferum* L.) bitkisinde tebain yolağı üzerine etkilerinin belirlenmesi**"** adlı tez çalışması 10/07/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN

Jüri Üyeleri :

Başkan:

Üye:

Üye:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek lisans tezi

EPİGENETİK DÜZENLEMELERİN HAŞHAŞ (Papaver somniferum L.*) BİTKİSİNDE TEBAİN YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ*

Zehra AYDINLI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN

DNA metilasyonu, gen ekspresyonunun düzenlenmesini etkileyen başlıca epigenetik modifikasyonlardan biridir. *Papaver somniferum* L. önemli bir tıbbi bitkidir. Lateksi, zengin bir farmasötik benzilizokinolin alkaloid (BIA) kaynağı olan afyon içermektedir. Burada, MSAP moleküler markörleri kullanılarak afyon haşhaşı çeşitleri arasındaki DNA metilasyon seviyelerini karşılaştırmak için tebain biyosentezi yolağında görev alan gen ve gen bölgeleri üzerinde epigenetik düzenlemelerin metilasyona duyarlı amplifikasyon polimorfizm (MSAP) profilleme tekniği uygulanmıştır. Bu kapsamda tebain yolağında epigenetik düzenlemelerde metilasyonun etkileri ilk kez araştırılmıştır. MSAP profili, farklı BIA içeriğine sahip *Papaver somniferum* L. çeşitleri arasındaki farklı metilasyon durumunu yansıtmıştır.

2020, 70 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Haşhaş (*Papaver somniferum* L.), Epigenetik, MSAP, Metilasyon, BIA

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINING THE EFFECTS OF EPIGENETIC ARRANGEMENTS ON THEBAİNE ROAD IN THE CROP (Papaver somniferum L.*) PLANT*

Zehra AYDINLI

Cankiri Karatekin University

Institute of Science

Department of Biology

Supervisors: Assoc. Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN

DNA methylation is one of the major epigenetic modifications affecting the regulation of gene expression. *Papaver somniferum* L. it is an important medicinal plant. Latex contains opium, a rich source of pharmaceutical benzylisoquinoline alkaloid (BIA). Here, methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) profiling of epigenetic arrangements on genes and gene regions involved in tebain biosynthesis pathway was applied to compare DNA methylation levels among opium poppy varieties using MSAP molecular markers. In this context, the effects of methylation in epigenetic arrangements in the tebain pathway were investigated for the first time. MSAP profile, *Papaver somniferum* L. with different BIA content it reflected the different methylation state between varieties.

2020, 70 pages

Key Words: Poppy (*Papaver somniferum* L.), Epigenetics, MSAP, Methylation, BIA

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

‘’Epigenetik düzenlemelerin afyon haşhaşı (*Papaver somniferum* L.) bitkisinde tebain yolağı üzerine etkilerinin belirlenmesi“ adlı bu çalışma 2019-2020 yılları arasında Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne ‘’Yüksek Lisans Tezi’’ olarak sunulmuştur. Bu araştırmanın amacı, Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinde tebain biyosentezi yolağında görev alan gen ve gen bölgeleri üzerinde epigenetik düzenlemelerin en önemlilerinden olan metilasyon etkilerinin "Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi" (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism) yöntemi ile aydınlatılmasıdır.

Bu araştırmayı yüksek lisans tezi olarak veren, tez çalışmasının başlangıcından sonuna dek her türlü katkı ve yardımları ile beni yönlendiren, yakın ilgi ve tavsiyeleri ile yanımda olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN’e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Topra Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü, Haşhaş ve Alkaloid İşleri Dairesi Başkanlığına çalışmamızda kullandığımız haşhaş çeşitlerini bizlere temin ettiği için teşekkürlerimi sunarım.

Bu aşamaya ulaşmam da her zaman destek olan anneme, babama ve kardeşlerime şükranlarımı sunarım.

Zehra AYDINLI
Çankırı, Temmuz 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1.GİRİŞ **1**
1.1 Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) **1**
2. KURAMSAL TEMELLER **5**
2.1 Haşhaş (*Papaver Somniferum L.*) Önemi **5**
2.2 BIA ve Tebain Yolağı **6**
2.3 DNA Metilasyonu **8**
2.4 Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP) **10**
2.5 Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) **11**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **12**
3.1 Bitki Materyali **12**
3.2 Yöntem **13**
3.2.1 Haşhaşların yetiştirilmesi **13**
3.2.2 DNA İzolasyonu **13**
3.2.3 MSAP (Metilasyonu Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi) Analizi **15**
3.2.3.1 Restriksiyon Endonükleaz ile Kesim İşlemi **15**
3.2.3.2 Ligasyon (Adaptör Bağlanması) **16**
3.2.3.3. Ön seçim PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) **17**
3.2.3.4 Seçim PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) **18**
3.2.3.5 PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforezi) **20**
3.2.4. Skorlama işlemi **21**
4. BULGULAR **22**
4.1. Çeşitlere Ait Örneklerin Yetiştirilme Sonuçları **22**

4.2. Haşhaş Bitkisi Örneklerinin DNA İzolasyon Sonuçları 22
4.3. MSAP Analizine ait sonuçlar 23
4.4 Skorlama Sonuçları.....42
4.5. Filogenetik Analizler ve Sonuçları.....60
5. TARTIŞMA 62
6. SONUÇ.....64
KAYNAKLAR 66
ÖZGEÇMİŞ.....70

SİMGELER DİZİNİ

°C	Celcius
ul	Mikrolitre
uM	Mikromolar
dk	Dakika
bp	Baz çifti
M	Molarite
%	Yüzde
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
pmol	Pikomol
rpm	Dakikadaki devir sayısı
A	Absorbans değeri

KISALTMALAR

ddH_2O	Deiyonize su
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Ethilendiamintetraasetik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
TBE	Tris-Borik asit-EDT
RNA	Ribonükleik asit
MSAP	Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Haşhaş bitkisinin ilk çizimi 1
Şekil 1.2 Dünya çapında haşhaş üretim dağılımı 2
Şekil 1.3 Türkiye'de Haşhaş Üretim Haritası 2
Şekil 1.4 Bazı Alkaloidlerin kimyasal yapıları 3
Şekil 2.1 BIA yolağı gösterimi 6
Şekil 2.2 Tebain oluşum aşaması 7
Şekil 2.3 SalAt ile Tebain oluşumu 8
Şekil 2.4 DNA baz diziminde metil grubunun bağlanması 9
Şekil 3.1 Ön Seçim İşlemi Öncesi Örneklerin Hazırlanışı 18
Şekil 3.2 PAGE sistemi 21
Şekil 4.1 Bitkilerin saksılarda yetiştirilmesi 22
Şekil 4.2 Restriksiyon işlemi sonrası jel görüntüsü 24
Şekil 4.3 Amplifikasyona ait jel görüntüsü 24
Şekil 4.4 PAGE işleminde jellerin yürümesi 25
Şekil 4.5 Ed_Hd ait Bant görüntüsü 26
Şekil 4.6 Ed_He ait Bant görüntüsü 27
Şekil 4.7 Ed_He 2 ait Bant görüntüsü 28
Şekil 4.8 Ed_Hf ait Bant görüntüsü 29
Şekil 4.9 Ed_Hf 2 ait Bant görüntüsü 30
Şekil 4.10 Ee_Hd ait Bant görüntüsü 31
Şekil 4.11 Ee_Hd 2 ait Bant görüntüsü 32
Şekil 4.12 Ee_He ait Bant görüntüsü 33
Şekil 4.13 Ee_He 2 ait Bant görüntüsü 34
Şekil 4.14 Ee_Hf ait Bant görüntüsü 35
Şekil 4.15 Ee_Hf 2 ait Bant görüntüsü 36
Şekil 4.16 Ef_Hd ait Bant görüntüsü 37
Şekil 4.17 Ef_Hd 2 ait Bant görüntüsü 38
Şekil 4.18 Ef_He ait Bant görüntüsü 39
Şekil 4.19 Ef_He 2 ait Bant görüntüsü 40
Şekil 4.20 Ef_Hf ait Bant görüntüsü 41
Şekil 4.21 Ef_Hf 2 ait Bant görüntüsü 42
Şekil 4.22 Örneklerin NML (non-methylated loci) PCo gösterimi. Pop1: Ofis 95, Pop2: Ofis 96, Pop3: TMO-T. 61
Şekil 4.23 Örneklerin MSL(methylation susceptible loci) PCo gösterimi. Pop1: Ofis 95, Pop2: Ofis 96, Pop3: TMO-T. 61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Haşhaş Çeşitleri 12
Çizelge 3.2 Adaptörler dizilerinin listesi 17
Çizelge 3.3 Primerlerin baz dizilimlerinin sıralanışı.....19
Çizelge 4.1 Çeşitlere ait dokuların saflık ve konsantrasyon değerleri.....23
Çizelge 4.2 Ed_Hd skorlama sonuçları.....43
Çizelge 4.3 Ed_He skorlama sonuçları 44
Çizelge 4.4 Ed_He 2 skorlama sonuçları 45
Çizelge 4.5 Ed_Hf skorlama sonuçları.....46
Çizelge 4.6 Ed_Hf 2 skorlama sonuçları.....47
Çizelge 4.7 Ee_Hd skorlama sonuçları 48
Çizelge 4.8 Ee_Hd 2 skorlama sonuçları 49
Çizelge 4.9 Ee_He skorlama sonuçları 50
Çizelge 4.10 Ee_He 2 skorlama sonuçları 51
Çizelge 4.11 Ee_Hf skorlama sonuçları.....52
Çizelge 4.12 Ee_Hf 2 skorlama sonuçları.....53
Çizelge 4.13 Ef_Hd skorlama sonuçları.....54
Çizelge 4.14 Ef_Hd 2 skorlama sonuçları.....55
Çizelge 4.15 Ef_He skorlama sonuçları.....56
Çizelge 4.16 Ef_He 2 skorlama sonuçları.....57
Çizelge 4.17 Ef_Hf skorlama sonuçları 58
Çizelge 4.18 Ef_Hf 2 skorlama sonuçları 59
Çizelge 4.19 Ofis 95, Ofis 96 ve TMO-T örneklerinin metilasyon profil frekansları 60

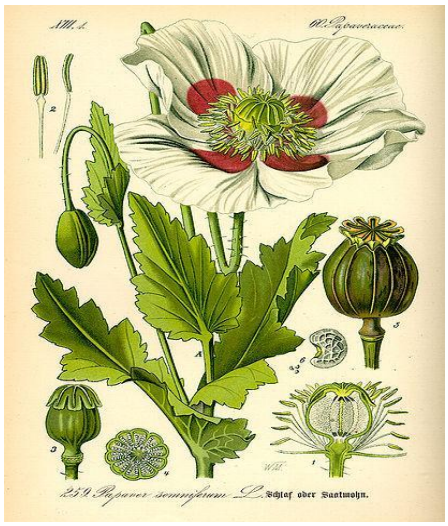
1.GİRİŞ

1.1 Haşhaş (*Papaver somniferum* L.)

Geleneksel olarak tarımı yapılan haşhaş, *Papaver somniferum* L. türü olan tek yıllık bir kültür bitkisidir. *Papaver somniferum* L. Rhoedales takımının *Papaveraceae* familyasındandır. *Papaveraceae* familyası *papaver sp*. cinsi içerisinde son düzenlemeler ile ülkemizde 28 tür, 18 tür altı takson tespit edilmiştir (Davis et al. 1988 ; Anonim 2017).

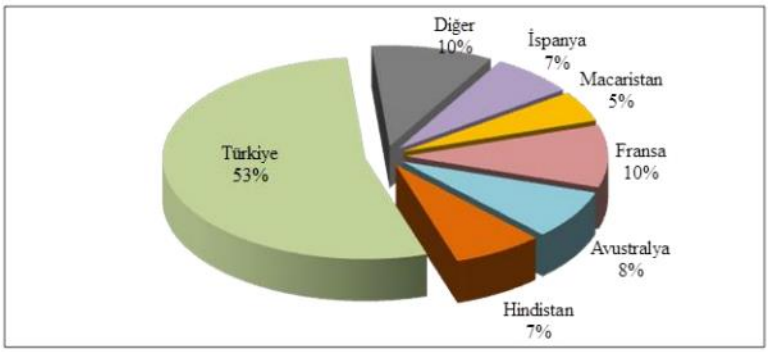
Çalışmamızın amacı haşhaş bitkisinin çok yönlü kullanım özelliğinden yararlanılarak tebain biyosentezi yolağında görev alan gen ve gen bölgeleri üzerinde epigenetik düzenlemelerin en önemlilerinden olan metilasyon etkilerinin MSAP yöntemi ile aydınlatılmasıdır. Bu kapsamda tebain yolağında epigenetik düzenlemelerde metilasyonun etkileri ilk kez araştırılmıştır.

Haşhaş bitkisinin eski çağlardan beri bilindiği, M.Ö. 5000 yıllarında Mezopotamya'da kültür bitkisi olarak kullanıldığı, Avrupa'da M.Ö. 4000 yıllarında kültürü yapılmakta olduğu belirtilmektedir (İncekara 1979). Haşhaş bitkisinin ilk çizimi Otto Wilhelm tarafından çizilmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Haşhaş bitkisinin ilk çizimi (Otto 1885)

Eski çağlardan beri bilinen haşhaşın günümüzde legal olarak Birleşmiş Milletler Teşkilatı denetiminde izine bağlı olarak kültürü yapılmaktadır. Dünya çapında haşhaş üretiminde Türkiye ilk sırada yer almaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Dünya çapında haşhaş üretim dağılımı (Anonim 2015)

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nce yapmış olduğu çalışmaya bakıldığında tüm dünyada 20.000 civarında bitki türünün tıbbi amaçla kullanıldığı belirtilmektedir (Arslan vd. 2015). Yasal olarak Türkiye'de şu an sadece 13 ilde Haşhaş üretimi izne bağlı olarak yapılmaktadır (Şekil 1.3).

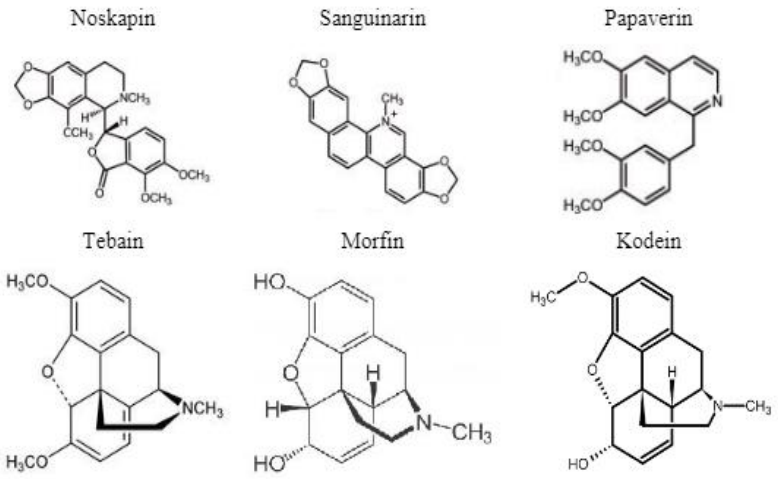


Şekil 1.3 Türkiye'de Haşhaş Üretim Haritası (Anonim 2013)

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin tohum ve kapsül kabuğu olmak üzere iki önemli şekilde ürün elde edilmektedir.

Kapsülünden faydalanma olarak haşhaşın milletlerarası ününü sağlayan ihtiva ettiği morfin ve diğer alkaloidlerden kaynaklanan tıbbi özelliği devreye girmektedir. Haşhaş kapsülünün morfin, kodein, tebain, noskapin ve papaverin gibi tıbbi öneme sahip olan alkaloidler izole edilmiştir (Anonim 2019). Bunlardan türevleri olan katma değerleri yüksek, yarı sentetik ilaç aktif hammaddeleri üretilmektedir. Bu alkaloidlerden morfin, kodein ve tebainin uyuşturucu özelliği olmasına rağmen noskapin ve papaverin uyuşturucu özelliğe sahip değillerdir. Tıpta; analjezik (ağrı kesici), anestezik (uyuşturucu) ve antitüssif (öksürük kesici) olarak yararlanılmaktadır. (TMO, 2018).

Alkaloidler; bitkilerden elde edilen, genellikle kuvvetli fizyolojik ve farmakodinamik aktivite gösteren, halka içinde bir veya birden fazla azot taşıyan, bazik karakterli maddelerdir. Diğer sekonder metabolitler gibi alkaloidler de bitkilerde herbivorlar ve patojenlere karşı savunmada görev alan bileşiklerdir. Biyolojik aktivitelerine bağlı olarak bilinen yaklaşık 12.000 alkaloid, farmasötik, uyarıcı, narkotik ve zehir olarak kullanılmaktadır (Zulak vd. 2006, Gürkök vd. 2010). Alkaloidlerin kimyasal yapıları aşağıda verilmiştir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 Bazı Alkaloidlerin kimyasal yapıları (Anonim 2018).

Papaveraceae familyası morfin, kodein, tebain, noskapin, papaverin, narceine, isoboldine ve salsalinol gibi alkoloidlerinin türemiş olduğu L-tyrosine zinciri içerirler. Kapsüldeki alkaloid miktarı % 0,2-0,8 arasında değişmekle beraber, yapılan ıslah çalışmaları neticesinde bu oran % 1'in üzerine çıkarılmıştır (Arslan vd. 2008). Tebain ana alkaloitlerden olan morfin ve kodein gibi alkaloitlerin kimyasal yapılarının köken aldığı önemli bir alkaloiddir.

Tebain ismi eskiden afyon ihraç eden Mısır şehri Teb'den gelmektedir (Paul 2002). Windholz vd. (1983) tarafından 6,7,8,14 tetrahidro-4,5-epoksi-3,6 dimetoksi-17-metil morfinan ismi verilmiştir. Diğer kısa ismi paramorfindir, ancak ilaç olarak kullanılmaz, santral sinir sistemini uyarıcı etkisi vardır. Önceleri morfinin bir izomeri olduğu düşünülmüştür. Aromatik halkada CH_3O grubu yerine HO-olduğunda bu alkaloide oripavin adı verilir (Küçük 1996). Afyon (Opium) içerisindeki oranı % 0.2-1'dir (Tanker 2003). En zehirli afyon alkaloiti olup; medikal amaçlı kullanılmamaktadır. *Papaver somniferum* L.'deki en az fenantren alkaloit tebaindir. Medikal amaçlı kullanılan; hidrokodon (dihidrokodon), asetildihidrokodein ve oksikodon (dihidrohidroksi kodeinon) 'a dönüştürülebilir. Ağrı kesici etkisi azdır, sara nöbetine benzer bir etki yapar. Son yıllarda, analjezik, antitussif (öksürük kesici) ve yatıştırıcı özelliklere sahip yarı sentetik ilaçların üretiminde tebaine olan ilgi artmıştır (Önmez 2007).

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Haşhaş (*Papaver Somniferum L.*) Önemi

Haşhaş bitkisi özellikle alkaloidi için yetiştirilen bir kültür bitkisi olup; alkaloitler bitkinin kapsüllerinden elde edilmektedir. Haşhaş kapsüllerinin ihtiva ettiği 20 kadar alkaloid, tıpta birçok ilacın hazırlanmasında kullanılır. Haşhaş, tohumlarından ve yağından gıda olarak faydalanılan, küspesi hayvan yemi olarak kullanılan ve kapsüllerinin içerdiği alkaloitlerden, tıbbi olarak kullanılan çok yönlü olan bir bitkidir (Gürkök vd. 2010). Haşhaşın tıbbi ve ekonomik değeri benzilizokuinolin (BIA) üretiminden kaynaklanmaktadır. Haşhaşın meyve kabuğunun içerdiği 20 kadar alkaloit, tıbbi olarak yararlanılmaktadır (İncekara 1972).

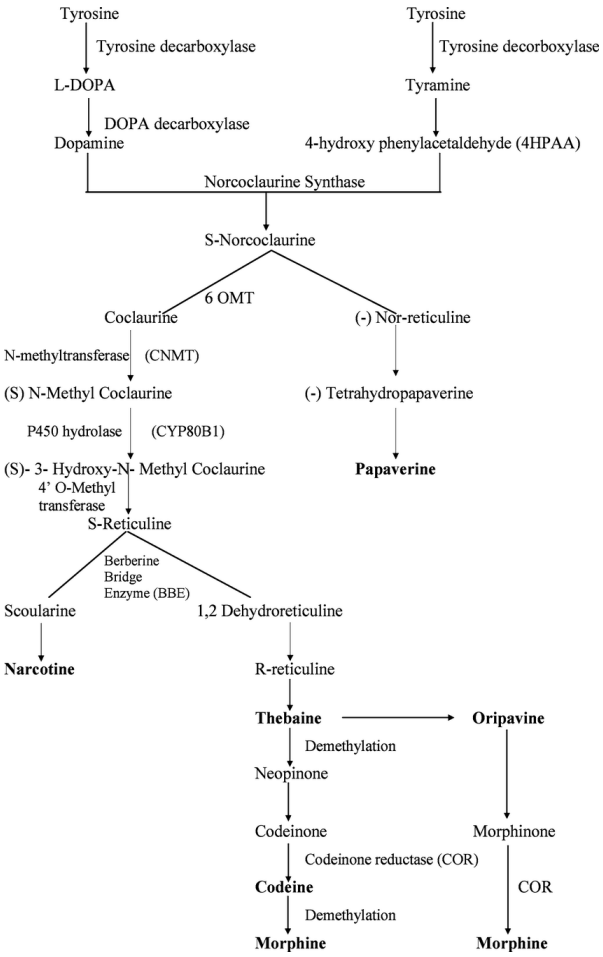
Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisi hem yazlık hem de kışlık ekilebilen, otsu yapıda tek yıllık bir bitkidir. Yazlık ve kışlık ekiliş tarihine göre vejetasyon süresi 110-280 gün arasında değişmektedir. 30–100 cm kadar derinine inen kazık kök sistemine sahiptir. Bitkinin sapı ve dalları tüysüz, düz ve üzeri gri-yeşil bir mumsu tabakayla çevrilidir. Olgunlaştığında kahverengimsi sarı bir renk almaktadır. Yapraklarının üzeri tüysüz ve grimsi-yeşil bir mum tabakasıyla kaplıdır (İşler 2009).

Yapısında alkaloid bulunan bitkinin her organında alkaloit olmayabilir. Haşhaş meyvesinde alkaloid bulunmasına karşın tohumlarında bulunmaz (Tanker vd. 1990).

Birleşmiş Milletler denetiminde yasal ana üretici olarak Türkiye, Hindistan, Avustralya, Fransa, İspanya, Macaristan'da haşhaş ekimi yapılmaktadır. Ayrıca Türkiye ve Hindistan Birleşmiş Milletler tarafından geleneksel haşhaş üreticisi ülkeler olarak kabul edilmektedir (Anonim 2016).

2.2 BIA ve Tebain Yolağı

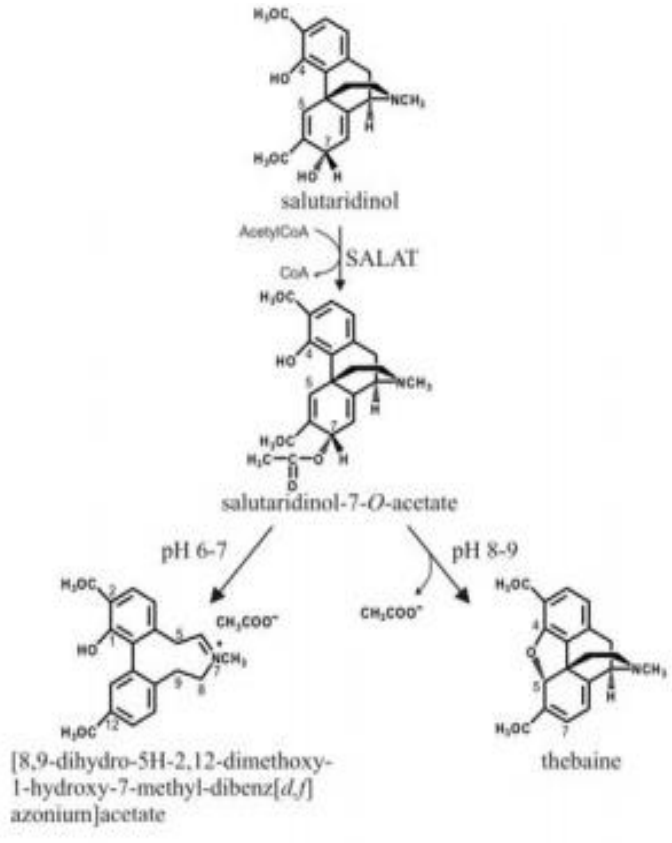
Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin tohum ve kapsül kabuğu olmak üzere iki önemli şekilde ürün elde edilmektedir. Kapsülünden faydalanma olarak haşhaşın milletlerarası ününü sağlayan ihtiva ettiği benzilizokinolin (BIA) adı verilen ve içerdiği alkaloidler sebebiyle tıbbi özellikleri devreye girmektedir. Morfin ve kodein güçlü analjezikler olup, antimikrobiyal ajan olarak sanguinarin ile berberin verilebilir. Tebain, morfin ve kodein için öncül bir molekül olarak kullanılmaktadır. Tebainin biyosentez yolu Tirozin ile başlayarak devam etmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 BIA yolağı gösterimi (Yadav vd.2006)

Biyosentez yolu temel olarak tirozin amino asidinin, hem dopamin hem de 4-hidroksifenilasetaldehit molekülüne tirozindekarboksilaz (TYDC) enzimi ile dekarboksilasyon, orto-hidroksilasyon ve deaminasyon basamakları ile başlamaktadır (Facchini 2007).

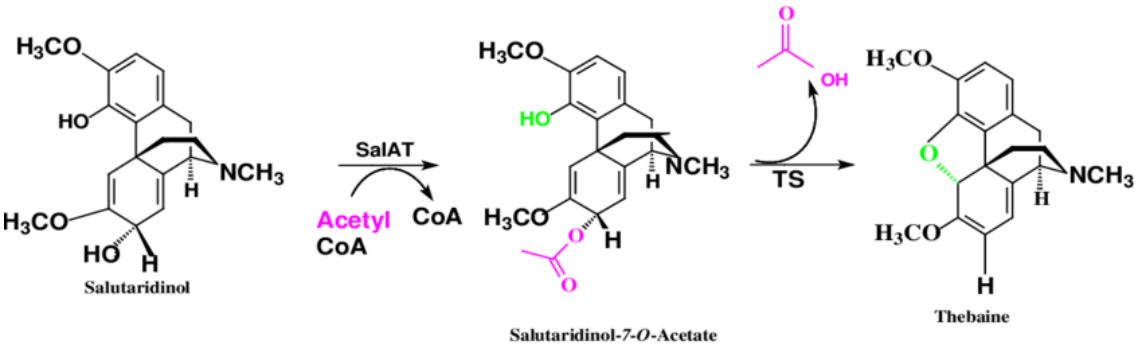
Haşhaş morfin biyosentetik yolu boyunca, salutaridinol-7-O-asetattan tebaine geçişin daha önce enzimatik olmayan bir şekilde pH 8-9 arasında ilerlediği iddia edilmiştir. PH 6-7'de asetat, bir azonin türevine dönüştürülmüştür. Bu dönüşüm reaksiyonları, olası bir protein katalizörü aramak için *P. Somniferum* L. protein ekstreleri kullanılarak yeniden ziyaret edilmiştir. Kalıntıların ve inhibitör düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin *P. Somniferum* lateksinden çıkarılmasından sonra, bu lateks serumunun salutaridinol-7-O-asetatı yüksek fizyolojik pH 7.0'da yüksek verim ile tebaine dönüştürdüğü gösterilmiştir (Fisinger 2007). Tebain oluşum yolağı aşaması aşağıda verilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Tebain oluşum aşaması (Fisinger 2007)

Bu kısımda, morfinin biyosentezi için ilk önce (*S*)-retikülinin (*R*)-retiküline dönüşümü gerekir. (*R*)-retikülin, CYP salutaridine sentaz (CYP719B1) aracılığıyla ilk önce salutaridine ve sonrasında da kısa zincirli dehydrogenase/reductase olan salutaridine reductase (SalR) vasıtasıyla salutaridinol'e dönüştürülür. Salutaridinol-7-O-asetattan pH 8-9 ve [8,9-dihidro-5H-2,12-dimetoksi-1-hidroksi-7-'de tebain pH 6-7'de metildibenz [d,f] azonyum asetat, SalAT = salutaridinol-7-Oasetiltransferaz etkisi ile tebain oluşumu gerçekleşmektedir. Salutaridinol 7-O-asetatın asetat ile tebain dönüşümünü morfin yolağında katalize edilerek oluşmuştur. Morfinin biyosentezinde (S)-retikülinin (R)-retiküline dönüşümü gereki (Demirci 2016).

Salutaridinol, salutaridinol 7-*O*-acetyltransferase (SalAT) enzimi ile *O*-asetillenir ve Salutaridinol 7-*O*-acetate, pH 8-9 olduğu ortamda kendiliğinden halkalanma göstererek, ilk pentasiklik morfinyan alkaloit olan tebaine dönüşür (Şekil 2.3).



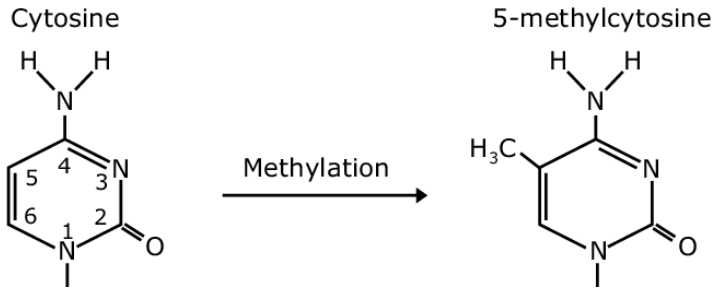
Şekil 2.3 SalAt ile Tebain oluşumu (Sabarna 2019).

2.3 DNA Metilasyonu

Epigenetik mekanizmalar içerisinde; DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kromatin düzenlenmesi yer almaktadır. DNA metilasyonu, bir metil grubunun DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) ile DNA'nın sitozin halkasının C-5 pozisyonuna kovalent transferini içeren kalıtımsal bir epigenetik işarettir (J. E. Dodge vd. 2002).

Bitkilerde sitozinler hem simetrik (CpG veya CpNpG; N, guanin haricinde herhangi bir nükleotittir) hem de asimetrik (CpNpNp) olarak metillenebilir. Bazı organizmalarda, örneğin meyve sineklerinde, hemen hiç DNA metilasyonu görülmez. Memelilerde metilasyonun CpG dizilerindeki sitozinde metillenmesine karşın, bitkilerde sitozin CpG, CpNpG ve CpNpN dizilerinde de metillenir (burada N, guanin dışında her nükleotit anlamına gelmektedir.) DNA metilasyonu, DNMT'lerin diğer modifikasyonlarla ve bu işaretlere aracılık eden makinelerin bileşenleriyle etkileşimi yoluyla kromatin durumunu koordine edebilmektedir (X.Cao vd. 2002).

Bugüne kadar, DNA metilasyonu alglerden, tahıl ürünlerinden, sebzelerden, meyvelerden, ağaçlara kadar birçok bitki türünde incelenmiştir. Araştırmalar, DNA metilasyonunun seviyeleri ve sekans bağlamları açısından çok çeşitli olduğunu kaydetmiştir. Yeşil alglerin en düşük DNA metilasyon seviyesine sahip olunduğu bulunmuştur. Kara bitkilerinin ve pancarın DNA metilasyon seviyelerinin yüksek, pirinçte ise orta seviyede bir DNA metilasyonu görülmüştür (Anonim 2019). DNA baz diziminde metilasyon gösterimi aşağıda verilmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 DNA baz diziminde metil grubunun bağlanması (Kumar vd. 2016).

2.4 Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP)

Metilasyon Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizm (MSAP), bitkilerdeki DNA metilasyon değişikliklerini değerlendirmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem, metilasyona duyarlı kısıtlama enzimleri kullanılarak ayrılan seçici olarak amplifiye edilmiş DNA'dan PCR fragmanlarının jel bazlı görüntülenmesini içermektedir.

Aşamalar aşağıda verilmiştir.

i) Metil bölgelerine hassas kesim enzimleri ile DNA'nın parçalara ayrılması,

ii) DNA fragmanlarının poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yardımıyla ayrılması ve bantların profillenerek örnekler arasında farklılık gösteren bantların tespiti,

iii) Farklılık gösteren bantların jelden izole edilerek dizilenmesi ve dizi analizi.

Restriksiyon endonükleazları olan kesici enzimler DNA'yı belirli noktalardan ayırmaktadır. Bu şekilde metillenmiş veya metillenmemiş DNA'nın ayrımı yapılabilmektedir. Hpa II ve Msp I izosizomerleri CCGG sekanslarını tanıyabilen metilasyona duyarlı kısıtlama endonükleazlarıdır. HpaII sadece metile edilmemiş CCGG ve hemi-metillenmiş mCCGG sekanslarını ayırır, MspI ise metillenmemiş CCGG ve hemi -veya tamamen metillenmiş CmCGG sekanslarını sindirebilir, ancak hemi- ve tamamen metillenmiş mCCGG ve mCmCGG sekanslarını sindirebilir. Metillenmiş CCGG dizileri sadece MspI izoşizomeri ile kesilebilmektedir. Böylece PCR engellemiş olur. Böylece Hpa II ile PCR amplifikasyonu doğru bir şekilde gerçekleştirir. Msp I ile Eco RI ve Hpa II ile Eco R1 ile düzenlenen DNA örnekleri, uyumlu uçlara bağlanır. Bağlanan fragmanlar, primerlerle öncesinde çoğaltılır. Sonrasında seçici primerler devreye girerek amplifikasyon gerçekleştirilir. Bu amplifikasyon jelde bir çoğalım oluşturur. Oluşan fragmanların görüntülenmesi için florasan etkili primer eklenir. Jelde, her bir şeritte Eco R1, Msp I ve Hpa II ile kaynaşmış DNA'dan (M-H) iki komşu model meydana gelir (Fulnecek ve Kovark 2014).

.

Açıkça ayırt edilebilir DNA parçaları, örnekler için mevcut (1) veya yok (0) olarak bir ikili matris formunda puanlanmaktadır. Tanımlanan tüm bantlar genellikle dört tipe ayrılabilir. Bunlar (+, +), (+,−), (−, +) ve (-, -)'dır. "Msap" r paketi ikili verilerin analizi için kullanılmıştır. (+,+) modeli, metillenmemiş CCGG bölgesi için her iki enzim ile sindirime uğramıştır. (-,-) modeli, farklı bir işlem görmüş örnek, başka fragmanın kendisini gösterdiğinde, bütün olarak metilenmiş mCmCGG kısmında her iki enzim ile sindirime uğradığını gösterir. (-,-) modelinin başka bir anlamı ise, o bölgenin bir mutasyona uğradığını da belirtebilir. (+,-) modeli, Hpa II ile olmayıp sadece Msp I ile sindirime uğradığını ve CmCGG bölgesini tespit eder. (-,+) modeli ise, CCG ve CG kısımlarında metilasyon oluştuğunu söylemektedir (Perez-Figueroa 2013).

2.5 Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

PAGE (Poliakrilamid jel elektroforezi) bileşenleri boyutlarına göre ayırmak için kullanılan analitik bir yöntemdir. Enzimler ile kesimden sonra meydana gelen uzunluklar elektroforez işlemi sayesinde yüklü bir molekülün bir elektrik alanında zıt işaretli bir elektroda doğru göç edeceği prensibine dayanır. Jel yürütülmesi işleminden sonra fragmanlar UV ışığı altında etki gösteren etidyum bromür (EB) boyası ile boyanarak en düşük konsantrasyonda dahi görünüm vermektedir.

Akrilamidin polimerizasyonu ile hazırlanan poliakrilamid jellerin diğer jellere göre üstünlükleri vardır. Bu üstünlük yüksek ayrıştırma gücü ile kendini göstermektedir. Poliakrilamid jellerle gerçekleşen elektroforez işlemi bileşenlerin daha iyi ayrışmasına yol açar. Bunun sebebi moleküler elekleme ve elektroforetik hareketleridir. Jel oluşumunda Tetrametiletilendiamin (TEMED) poliakrilamid jel polimerizasyonu için önemli bir katalizördür. TEMED, elektroforez için jeller hazırlanırken akrilamid polimerizasyonunu katalize etmek için amonyum persülfat (APS) ile birlikte kullanılmaktadır (Dilsiz 2004).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bitki Materyali

Benzilizokinolin alkaloitleri (BIA) içeriğinde farklı olan Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) çeşidinin tohumları Toprak Mahsulleri Ofisi'den (TMO; Ankara, Türkiye) temin edilmiştir. Bitki materyali olarak TMO'dan elde edilen *Papaver somniferum* L. tebain içeriği yüksek TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 kullanılmıştır. Haşhaş çeşitleri çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Haşhaş Çeşitleri

TMO TARAFINDAN ISLAH EDİLEN VE TESCİL ETTİRİLEN HAŞHAŞ ÇEŞİTLERİ					
Haşhaş Çeşidi	Morfolojik Özellikleri	Tarımsal Özellikleri	Kalite Özellikleri	Hastalık ve Zararlıları	Önerildiği Alanlar
Ofis 95 (Tescil yılı: 1995-1996) (Islah metodu: Seleksiyon)	Çiçek rengi sarı,		Tohumdaki yağ oranı % 50	Önemli hastalık ve zararlısı yoktur.	Adaptasyon kabiliyeti geniştir
	Tohum rengi ise beyaz ve kapsül şekli basık koniktir.	Tohum verimi 155-220 kg/da	Kapsüldeki morfin oranı % 0.550-0.710		
	Bitki boyu 89-101 cm arasında değişir.	Kapsül verimi 132-200 kg/da			
Ofis 96 (Tescil yılı: 1995-1996) (Islah metodu: Seleksiyon)	Çiçek rengi beyaz,		Tohumdaki yağ oranı % 53	Önemli hastalık ve zararlısı yoktur.	Adaptasyon kabiliyeti geniştir
	Tohum rengi ise sarı ve kapsül şekli koniktir.	Tohum verimi 113-160 kg/da	Kapsüldeki morfin oranı % 0.555-0,700		
	Bitki boyu 85-95 cm arasında değişir.	Kapsül verimi 100-135 kg/da			
TMO T (Tescil yılı: 2010)	Çiçek rengi mavi,		Kapsüldeki tebain oranı % 1,8	Önemli hastalık ve zararlısı yoktur.	Adaptasyon kabiliyeti geniştir

(Islah metodu: Melezleme)	Tohum rengi mavi ve kapsül şekli armuttur.	Tohum verimi 58 kg/da	Kapsüldeki morfin oranı % 0,4		
	Bitki boyu 90-100 cm arasında değişir	Kapsül verimi 47 kg/da			

Kaynak: Anonim

3.2 Yöntem

3.2.1 Haşhaşların yetiştirilmesi

Bitki materyali olarak TMO'dan elde edilen TMO T, Ofis 95 ve Ofis 96 kullanılmıştır. 20 adet viyole ekimler gerçekleştirilmiştir. Gelişen fideler, saksılara alınarak bakımları gerçekleştirilmiştir. Bitkiler 20/24 fotoperiyotta 16/8 saat gündüz / gece döngüleri ile tutulmuş ve altı aylık periyotta DNA izolasyonu için kapsül, gövde ve yaprakları toplanmıştır. Çalışmaya hazırlık aşamasında numuneler hemen sıvı azot içinde dondurulmuş ve analiz edilene kadar 80 ° C'de saklanmıştır.

3.2.2 DNA İzolasyonu

Moleküler biyoloji çalışmaları üzerinde çalışılan bitkilerden yüksek kalitede DNA izolasyonu gerektirmektedir. Bu nedenle, çalışmalarda kullanılacak bitkilerden kısa sürede ve saf olarak yüksek konsantrasyonda DNA izolasyonu gerçekleştirmek son derecede önemlidir. Çalışmamızda Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA İzolasyon Mini Kit (10 mM Tris HC1, pH 8.5) prosedürü kullanılmıştır. 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne 350 ul Lizis Tampon A alınmıştır. Bitki dokusu tartılıp - 100 mg taze veya donmuş doku kullanılmıştır. Derin dondurucuda saklanan örnekler sıvı azot yardımıyla havanda ezilmiş ve daha ufak parçalara ayrılarak 1,5 veya 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine doldurulmuştur.

50 *ul* Lizis Tampon B ve 20 *ul* RNaz A eklenmiş ve mekanik bozulmayı önlemek adına mikrosantrifüj tüpü ile 1 dakika vortekslenmiştir. Numune 10 dakika boyunca 65 ° C'de vortekslenmiş, inkübe edilmiş veya bir çalkalama suyu banyosu, sallanan platform veya termomikser kullanılmıştır. 130 *ul* Çökeltme Solüsyonu eklenmiş ve tüp 2-3 kez ters yüz ederek karıştırılmış ve buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiştir. ≥20,000 × g (≥14,000 rpm)'de 5 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Süpernatantı toplanmış (genellikle 450-550 *ul*) ve temizlenip mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. 400 *ul* bitki gDNA Bağlama Solüsyonu ve 400 *ul* % 96 etanol eklenip iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımın yarısı (600-700 *ul*) döndürme kolonuna aktarılmış ve 6,000 x g'de 1 dakika (~ 8,000 rpm) santrifüj yapılmıştır. Sıvı çözeltisi atılmış ve aynı kolon üzerine kalan karışı. 6,000 × g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir (~ 8.000 rpm). Kolona 500 *ul* yıkama tampon I eklenmiş (etanol) 8,000 × g'de (~ 10,000 rpm) 1 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve sıvı kısım boşaltılıp ve sütunu tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Kolona 500 *ul* yıkama tamponı II eklenmiş (etanol) Min20.000 × g (≥14.000 rpm) maksimum hızda 3 dakika santrifüjlenmiştir. Tüp ve kolonu 1 dakika boyunca maksimum hızda(≥20,000 × g, ≥14,000 rpm) tekrar döndürülmüştür. Sıvı çözeltisini içeren kısım toplama tüpünü atılmış ve steril bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.

Genomik DNA'yı uzaklaştırmak için kolonun merkezine 100 *ul* Elüsyon Tamponu eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe ile 1 dakika santrifüj 8,000 x g'de (~ 10,000 rpm) işlemi gerçekleştirilmiştir. 100 *ul* Elüsyon Tamponunu kullanarak ikinci bir elüsyon adımı gerçekleştirilip aynı elüsyon yani uzaklaştırma adımı farklı tüplerde yapılmıştır.

Saflaştırılmış DNA, yapacağımız işlem için hazır olup -20 ° C'de saklanmıştır. Fenolik bileşikleri DNA özütünden ayırmak için PVP eklenmesi prosedürü de aynı kit içerisinden uygulanmıştır. 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne 350 *ul* Lizis Tamponu A eklenmiş (PVP % 2 nihai konsantrasyon). Sıvı azot içerisinde 100 mg bitki materyali öğütülmüştür. Öğütülmüş bitki dokusu önceden hazırlanmış Lizis ile tüplere aktarılmış ve Tampon A (PVP ile), 50 *ul* Lizis Tampon B ve 20 *ul* RNaz A eklenip, vorteks yapılıp, pipet ile karıştırılmıştır. Örnek 10 dakika boyunca 65 ° C'de vortekslenip, inkübe edilmiştir. 130 *ul* Çökeltme Solüsyonu ekleni, tüp 2-3 kez ters yüz edilerek karıştırılmıştır. Sonrasında buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiştir.

Bir DNA örneğinin PZR reaksiyonlarında kullanılması, izolasyon işlemi sonunda elde edilmiş DNA konsantrasyonu ve kalitesine bağlıdır. Bu nedenle izole edilen DNA örneklerinin kalite ve konsantrasyonu belirlemek için elde edilmiş DNA örneklerinin konsantrasyonu NanoDrop Spektrofotometre cihazı (Thermo, 2000c) kullanılarak belirlenmiştir. İzole edilmiş DNA örneklerinden 1 ul alınıp NanoDrop 2000c spektrofotometre (Thermo Scientific,Vilnius, Litvanya) cihazının haznesine aktarılmıştır. DNA örneğinin kalitesinin göstermek için ise 2 ul DNA örneği 0.2 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerine 1 ul boya (Loading dye-Thermo) ilave edilmiştir. Hazırlanan örnek TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) solüsyonu içinde bulunan %0.8'lik konsantrasyona sahip agaroz jele yüklenmiştir. Agaroz jele yüklenen örnekler 100 Voltta 60 dakika yürütülmüş ve yürütülme sonunda agaroz jel UV transilluminatör ışığının altında görüntülenmiştir.

Örneklerin DNA kalitesini göstermek için agaroz jele standart olarak 1 kb uzunluğunda markör (Gene Ruller) yüklenmiş ve örneklerle beraber yürütülme işlemi yapılmıştır. DNA örnekleri kullanım için -20 ° C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 MSAP (Metilasyonu Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi) Analizi

3.2.3.1 Restriksiyon Endonükleaz ile Kesim İşlemi

Tebain içeriği yüksek *P. somniferum* L. TMO-T ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerine ait kapsül ve gövdelerinden izole edilen DNA örneklerinden MSAP analizi gerçekleştirmek için MspI ve HpaII olmak üzere iki farklı restriksiyon enzimleriyle kesim yapılmıştır.

DNA izolasyon işlemi gerçekleştirdiğimiz ve -20 derecede muhafaza ettiğimiz örneklerle beraber, buz kütlesi üzerinde çalışılmasına özen gösterilerek karışım hazırlanmıştır.

Toplam hacmin 25 ul olacak şekilde ayrılan eppendorf tüpler hazırlanarak setlere yerleştirilip sırasıyla mikropipet yardımıyla DNA konsantrasyonundan 500 $ng/\mu l$, 5 U EcoR1 (Thermo Scientific), 10 U MspI (Thermo Scientific), 2X Tango Tamponu (Thermo Scientific) ile üstü 25 ul'e tamamlanacak şekilde 13.5 ul (ddH_2O) ultra saf su ilave edilmiştir. Ayrı bir tüpte DNA konsantrasyonundan 500 $ng/\mu l$, 5 U EcoR1(Thermo Scientific), 20 U HpaII (Thermo Scientific), 2X Tango Tamponu (Thermo Scientific) ve toplam hacim 25 ul'e tamamlanacak şekilde ultra saf su (ddH_2O) 12.5 ul ilave edilmiştir. Pro- RAD T100 Thermal Cycler cihazında 37 ° C'de 24 saat ve 80 ° C 20 dakika inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur.

3.2.3.2 Ligasyon (Adaptör Bağlanması)

Bir enzim bileşimi ile iki nükleik asit parçalarının birleştirilmesi işlemidir. Ligasyon reaksiyonları, kısıtlama enzimi sindirimi ile üretilen DNA fragmanlarını içermektedir. Restriksiyon işleminde kullandığımız MspI ve HpaII izoşimerleri tanıma sekansları boyunca DNA'yı asimetrik olarak sindirir ve bu işlem DNA fragmanının sindirilmiş ucunda tek bir sarmal çıkıntısına neden olur. HpaII metilasyona duyarlı ve MspI metilasyona duyarsız adaptör bölgelerine bağlanmıştır.

Adaptörlerin bağlanması için 60 U HpaII (Thermo Scientific) linker, 60 U EcoRI (Thermo Scientific) linker, 1 U T4 DNA Ligase (Fermentas), 1X T4 Ligase Buffer (Fermentas) ,10 μl restriksiyon karışımı ve 3,4 ul su (ddH_2O) konularak toplamda 25ul hacminde olacak şekilde tüpe konulmuştur. Hazırlanan karışım 23° C'de 4,5 saat ve 60° C'de de 10 dakika inkübe edilerek -20° C'de PZR için saklanmıştır. Reaksiyonda kullanılan adaptör dizileri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

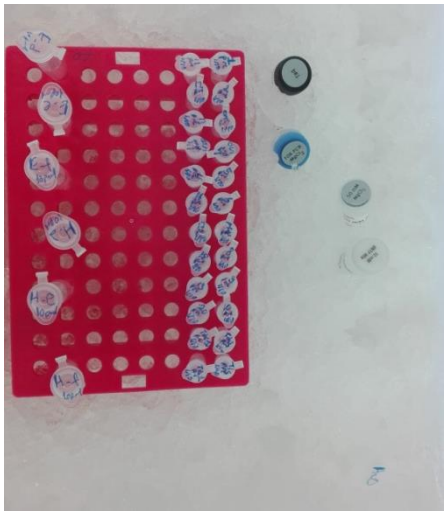
Çizelge 3.2 Adaptörler dizilerinin listesi

Adapters/Primers	**Sequences (5’ - 3’)**
EcoR1 adapter 5	CTCGTAGACTGCGTACC
EcoR1 adapter 3	AATTGGTACGCAGTCTAC
HpaII/MspI adapter 5	GATCATGAGTCCTGCT
HpaII/MspI adapter 3	CGAGCAGGACTCATGA

3.2.3.3. Ön seçim PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PZR reaksiyonuna hazırlık için , 1/10 sulandırılması yapılmış DNA (ligasyon ürünü) örneklerinden 5 µl, 1X PCR Buffer (İnvitrogen), 2mM Mg, *0,3* mM dNTP (Thermo Scientific), 1.5Ü Taq DNA (İnvitrogen), 10 pmol linker EcoR1, 10 *pmol* linker HpaII, 9,3 µl saf su (ddH_2O) konularak toplamda 20 µl hacminde olacak şekilde tüpe konulmuştur. Linker hazırlanışı şu şekildedir:

100 pmol EcoR1 5’+ 100 pmol EcoR1 3’ve 100 pmol HpaII 5’+ 100 pmol HpaII 3’dir. İşlem için primer ve örneklerin hazırlanışı aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1)



Şekil 3.1 Ön Seçim İşlemi Öncesi Örneklerin Hazırlanışı (Orijinal 2019).

3.2.3.4 Seçim PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PZR reaksiyonu örnekleri için 1/10 sulandırılması yapılmış ligasyon ürünleri olan DNA örneklerinden 5 µl, 1X PCR Buffer (Invitrogen), 2mM Mg, 0,3 mM dNTP (Thermo Scientific), 1,5 U Taq DNA (Invitrogen), 10 pmol F, 10 $pmol$ R, 9,3 µl su (ddH_2O) konularak toplamda 20 µl hacminde ayarlanarak tüpe aktarılmıştır.

PZR protokolü aşağıdaki gibi gerçekleşmiştir ;

94°C'de 5 dakika, 94°C'de 30 saniye, 65°C'de 1 dakika (her aşamada 0,7°C düşürülerek), 72°C'de 1 dakika 12 döngü, ardından da 94°C'de 30 saniye, 56 °C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika 23 döngü, son olarak 72°C'de 5 dakika şeklindedir.

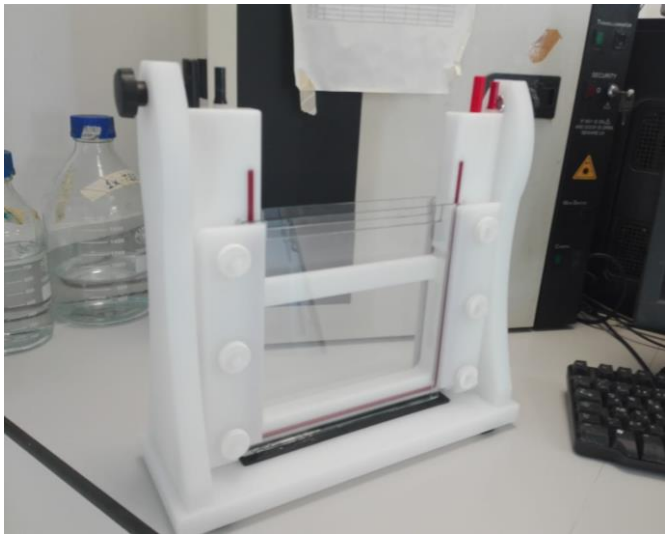
Ön seçim karışımından 3 µl %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve görüntüler UV transillüminatör alınmıştır. PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Primerlerin baz dizilimlerinin sıralanışı

Primerler	**Baz Dizisi 5'-3'**
EcoR1 +1 primer	GACTGCGTACCAATTCA
EcoR1 +2 primer a	GACTGCGTACCAATTCAG
EcoR1 +2 primer b	GACTGCGTACCAATTCAT
EcoR1 +2 primer c	GACTGCGTACCAATTCAC
HM + 1 primer	ATCATGAGTCCTGCTCGGT
HM + 3 primer a	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAA
HM + 3 primer c	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC
E_d	GACTGCGTACCAATTCAAC
E_e	GACTGCGTACCAATTCACG
E_f	GACTGCGTACCAATTCACT
H_d	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAG
H_e	ATCATGAGTCCTGCTCGGGTGG
H_f	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTA

3.2.3.5 PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

İşleme başlamadan önce poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Bunun için 6 ml %40 (19:1) Acrylamide/Bis Solution (BIO-RAD), %0,1 APS (Amonyum persülfat) 0,01X TEMED, 1X TBE (Tris- Borik Asit- EDTA) eklenerek %6'lık konsantrasyona sahip poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Hazırlanan jel 19,4 cm x 18,5 cm (G x B) boyutunda ve 1,0 mm kalınlığa sahiptir. Ayarlanabilir dikey jel elektroforezi aletinde (Biometra Eco- Maxi-Analytik Jena Company) gerçekleştirilecek şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan jel kaseti, jel dökme bölmesine yerleştirilmeden önce jelin sızdırmasını önlemek için %5' lik bir agar çözeltisi macun kıvamına getirilerek etrafına sürülmüştür. Hazırlanan karışım jel kasetine yüklenmiş ve 20 dişli tarak üzerine yerleştirilmiştir. 40 dakika boyunca jelin polimerize olması beklenerek süre sonunda taraklar kaldırılmıştır. 1X TBE (Tris- Borik Asit- EDTA) tamponu tanka aktarılmıştır. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez aygıtına yerleştirilmiştir. DNA fragmanlarının poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) işlemi kullanılarak ayrılmaları sağlanmıştır. PZR reaksiyonu sonucunda elde ettiğimiz ürünler, poliakrilamid jelde yürütülme işleminden önce 20µl PZR ürününe 3µl yükleme boyası Loading Dye (Thermo Scientific) ilave edilip santrifüjlenerek %6'lık konsantrasyona sahip poliakrilamid jele yüklenmiş ve 200 V akım geçecek şekilde düzenlenmiştir. Ortalama 6 saat yürütme işlemi gerçekleştirilerek elektroforez işlemi tamamlanmıştır. Elektroforetik ayırma sonunda oluşan bantlar aşamalı olarak etidyum bromür ve gümüş boyama tekniklerine tabi tutulup, analiz edilmiştir. Analiz sonucunda UV transilluminatör altında jele ait görüntüler alınmıştır.



Şekil 3.2 PAGE sistemi (Orijinal 2019).

3.2.4. Skorlama işlemi

Açıkça ayırt edilebilir DNA parçaları, örnekler için mevcut (1) veya yok (0) olarak bir ikili matris formunda puanlanmıştır. Tanımlanan tüm bantlar genellikle dört tipe ayrılabilir, yani, (+, +), (+,−), (−, +) ve (-, -). "Msap" r paketi ikili verilerin analizi için kullanılmıştır (Perez-Figueroa 2013). İlke koordinatları analizi (PCoA) "msap" programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler, BIA içeriğine göre gruplandırılmış örneklerle gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çeşitlere Ait Örneklerin Yetiştirilme Sonuçları

Uygun şartlarda ve periyodik koşullarda yetiştirilen bitki çeşitlerinde DNA izolasyonu için yaprak, gövde ve kapsül olmak üzere örnekler toplanmıştır. Alınan örnekler dondurucu bölümünde –80°C'de muhafaza edilmiştir. Saksılarda uygun koşullarda yetiştirilmesi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Bitkilerin saksılarda yetiştirilmesi (Orijinal 2019).

4.2. Haşhaş Bitkisi Örneklerinin DNA İzolasyon Sonuçları

Haşhaş örneklerine ait gövde, yaprak ve kapsüllerden toplanan dokulardan Trizol reaktifi kullanılarak DNA izolasyonu işlemi yapılmıştır. İzole edilen DNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi için örnekler agaroz jelde yürütülme işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları Nanodrop (ND-2100C, Thermo) spektrometre cihazı ile ölçülmüştür. Örneklerin konsantrasyonları ve saflık dereceleri Absorbans (A) 260-280/260-230 değerleriyle gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Çeşitlere ait dokuların saflık ve konsantrasyon değerleri

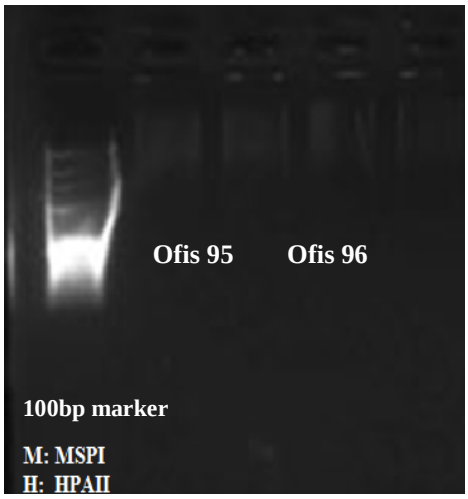
ÖRNEKLER	GÖVDE /KAPSÜL $(ng/\mu l)$	A260/A280	A260/A230
TÜM BİTKİ	508,3	1,83	1,81
GÖVDE	336,8	1,84	1,62
KAPSÜL	1497,9	1,86	1,84
TÜM BİTKİ	882,1	1,93	1,86
KAPSÜL	1942,4	1,87	1,77
GÖVDE	110,4	1,52	0,54
TÜM BİTKİ	1474,2	1,98	2,03
GÖVDE	28,6	1,48	0,59
KAPSÜL	1424	2,24	0,36

4.3. MSAP Analizine ait sonuçlar

Metilasyon Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizm (MSAP), bitkilerdeki DNA metilasyon değişikliklerini değerlendirmek için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Bu yöntem, metilasyona duyarlı kısıtlama enzimleri kullanılarak ayrılan seçici olarak amplifiye edilmiş DNA'dan PCR fragmanlarının jel bazlı görüntülenmesini içermektedir. Metilasyona duyarlı kısıtlama enzimleri HpaII veya MspI ile bölünmeyi kullanır. Ardından adaptör ligasyonu, amplifikasyonu ve daha fazla jel bazlı görüntüleme tekniklerini içerir (Reyna-Lopez et all. 1997).

İlk olarak DNA, metilasyona duyarsız olan ve nadir kesici özelliği bulunan EcoRI ile kesilmiş ve sonrasında metilasyona duyarlı kısıtlama enzimi Hpa II ile kesilmiştir.

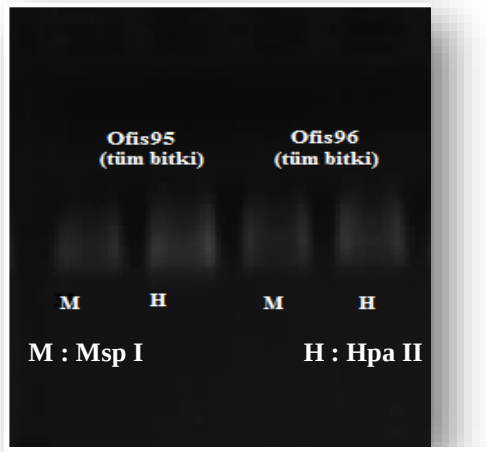
En son metilasyona duyarsız izoşizomeri olan Msp I ile kesim işlemlerine tabi tutulmuştur. Jel üzerinde görünümü Şekil 4,2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Restriksiyon işlemi sonrası jel görüntüsü (Orijinal 2019).

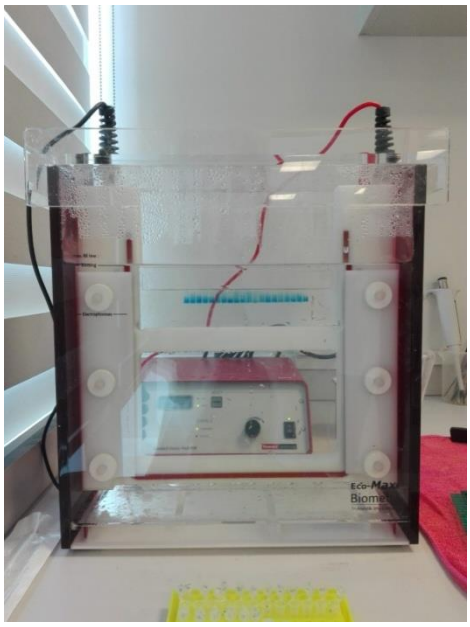
Kesimler sonucu oluşmuş yapışkan uçlara tamamlayıcı özelliği bulunan özelleşmiş adaptörler, ön seçici olan primerlerle PZR işlemi yapılarak, bant görüntüsü agaroz jel üzerinde görüntülenmiştir

Primer kombinasyon işlemi yapılarak ön seçim PZR ve seçim PZR olmak üzere iki aşamalı PZR çoğaltımı yapılmıştır. Sonrasında agaroz jel üzerinde yürütülüp, UV transilluminatör cihazında görüntü alınmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Amplifikasyona ait jel görüntüsü (Orijinal 2019).

Primer kombinasyonu ile elde edilen örnek fragmanlarının kapsamlı ayrımı için PZR reaksiyonu sonucunda oluşan ürünler, Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi kullanılarak ayrılmıştır. PAGE işlemi için kullanılan cihaz ve jel yürümesi Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

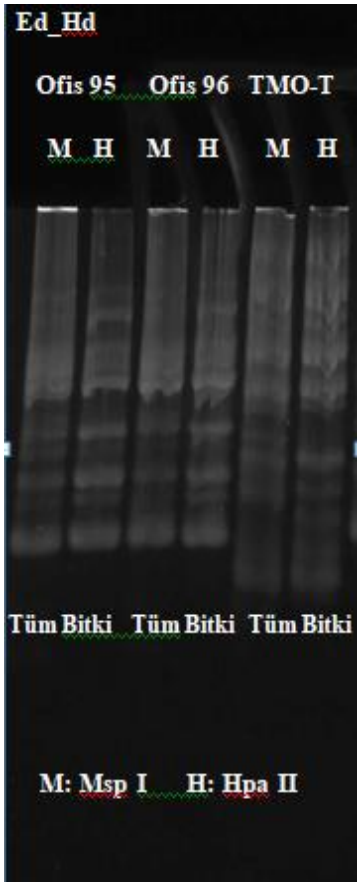


Şekil 4.4 PAGE işleminde jellerin yürümesi (Orijinal 2019).

Primer kombinasyonundan oluşturulan fragmanların PAGE ile elektroforetik ayırma sonunda bantlar elde edilmiştir. Bu bantların daha net görünümü için 4 aşamalı etidyum bromür (EBr) boyama işlemi yapıldıktan sonra UV transilluminatör ile görüntüleri alınmıştır.

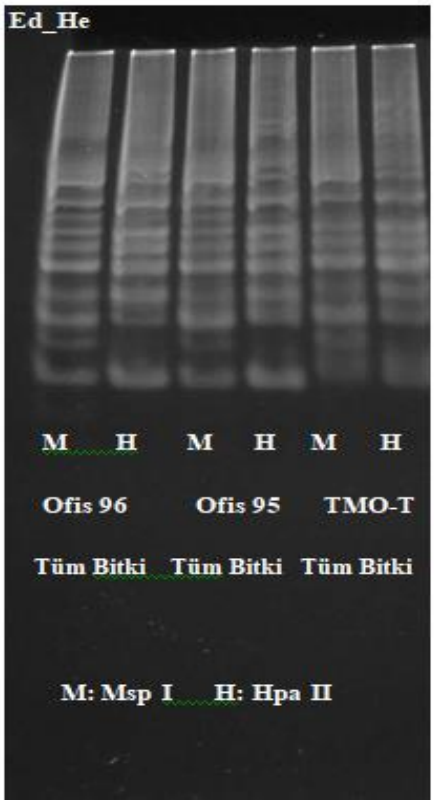
Çalışmamızda farklı primer kombinasyonları kullanılmıştır. Temel koordinat analizi (PCoA) "msap" programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler, BIA içeriklerine göre gruplandırılmış örnekler ile gerçekleştirilmiştir. Primer kombinasyonları ile elde edilen görüntüler şekillerde gösterilmiştir.

Ed_Hd primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H : Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



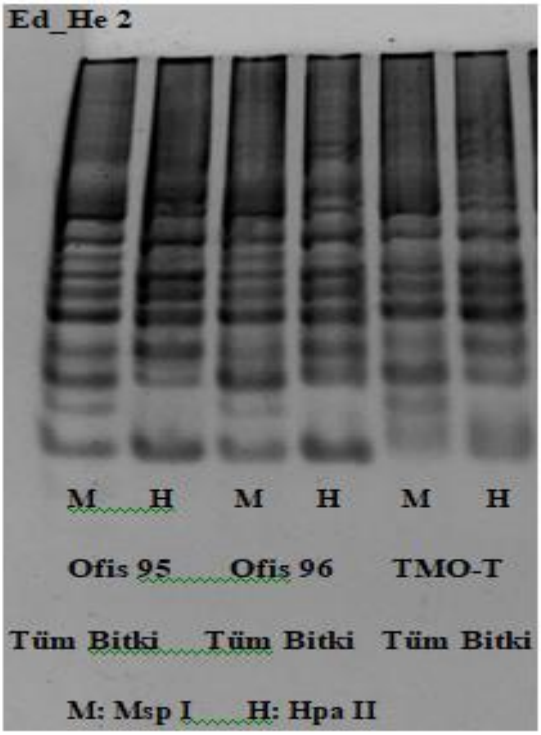
Şekil 4.5 Ed_Hd ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ed_He primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H : Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



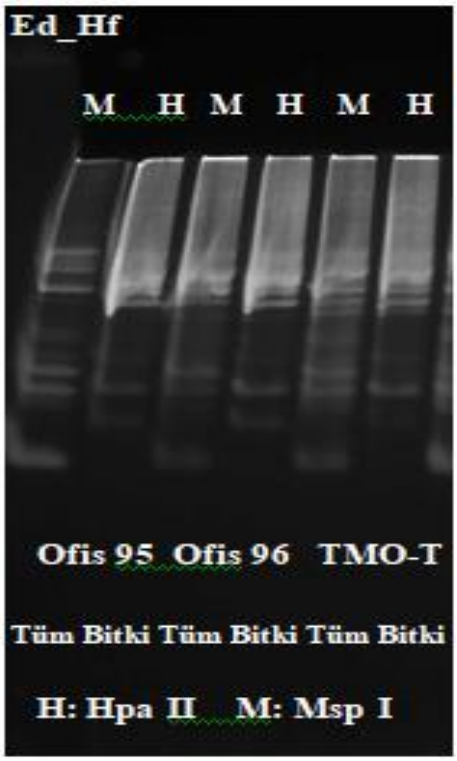
Şekil 4.6 Ed_He ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ed_He 2 primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H : Hpa II) Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



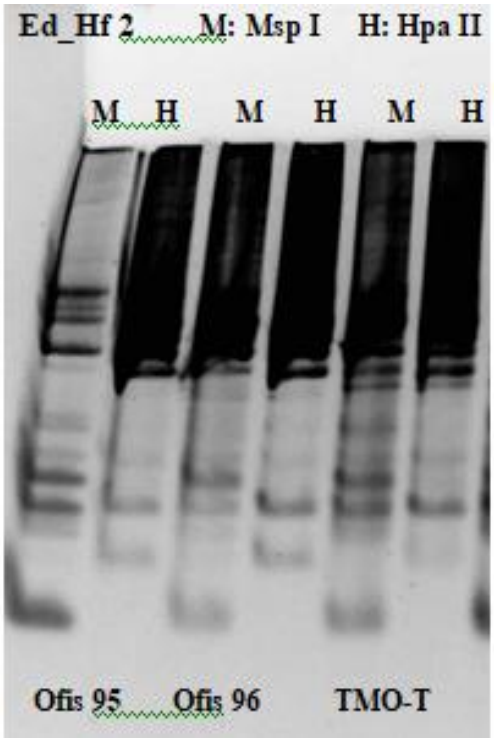
Şekil 4.7 Ed_He 2 ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ed_Hf primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H : Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



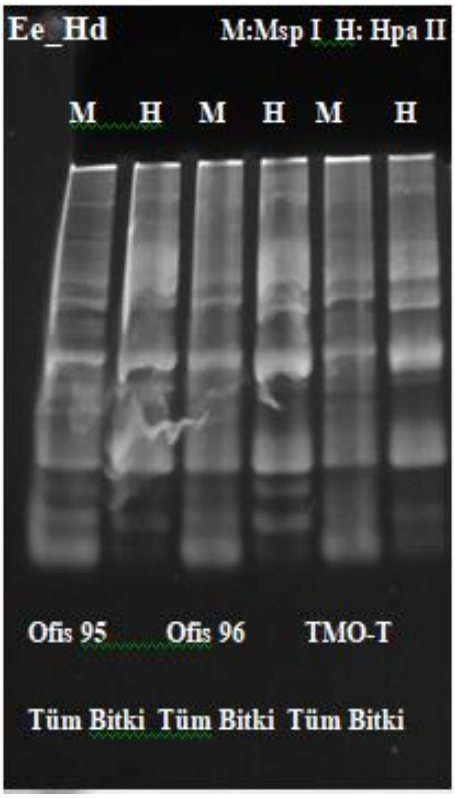
Şekil 4.8 Ed_Hf ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ed_Hf 2 primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H : Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



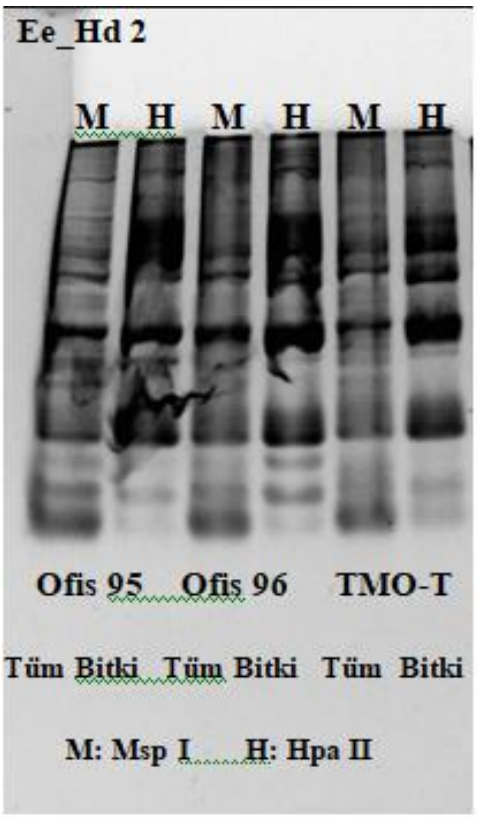
Şekil 4.9 Ed_Hf 2 ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ee_Hd primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H : Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



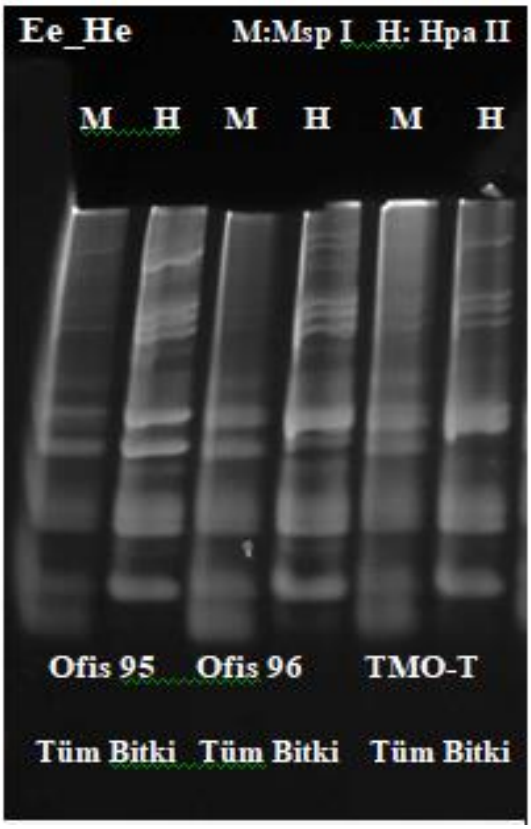
Şekil 4.10 Ee_Hd ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ee_Hd 2 primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H : Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



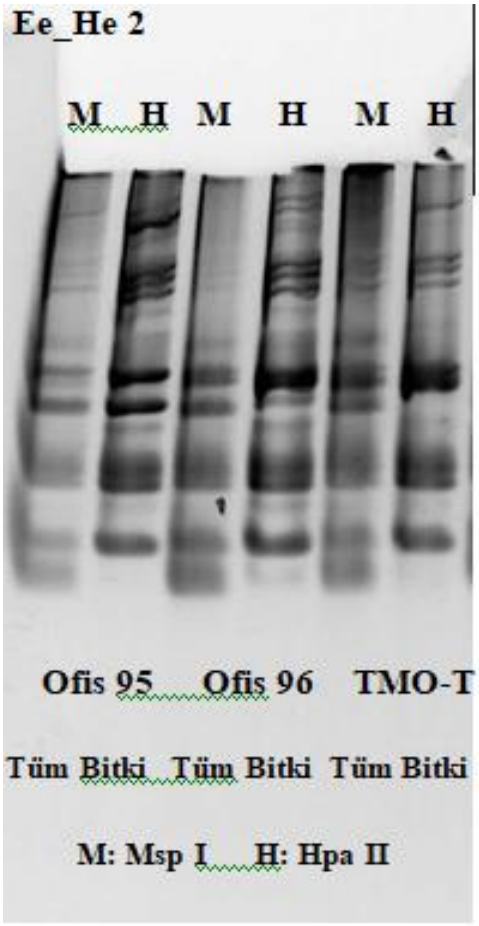
Şekil 4.11 Ee_Hd 2 ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ee_He primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H : Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



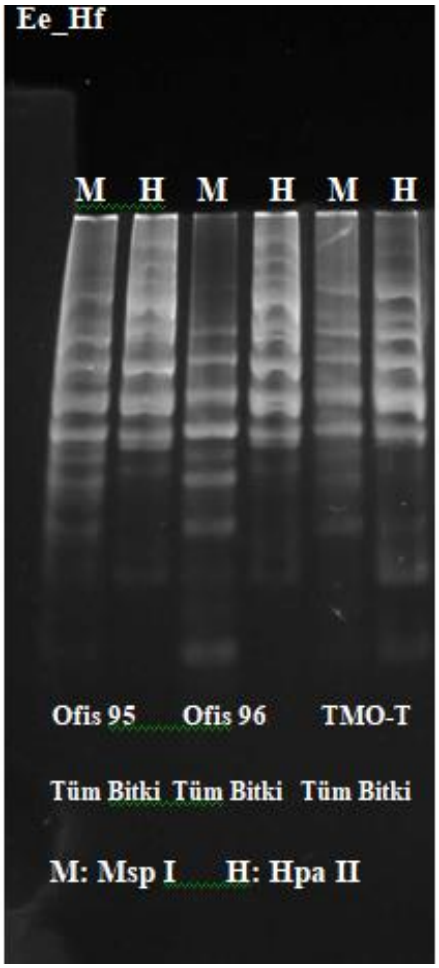
Şekil 4.12 Ee_He ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ee_He 2 primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H :Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.13'de gösterilmiştir.



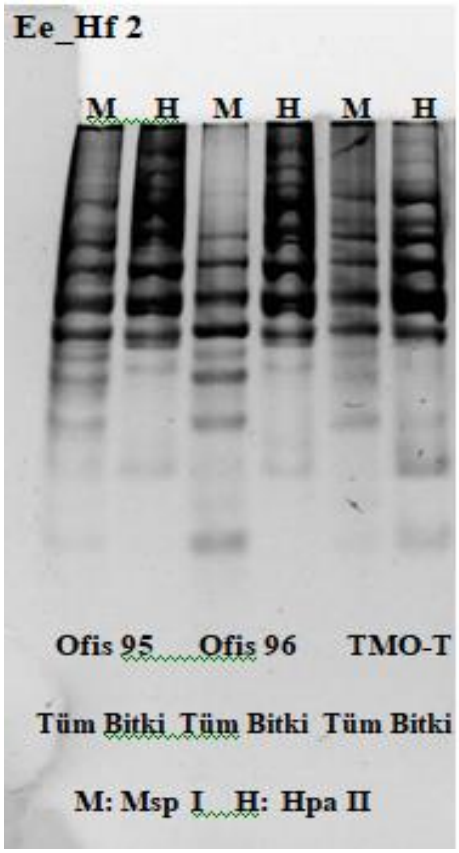
Şekil 4.13 Ee_He 2 ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ee_Hf primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H :Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14 Ee_Hf ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ee_Hf 2 primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H :Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.15'de gösterilmiştir.



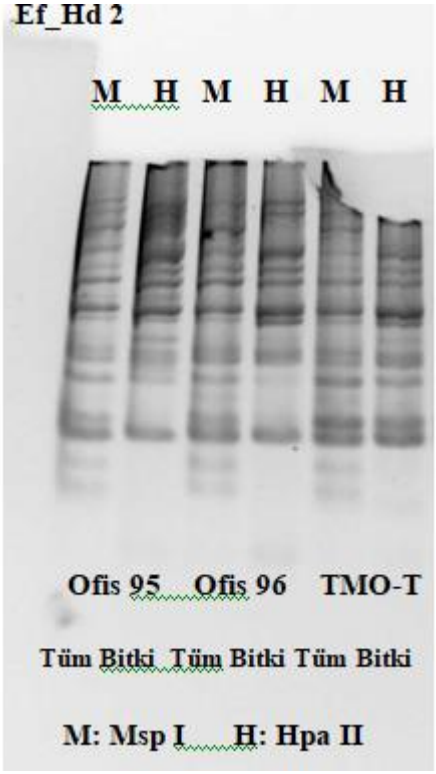
Şekil 4.15 Ee_Hf 2 ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ef_Hd primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H :Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



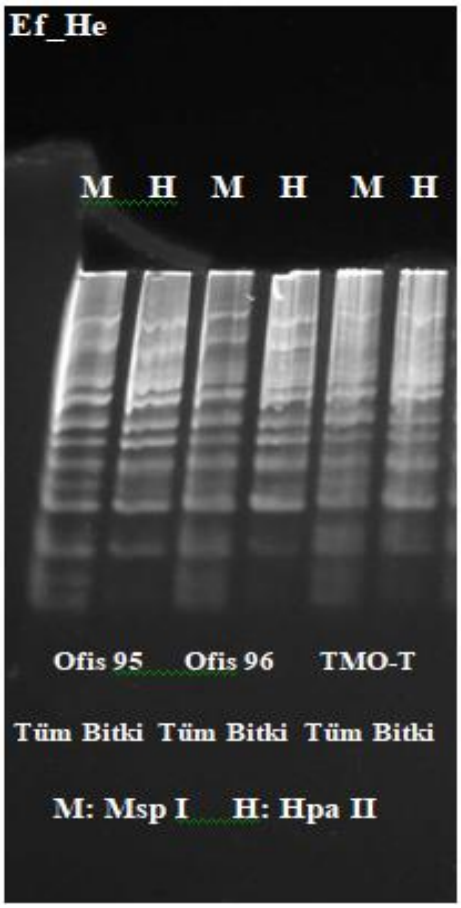
Şekil 4.16 Ef_Hd ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ef_Hd 2 primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H :Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



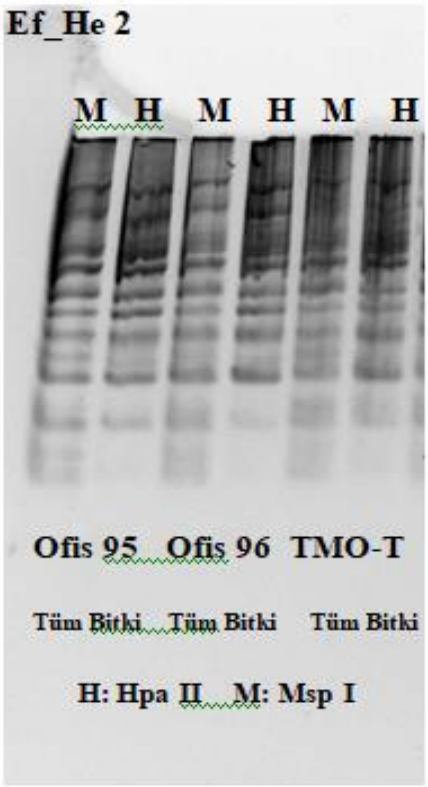
Şekil 4.17 Ef_Hd 2 ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ef_He primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H :Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



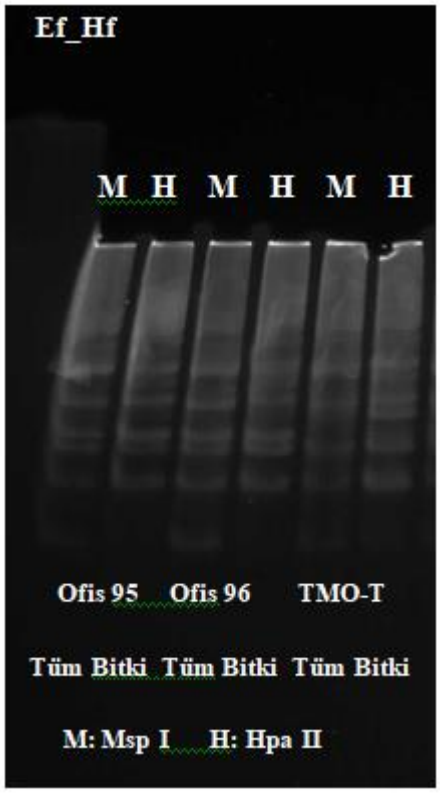
Şekil 4.18 Ef_He ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ef_He 2 primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H :Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



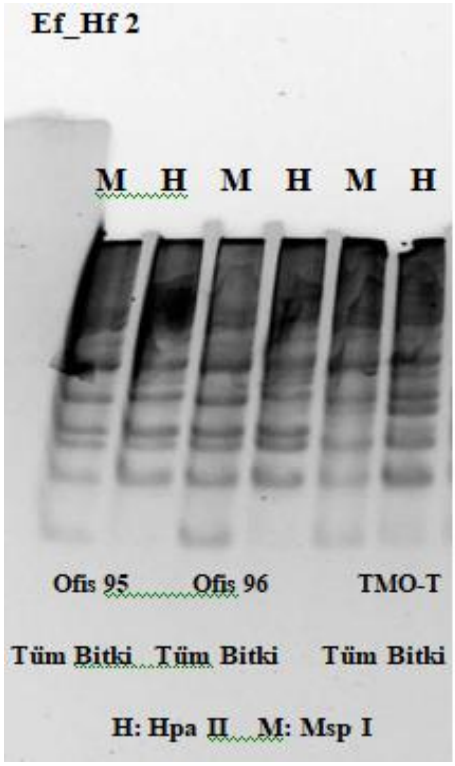
Şekil 4.19 Ef_He 2 ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ef_Hf primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H :Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20 Ef_Hf ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

Ef_Hf 2 primerine ait bant görüntüsü, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki örneği için (M : Msp I ve H :Hpa II) olacak şekilde Şekil 4.21'de gösterilmiştir.



Şekil 4.21 Ef_Hf 2 ait Bant görüntüsü (Orijinal 2019).

4.4 Skorlama Sonuçları

Açıkça ayırt edilebilir DNA parçaları, örnekler için mevcut (1) veya yok (0) olarak bir ikili matris formunda puanlanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.

Ed_Hd primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Ed_Hd skorlama sonuçları

Ed_Hd	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1

Ed_He primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Ed_He skorlama sonuçları

Ed_He	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	1	0	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	0	1	0

Ed_He 2 primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Ed_He 2 skorlama sonuçları

Ed_He 2	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	1	0	1
	0	0	0	1	0	0
	1	0	1	0	1	1
	1	0	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	0	1
	1	0	0	0	1	0
	1	1	1	1	1	1

Ed_Hf primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 Ed_Hf skorlama sonuçları

Ed_Hf	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	1	1
	0	0	0	0	1	1
	1	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	0	1	0

Ed_Hf 2 primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.6'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 Ed_Hf 2 skorlama sonuçları

Ed_Hf 2	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	1	0	1	0	1	0
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	0	1	0

Ee_Hd primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 Ee_Hd skorlama sonuçları

Ee_Hd	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	1	1	0	1	1	1
	1	0	0	1	1	1
	1	0	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	1	0	0
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	0
	1	0	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0

Ee_Hd 2 primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 Ee_Hd 2 skorlama sonuçları

Ee_Hd 2	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	0	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	0
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	0
	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0

Ee_He primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 Ee_He skorlama sonuçları

Ee_He	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	0	0	0	1	0	1
	0	0	0	1	0	0
	0	1	0	1	1	1
	0	1	0	1	0	0
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	0	1	0
	0	0	0	0	0	0

Ee_He 2 primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10 Ee_He 2 skorlama sonuçları

Ee_He 2	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	1	1	0	1	0	1
	1	1	0	1	0	1
	0	1	0	1	1	1
	0	1	0	1	0	0
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	0
	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	0	1	0
	0	0	0	0	0	0

Ee_Hf primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11 Ee_Hf skorlama sonuçları

Ee_Hf	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	0	1
	0	1	0	1	1	1
	1	1	1	1	0	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	0
	1	0	1	0	1	0
	0	0	1	0	0	1
	0	0	1	0	0	0
	0	0	1	0	1	1

Ee_Hf 2 primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12 Ee_Hf 2 skorlama sonuçları

Ee_Hf 2	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	0	1	0	1	0	1
	0	1	0	1	0	1
	0	1	0	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	0	0	0
	1	0	1	0	1	0
	1	0	1	0	1	1
	0	0	1	0	0	1

Ef_Hd primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.13'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13 Ef_Hd skorlama sonuçları

Ef_Hd	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	1	0	0	1	0	0
	1	1	1	0	1	0
	1	0	0	0	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	1	1
	1	1	1	1	1	1

Ef_Hd 2 primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.14'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.14 Ef_Hd 2 skorlama sonuçları

Ef_Hd	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	1	0	0	1	0	0
	1	1	1	0	1	0
	1	0	0	0	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	1	1
	1	1	1	1	1	1

Ef_He primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.15'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.15 Ef_He skorlama sonuçları

Ef_He	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0
	0	0	1	0	0	0
	1	0	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	0	1	0

Ef_He 2 primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.16'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16 Ef_He 2 skorlama sonuçları

Ef_He	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	0	0	1	0	0	0
	1	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	0	1	1
	1	0	1	0	1	0

Ef_Hf primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.17'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.17 Ef_Hf skorlama sonuçları

Ef_Hf	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	0	1
	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0
	1	0	1	0	1	1

Ef_Hf 2 primerine ait skorlama sonuçları, tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerinde tüm bitki olacak şekilde Çizelge 4.18'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.18 Ef_Hf 2 skorlama sonuçları

Ef_Hf 2	Ofis 95 Tüm Bitki Msp I	Ofis 95 Tüm Bitki Hpa II	Ofis 96 Tüm Bitki Msp I	Ofis 96 Tüm Bitki Hpa II	TMO-T Tüm Bitki Msp I	TMO-T Tüm Bitki Hpa II
	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	0	1
	0	0	1	1	0	1
	0	0	0	0	0	0
	1	0	1	1	1	1

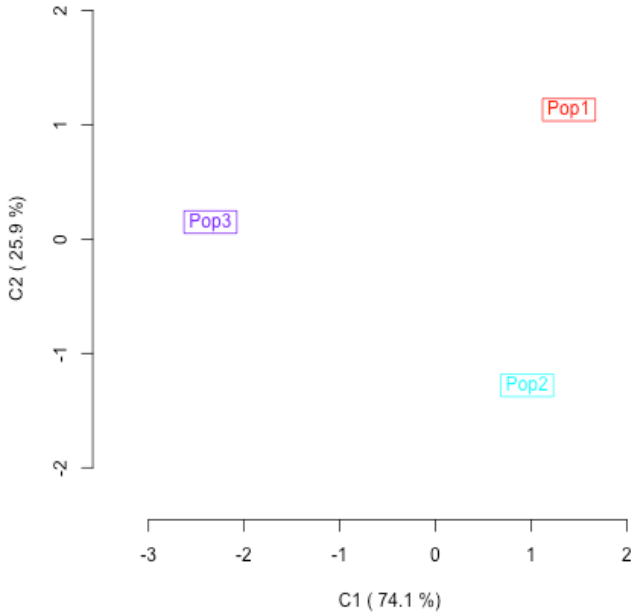
4.5. Filogenetik Analizler ve Sonuçları

Analizlerden elde edilen DNA fragmanları profillenerek örneklendirilmiştir. Aralarında farklılık bulunan bantların analizi *Msap* Rprogramı kullanılarak toplam 194 tane bant analizi yapılmıştır. Farklı primer kombinasyonları sonucunda bant analizleri elde edilmiştir. 96 tane metilasyona duyarlı lokus (methylation susceptible loci: MSL) ve 98 tane de metillenmemiş lokus (non-methylated loci: NML) elde edilmiştir. Polimorfik MSL bant sayısı 46 (% 48), ve NML 17 (% 17) olarak hesaplanmıştır. Örneklere ait metilasyon profillerinin frekansları Çizelge 4.19'da verilmiştir.

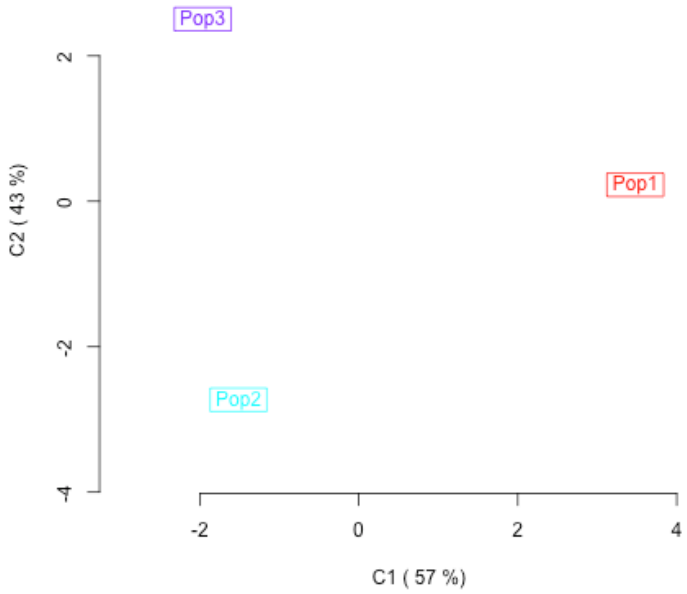
Çizelge 4.19 Ofis 95, Ofis 96 ve TMO-T örneklerinin metilasyon profil frekansları

Metilasyon Durumları	Populasyon 1 Ofis 95 Tüm Bitki	Populasyon 2 Ofis 96 Tüm Bitki	Populasyon 3 TMO-T Tüm Bitki
HPA+/MSP+ (Metillenmemiş)	0.2500	0.2292	0.1875
HPA+/MSP- (Hemi-metilasyon)	0.2396	0.3438	0.3333
HPA-/MSP+ (İç sitozin Metilasyonu	0.2917	0.3125	0.2708
HPA-/MSP- (Tam Metilasyon)	0.2188	0.1146	0.2083

Örneklerin MSL ve NML PCo grafikleri Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'de gösterilmiştir.



Şekil 4.22 Örneklerin NML (non-methylated loci) PCo gösterimi. Pop1: Ofis 95, Pop2: Ofis 96, Pop3: TMO-T.



Şekil 4.23 Örneklerin MSL(methylation susceptible loci) PCo gösterimi. Pop1: Ofis 95, Pop2: Ofis 96, Pop3: TMO-T.

5. TARTIŞMA

DNA metilasyonu çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynar. Genel olarak, bitkiler çevresel değişikliklere dayanmak için epigenetik mekanizmalar kullanır. Farklılıkların gelişme derecesi, organ tipi gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğu dinamik bir süreçtir**.**

MSAP tekniği, haşhaş çeşitlerinin metilasyon durumunu profillemek için yapılmıştır. Toplam metilasyon seviyesi tüm çeşitlerde yüksek seyretmiştir. Örnekler arasındaki metillenmiş alanların frekansındaki küçük fark, küresel DNA metilasyon seviyesinin, analiz edilen çeşitlerdeki alkaloid içeriği üzerinde düşük etkiye sahip olduğunu ima etmektedir. Bu durum genomların yüksek tekrar içeriğine bağlanmaktadır.

Metilasyon frekansları çeşitleri arasında uyumlu olmasına rağmen, metilasyon desenleri örnekleri arasında farklılıklar ortaya koymaktadır. Bitki alkaloidlerinin savunma bileşikleri olarak hareket ettiği bilinmektedir (GÜrkok vd 2015; Matsuura ve Fett-Neto 2017). Kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında, yüksek BIA içeriği olan numuneler arasında gözlenen de-metilasyon paterni, alkoloid biyosentezinde yer alan savunma genlerinin ekspresyonu ile ilişkili olabilmektedir.

BIA biyosentezi sırasında; morfin, tebain ve noscapine, farklı yollar yoluyla S-retikulin'den türetilmektedir. Tebainin morfine dönüşümü iki çatallı bir yolla gerçekleşmektedir ve tebain morfinin bir öncüsü olurken, norcapinenin sentezi BIA yolunda tamamen farklı bir dalda ilerlemektedir (Beaudoin ve Facchini 2014). Biyosentezde gözlenen bu fark, MSAP analizi sonucunda epigenetik ve genetik olarak da görülmüştür.

Metilasyon durumunun Arabidopsis'deki dokular arasında büyük ölçüde değiştiği bulunmuştur (Widman et all 2014). Organa özgü epigenetik işaretler A. thaliana'da bitki çoğalmasına katkıda bulunmuştur (Wibowo et all 2016). Burada ayrıca epigenetik değişikliklerin organa özgü bir şekilde eşlik ettiğini sunulmuştur.

Gürkök ve arkadaşları (2015) yılında yapmış olduğu çalışmada farklı alkaloit tiplerinin organa özgü biyosentezi ile ilişkili olarak BIA genlerinin farklı ekspresyonu daha önce bildirilmiştir. Kapsüllerin alkaloid birikme yerleri olduğu ve alkaloid biyosentez bölgelerini kaynakladığı öne sürülmüştür.

Bu çalışmada, MSAP tekniğinin DNA metilasyon analizi için kullanılabilir ve güvenilir bir çalışma yöntemi olduğu doğrulanmıştır. Farklı DNA metilasyon durumlarının özellikle alkaloid içeriğinin değişimi durumunda, önemli bir biyolojik anlamı taşıyabileceği bulunmuştur.

Çalışmamızda TMO tarafından tescillenmiş Afyon yöresinde yaygın olarak ekimi gerçekleştirilen haşhaş bitkisine ait Ofis 95, Ofis 96 ve TMO-T örnek çeşitleri farklı MSAP markörü kullanılarak DNA metilasyon seviyeleri farklılıklarına göre, metilasyona duyarlı amplifikasyon polimorfizmi (MSAP) yöntemi kullanılarak kıyaslanmıştır.

Bu yöntemle CCGG dizileri HpaII ve MspI enzimleriyle eşit olarak kesime uğramıştır. Metillenmiş CGG dizileri HpaII enzimi ile kesilmemiş, MspI enzimi ile kesilmiştir. Metillenmemiş diziler ise iki enzimle birlikte kesim işlemi görmüştür. PZR basamağında metilasyon bulunuyorsa HpaII enzimi DNA dizisini kesemeyecek ve sonucunda amplifikasyon başarıyla sonuçlanmış olacaktır.

Tebain yolağının keşfi, haşhaş bitkisinde morfin biyosentetik yolu boyunca salutaridinol-7-O-asetattan thebaine geçişin daha önce enzimatik olmayan bir şekilde pH 8-9 arasında ilerlediği iddia edilerek başlanmıştır. Ph 6-7'de asetat, bir azonin türevine dönüştürülmüştür. Bu dönüşüm reaksiyonları, olası bir protein katalizörü aramak için *Papaver somniferum* L. protein ekstreleri kullanılarak yeniden ziyaret edilmiştir. Kalıntıların ve inhibitör düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin *Papaver somniferum* L. lateksinden çıkarılmasından sonra, bu lateks serumunun salutaridinol-7-O-asetatı yüksek fizyolojik pH 7.0' da yüksek verim ile tebaine dönüştürdüğü gösterilmiştir (Fisinger 2007).

6. SONUÇ

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinde tebain biyosentezi yolağında görev alan gen ve gen bölgeleri üzerinde epigenetik düzenlemelerin en önemlilerinden olan metilasyon etkilerinin "Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi" (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism) yöntemi ile belirlenmesi çalışması yapılmıştır. Bitki materyali olarak TMO'dan elde edilen tebain içeriği yüksek *Papaver somniferum* L. TMO-T çeşiti ile tebain içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitleri kullanılmıştır.

MSAP markörleri kullanılarak örnekler arasındaki DNA metilasyon seviyeleri metilasyona duyarlı amplifikasyon polimorfizmi (MSAP) tekniği kullanılarak karşılaştırılmıştır.

MSAP analiz tekniği ile CCGG dizileri HpaII ve MspI enzimleriyle eşit olarak kesilmiştir. Metillenmiş CGG dizileri HpaII le kesilmemiş MspI ile kesilmiştir. Metillenmemiş diziler ise iki enzimle birlikte kesilmiştir. PZR aşamasında gende metilasyon varsa HpaII DNA dizisini kesemeyecek ve amplifikasyon başarıyla sonuçlanmış olacaktır.

Çalışmamızda toplam 194 tane bant elde edilmiştir. Bu bantların 46 tanesi (% 48) polimorfik MSL iken 17 tanesi (% 14) NML olarak hesaplanmıştır.

Metillenmiş sitozin gen ifadesinin düzenlenmesinde etkilidir. Normal sitozinden farklı olmasından dolayı "DNA'nın beşinci bazı" olarak adlandırılmaktadır.

Çalışmamızda 4 farklı metilasyon deseni gözlemlenmiştir. Bunlar Tip I (HPA+/MSP+) metillenmemiş bölgeyi temsil eder, Tip II (HPA+/MSP-) hemi metilasyonlu bölgeyi temsil eder, Tip III (HPA -/MSP+) ise iç sitozin metilasyonunu temsil ederken Tip IV (HPA-/MSP-) tamamen metilenmiş bölgeyi ifade etmektedir. 3 populasyon içerisinde

yoğunluk en çok HPA+/MSP-(Hemi-metilasyon) ile HPA-/MSP+(İç sitozin Metilasyonu) kısımlarında görülmüştür.

Sonuçlara bakıldığında BIA içeriğine sahip haşhaş çeşitlerinin metilasyon profilininin farklı olduğunu görülmüştür. Populasyonların Msap r programına göre elde edilen değerleri bu farklılığı göstermiştir. Ayrıca NML (non-methylated loci) ve MSL(methylation susceptible loci*)* PCo gösterimi ile örneklerin Pop1: Ofis 95, Pop2: Ofis 96, Pop3: TMO-T ayrımı şekillerdeki dağılımlarla görülmüştür.

KAYNAKLAR

Anonim, 2017. 2016 Yılı Haşhaş Sektör Raporu. Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü. [http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/hashassektorraporu2017.pdf] (Erişim Tarihi: 15.08.2017).

Anonim, 2015. 2014 Yılı Haşhaş Sektör Raporu. TMO Genel Müdürlüğü, Ankara. [http://tarim.kalkinma.gov.tr/wpcontent/uploads/2015/12/2014%20hasha%C5%9F%20sektorraporu.pdf] (Erişim Tarihi: 15.08.2017)

Anonim, 2013. Türkiye İstatistik Kurumu Verileri, [http://tuikapp.tuik.gov.tr/ bitkiselapp/ bitkisel.zul], (Erişim Tarihi: 13.07.2013)

Anonim, 2019. 2018 Yılı Haşhaş Sektör Raporu. TMO Genel Müdürlüğü, Ankara. [http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/hashassektorraporu2018.pdf] (Erişim Tarihi: 12.08.2018)

Arslan N. Baydar H, Kızıl S, Karik Ü, Şekeroğlu N, Gümüşçü A. 2015. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretiminde Değişimler ve Yeni Arayışlar. TMMOB Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı–I, 483–505, Ankara.

Arslan, Y., Katar, D., Kayaçetin, F., Subaşı, İ. 2008. Afyon (Opium) Alkaloitleri ve Önemi. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi 17 , (1-2).

Atakişi Kİ. 1999. Yağ Bitkileri Yetiştirme ve Islahı Ders Kitabı Notları. Trakya Üniversitesi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi, Yayın No: 148.

Beaudoin ve Facchini. 2014. Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy Epub, 240 (1): 19-32.

Davis PH, Mill RR, Tan K. 1988. The Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Vol 1-10.

Facchini, P, J, 2007. Opium poppy, blueprint for an alkaloid factory Phytochem Rev, 6,97-124.

Fisinger, U. Grobe N. 2007. Thebaine Synthase: a new enzyme in the morphine pathway in papaver somniferum. Natural Product Communication, 249-253.

Fisinger U. Grobe, Zenk MH. 2007. Thebaine synthase: a new enzyme in the morphine pathway in P.somniferum. Nat Prod Commun, 249-253.

Fulnecek, J., Kovark A., 2014. How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) profiles Genetics 15, 2–9.

Gürkök, T., Türktaş, M., Parmaksız, İ., Ünver, T., 2015. Elisitör Kaynaklı Afyon Haşhaşında Alkaloid Biyosentezinin Transkriptom Profili,.Bitki Mol Biol Rep, 33: 673 – 688.

Gürkök, T., Parmaksız İ., Boztepe G., ve Kaymak E., 2010. "Haşhaş (Papaver somniferum L.) Bitkisinde Alkaloid Biyosentez Mekanizması" BiyoTeknoloji Elektronik Dergisi, 1(2) 31-45.

Gürkök, T , Parmaksız, İ , Ünver, T . 2016. Identification and sequence analysis of alkaloid biosynthesisgenes in Papaver section Oxytona. Turkish Journal of Biology , 40 (1) , 174-183.

İncekara, F., 1972. Endüstri Bitkileri ve Islahı, Cilt:2, Yağ Bitkileri ve Islahı. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 33, İzmir.

İncekara F. 1979. Endüstri Bitkileri ve Islahı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Cilt-2, No:68.

İşler, N., 2013. Haşhaş Tarımı. M.K.Ü Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri. [http://www.mku.edu.tr/files/898-595293aa-9378-4c9f-8650-e3066e00eaab.pdf] (Erişim Tarihi: 13.07.2013)

Koç, H., Camcı H., Kadiroğlu A. ve Gür K. 2006. Seçilmiş Bazı Haşhaş Hatlarının Morfin Yönünden Değerlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma. Journal of Crop Research (Bitkisel Araştırma Dergisi), 1:31-35.

Küçük, Y.N., 1996. Türkiye'nin Çesitli Yörelerinde Yetiştirilen Haşhaş Bitkilerinde Alkaloidlerin Esktraksiyonu ve Ekstraksiyonların Susuz Fen Ortamlarda

Özelliklerinin İncelenmesi. Basılmamış Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Matsuura ve Fett-Neto. 2017. Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity and Mechanisms of Action . Plant Toxins, 243-261, Spain.

Otto W. 1885. Thomé Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz Gera, Germany.

Önmez, H., 2007. Papaver somniferum Bitkisinden Elde Edilen Alkaloidlerin Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözücü Ve Metodların Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Paul, L. S. Jr., 2002. School of Pharmacy, University of Pittsburgh, 513.

Pérez-Figueroa A. 2013. Msap: a tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data. Epub Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, 13(3):522-7, Spain.

Reyna-López G. A., 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, 703–710.

Tanker, M. ve Tanker, N., 2003. Farmakognozi Cilt.1. Ankara Ünv.. Eczacılık Fak.. Yayınları, No: 66. Ankara.

Tanker, M.ve Tanker,N. 1990. Farmakognozi, Cilt 2, Ankara Üniversitesi Eczacılık Yayınları.

TMO,[http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/hashassekt rraporu.pdf] (Erişim Tarihi: 01.03.2020)

Wibowo ve diğ. 2016. Hyperosmotic stress memory in *Arabidopsis* is mediated by distinct epigenetically labile sites in the genome and is restricted in the male germline by DNA glycosylase activity. eLife, 5e13546.

Widman, N, Feng S, Jacobsen E, Pellegrini M. 2014. Epigenetic differences between shoots and roots in Arabidopsis reveals tissue-specific regulation. Epigenetics 9, 1-7.

Wilhelm, O. 1885 Thomé Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, Germany.

Windholz, M., Budavarı, S., Blumetti, R.F. and Otterbein, S.E., 1983. The Merck Index tenth edition , Publishes by Merck Co, 972-975.

Yadav, H.K., Shukla, S. Singh, S.P 2006. Genetic variability and interrelationship among opium and its alkaloids in opium poppy (Papaver somniferum L). Euphytica, 15, 208-214.

Zulak, K.G, Liscombe, D.K., Ashihara, H. and Facchini, P.J, Crozier, A., Clifford, N., Ashihara, H. 2006. Plant Secondary Metabolites In: Alkaloids, Blackwell Publishing, 102-136.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Zehra AYDINLI
Doğum Yeri: Çankaya/ANKARA
Doğum Tarihi: 10.08.1994
Medeni Hali: Bekar
Yabancı Dili: İngilizce
Tel : 05428911170

Adres: Çankırı Karatekin Üniversitesi, Uluyazı Kampüsü, Fen Fakültesi

E-posta: zeaydinli@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise: Sabahattin Zaim Anadolu Lisesi, (2008)
Lisans: İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, (2012)
Yüksek Lisans: Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü (2020)