ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EPİGENETİK DÜZENLEMELERİN HAŞHAŞ (Papaver somniferum L.) BİTKSİNDE MORFİN YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Betül BULUT

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

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

Betül BULUT

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN

DNA metilasyonu, ökaryotlar canlılarda gen transkripsiyon aktivitesinin kontrol edilmesini kolaylaştıran önemli bir epigenetik süreçtir. Belirlenen genin metilasyon durumu hakkındaki bilgiler, ilgili genin regülasyonu hakkında bilgi vermektedir. Bu çalışmada önemli alkaloit kaynağı (BIA) olan haşhaş, (*Papaver somniferum L.)* bitkisinde morfinin biyosentez yolağında rol olan gen ve gen bölgeleri üzerinde epigenetik düzenlemelerden en önemlisi olan metilasyonun etkileri ilk kez araştırılmıştır. Araştırmada materyal olarak TMO'dan elde edilen morfin içeriği yüksek *P. somniferum* Ofis 1 ve Ofis 2 çeşitleri ile morfin içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 afyon haşhaş çeşitleri, 21 MSAP markör kullanılarak çeşitler arasındaki metilasyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. DNA metilasyon seviyeleri "Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi" (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism - MSAP) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada aynı zamanda morfin içerikleri farklı haşhaş çeşitlerinin yaprak, kapsül ve gövde dokuları kullanılmış ve metilasyonun morfin biyosentezindeki rolünün yanısıra farklı organlar üzerindeki etkileri de aydınlatılmıştır. Sonuçlar bize farklı BIA içeriğine sahip afyon haşhaş çeşitlerinin metilasyon profilininin farklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca Çeşitlerin kapsül ve yaprak doku örnekleri bakımından da farklı metilasyon profili göstermektedir. Gen ifadesini düzenleyiciler gen ekspresyonunu dokuya özgü etkileyerek bizim çalışmamızda farklı metilasyon profilini görmemize sebep olmuştur. Farklı DNA metilasyon durumu, özellikle afyon haşhaşındaki alkaloit içeriği söz konusu olduğunda önemli biyolojik anlamlara sahip olabilir. Farklı organlarda ortaya çıkan farklı epigenetik profiller bize DNA metilasyonun BIA biyosentezi üzerinde etkili olabileceğini ve bunun da organ seviyesinde daha da belirgin ve önemli olduğunu göstermiştir.

2020, 70 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Afyon Haşhaş, Epigenetik, BIA, Metilasyon, MSAP

ABSTRACT

Master Thesis

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

Betül BULUT

Çankırı Karatekin University

Institute of Science

Department of Biology

Supervisors: Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN

DNA methylation is an important epigenetic process that facilitates the control of gene transcription activity in eukaryotes. The information about the methylation status of genes provides information on the regulation of the gene of interest. In this study, the effects of methylation which is the most important epigenetic regulation on the genes that are involved in morphine biosynthesis pathway in poppy, (*Papaver somniferum* L.) plant, which is an important alkaloid source (BIA), were investigated for the first time. *P. somniferum* varieties of Ofis 1 and Ofis 2 with high morphine content and varieties of Office 95 and Ofis 96 opium poppy with low morphine content were obtained from TMO, and 21 MSAP markers were used to compare methylation levels of them. DNA methylation levels were determined using the Methylation Sensitive Amplification Polymorphism - MSAP method. In the study, leaf, capsule and stem tissues of different poppy cultivars with different morphine contents were used and the role of methylation in morphine biosynthesis as well as their effects on different organs were also elucidated. The results show us that the methylation profile of opium poppy varieties with different BIA content is different. It also shows different methylation profiles in terms of capsule and leaf tissue samples of cultivars. Regulators of gene expression influenced gene expression by organ-specific effects, revealed different methylation profiles in our study. The different DNA methylation state may have important biological meanings, especially when it comes to the alkaloid content in opium poppy. The different epigenetic profiles in different organs have shown us that DNA methylation may have an impact on BIA biosynthesis, even more dramatic and higher impact at organ level.

2020, 70 pages

KEY WORDS: Opium Poppy, Epigenetics, BIA, Methylation, MSAP

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Seminer çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım. Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, hayata bakışımı şekillendiren başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca TOPRAK MASULLERİ OFİSİ GENEL MÜDÜRLÜĞÜ, Haşhaş ve Alkaloid İşleri Dairesi Başkanlığına çalışmamızda kullandığımız haşhaş çeşitlerini bize temin ettiği için teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi BAP Birimi FF061218L04 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

Betül BULUT
Çankırı, Ocak 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET……..……..……..... ii
ABSTRACT....……..……iii
TEŞEKKÜR ……..… ……iv
SİMGELER DİZİNİ…….....vi
ŞEKİLLER DİZİNİ…….....…….vii
ÇİZELGELER DİZİNİ…...……..viii
1. GİRİŞ…….....1-3
2. KURAMSAL TEMELLER.....…….....4
2.1 Haşhaş (*Papaver somniferum L.)* ve Önemi 4-5
2.2 BIA ve Morfin Yolağı.....5-8
2.3 DNA Metilasyonu…….....8-10
2.4 Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP)……..….....10-13
2.5 Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)……...…...…..... 13-14
3. MATERYAL VE YÖNTEM......15
3.1 Materyal…….....…..….. .15- 16
3.2 Yöntem…….....…..……16
3.2.1 Haşhaş çeşitlerinin ekimi ve yetiştirilmesi…….....……..……..…....16-17
3.2.2 DNA izolasyonu……...…….....17-18
3.2.3 Metilasyona duyarlı amplifikasyon polimorfizmi (MSAP) analizi.…….....18
3.2.3.1 Restriksiyon enzimleri ile kesim …..…..……..…..…....18
3.2.3.2 Adaptör bağlama (Ligasyon).....19
3.2.3.3 Ön seçim polimeraz zincir (PZR) reaksiyonu.…..……..….....20
3.2.3.4 Seçim polimeraz zincir (PZR) reaksiyonu….……...……20-21
3.2.3.5 Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) …….....22-23
3.2.4 Skorlama…….....…….23
4.BULGULAR…….....…….....24
4.1 Çeşitlere Ait Örneklerin Toplanmasına Ait Sonuçlar……...…....24-25
4.2 Haşhaş Çeşitlerine Ait DNA İzolasyon Sonuçları…..……..…..…….25-27
4.3 MSAP Yöntemine Ait Sonuçlar…….....27-41
4.4 SkorlamayaAit Sonuçlar…….....42-59
4.5 Filogenetik Analizler ve Sonuçları …...……...……...…….....60-61
5.TARTIŞMA VE SONUÇ…….....62-65
KAYNAKLAR…….……..66-69
ÖZGEÇMİŞ…….....70

SİMGELER DİZİNİ

ug	Mikrogram
ul	Mikrolitre
uM	Mikromolar
bp	Baz çifti
dk	Dakika
M	Molarite
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
℃	Celsius
$pmol$	Pikamol
rpm	Dakikadaki devir sayısı
A	Absorbans değeri

KISALTMALAR

AFLB	Çoğaltılmış parça uzunluğu
DdH_{2o}	Deiyonize su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
EDTA	Ethilendiamintetraasetik asit
SSR	Basit dizi tekrarları
MSAP	Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
RNA	Ribonükleik asit
TBE	Tris-Borik asit-EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2.1 BIA yolağı……..…….....…….....6
ŞEKİL 2.2 DNA baz diziliminde guaninden önce önce gelen sitozinin 5. karbonuna bir metil (-CH_3) grubunun bağlanması……..……10
ŞEKİL 2.3 Metilasyona duyarlı Hpa-II ve metilasyona duyarsız Msp-I enzimlerinin kesim şekilleri..……...…..……....11
ŞEKİL 2.4 Msp-I ve Hpa-II enzimlerinin 5-CCGG metilasyon durumuna duyarlılıkları …….....……...…..…13
ŞEKİL 3.1 Haşhaş çeşitlerine ait tohumlar……...…....……16
ŞEKİL 3.2 Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) sistemi..……..……..22
ŞEKİL 4.1 Bitkilerin yetiştirilmesi ……....……...……..24
ŞEKİL 4.2 Gelişen kapsül, gövde ve yapraklardan örnek …….……..25
ŞEKİL 4.3 Ofis 95 ve ofis 1 çeşitlerine ait DNA örneklerinin jel görüntüsü.....26
ŞEKİL 4.4 Ofis 96 ve ofis 2 çeşitlerine ait DNA örneklerinin jel görüntüsü……..26
ŞEKİL 4.5 Restriksiyon ile kesime ait jel görüntüsü …….……28
ŞEKİL 4.6 Pre-Amplifikasyona ait jel görüntüsü……..…….……28
ŞEKİL 4.7 Amplifikasyona ait jel görüntüsü…….....29
ŞEKİL 4.8 Jelin PAGE sistemde yürütülmesi…….……30
ŞEKİL 4.9 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……31
ŞEKİL 4.10 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……31
ŞEKİL 4.11 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……...32
ŞEKİL 4.12 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…32
ŞEKİL 4.13 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…33
ŞEKİL 4.14 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…33
ŞEKİL 4.15 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…34
ŞEKİL 4.16 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…34
ŞEKİL 4.17 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…35
ŞEKİL 4.18 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…35
ŞEKİL 4.19 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…36
ŞEKİL 4.20 Dokulara ait jel görüntüsü ……....…….……..…36
ŞEKİL 4.21 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…37
ŞEKİL 4.22 Dokulara ait jel görüntüsü …….…….……..…37
ŞEKİL 4.23 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……...…38
ŞEKİL 4.24 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…..38
ŞEKİL 4.25 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……...…39
ŞEKİL 4.26 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……...……39
ŞEKİL 4.27 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…40
ŞEKİL 4.28 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…40
ŞEKİL 4.29 Dokulara ait jel görüntüsü ……...…….……..…41
ŞEKİL 4.30 Çeşitlerin genetik olarak yakınlıklarını gösteren soyağacı(dendogram)..61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Adaptör dizileri ……...…….....19
Çizelge 3.2 Primer dizileri……...…….....21
Çizelge 4.1Çeşitlere ait dokuların DNA konsantrasyonları ve saflık dereceleri
…….....27
Çizelge 4.2 Dokulara ait skorlama sonucu…….....42
Çizelge 4.3 Dokulara ait skorlama sonucu…….....43
Çizelge 4.4 Dokulara ait skorlama sonucu…….....44
Çizelge 4.5 Dokulara ait skorlama sonucu…….....45
Çizelge 4.6 Dokulara ait skorlama sonucu…….....46
Çizelge 4.7 Dokulara ait skorlama sonucu…….....46
Çizelge 4.8 Dokulara ait skorlama sonucu…….....47
Çizelge 4.9 Dokulara ait skorlama sonucu…….....48
Çizelge 4.10 Dokulara ait skorlama sonucu…….....49
Çizelge 4.11 Dokulara ait skorlama sonucu….....50
Çizelge 3.12 Dokulara ait skorlama sonucu….....51
Çizelge 3.13 Dokulara ait skorlama sonucu...….....51
Çizelge 3.14 Dokulara ait skorlama sonucu…….....52
Çizelge 3.15 Dokulara ait skorlama sonucu...….....53
Çizelge 3.16 Dokulara ait skorlama sonucu….....54
Çizelge 3.17 Dokulara ait skorlama sonucu…….....55
Çizelge 3.18 Dokulara ait skorlama sonucu….....56
Çizelge 3.19 Dokulara ait skorlama sonucu….....57
Çizelge 3.20 Dokulara ait skorlama sonucu….....58
Çizelge 3.21 Dokulara ait skorlama sonucu….....59
Çizelge 3.22 Dokulara ait skorlama sonucu….....59
Çizelge 3.23 Örneklerin metilasyon profil sekansları.....60

1. GİRİŞ

Haşhaş (*Papaver somniferum L.),* içinde bulundurduğu alkoloidler sebebiyle önemli olan ve tıbbi amaç olarak kullanılan çok yönlü bir bitkidir. Rhodales takımında yer alan haşhaş Papaveraceae familyasından olup ülkemizde 28 türü bulunmaktadır (Davis et al. 1988, Anonim 2017, Yazıcı ve ark. 2017). Kapsüllerinde bulunan 20 kadar alkoloid tıbbi olarak kullanılmaktadır (İncekara 1972). İçeriğinde bulunan (BIA) adını verdiğimiz alkoloidler morfin, kodein, papaverin, narsein, narkotin, ve tebaindir (Gürkan ve ark. 2003).

Haşhaş ülkemiz ekonomisine büyük katkı sağlamaktadır. Türkiye hem morfin ve türevleri ihracatı yönünden, hem de tohum ihracatı ile dünya pazarlarında daimidir.

Haşhaş tarımı ve afyon üretimi ülkemizde serbest yapılmaktayken, 1933 yılında çıkan kanunlar ile birlikte kontrollü hale gelmiş ve 1971 yılında yasaklanmıştır. 1974'te ise afyon üretimi yasaklanmış ve yalnızca çizilmemiş haşhaş kapsül üretimi serbest hale gelmiştir (Anonim 2013a).

Bitkilerin büyümeleri ve gelişmesi esnasında çok sayıda üretilen organik bileşikler ikincil metabolit olarak adlandırılırlar. İkincil metabolitler, bitkilerde önemli işlevleri olan bileşenler olup bitki stres durumuyla karşı karşıya olduğunda sentezlenerek savunma mekanizması oluştururlar (Güven ve Gürsul 2014). Bitkileri herbivor ve patojenlere karşı savunurak bitkiyi varvaryonlara karşı korur ve gelişimine katkı sağlarlar. Şimdilerde yoğun olarak çalışılan ikincil metabolitler, alkaloidler, fenolik bileşikler, uçucu yağlar, saponinler, terpenoidler, resinler, antosiyaninler, taninlerdir (Anonim 2011).

İkincil metabolitler hücrede gen ekspresyon düzenleyicileri, bitki büyüme düzenleyicileri, ve transdüksiyon mekanizmalarında görev almaktadırlar (Güven ve Gürsul 2014).

Gen ekspresyonundaki değişmeler mRNA transkripsiyonu, translasyonu, işlenmesi, taşınması ve depolanması gibi değişmeler epigenetik olarak adlandırılan çeşitli mekanizmalar ile sağlanmaktadır. Bu epigenetik mekanizmalardan en önemlisi DNA metilasyonudur.

DNA metilasyonu, Sitozin ya da Adenin nülkleotidlerinin metillenmesi ile oluşan ve genleri susturan bir mekanizmadır. Genlerin prömotor bölgelerindeki metilasyonun azalması ile gen ifadesindeki artış arasında korelasyon bulunmaktadır. Genlerin promotor bölgelerinde metillenmede ve transkripsiyon faktörlerinin tanıma bölgelerinde değişiklikler yaparak, transkripsiyon faktörlerin bağlanmasını önleyerek gen ifadesinin baskılanmasına sebep olurlar. Embriyonik kök hücrenin tek bir çeşitten farklılaşması ile 200'den fazla farklı somatik hücreye dönüşmesinde bu mekanizma rol oynamaktadır. Farklı dokulardaki farklı genlerin ifade olmasında da etkili olmaktadır. Metilasyon oranı, genomdaki tekrar dizilerinin ve transpozonların CpG bölgelerinde fazladır, böylece transkripsiyon baskılanarak transpozonların genom içerisindeki hareketi engellenmekte ve böylece kromatin kararlılığı korunmaktadır (Yokuş 2013).

DNA metilasyonu, ökaryotlar canlılarda gen transkripsiyon aktivitesinin kontrol edilmesini kolaylaştıran önemli bir epigenetik süreç olarak adlandırılır. Belirlediğimiz genin düzenleyici sekansının metilasyon durumu hakkındaki bilgiler bize bu transkripsiyonel kontrol hakkında bilgi verir.

DNA metilasyonu, (Bi-seq) ve metilasyona duyarlı endonükleazlar kullanılarak kısıtlama kesimi de dahil olmak üzere farklı yöntemlerle tespit edilebilir. Metile Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP), bir organizmanın global DNA metilasyon durumunu ve diferansiyel kesim modeliyle belirlenen DNA metilasyon durumuna bağlı olarak, birbirinden ayırmak için kullanılan tekniktir. Bu teknik, DNA metilasyon haritalaması ve farklı şekilde metillenmiş genlerin konumlarını klonlanması için etkili bir yöntemdir.

Bu teknik ile birlikte, genomik DNA önce *Hpa* II vb. metilasyona duyarlı bir restriksiyon enzimiyle kesilir ve sonra amplifikasyonunu kolaylaştırmak amacıyla DNA frag-

manları adaptörlere bağlanır. *Hpa* II, *Msp* I'in metilasyona duyarsız bir *izoschizomerini* kullanarak kesim, deneyde bir yükleme kontrolü olarak bir paralel kesim reaksiyonunda kullanılır.

Oluşan bu fragmanlar flüoresan etiketli primerler yardımıyla seçici olarak büyütülür. Farklı türlerden gelen PCR ürünleri karşılaştırılması yapılıp, farklı polimorfik lokus tanımlandıktan sonra istenilen DNA fragmanı, denatürasyon poliakrilamid jelden izole edilir, dizilenir ve veritabanında bulunan diğer sekanslara benzerliklerine dayalı olarak tanımlanır (Yaish vd. 2014). MSAP polimorfik metilasyon lokuslarını belirlemek için güvenilir bir yöntemdir. Ancak bu yöntem DNA kesiminde kullanılan enzimlerin tanıma bölgeleri ile sınırlıdır.

Bu çalışma kapsamında, ülkemizin dünyadaki ana yetiştiricilerinden birisi olduğu ve üretmiş olduğu alkaloitler sebebiyle ekonomik değeri yüksek olan haşhaş bitkisinde morfin yolağında epigenetik düzenlemelerden metilasyonun etkileri **ilk kez** araştırılmıştır. Bugüne kadar haşhaş bitkisinde morfin yolağının aydınlatılması üzerine çalışmalar bulunmakla birlikte, epigenetik mekanizmaların bu yolak üzerindeki etkilerinin aydınlatılmasına yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla yapılan bu tez çalışması, bu alandaki ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) ve Önemi

Papaveraceae familyası Kuzey Yarımkürenin ılıman ve subtropik bölgelerinde yetişmektedir. 28 cinsten ve teşhisi yapılmış yaklaşık 250 türden oluşmaktadır. Bu familyadan ülkemizde 5 cins bulunmaktadır (Seçmen vd. 1995). Bu aileye ait olan ve ülkemiz çiftçisinin hayatında da önemli bir bitki olan haşhaş *(Papaver somniferum* L.) tek yıllık bir bitkidir. Anadolu'da Hititlerden bu yana tarımının yapıldığı bilinmektedir. Sıcak, tropik bölgelerde ve ülkemizde yetişmektedir (Eser vd. 2006). Türkiye çoğu bitkinin gen kaynağı olmakla beraber, haşhaş bitkisinin de anavatanıdır (Anonim 2013).

Haşhaş *(Papaver somniferum* L.), 60-200 cm kadar boylanan, kapsülleri kapalı, mor ve beyaz renkte çiçekleri olan tek yıllık bir bitkidir. Alkaloitler bitkinin kapsüllerinden elde edilmekte olup tohumlarında bulunmaz. Kapsüllerinde %1civarında alkaloit içermektedir (Koç vd. 2006).

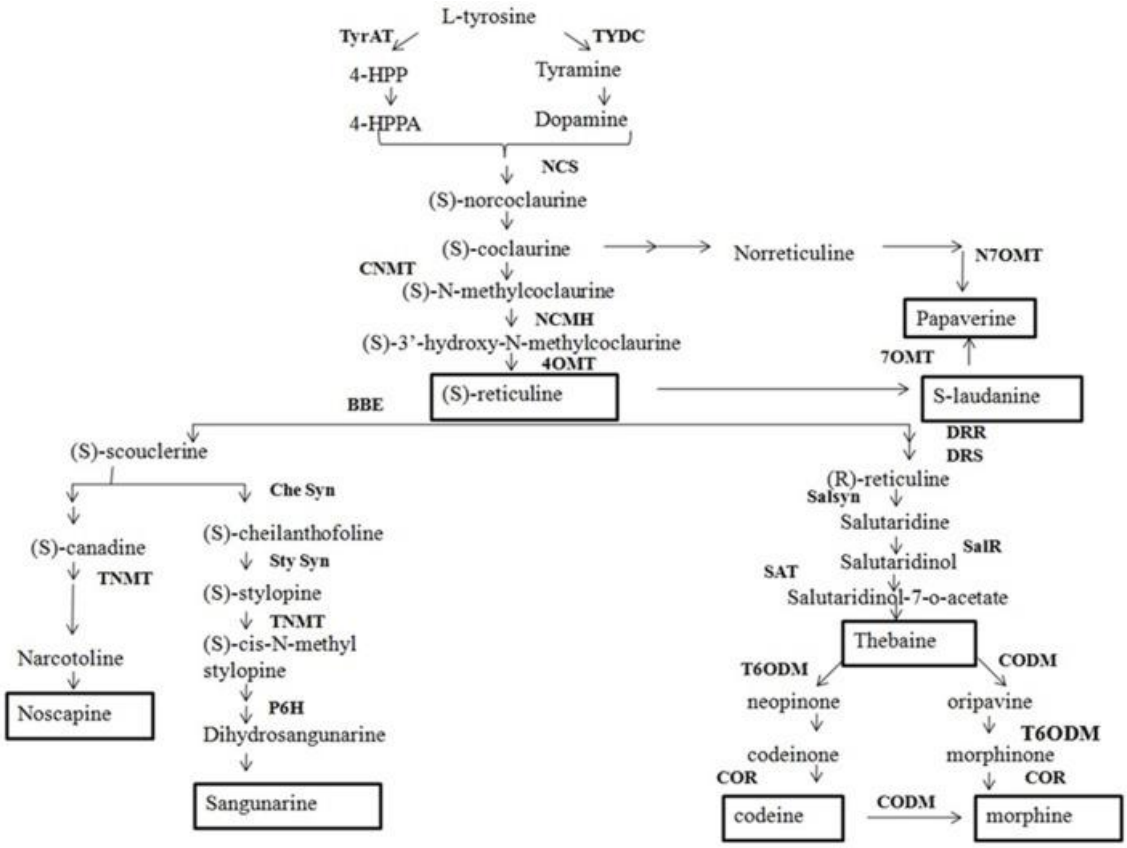
Türkiye doğal olarak yetişen ve kültürü yapılan, tıbbi ve aromatik bitkiler açısından önemli bir paya sahiptir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nce yapmış olduğu çalışmaya bakıldığında tüm dünyada 20.000 civarında bitki türünün tıbbi amaçla kullanıldığı belirtilmektedir (Arslan vd. 2004).

Haşhaş, tohumlarından ve yağından gıda olarak faydalanılan, küspesi hayvan yemi olarak kullanılan ve kapsüllerinin içerdiği alkaloitlerden, tıbbi olarak kullanılan çok yönlü olan bir bitkidir. Haşhaşın tıbbi ve ekonomik değeri benzilizokuinolin (BIA) üretiminden kaynaklanmaktadır. Haşhaşın meyve kabuğunun içerdiği 20 kadar alkaloit, tıbbi olarak yararlanılmaktadır (İncekara 1972). Haşhaşın meyvesinde alkaloit bulunmasına karşın tohumlarında bulunmamaktadır (Tanker vd. 1990). Haşhaş ülkemiz ekonomisine büyük katkı sağlamaktadır. Türkiye hem morfin ve türevleri ihracatı yönünden, hem de

tohum ihracatı ile dünya pazarlarında daimidir. Araştırmalar en çok tıpta ve eczacılıkta kullanılan ve haşhaşta bulunan morfin, kodein, tebain, noskapin, papaverin alkaloitlerinin izolasyonu ve türevlendirilmesi konusunda yapılmaktadır (Arslan vd. 2008). Morfin alkaloidi haşhaşta fazlaca bulunan önemli bir BIA alkaloididir. Morfin tıpta ağrı kesici ve uyuşturucu amacıyla kullanılmaktadır (Kopmaz 2016).

2.2 BIA ve Morfin Yolağı

Haşhaş, benzilizokinolin (BIA) adını verdiğimiz kodein, morfin, narsein, sanguinarin, papaverin ve noskapin gibi çeşitli BIA alkaloitlerini içermektedir. BIA'ların biyosentez yolağı, pek çok enzimin etkili olduğu ve sentez mekanizması net olarak anlaşılmayan karmaşık bir yolaktır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 BIA yolağı (Mirsha ve diğ. 2013).

BIA biyosentezi ilk aşamada, tirozin amino asitinden türevlenen dopamin ve 4-hidroksifenilasetaldehit (4-HPAA)'in (NCS) norkoklaurin sentaz enzimi ile (*S*)-norkoklaurin'e dönüşümüyle başlar. (*S*)-norkoklaurin, çeşitli enzimler aracılığıyla merkezi ara molekül olan (*S*)-retiküline dönüşür. (*S*)-retikülin ara molekülü ise farklı yolakları takip ederek sanguinarin, noskapin, berberin ve morfin alkaloitleri ile sonlanır. Ortaya çıkan benzilizokinolin alkaloitlerinden morfin, afyonda bulunan alkaloitten en önemlisi olup en yüksek miktarda olanıdır. *Papaver* türleri çeşitli alkaloitleri üretmesine rağmen morfin sadece *P. somniferum* ve *P.setigerum* türlerinden üretilmektedir. Ham afyonun işlenmesi ile morfin elde edilir. Kapalı formülü $C_{17}H_{19}NO_3$ ve molekül ağırlığı 285.34 $_{g/mol}$'dür. Suda ve alkolde çözünebilir (Demirci 2016).

Morfinin fenolik ve alkol grubu olmak üzere 2 tane hidroksil grubu bulunmaktadır. Bu özelliğiyle morfini diğer alkaloidlerden farklılaşır. Fenolik grubun metillenmesiyle kodein elde edilir. Morfin kristalleri renksiz ve kokusuz bir yapıya sahiptir. Morfinin çeşitleri, dihidromorfin, apomorfin, normorfindir (Küçük 1996, Önmez 2007, Tanker vd. 2007).

Morfinin biyosentezi için öncelikle (*S*)-retikülinin (*R*)-retiküline epimerizasyonunu gerekir. (*R*)-retikülin, CYP salutaridine sentaz (CYP719B1) aracılığıyla önce salutaridine ve sonrasında da kısa zincirli bir dehydrogenase/reductase olan salutaridine reductase (SalR) aracılığıyla da salutaridinol'e dönüştürülür. Salutaridinol, salutaridinol 7-*O*-acetyltransferase (SalAT) enzimi ile *O*-asetillenir. Salutaridinol 7-*O*-acetate, pH 8-9 olduğu ortamda kendiliğinden halkalanma göstererek, ilk pentasiklik morfinyan alkaloit olan tebaine dönüşür. Morfin yolağı burada iki kola ayrılır; ilk yolda tebain alkaloiti, 6-*O*-demetilaz (T6ODM) ile kendiliğinden kodeinona dönüşür. Kodeinon, bir aldo-keto redüktaz olan kodeinon redüktaz (COR) aracılığıyla kodeine, kodein de, kodein *O*-demetilaz (CODM) ile morfine dönüşür. İkinci yol ise, tebainin CODM aracılığıyla oripavine 3-*O*-demetilasyonudur. Sonrasında T6ODM, oripavini COR morfine indirgenen morphinone'e dönüştürür (Demirci 2016).

Morfinin izolasyonu ile birlikte bitki alkaloit biyokimyasının çalışma alanı da başlamış oldu. Molekülün stereo-kimyasal karmaşıklığından ötürü 1952 yılına kadar yapısı açıklanamamıştır. Yarım yüzyılı aşkındır bitkilerdeki alkaloit biyosentezi; biyokimyasal, kimyasal ve moleküler araştırmalar yapılarak çözülmeye çalışılmaktadır (Facchini vd. 2001).

Haşhaş bitkisinde RNAi kullanılarak COR enziminin fazla ifadesi (over-ekspresyonu) ile morfinan alkaloitlerinin arttırılması hedeflenmiştir. COR enzimi haşhaştan saflaştırılmış ve klonlanmıştır (Lenz ve Zenk 1995). Huang ve Kuthan ise yaptıkları çalışmada,

COR transkriptlerinin kodein veya morfin bulundurmayan türlerde dahi olmak üzere bütün türlerde bulunduğunu belirtmişlerdir.

Hagel ve Facchini 2010 yılında fonksiyonel genomik kullanarak tebain T60MD ve COMD enzimlerini izole etmişlerdir. Yapılan çalışmada yüksek tebain ve oripavin içeren ancak morfin ve kodein içermeyen *Top1* mutantları ile morfin biriktiren 3 farklı gövde transkriptomlarını karşılaştırmışlardır. Bu çalışmalarda morfin biyosentezinin tebain'in sentezlenmesinden sonra iki farklı yol ile gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Birinci yol, neopinon üzerinden kodein oluşumu ve arkasından da morfinin sentezlenmesidir. İkinci yol da ise tebainden oripavin ve devamında morfinon ve kodeinon redüktaz (COR) enzimi ile morfin oluştuğu bildirilmiştir (Gürkök vd. 2010).

2.3 DNA Metilasyonu

Epigenetik değişiklikler; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yapısının yeniden düzenlenmesi ve kodlanmayan RNA'lar ile ilişkili mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalarla gen aktivitesi DNA kodunda değişiklik olmadan düzenlenir.

DNA metilasyonu, DNA sentezlendikten sonra DNA bazlarına metil gruplarının ($-CH_3$) bağlanmasıdır. Çoğu hayvan ve bitkinin DNA'sı, genellikle sitozin olmak üzere, metillenmiş bazlar içerir. Metilenmiş bir ökaryot DNA'sında bulunan sitozin bazlarının yaklaşık % 5'i metil gruplarına sahiptir (Nestler 2014).

DNA metilasyonu, CpG adacıkları adı verilen G'nin guaninin, C' sitozin C $^{5'}$pozisyonunda bir metil grubunun bağlanmasıyla oluşur. DNA metilasyonu, hücre fark-

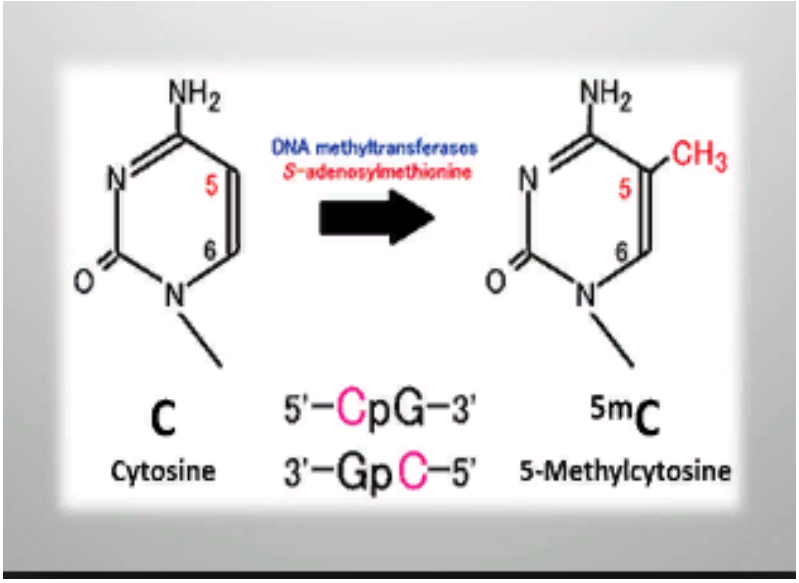
lılaşmasında, imprinting ve X kromozomu aktivasyonunda esas rol oynar (Zhang 2007, Nestler 2014).

Metilasyon, DNA baz diziliminde CpG dinükleotidlerinde guaninden önce gelen sitozinin 5. karbonuna bir metil ($-CH_3$) grubunun bağlanması olayıdır. DNA metilasyonunda; guanin tarafından takip edilen sitozin bazına DNA metiltransferaz (DNMT) enzimince bir metil grubu bağlanır. Metilasyon ile genler susturulabilmekte ve kromatin yapısı değişmektedir.

DNA metilasyonu, DNA sentezlendikten sonra DNA bazlarına metil gruplarının ($-CH_3$) bağlanması olayıdır. Çoğu bitkinin DNA'sı, genellikle sitozin olmak üzere, metillenmiş bazlar içermektedir (Nestler 2014).

Metilasyonun genlerin ifadelerinin düzenlenmesi üzerine etkilerine dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin Chen vd. (2017) yapmış oldukları çalışmada, yabani pamuğun yaz aylarında olduğu gibi günışığı saatlerce uzun süre çiçek açmasını önleyen metillenmiş bir gen içerdiğini buldu. Evcilleştirilmiş pamukta, aynı gen metilasyonunu kaybetti ve genin ekspresyonuna izin verdi. Yapılan çalışmada yetiştiricilerin, kimyasallarla veya modifiye edilmiş gen düzenleme teknolojileri aracılığıyla gen metilasyonunu değiştirebileceklerini belirtmiştir. Bu yöntemler ile yetiştiricilerin bir bitkinin epigenomuna yönelik hedeflenmiş değişiklikler yapmalarına ve geliştirilmiş özellikleri olan yeni ırklar oluşturmalarına imkan sağlayabilir. Epigenetik düzenlemeler üzerinden yapılan üreme çalışmaları sadece pamukta değil, aynı zamanda buğday, kanola, kahve, patates, muz ve mısır gibi diğer büyük bitkilere de uygulanabilmektedir.

DNA metilasyonu, bisülfit dizileme ve metilasyona duyarlı endonükleazlar kullanılarak kısıtlama kesimi de dahil olmak üzere farklı yöntemlerle tespit edilebilir. Bu teknik, DNA metilasyon haritalaması ve farklı şekilde metillenmiş genlerin tespiti için etkili bir yöntemdir.



Şekil 2.2 DNA baz diziliminde guaninden önce gelen sitozinin 5. karbonuna bir metil (-CH_3) grubunun bağlanması (http://www.ardimed.com/epigenetik-nedir-1).

2.4 Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP)

Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP), bir organizmanın global DNA metilasyon durumunu ve diferansiyel kesim modeliyle belirlenen DNA metilasyon durumuna bağlı olarak, birbirinden ayırmak için kullanılan tekniktir (Yaish vd. 2014). Bu teknik, DNA metilasyon haritalaması ve farklı şekilde metillenmiş genlerin tespiti için etkili bir yöntemdir. Msap yönteminin aşamaları aşağıda belirtilmiştir:

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,

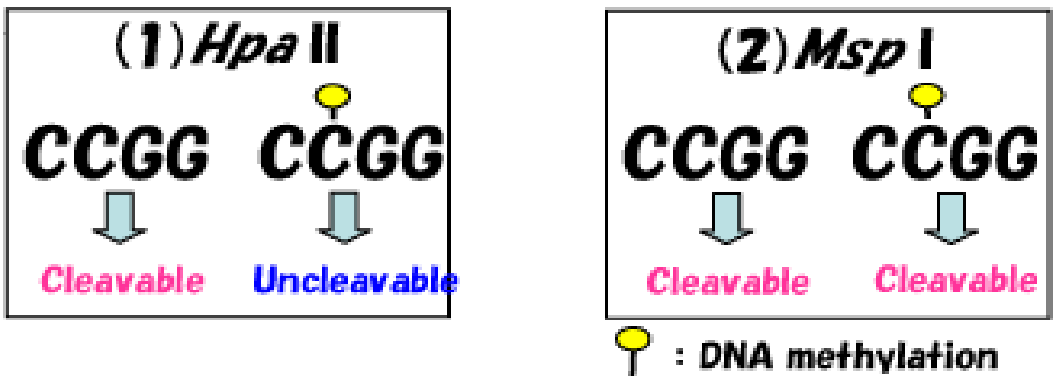
iii) Farklılık gösteren bantların jelden izole edilerek dizilenmesi ve dizi analizi.

Restriksiyon enzimleri DNA'yı belli bir DNA dizisinden (restriksiyon bölgesinden) kesmektedir. Restriksiyon enzimleriyle, enzimler metillenmiş ya da metillenmemiş

DNA'yı tanıyıp kesim yapacak şekilde adapte edilebilmektedir. MspI ve HpaII birbirinin izoşizomeri olan ve CCGG tanıma bölgelerini eşit olarak kesen restriksiyon enzimidir.

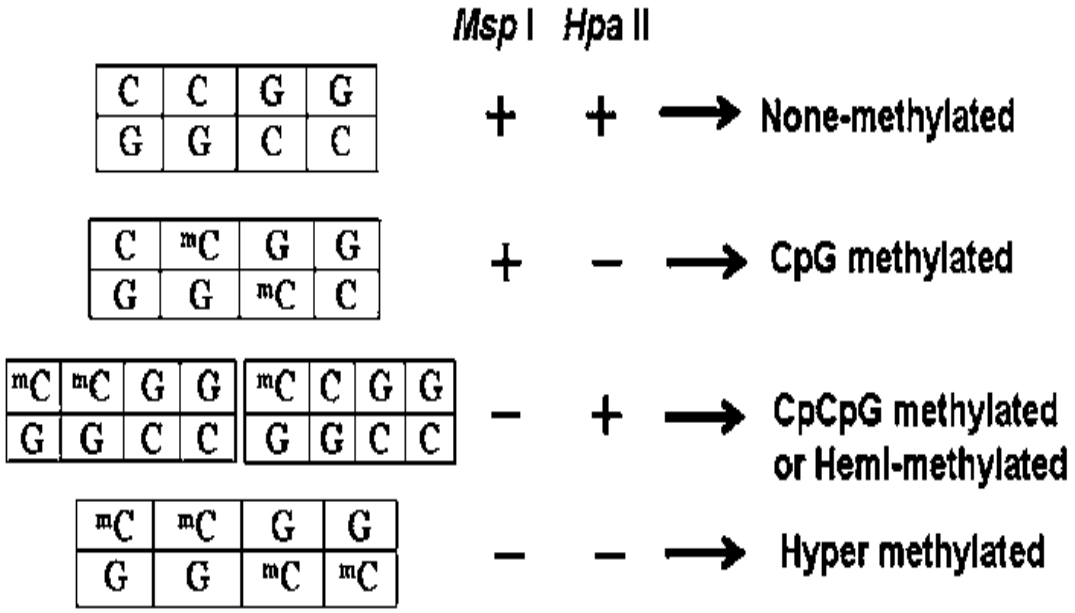
CGG dizileri HpaII ile sindirilmemiş ancak MspI ile sindirilmiştir. MspI C↓CGG bölgesini tanıyarak iki sitozin arasından ok yönünde DNA'yı kesmektedir. MspI CCGG tanıma dizisinde dıştakı sitozin metillenirse kesemez, ancak enzim DNA'yı içteki sitozin metillenirse kesebilir. Yani MspI DNA tanıma bölgesinin dıştaki sitozinin metillenmesine duyarlıdır. HpaII'ninde tanıma bölgesi C↓CGG olup, m4CCGG, m5CCGG, Cm4CCGG, Cm5CCGG VE hm5Chm5CGG durumlarında diziyi kesemez (Tekin vd. 2003).

Metilenmemiş CCGG dizileri iki enzimlede kesilebilir ve DNA segmentini PCR primer sekansları arasından kırarak PCR amplifikasyonunu önler. Metilenmiş CCGG dizileri yalnızca MspI RE ile kesilirler. MspI başarıyla enzim yerlerini sindirip ve PCR'ı engeller. Sonuç olarak HpaII sindirimi inhibe olup PCR amplifikasyonu başarıyla sonuçlanır. Metilasyon varsa HpaII hedef diziyi kesemeyerek ve ürün elde edilecektir (Tekin vd. 2003).



Şekil 2.3 Metilasyona duyarlı Hpa II ve metilasyona duyarsız Msp I enzimlerinin kesim şekilleri (Biyolojik genom Kaynak Merkezi, moleküler ve hücresel düzenleme Enstitüsü, Gunma Üniversitesi).

Msp I ve *Eco* RI veya *Hpa* II ve *Eco* RI ile sindirilen DNA örnekleri, *Msp* I ,*Eco* RI ve *Hpa* II ile oluşan uçlarla uyumlu iki dsDNA adaptörüne bağlanır. Bağlanan DNA fragmanları, adaptörlere seçici olmayan tamamlayıcı primerler ile önceden çoğaltılır. Daha sonra seçici primerle amplifikasyon yapılır (bunlar, 3 ′ uçlarında seçici olmayan veya önceden seçici primerlerin bir ila üç baz genişletilmiş varyantlarıdır)). Bu amplifikasyon, denatüre edici poliakrilamid jelde parçalanmış ve ayrılmış bir popülasyonu oluşturur. Fragmanları görüntülemek için, genellikle seçici bir amplifikasyon basamağı esnasında flüoresan etiketli bir primerin eklenmesi gerekir. Jelde, her bir DNA numunesi, *Eco* RI, *Msp* I ve *Eco* RI, *Hpa* II ile sindirilmiş DNA'dan (sırayla M ve H şeridi) kaynaklanan iki komşu fragman şeridi ile ifade edilir. Bu nedenle, bir fragmanın yokluğuna (-) varlığına (+) denilerek dört farklı MH fragman varyantı "+ +, - -, + -, - +" oluşabilir. (+, +) Modeli (hem M hem de H şeridinde görüntülenen belirli uzunluktaki bir fragman), metillenmemiş bir CCGG bölgesinde her iki enzim tarafından sindirime bağlanır. (-, -) modeli, başka bir işlem görmüş numune, o pozisyonda bir fragmanın varlığını gösterdiğinde, tamamen metillenmiş bir mCmCGG bölgesinde her iki enzim ile sindirimin inhibe edildiğini gösterir. (-, -) modeli, genetik olarak farklı örnekler kıyaslandığında mutasyona uğramış bir bölgeyi de ifade edebilir. M'de görselleştirilen, ancak H şeridinde görselleştirilmeyen kesin uzunlukta bir fragmanı ifade eden (+, -) modeli, *Hpa* II ile değil fakat *Msp* I ile sindirime uğradığını, ve bir CmCGG bölgesinin varlığına karşılık gelir. Son olarak, (-, +) modelinin, özellikle CCG ve CG motiflerinde metilasyonu meydana geldiğini ve bitki genomlarında yorumlanması da oldukça zor olmaktadır (Fulnecek ve Kovarik 2014).



Şekil 2.4 Msp-I ve Hpa-II enzimlerinin 5-CCGG metilasyon durumuna duyarlılıkları (Salmon ve ark. 2008).

2.5 Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

Enzim kesiminden sonra ortaya çıkan parçaların uzunlukları "elektroforez" adı verilen yüklü moleküllerin elektriksel alanda yaptığı hareketin izlenmesi yöntemine bir laboratuvar yöntemi ile tahmin edilir. Elektroforez, DNA fragmanlarını büyüklüklerine göre ayıran bir yöntemdir.

Moleküller, elektrik yüklerinin kütlelerine oranıyla belirlenen hızlarda elektriksel ortamda hareket ederler. Laboratuvarlarda hızlı ve basit olarak kullanılan elektroforez yöntemi diğer yöntemlerden kıyasla yeterli düzeyde ayrılamayan DNA fragmentlerinin ayrılmasını sağlar. UV ışığı altında fluoresan etki gösteren etidyum bromür (EB) boyasının kullanılmasıyla çok düşük konsantrasyonlardaki DNA'nın yerini belirlemek mümkündür. İncelenecek örnek jele leke ya da ince bir bant halinde uygulanarak analiz edilir. Katı haldeki jel ile ayrımı yapılacak moleküllerin hareketi; moleküllerin yüküne, boyutuna, kimyasal içeriğine ve uygulanan elektrik alana bağlı olarak değişkenlik gösterir.

Poliakrilamid jeller küçük DNA fragmentleri (50-500 baz) ve RNA moleküllerinin ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. Birbirine boyut bakımından birbirine çok yakın DNA fragmentlerinin analizlerinde kullanmak uygundur (Sarıkaya 2007).

Akrilamidin polimerizasyonuyla poliakrilamid oluşur (Temizkan 2007). Jel oluşumu sırasında amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N'- tetrametilendiamin (TEMED) serbest radikal katalizör görevi görür. TEMED, APS'yi etkileyerek SO_4 radikaline dönüştürür (Dilsiz 2004).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan haşhaş (*Papaver somniferum* L.) örnekleri morfince düşük ve morfince zengin çeşitler olarak seçilmiştir.

Çalışmada materyal olarak TMO tarafından tescillenmiş Afyon yöresinde yaygın olarak ekimi yapılan morfin oranı düşük Ofis 95, Ofis 96 ve morfin oranı yüksek Ofis 1 ve Ofis 2 çeşitleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bitkiler BAP tarafından desteklenen FF061218L04 nolu proje kapsamında TMO'dan temin edilen ve ekimi yapılan çeşitlerdir. Çalışmada kullanılan bitkilerin genel özellikleri aşağıda verilmiştir;

Ofis 95;

Tohum rengi beyaz ve kapsül şekli basık koniktir. Bitki boyu ortalama 89-101 cm arasındadır. Kapsüldeki morfin oranı % 0,550-0,710 olan haşhaş çeşitidir (Türk Gıda Kompozisyon Veri Kitabı).

Ofis 96;

Tohum rengi sarı ve kapsül şekli koniktir. Bitki boyu 85-95 cm arasındadır. Kapsüldeki morfin oranı %0,555-0,700 olan haşhaş çeşitidir (Türk Gıda Kompozisyon VeriKitabı).

Ofis 1;

Çiçek rengi açık viyole, kapsül şekli armut ve tohum rengi mavidir. Bitki boyu 105-110 cm arasında değişir. Kapsüldeki morfin oranı % 1,71-1,97 olan haşhaş çeşitidir (Türk Gıda Kompozisyon Veri Kitabı).

Ofis 2;

Çiçek rengi beyazdır. Tohum rengi beyaz ve kapsül şekli yuvarlaktır. Bitki boyu 105-110 cm arasında değişir. Kapsüldekimorfin oranı %1,46-1,60 olan haşhaş çeşitidir (Türk Gıda Kompozisyon Veri Kitabı).

3.2 Yöntem

3.2.1 Haşhaş çeşitlerinin ekimi ve yetiştirilmesi

Bitki materyali olarak TMO'dan elde edilen morfin içeriği yüksek *Papaver somniferum* Ofis 1 ve Ofis 2 çeşitleri ile morfin içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitleri kullanılmıştır. Torf ve perlit karıştırılarak oluşturulan toprak toplamda 20 viyole, her bir viyole yaklaşık 2-3 tane tohum olacak şekilde ekilmiştir. Her bir haşhaş örneği için işlem tekrarlanmıştır. 3'er günlük periyotlar ile bakımı (sulama vb.) yapılmıştır.



Şekil 3.1 Haşhaş çeşitlerine ait tohumlar

Ardından gelişen fideler, 1 ay sonra saksılara alınmıştır ve 1 haftalık periyotlar halinde su ve bakım işlemleri yapılmıştır. Son olarak kasalara alınarak 20ºC/18ºC de 16/8 saatlik (aydınlık/karanlık) fotoperiyotta sera şartlarında yetiştirilerek DNA izolasyonunda kullanılmak üzere kapsül ve gövdelerinden materyal alınacak şekilde hazır hale getirilmiştir.

Gelişim gösteren haşhaş *(Papaver somniferum* L.) çeşitlerinden, altı ay sonunda total DNA izolasyonu için yaprak, kapsül ve gövdelerinden örnekler steril bisturi yardımı ile kesilmiş ve önceden etiketlenmiş poşetlere konulmuştur. Örnekler daha sonra -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.2 DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu Thermo Scientific GENEJET plant genomic DNA purification mini kiti protokolüne göre yapılmıştır. Protokol şu şekilde uygulanmıştır.

1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne 350 ul Lizis tampon A pipetlenmiştir. Bitki dokusu tartılmıştır. Her bir örnek için 100 mg bitki dokusu kullanılmıştır. Havan içine 100 mg bitki dokusu yerleştirilmiştir ve üzerine sıvı azot eklenerek iyice ezilmiştir. Ezilen doku 350ul Lizis tampon içeren 1,5mg'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve 10-20 saniye iyice karıştırılmıştır. Tüpe Lizis tampon B ve 20 ul RNAaz A eklenerek, 1 dakika vortekslenmiştir. Numune 10 dakika boyunca 65℃' de inkübe edilmiştir. 130 ul yağış solüsyonu eklenmiş ve tüp 2-3 kez ters yüz edilerek karıştırılmıştır. Buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiş ve 20,000 g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.

Süpernatant toplanmıştır ve temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. %96'lık etanolden 400 ul eklenip karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımın yarısı döndürme kolonuna aktarılmıştır. 6,000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Akış çözeltisi atılmıştır ve kolon üzerinde kalan karışım 6,000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Kolona 500 ul yıkama tampon I eklenerek 8,000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.

Kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir ve kolona yıkama tamponu II eklenmiştir. Yıkama tamponu 20,000 g'de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü boşaltılmıştır. Arıtma kolonu tekrar yerine yerleştirilmiştir. Tüp ve kolon 1 dakika boyunca tekrar santrifüjlenmiştir. Akış çözeltisi içeren toplama tüpü atılmıştır. Kolon steril bir mikro-santrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Elüsyon tamponu eklenerek membran oda sıcaklığında 5 dakika inkübe ve 8,000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. 100ul Elüsyon tamponu ilave edilmiş ve ikinci bir elüsyon adımı uygulanmıştır. Saflaştırılmış DNA kullanıma hazır hale gelmiştir ve -20 ℃ de saklanmıştır.

3.2.3 Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP) Analizi

3.2.3.1 Restiksiyon enzimleri ile kesim

Morfin içeriği yüksek *P. somniferum* Ofis 1 ve Ofis 2 çeşitleri ile morfin içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 çeşitlerine ait kapsül ve gövdelerinden izole edilen DNA örneklerinden MSAP analizi yapmak için MSP1 VE HPAII olmak üzere iki farklı restriksiyon enzimleriyle kesim yapılmıştır.

Öncelikle izole edilen DNA'lardan her bir örnek için 500 $ng/\mu l$ DNA, 5 U EcoRI (Thermo Scientific), 10 U MSP1 (Thermo Scientific), 2X Tango Tamponu (Thermo Scientific) ve 13,5 μl ddH_2O eklenerek 25 μlhacminde hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 37°C 24 saat ve 80°C 20 dakika inkübe edilmiştir. Ayrı bir tüpte de 500 $ng/\mu l$ DNA, 5 U EcoRI (Thermo Scientific), 20 U HPAII (Thermo Scientific), 2X Tango Tamponu (Thermo Scientific) ve 12,5μl ddH_2O eklenerek 25 μlhacminde hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlar 37°C 24 saat ve son olarak 80°C 20 dakika inkübe edilmiştir.

3.2.3.2 Adaptör bağlama (Ligasyon)

DNA amplifikasyonunu kolaylaştırmak amacıyla DNA fragmanlarının uçlarına, metilasyona duyarlı Hpa II ve metilasyona duyarsız bir izoşizomeri olan Msp I için uygun adaptör bölgeleri bağlanmıştır. Bunun için 60U 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 μl su (ddH_2O) konularak toplamda 25 μl hacminde olacak şekilde tüpe alınmıştır. Hazırlanan karışım 23°C 4,5 saat ve 60°C de 10 dakika inkübe edilerek -20 derecede PZR için saklanmıştır. Reaksiyonlarda kullanılan adaptör dizileri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Adaptör dizileri.

Adaptörler	**Baz Dizisi 5'-3'**	**Tm (℃)**
EcoR1 adapter 5	CTCGTAGACTGCGTACC	55
EcoR1 adapter 3	AATTGGTACGCAGTCTAC	51
HpaII/MspI adapter 5	GATCATGAGTCCTGCT	49
HpaII/ MspI adapter 3	CGAGCAGGACTCATGA	52

3.2.3.3 Ön seçim polimeraz zincir (PZR) reaksiyonu

PZR reaksiyonu için, çeşitlere ait 1/10 sulandırılması yapılmış DNA (ligasyon ürünü) örneklerinden $5\mu l$, 1X PCR Buffer (İnvitrogen), $2mM$ Mg, $0{,}3\,mM$ dNTP (Thermo Scientific), 1,5U Taq DNA (İnvitrogen), 10 $pmol$ linker EcoR1, 10 $pmol$ linker HPAII, 9,3 μl su (ddH_2O) konularak toplamda 20 μl hacminde olacak şekilde tüpe alınmıştır. Linker şu şekilde hazırlanmıştır: 100 $pmol$ EcoR1 5'+ 100 $pmol$ EcoR1 3'ye 100 $pmol$ HPAII 5'+ 100 $pmol$ HPAII 3' olacak şekilde hazırlanmıştır.

PZR protokolü 94°C'de 1 dakika denatürasyon aşaması, 94°C'de 30 saniye, 51°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakikada 30 döngü boyunca, 72°C'de 10 dakika şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4 Seçim polimeraz zincir (PZR) reaksiyonu

PZR reaksiyonu için çeşitlere ait 1/10 sulandırılması yapılmış ligasyon ürünü olan DNA örneklerinden $5\mu l$, 1X PCR Buffer (Invitrogen), $2mM$ Mg, $0{,}3\,mM$ dNTP (Thermo Scientific), 1,5U Taq DNA (Invitrogen), 10 $pmol$ F, 10 $pmol$ R, 9,3 μl su (ddH_2O) konularak toplamda 20 μl hacminde olacak şekilde tüpe alınmıştır.

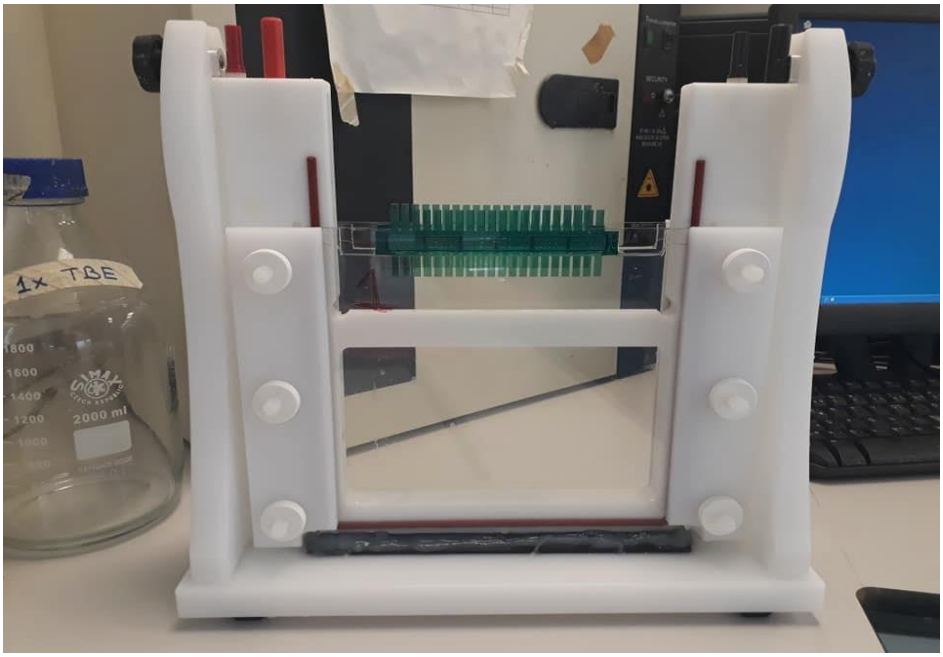
PZR protokolü 94°C'de 5 dakika, 94°C'de 30 saniye, 65°C'de 1 dakika (her siklusta 0,7 °C düşürülerek), 72°C'de 1 dakika 12 döngü, ardından da 94°C'de 30 saniye, 56 °C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika 23 döngü, son olarak ta 72°C'de 5 dakika şeklinde gerçekleştirilmiştir. Pre-amplifikasyon karışımından $3\mu l$ %1'lik agaroz jele yüklenilmiştir ve görüntüleri alınmıştır. PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Primer dizileri.

Primerler	**Baz Dizisi 5'-3'**	**Tm (℃)**
EcoR1 +1 primer	GACTGCGTACCAATTCA	50
EcoR1 +2 primer a	GACTGCGTACCAATTCAG	54
EcoR1 +2 primer b	GACTGCGTACCAATTCAT	51
EcoR1 +2 primer c	GACTGCGTACCAATTCAC	54
HM + 1 primer	ATCATGAGTCCTGCTCGGT	57
HM + 3 primer a	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAA	58
HM + 3 primer c	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC	60
E_d	GACTGCGTACCAATTCAAC	55
E_e	GACTGCGTACCAATTCACG	57
E_f	GACTGCGTACCAATTCACT	55
H_d	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAG	60
H_e	ATCATGAGTCCTGCTCGGGTGG	62
H_f	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTA	58

3.2.3.5 Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)

Öncelikle poliakrilamid jel hazırlamak 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) ilave edilerek %6'lık konsantrasyona sahip poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Hazırlanan jel 19,4 cm x 18,5 cm (G x B) boyutunda ve 1,0 mm kalınlığında bir jelin kullanıldığı ayarlanabilir dikey jel elektroforezi aletinde (Biometra Eco- Maxi-Analytik Jena Company) gerçekleştirilecek şekilde optimize edilmiştir. Hazırlanan jel kaseti, jel dökme bölmesine yerleştirilmiştir. Jelin sızdırmasını önlemek için %5' lik agar çözeltisi aparatın etrafına sürülmüştür. Hazırlanan karışım jel kasetine yüklenmiş ve 20 dişli tarak yerleştirilmiştir. 40 dakika jelin polimerize olması beklenmiştir. Daha sonra taraklar kaldırılmıştır. 1x TBE (Tris- Borik Asit- EDTA) tamponu tanka doldurulmuştur. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez aygıtına yerleştirilmiştir.



Şekil 3.2 PAGE sistemi

DNA fragmanları poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi kullanılarak ayrılmıştır. PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler, poliakrilamid jelde yürütülmeden önce 20μl PZR ürününe 3μl yükleme boyası Loading Dye (Thermo Scientific) ilave edilip santrifüjlenerek %6'lık konsantrasyona sahip poliakrilamid jele yüklenerek 200 V

akım geçecek şekilde ayarlanmıştır. Yaklaşık 6 saat yürütülerek elektroforez işlemi tamamlanmıştır.

Elektroforetik ayırma sonunda oluşan bantlar etidyum bromür boyama kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda UV transilluminatör altında jele ait görüntüler alınmıştır.

3.2.4 Skorlama

Görüntüleme sonucunda elde edilen bantlara skorlama yöntemine göre 0 ve 1 değerleri verilerek analiz dosyası hazırlanmıştır. Analizlerde elde edilen DNA fragmanlarının poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi kullanılarak ayrıldıktan sonra bantlar profillenerek örnekler arasında farklılık gösteren bantların tespiti *msap* R programı kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Çeşitlere Ait Örneklerinin Toplanmasına Ait Sonuçlar

Çimledilip uygun ortam şartlarında yetiştirilen bitki çeşitlerinden genomik DNA izolasyonu için yaprak, gövde ve kapsüllerinden steril bistüri yardımı ile örnekler alınmıştır. Çeşitlerden alınan doku örnekleri -80℃'de saklanmıştır. Bitkilerin yetiştirilmesine ait görüntüler Şekil 4.1'de verilmiştir.



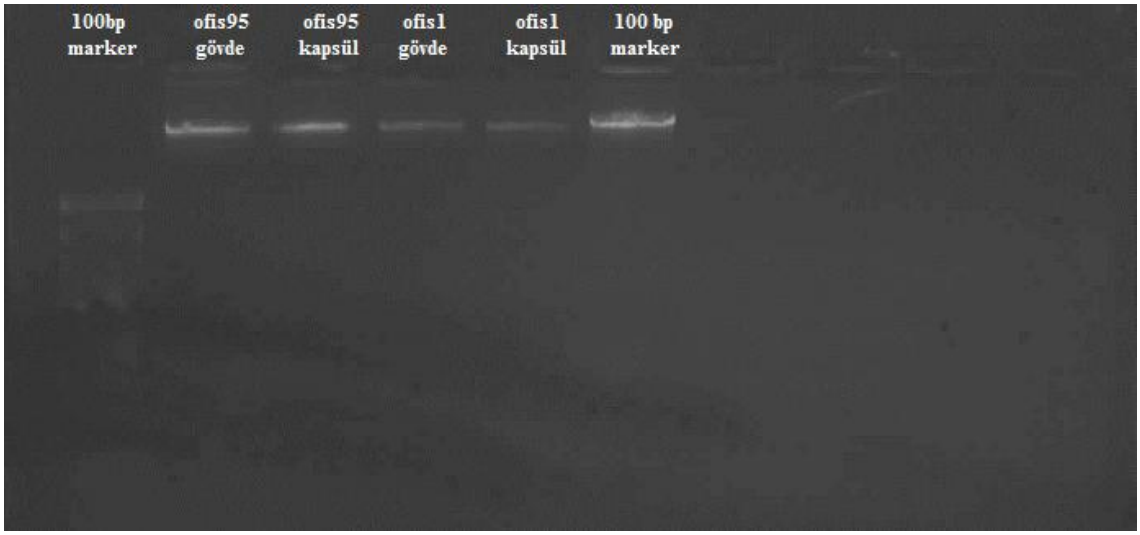
Şekil 4.1 Bitkilerin yetiştirilmesi.



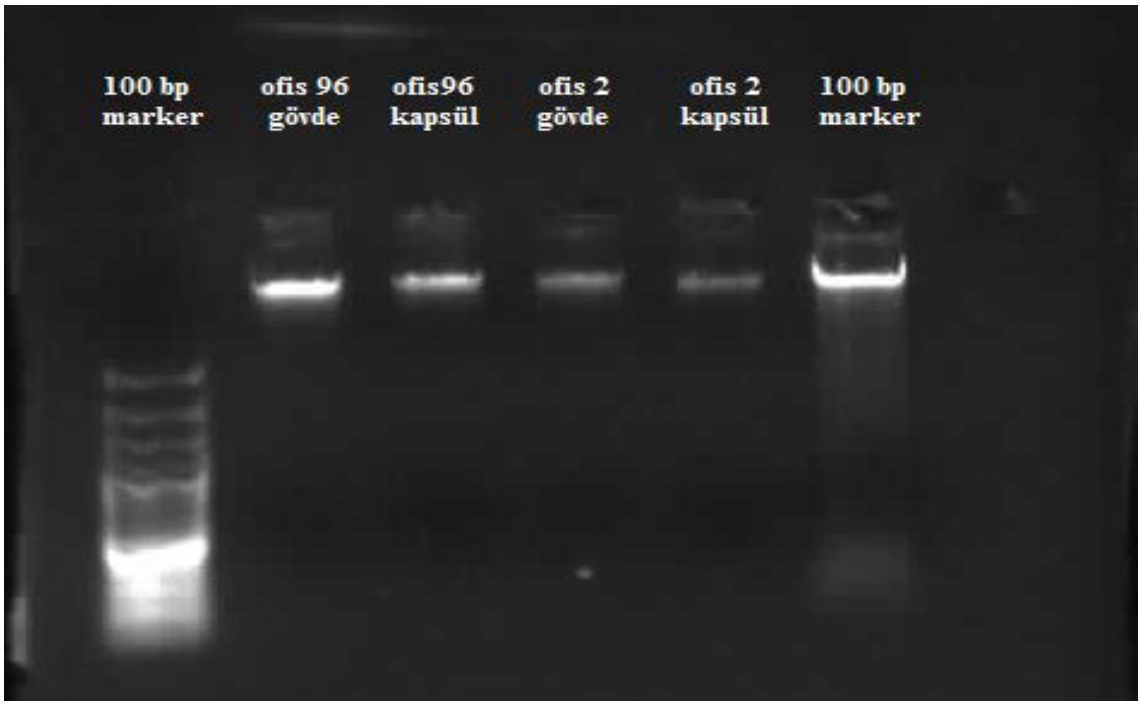
Şekil 4.2 Gelişen kapsül, gövde ve yapraklardan örnek.

4.2 Haşhaş Çeşitlerine Ait DNA İzolasyon Sonuçları

Haşhaş çeşitlerine ait kapsül, gövde ve yapraklardan alınan dokulardan TRİzol reaktifi kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA örneklernin kalitesinin belirlenmesi amacı ile örnekler agaroz jelde yürütülmüştür. Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları Nanodrop (ND-2100C,Thermo) spektrometre cihazı ile ölçülmüş olup örneklerin konsantrasyonları ve saflık dereceleri Absorbans (A) 260-280 ve 260-230 değerleri ile belirlenmiştir. Elde sonuçlar Şekil'4.3, Şekil'4.4 ve Çizelge'4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.3 Ofis 95 ve Ofis 1çeşitlerine ait DNA örneklerinin jel görüntüsü



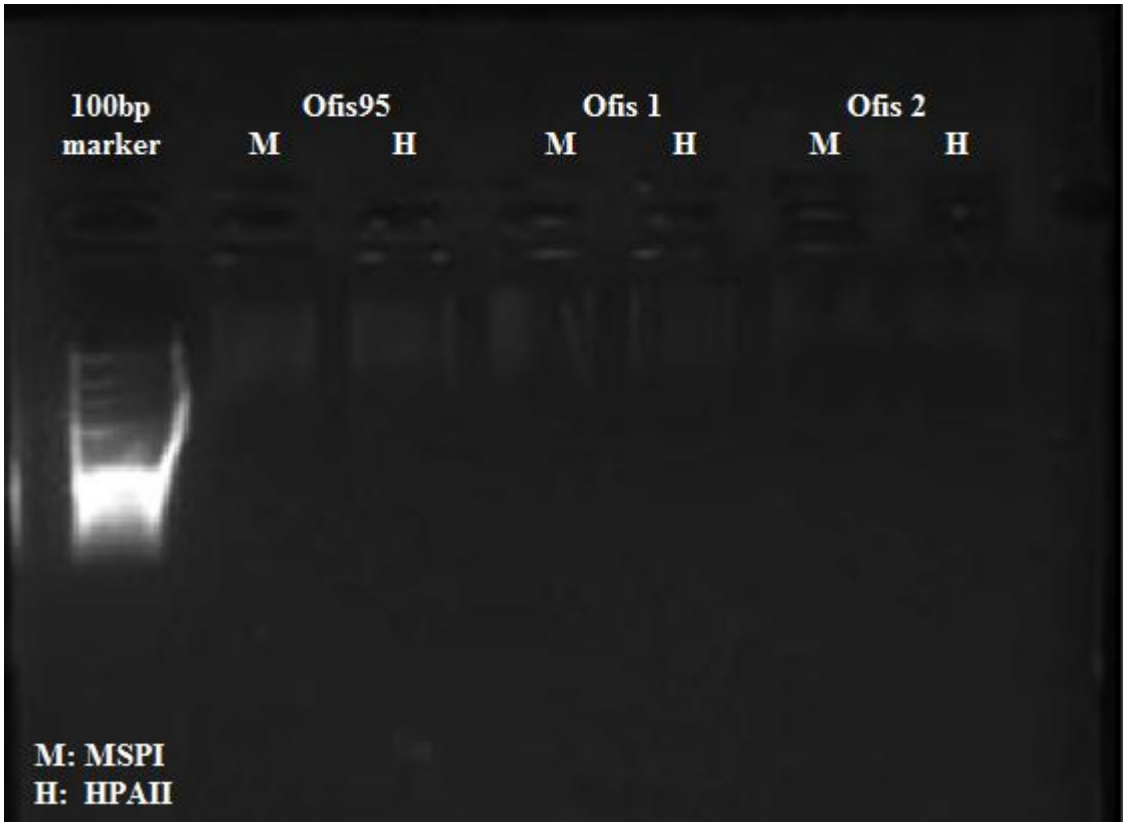
Şekil 4.4 Ofis 96 ve Ofis 2 çeşitlerine ait DNA örneklerinin jel görüntüsü

Çizelge 4.1 Çeşitlere ait dokuların DNA konsantrasyonları ve saflık dereceleri

	GÖVDE /KAPSÜL $(ng/\mu l)$	**A260/A280**	**A260/A230**
1 TÜM BİTKİ	508,3	1,83	1,81
2 GÖVDE	336,8	1,84	1,62
2 KAPSÜL	1497,9	1,86	1,84
2 TÜM BİTKİ	882,1	1,93	1,86
2 KAPSÜL 2.	1942,4	1,87	1,77
3 GÖVDE	110,4	1,52	0,54
3 KAPSÜL	1130,8	1,48	0,48
3 KAPSÜL 2.	758,6	1,64	0,59
3 TÜM BİTKİ	1474,2	1,98	2,03
4 GÖVDE	28,6	1,48	0,59
4 KAPSÜL	1424	2,24	0,36
4 TÜM BİTKİ	1076,1	1,75	1,51

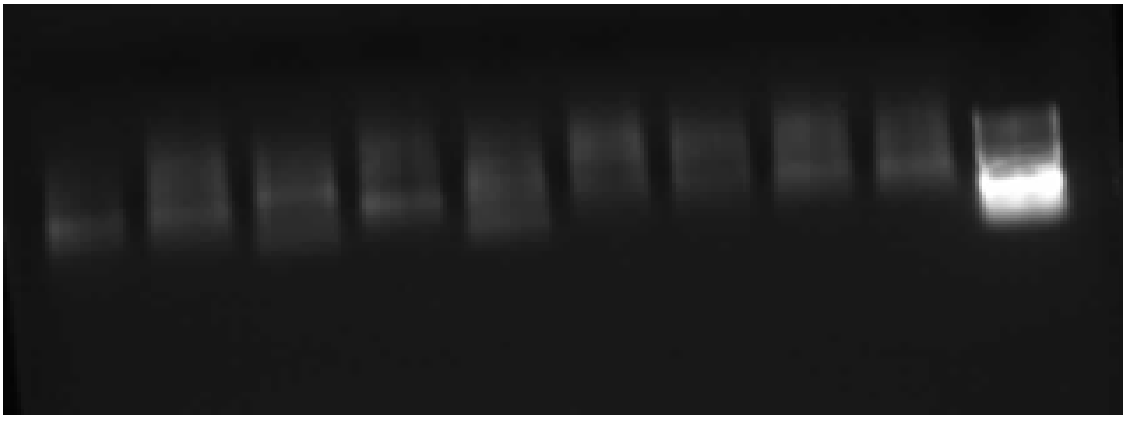
4.3 MSAP Yöntemine Ait Sonuçlar

MSAP, düşük maliyetli olması ve güvenilirliğinden dolayı farklı bitki türlerinde DNA metilasyonu için yaygın olarak kullanılan yöntemdir (Chwialkowska vd. 2017). DNA ilk önce, metilasyona duyarsız nadir kesici *Eco* RI, metilasyona duyarlı kısıtlama enzimi Hpa II ve metilasyona duyarsız bir izoşizomeri olan Msp I ile kesilmiştir (Şekil 4.5).



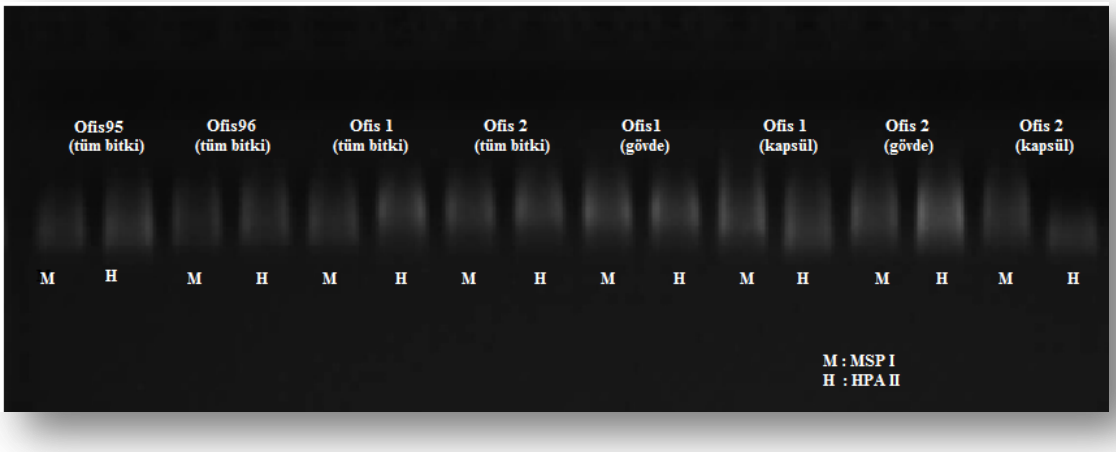
Şekil 4.5 Restriksiyon ile kesime ait jel görüntüsü

Kesimler sonucu oluşan yapışkan uçlara tamamlayıcı olan spesifik adaptörler, ön seçici olan primerlerle PZR yapılarak, bant profili agaroz jel üzerinde görüntülenmiştir (Şekil 4.6).



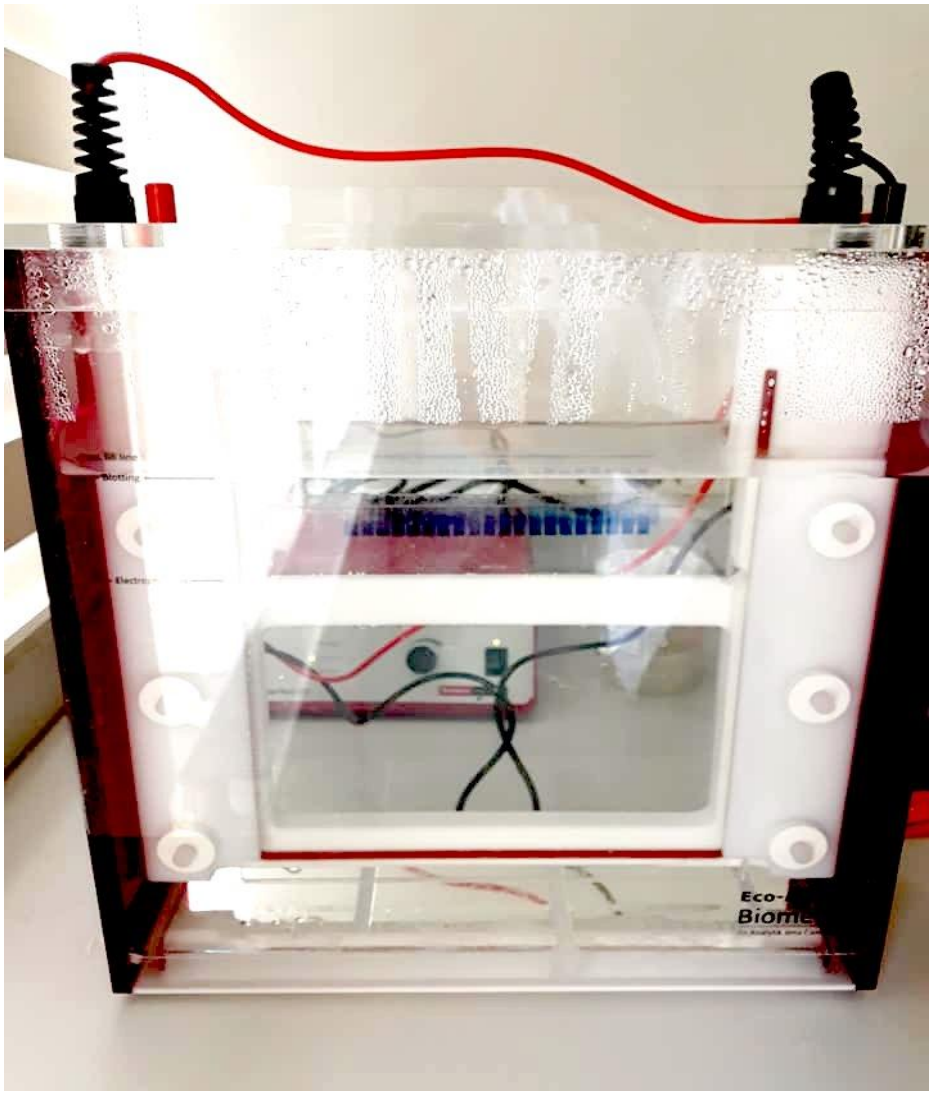
Şekil 4.6 Pre-amplifikasyona ait jel görüntüsü

21 primer kombinasyonu yapılmış olup daha sonra ön seçim PCR ve seçim PCR olmak üzere iki basamaklı PCR amplifikasyonu yapılmıştır ve kontrol amaçlı olarak agaroz jel üzerinde de görüntülenmiştir (Şekil 4.7).



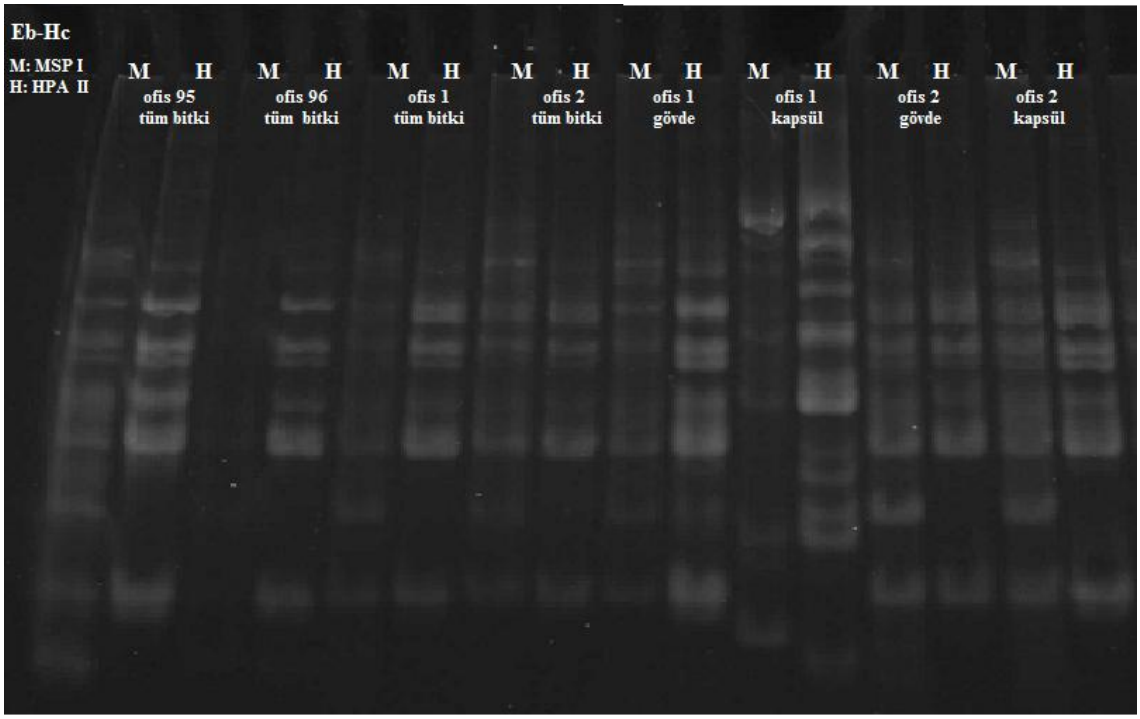
Şekil 4.7 Amplifikasyona ait jel görüntüsü

21 primer kombinasyonundan elde edilen fragmanların detaylı ayrımı için PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler, poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi kullanılarak ayrılmıştır (Şekil 4. 8).

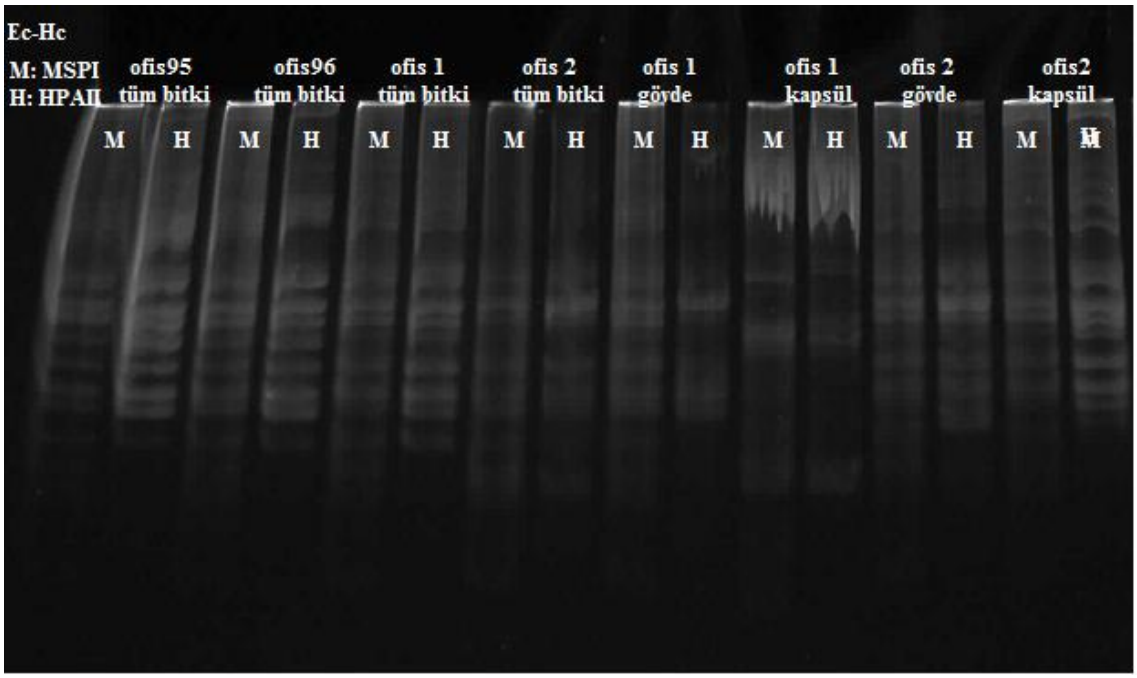


Şekil 4. 8 Jelin PAGE sisteminde yürütülmesi.

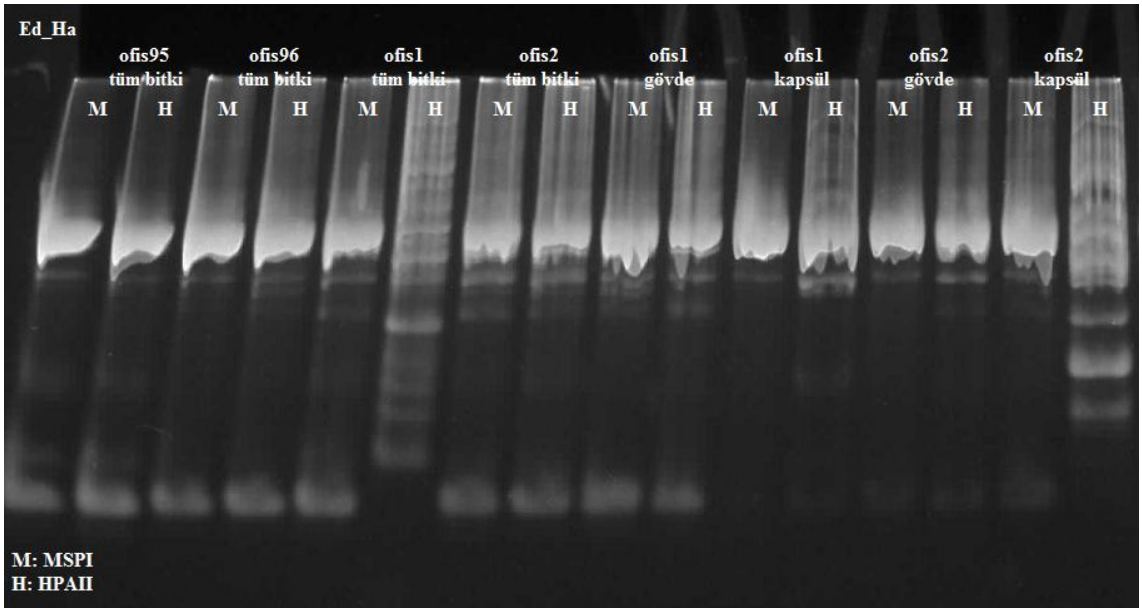
21 primer kombinasyonundan elde edilen fragmanların PAGE elektroforetik ayırma sonunda oluşan bantlar, etidyum bromür (EBr) boyama ile boyandıktan sonra UV transilluminatör ile görüntüleri alınmıştır. Elde edilen görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.9). Primer kombinasyonları jel resimlerinin üzerinde verilmiştir.



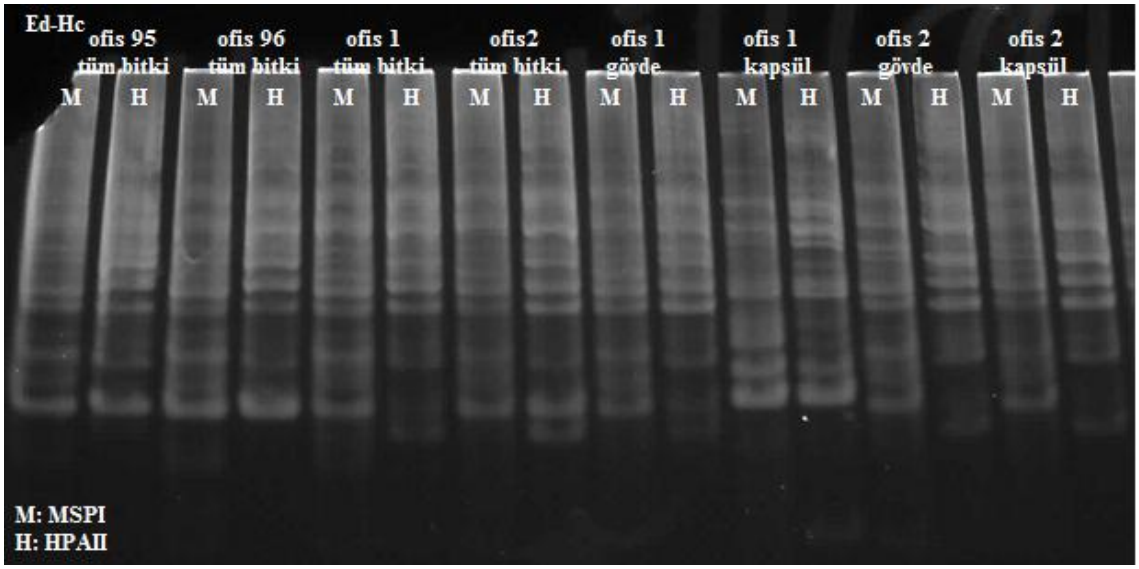
Şekil 4. 9 Dokulara ait jel görüntüsü



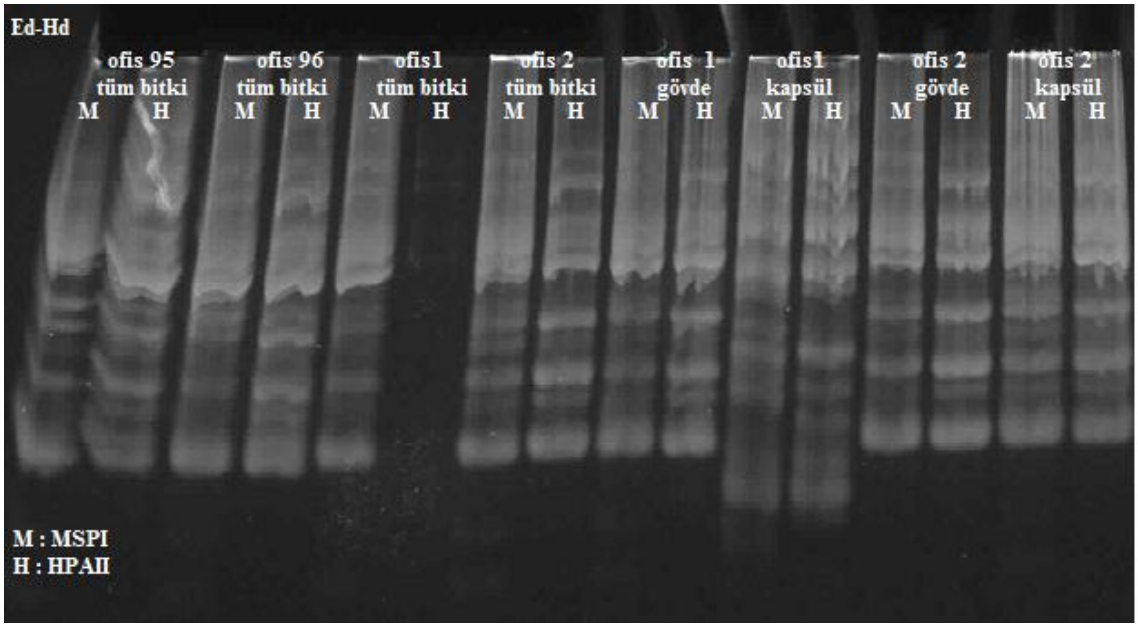
Şekil 4.10 Dokulara ait jel görüntüsü



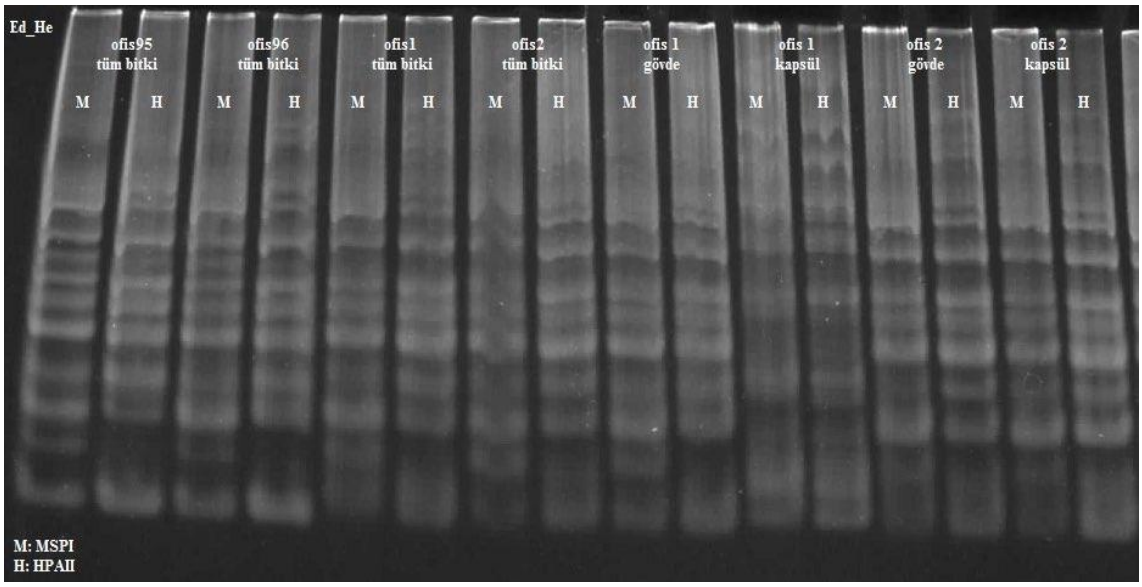
Şekil 4.11 Dokulara ait jel görüntüsü



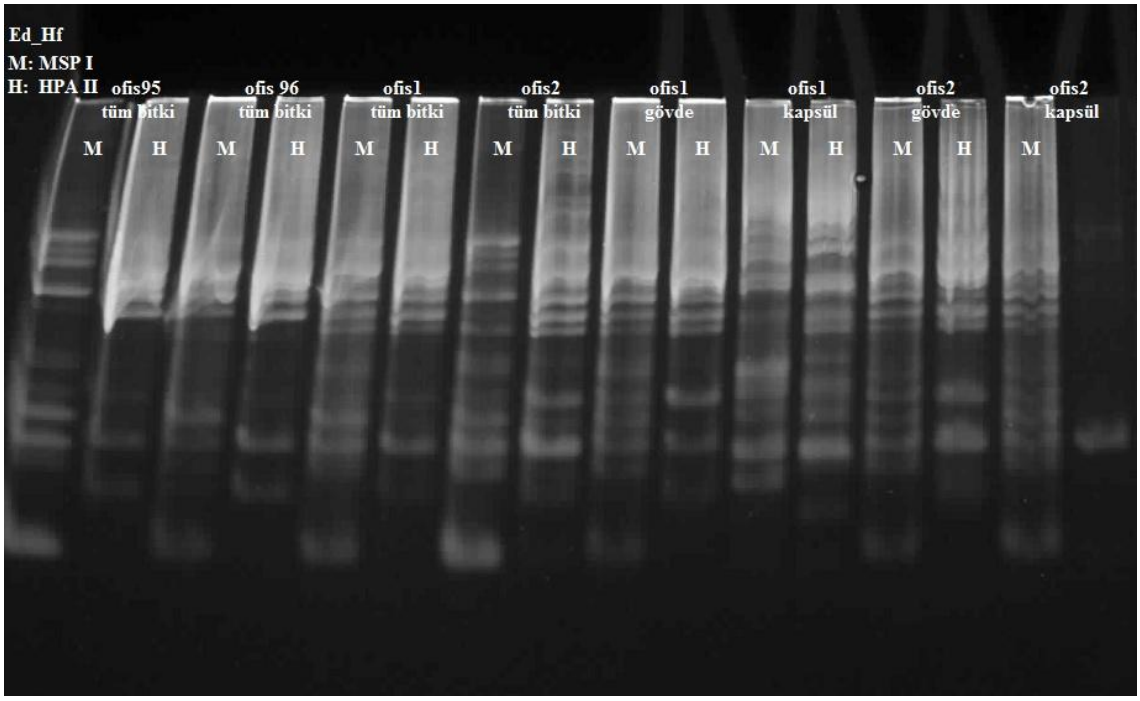
Şekil 4.12 Dokulara ait jel görüntüsü



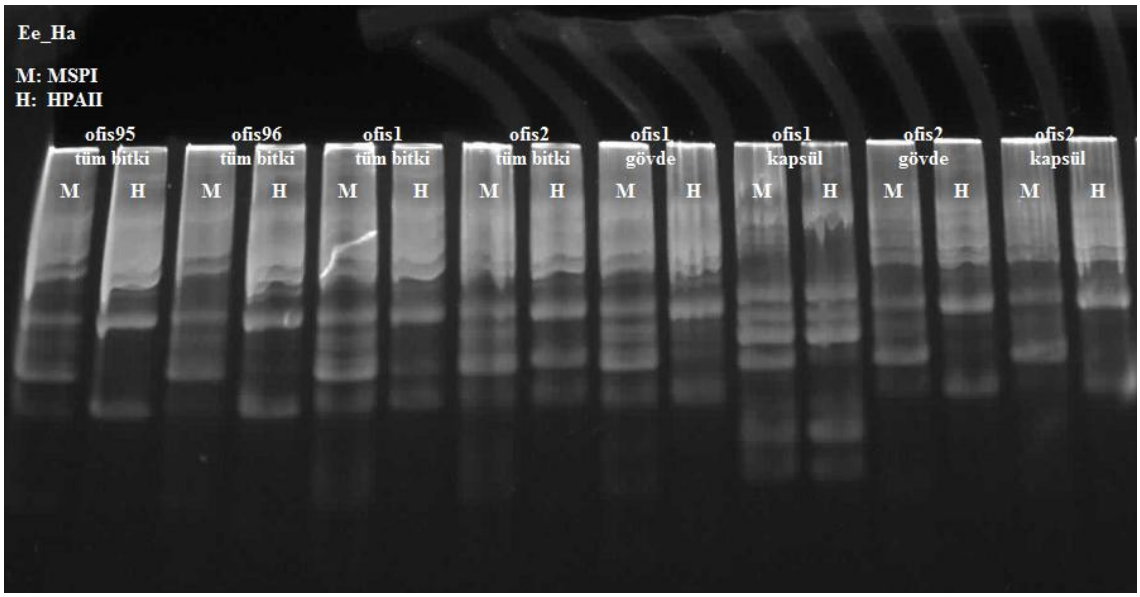
Şekil 4.13 Dokulara ait jel görüntüsü



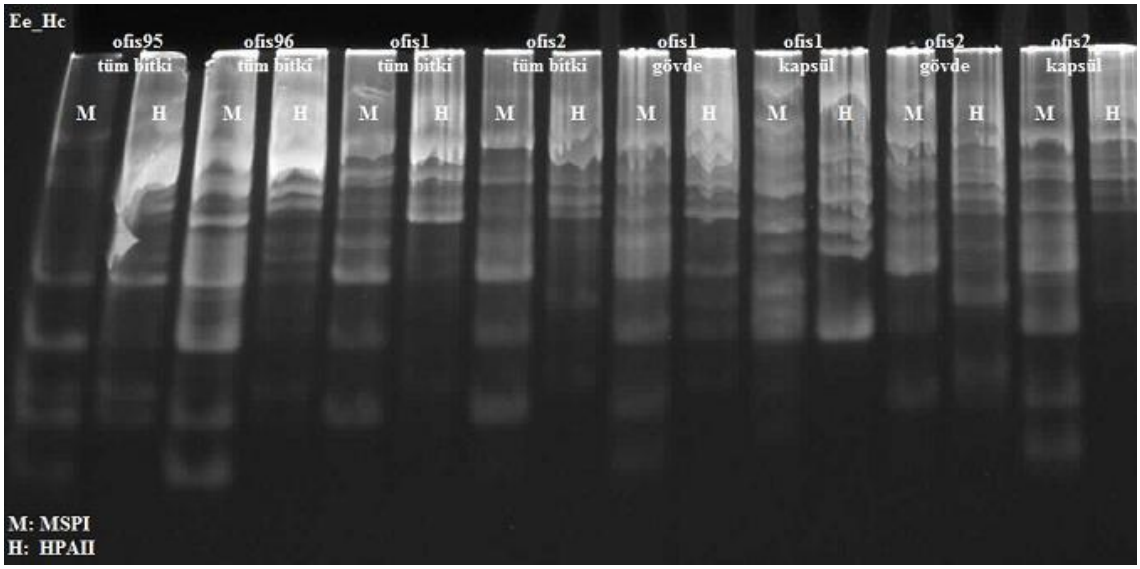
Şekil 4.14 Dokulara ait jel görüntüsü



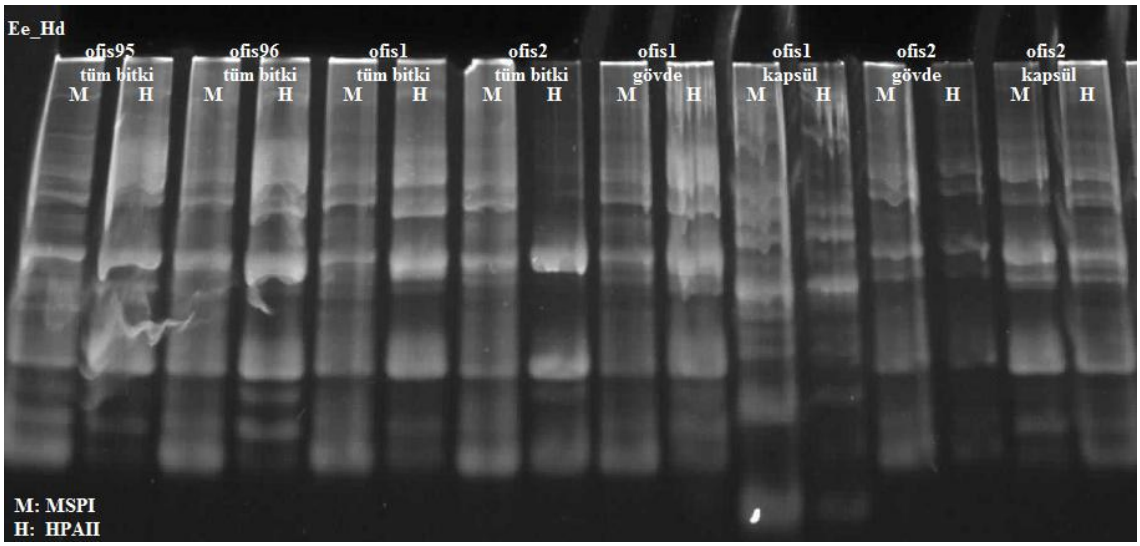
Şekil 4.15 Dokulara ait jel görüntüsü



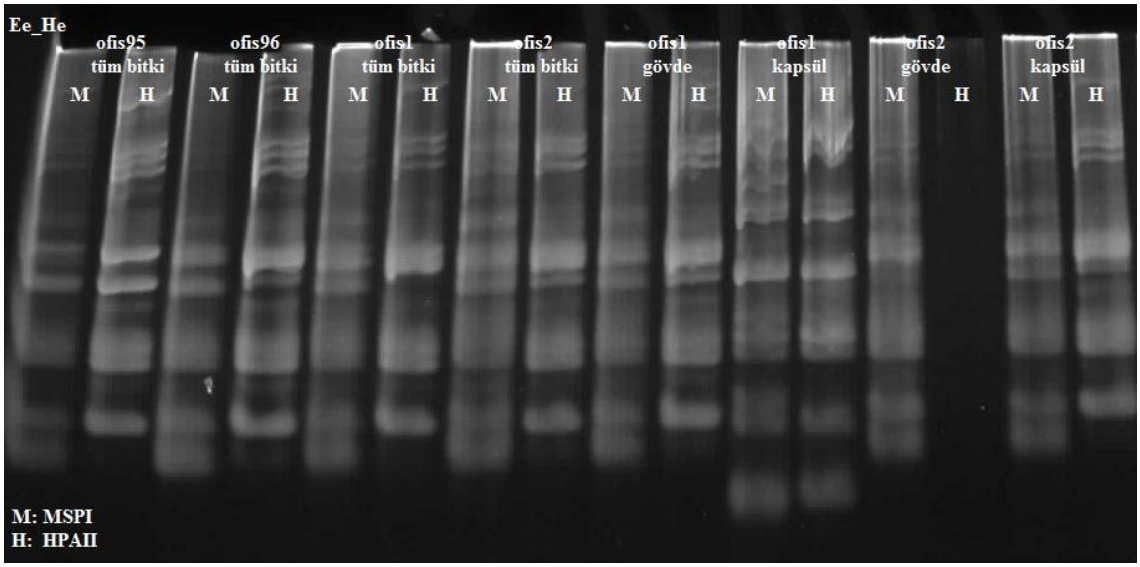
Şekil 4.16 Dokulara ait jel görüntüsü



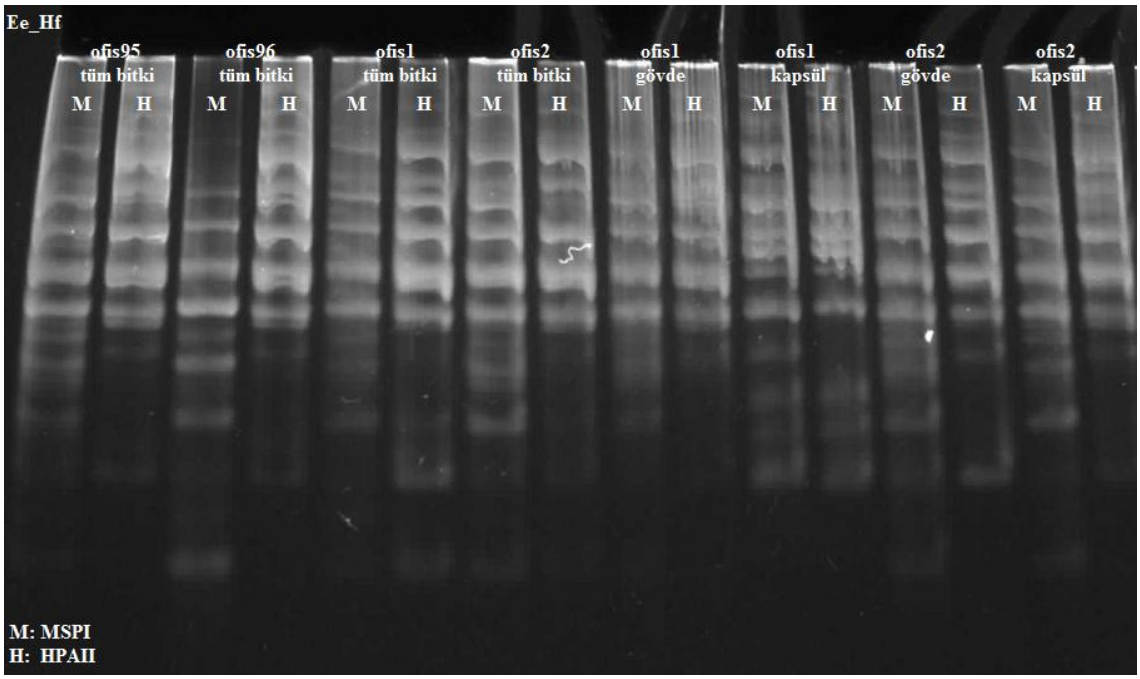
Şekil 4.17 Dokulara ait jel görüntüsü



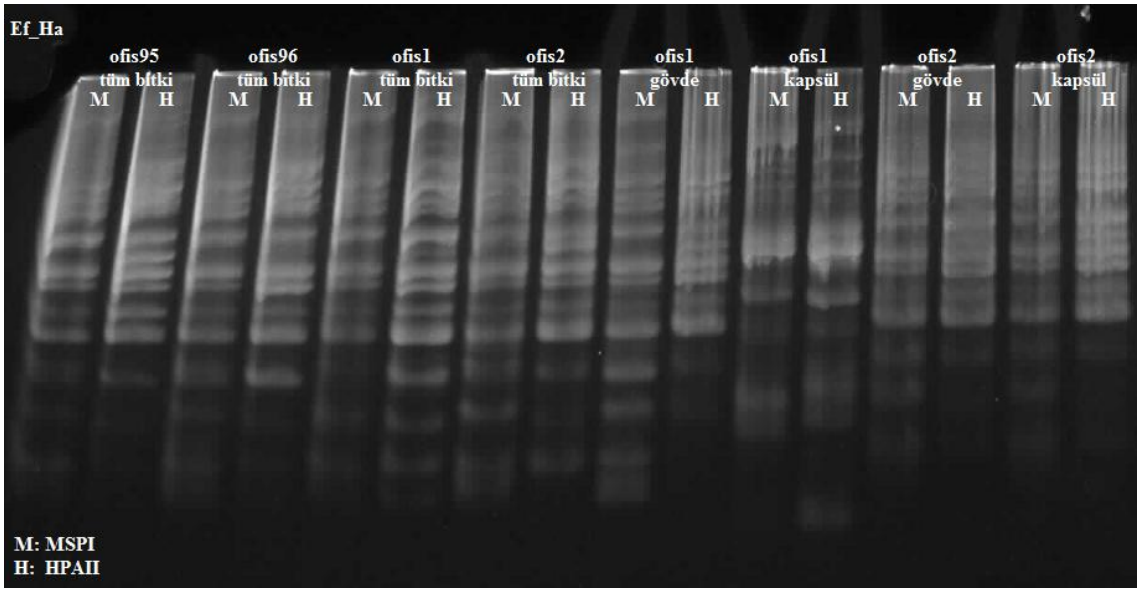
Şekil 4.18 Dokulara ait jel görüntüsü



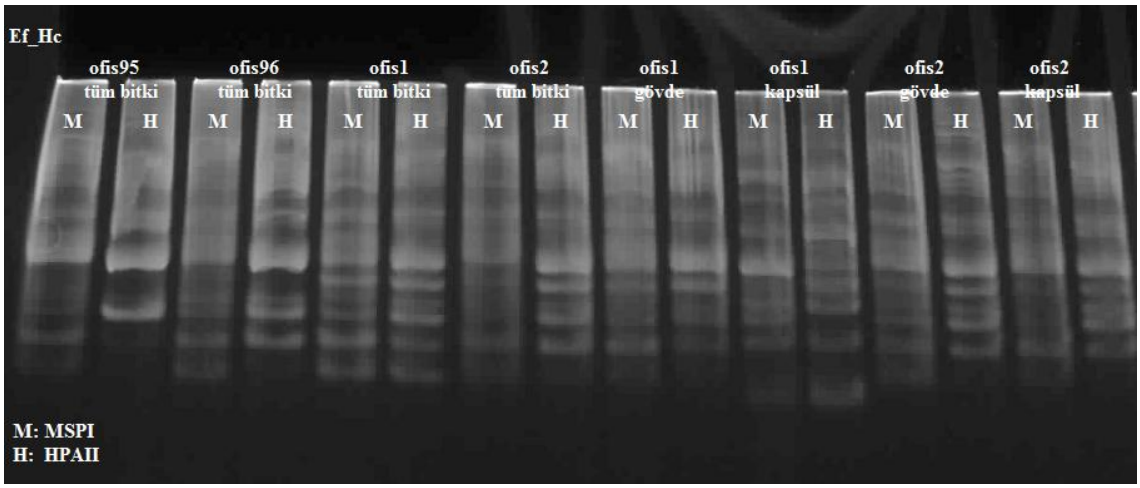
Şekil 4.19 Dokulara ait jel görüntüsü



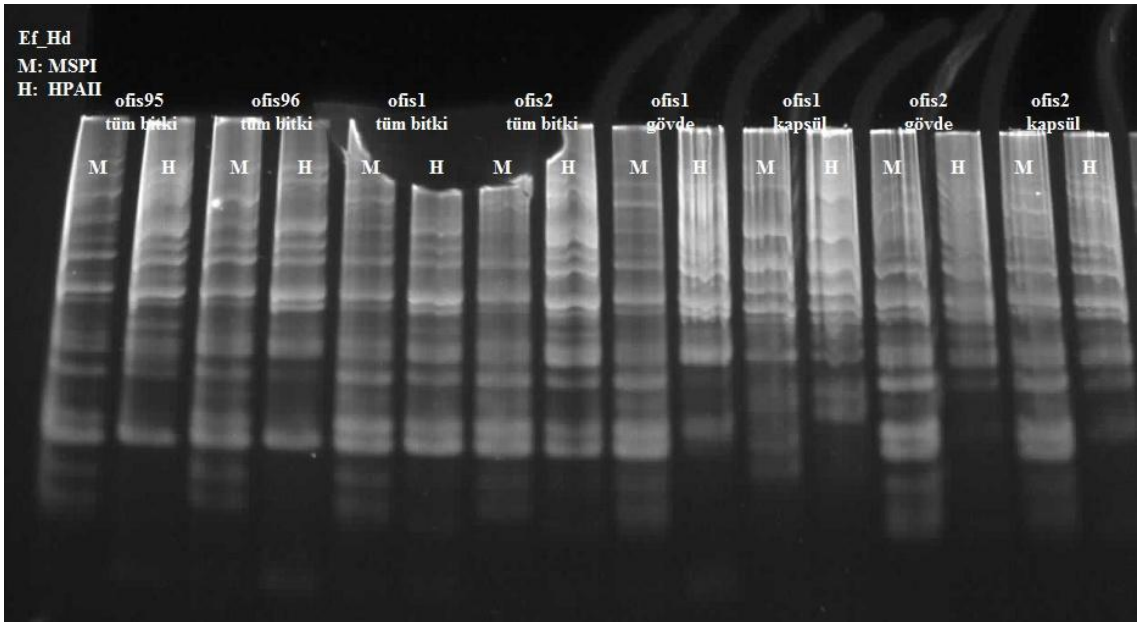
Şekil 4.20 Dokulara ait jel görüntüsü



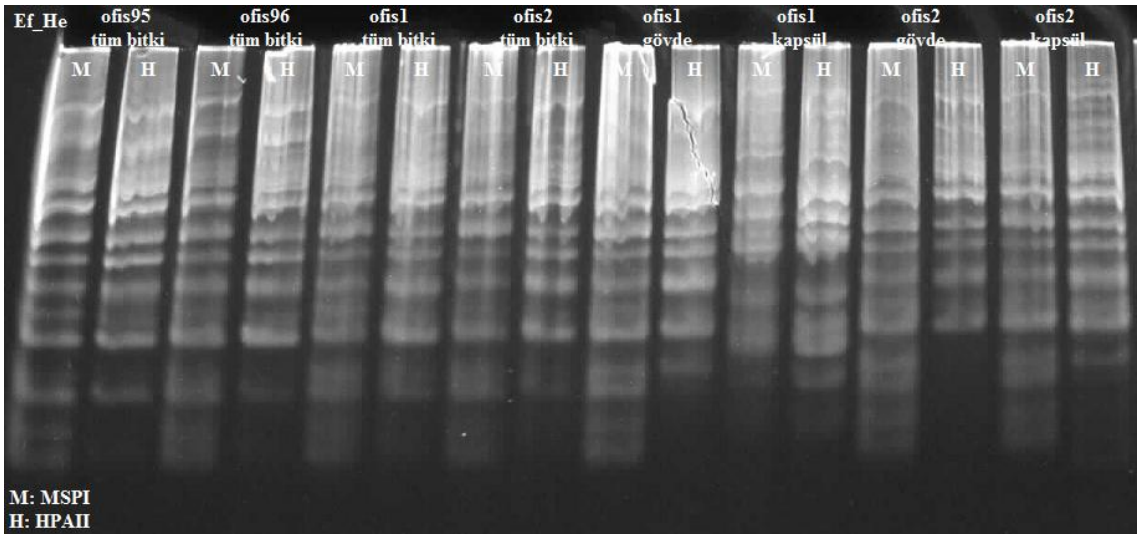
Şekil 4.21 Dokulara ait jel görüntüsü



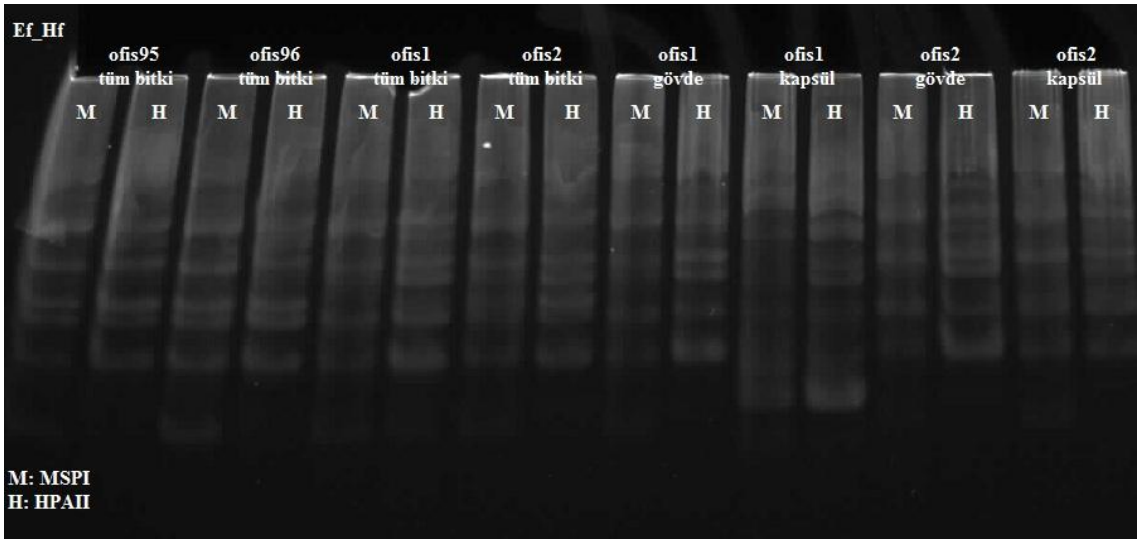
Şekil 4.22 Dokulara ait jel görüntüsü



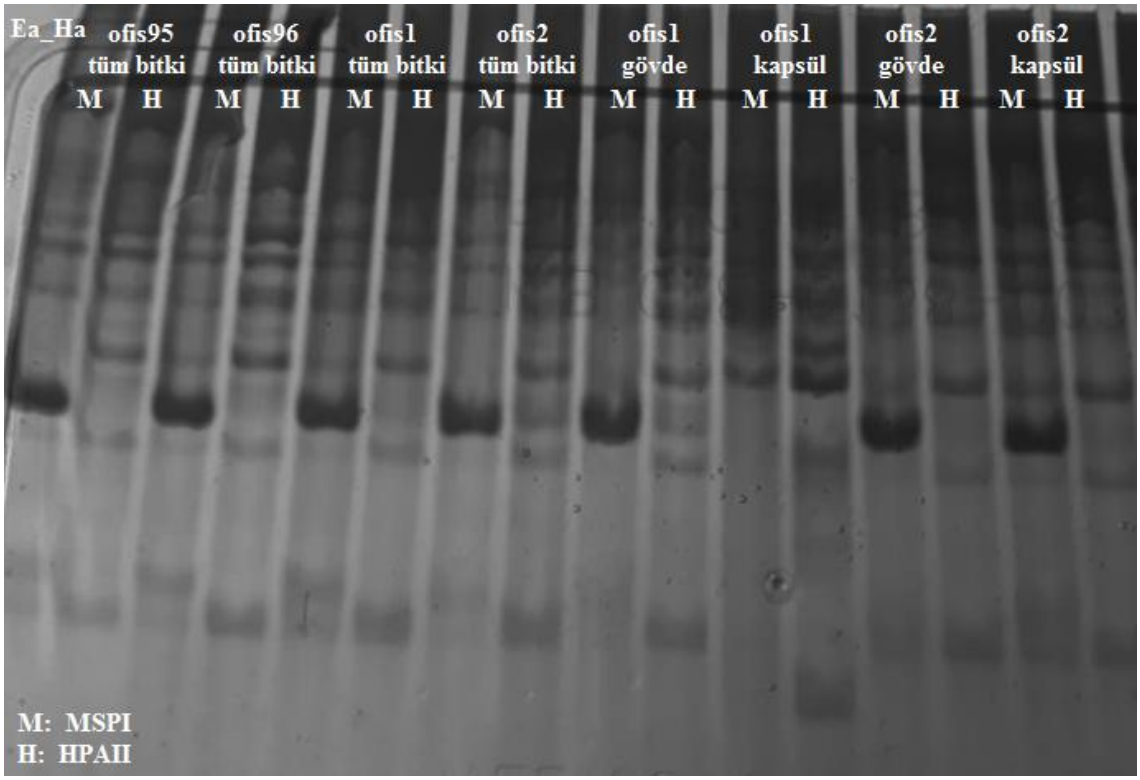
Şekil 4.23 Dokulara ait jel görüntüsü



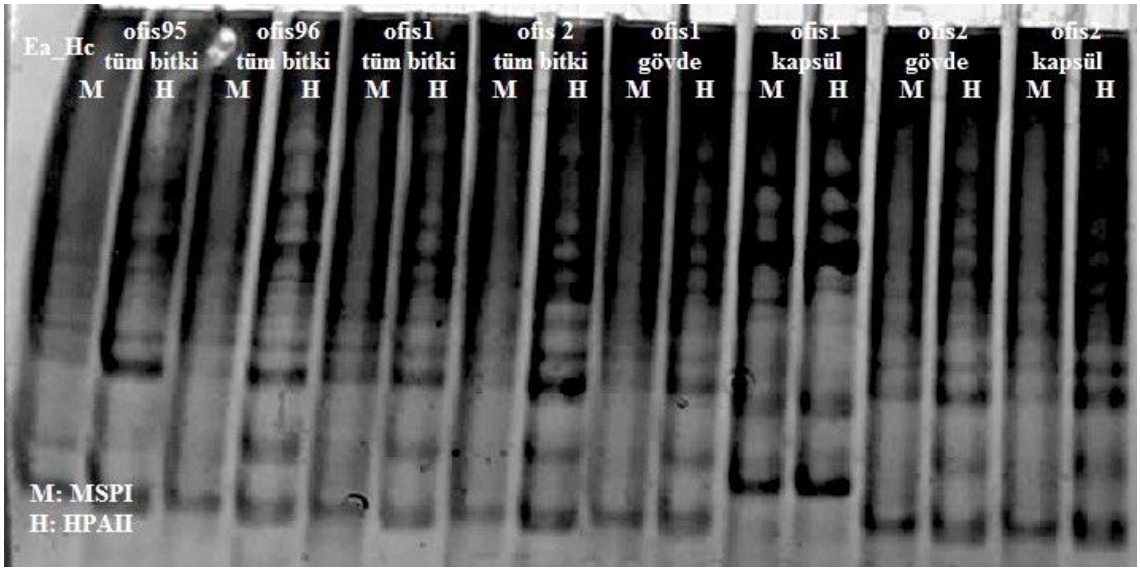
Şekil 4.24 Dokulara ait jel görüntüsü



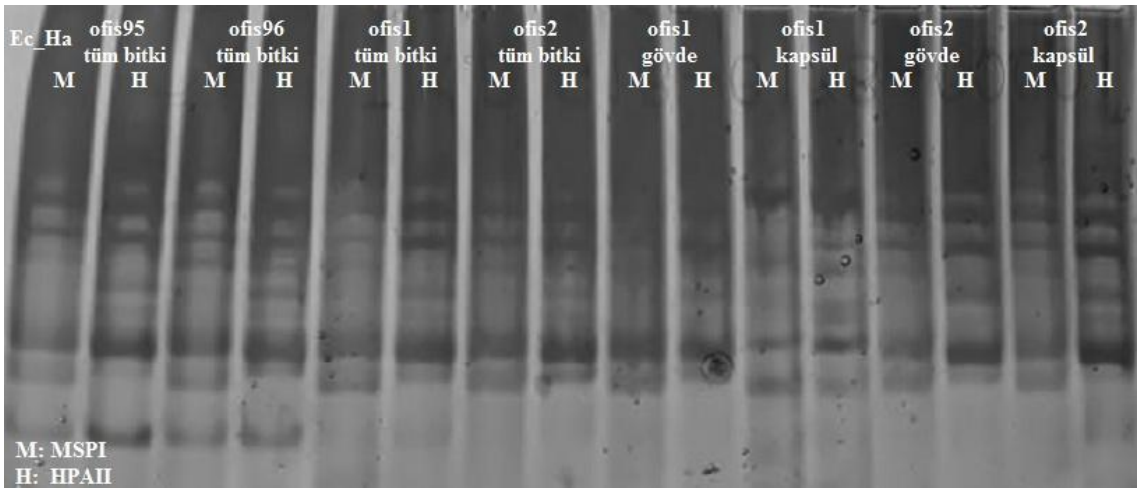
Şekil 4.25 Dokulara ait jel görüntüsü



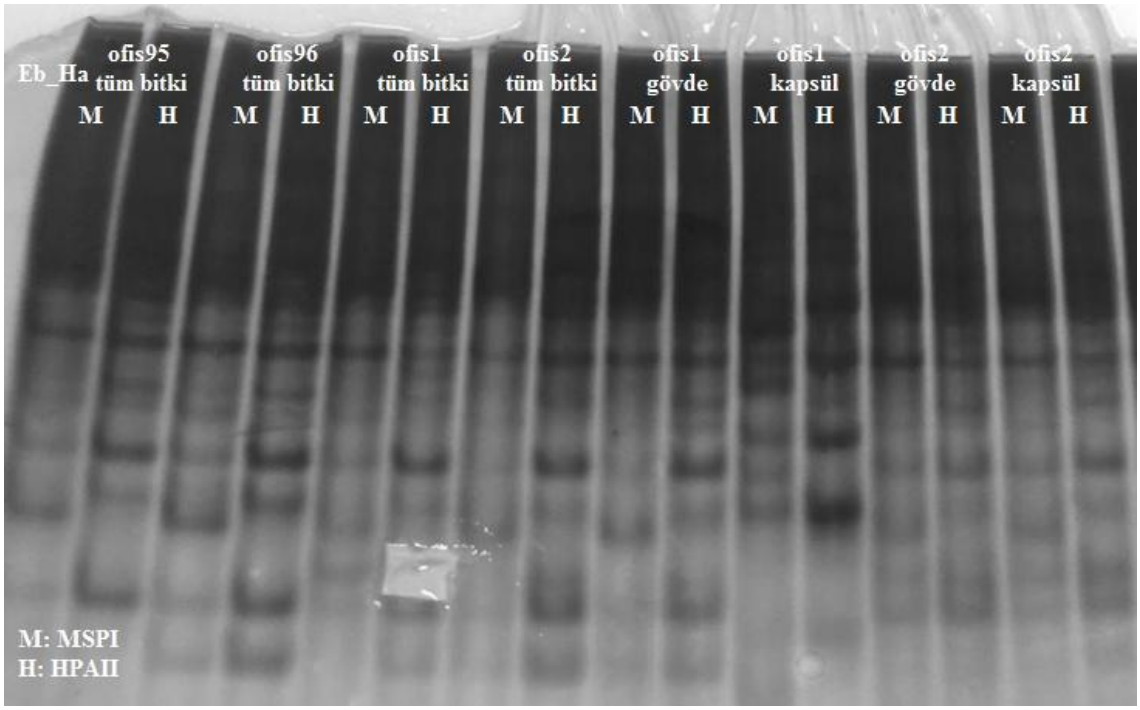
Şekil 4.26 Dokulara ait jel görüntüsü



Şekil 4.27 Dokulara ait jel görüntüsü



Şekil 4.28 Dokulara ait jel görüntüsü



Şekil 4.29 Dokulara ait jel görüntüsü

4.4 Skorlamaya Ait Sonuçlar

Alınan jel görüntülerindeki bantların değerlendirilmesi skorlama yöntemine yapılmış olup, 0 ve 1 değerleri verilerek analiz dosyası hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda çizelgelerde verilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ed_Ha	Ofis 95 Tümb. MSPI	Ofis 95 Tümb. HPAII	Ofis 96 Tümb. MSPI	Ofis 96 Tümb. HPAII	Ofis 1 Tümb. MSPI	Ofis 1 Tümb. HPAII	Ofis 2 Tümb. MSPI	Ofis 2 Tümb. HPAII	Ofis 1 Göv. MSPI	Ofis 1 Göv. HPAII	Ofis 1 Kap. MSPI	Ofis 1 Kap. HPAII	Ofis 2 Göv. MSPI	Ofis 2 Göv. HPAII	Ofis 2 Kap. MSPI	Ofis 2 Kap. HPAII
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0

Çizelge 4.3 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ed-Hc	**Ofis 95 Tümb. MSP I**	**Ofis 95 Tümb. HPA II**	**Ofis 96 Tümb. MSP I**	**Ofis 96 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Tümb. MSP I**	**Ofis 1 Tümb. HPA II**	**Ofis 2 Tümb. MSP I**	**Ofis 2 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Göv. MSP I**	**Ofis 1 Göv. HPA II**	**Ofis 1 Kap. MSP I**	**Ofis 1 Kap. HPA II**	**Ofis 2 Göv. MSP I**	**Ofis 2 Göv. HPA II**	**Ofis 2 Kap. MSP I**	**Ofis 2 Kap. HPA II**
	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	1	1	0	1
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1
	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1

Çizelge 4.4 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ed-Hd	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPAII**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPAII**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPAII**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPAII**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPAII**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPAII**
	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
	1	1	0	0	1	0	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	0
	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Çizelge 4.5 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ed-He	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPAII**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPAII**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPAII**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPAII**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPAII**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPAII**
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0
	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1
	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0

Çizelge 4. 6 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ed-Hf	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPA II**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPA II**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPA II**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPA II**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPA II**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPA II**
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0

Çizelge 4. 7 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ee_Ha	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPA II**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPA II**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPA II**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPA II**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPA II**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPA II**
	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1
	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

Çizelge 4.8 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ee_Hc	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPAII**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPAII**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPAII**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPAII**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPAII**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPAII**
	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0
	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.9 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ee_Hd	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPAII**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPAII**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPAII**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPAII**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPAII**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPAII**
	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0

Çizelge 4.10 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ee_He	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPAII**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPAII**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPAII**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPAII**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPAII**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPAII**
	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	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	0	1	1	1	1	0	0
	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0
	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.11 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ee_Hf	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPAII**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPAII**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPAII**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPAII**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPAII**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPAII**
	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
	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	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	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	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0

Çizelge 4.12 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ef_Ha	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPA II**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPA II**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPA II**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPA II**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPA II**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPA II**
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	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	1	1	1	1	0	0
	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0

Çizelge 4.13 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ef_Hc	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPA II**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPA II**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPA II**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPA II**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPA II**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPA II**
	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
	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	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	0	1	1	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.14 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ef_Hd	**Ofis 95 Tümb. MS PI**	**Ofis 95 Tümb. HPA II**	**Ofis 96 Tümb. MS PI**	**Ofis 96 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Tümb. MS PI**	**Ofis 1 Tümb. HPA II**	**Ofis 2 Tümb. MS PI**	**Ofis 2 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Göv. MS PI**	**Ofis 1 Göv. HPA II**	**Ofis 1 Kap. MS PI**	**Ofis 1 Kap. HPA II**	**Ofis 2 Göv. MS PI**	**Ofis 2 Göv. HPA II**	**Ofis 2 Kap. MS PI**	**Ofis 2 Kap. HPA II**
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	1	0	1	0	1	0	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
	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	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	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	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0

Çizelge 4.15 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ef_He	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPAII**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPAII**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPAII**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPAII**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPAII**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPAII**
	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	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	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.16 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ef_Hf	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPAII**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPAII**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPAII**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPAII**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPAII**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPAII**
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.17 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ec-Hc	**Ofis 95 Tümb. MSP I**	**Ofis 95 Tümb. HPA II**	**Ofis 96 Tümb. MSP I**	**Ofis 96 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Tümb. MSP I**	**Ofis 1 Tümb. HPA II**	**Ofis 2 Tümb. MSP I**	**Ofis 2 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Göv. MSP I**	**Ofis 1 Göv. HPA II**	**Ofis 1 Kap. MSP I**	**Ofis 1 Kap. HPA II**	**Ofis 2 Göv. MSP I**	**Ofis 2 Göv. HPA II**	**Ofis 2 Kap. MSP I**	**Ofis 2 Kap. HPA II**
	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	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	1	1	1	1	0	1
	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1

Çizelge 4.18 Dokulara ait skorlama sonuçları

Eb_Ha	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPAII**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPAII**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPAII**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPAII**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPAII**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPAII**
	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	0	0	1	1	1	0	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0

Çizelge 4.19 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ea-Ha	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPAII**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPAII**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPAII**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPAII**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPAII**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPAII**
	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.20 Dokulara ait skorlama sonuçları

Eb-Hc	**Ofis 95 Tümb. MSP I**	**Ofis 95 Tümb. HPA II**	**Ofis 96 Tümb. MSP I**	**Ofis 96 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Tümb. MSP I**	**Ofis 1 Tümb. HPA II**	**Ofis 2 Tümb. MSP I**	**Ofis 2 Tümb. HPA II**	**Ofis 1 Göv. MSP I**	**Ofis 1 Göv. HPA II**	**Ofis 1 Kap. MSP I**	**Ofis 1 Kap. HPA II**	**Ofis 2 Göv. MSP I**	**Ofis 2 Göv. HPA II**	**Ofis 2 Kap. MSP I**	**Ofis 2 Kap. 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	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1
	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.21 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ea-Hc	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPAII**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPAII**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPAII**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPAII**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPAII**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPAII**
	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	0	0	0	1	0	1	0	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

Çizelge 4.22 Dokulara ait skorlama sonuçları

Ec-Ha	**Ofis 95 Tümb. MSPI**	**Ofis 95 Tümb. HPAII**	**Ofis 96 Tümb. MSPI**	**Ofis 96 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Tümb. MSPI**	**Ofis 1 Tümb. HPAII**	**Ofis 2 Tümb. MSPI**	**Ofis 2 Tümb. HPAII**	**Ofis 1 Göv. MSPI**	**Ofis 1 Göv. HPAII**	**Ofis 1 Kap. MSPI**	**Ofis 1 Kap. HPAII**	**Ofis 2 Göv. MSPI**	**Ofis 2 Göv. HPAII**	**Ofis 2 Kap. MSPI**	**Ofis 2 Kap. HPAII**
	1	1	1	1	1	1	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
	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
	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

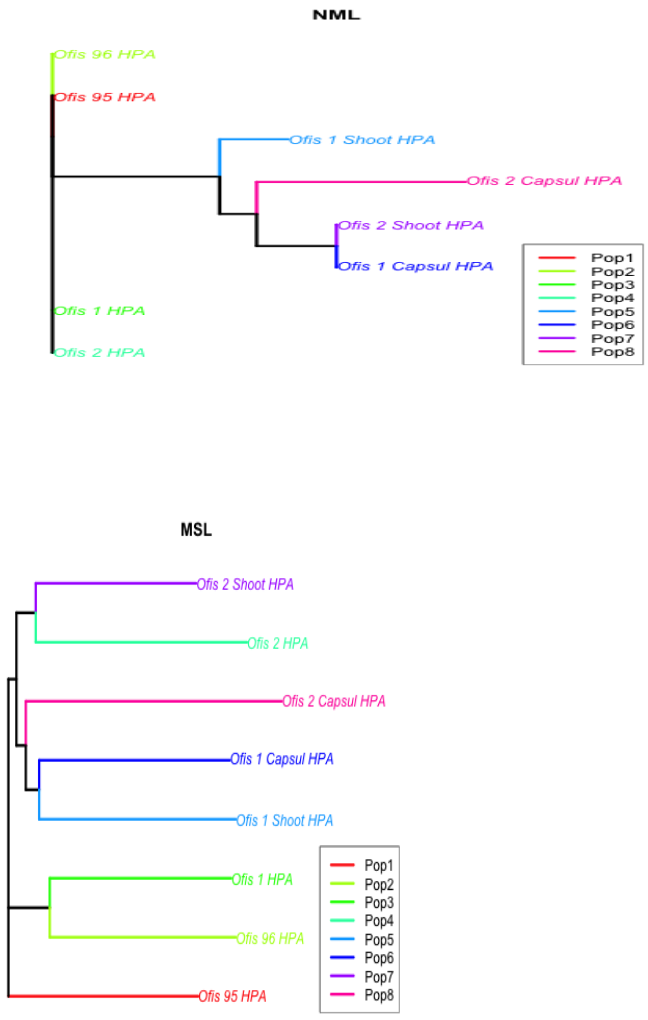
4.5 Filogenetik Analizler ve Sonuçları

Analizlerde elde edilen DNA fragmanları profillenerek örnekler arasında farklılık gösteren bantların analizi *msap* R programı kullanılarak yapılmıştır. 21 farklı primer kombinasyonu sonucunda toplamda 194 tane bant analiz edilmiş olup 150 tanesinde metilasyona duyarlı lokus (methylation susceptible loci: MSL) ve 44 tane de metillenmemiş lokus (non-methylated loci: NML) elde edilmiştir. MSL'de görülen ayrımlar epigenetik olup, NML'de gözlenen ayrımlar genetiktir. Polimorfik MSL bant sayısı 113 (% 75), ve NML 6 (% 14) olarak hesaplanmıştır. Örneklere ait metilasyon profillerinin frekansları Çizelge 4.23'de verilmiştir. En fazla sayıda metillenmemiş fragman bulunurken, bunu tam metillenmiş fragmanlar izlemektedir. En az sayıda ise hemi-metilasyonlu ve iç sitozinin metillendiği fragmanlar tespit edilmiştir.

Çizelge 4.23 Örneklerin metilasyon profil frekansları.

Metilasyon Durumları	**Populasyon 1 Ofis 95 Yaprak**	**Populasyon 2 Ofis 96 Yaprak**	**Populasyon 3 Ofis 1 Yaprak**	**Populasyon 4 Ofis 2 Yaprak**	**Populasyon 5 Ofis 1 Gövde**	**Populasyon 6 Ofis 1 Kapsül**	**Populasyon 7 Ofis 2 Gövde**	**Populasyon 8 Ofis 2 Kapsül**
HPA+/ MSP+ (Metillenmemiş)	0.3867	0.3733	0.3267	0.3667	0.3067	0.3533	0.3933	0.3000
HPA+/ MSP- (Hemimetilasyon)	0.1533	0.2200	0.1933	0.2000	0.1933	0.1800	0.1867	0.2400
HPA-/MSP+ (İç sitozin Metilasyonu	0.1867	0.2000	0.2400	0.1600	0.2467	0.2333	0.1933	0.2267
HPA-/MSP- (Tam Metilasyon)	0.2733	0.2067	0.2400	0.2733	0.2533	0.2333	0.2267	0.2333

Metilasyon profiline göre elde edilen Neighbor-Joining Tree (komşu birleştrme ağacı) metoduna göre filogenetik ağaç örneklerin organ düzeyinde farklı metilasyon profili gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.30). Kapsül ve gövde organları, yapraktan ayrı kollarda yer alarak, bu ayrım net bir şekilde gözlenmiştir.



Şekil 4.30 Çeşitlerin genetik olarak yakınlıklarını gösteren soyağacı (dendogram).

5. TARTIŞMA

Epigenetik, ilk kez 1940' te tanımlanmış ve DNA'daki dizilimden kaynaklanmayan fakat gen ifadesinde ortaya çıkan kalıtsal olan değişimler olarak ifade edilmektedir. Günümüzde ilerleyen teknoloji ile bu alanda yapılan çalışmalar büyük oranda artmıştır. Epigenetiğin organizma üzerindeki etkilerinin ortaya çıkmasıyla birlikte aynı genetik diziye sahip hücrelerin farklı profiller ortaya çıkararak farklı fenotiplerin meydana geldiği belirtilmiştir. Genlerin ifade şekillerinin farklı olması ata hücreden farklı şekillerde hücre tipinin oluşmasında etkili olmuştur (Güler ve Peynircioğlu 2016). DNA metilasyonu, genlerin ifadesinde etkili olan önemli epigenetik modifikasyonlardan biridir.

Türkiye doğal olarak yetişen tıbbi ve aromatik bitkiler açısından önemli bir paya sahiptir (Arslan vd. 2004). Haşhaş, benziizokinolin alkaloit kaynağı (BIA) olan afyon içeren çok yönlü olarak kullanılan bitkidir. Bu çalışma kapsamında, ülkemizin dünyadaki ana yetiştiricilerinden birisi olduğu ve üretmiş olduğu alkaloitler sebebiyle ekonomik değeri yüksek olan haşhaş bitkisinde morfin yolağında epigenetik düzenlemelerden metilasyonun etkileri ilk kez araştırılmıştır. Aynı zamanda morfin içerikleri farklı haşhaş çeşitlerinin kapsül ve gövde dokuları kullanılarak, metilasyonun morfin biyosentezindeki rolünün yanı sıra farklı organlar üzerindeki etkileri de aydınlatılmıştır.

Metilasyonun genlerin ifadelerinin düzenlenmesindeki etkilerine dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bazı genom bölgelerinde gelişimsel veya çevresel etmenlerle birlikte metilasyon durumu gen anlatımının düzenlenmesi amacıyla sürekli değişebilmektedir (Grant-Downton ve Dickinson 2005; Verhoeven ve ark. 2010; Furner ve Matzke 2011).

Genom dizilimi belirlendikten sonra DNA metilasyon desenlerini ortaya çıkarmak amacıyla birçok bilim insanı çalışmıştır. Genom dizisi belli olan ilk bitki olan *Arabidopsis'te* metilasyon durumu dokular arasında büyük oranda değiştiği bulunmuştur (Widman ve diğ. 2014) .

Organa özgü epigenetik işaretler, *A. thaliana'da* bitki üretimine katkıda bulunmuştur (Wibowo ve ark. 2018) . Bitkilerde ve hayvanlarda metilasyon süreci büyük oranda benzemektedir ve bitkilerde tespit edilmesi daha kolaydır çünkü bitkiler metilasyon bozukluklarını hayvanlardan daha kolayca tolere etmektedir (Uzel 2019). Yapılan başka bir çalışmada Mısır bitkisinde metilasyon durumlarında farklılık gözlemlenmiştir (Wang ve ark. 2009) . Epigenetik düzenlemeler üzerinde yapılan çalışmalar buğday, kanola, kahve, patates, muz gibi diğer büyük bitkilere de yapılmaktadır.

Çalışmamızda TMO tarafından tescillenmiş Afyon yöresinde yaygın olarak ekimi yapılan morfin oranı düşük Ofis 95, Ofis 96 ve morfin oranı yüksek Ofis 1 ve Ofis 2 çeşitleri 21 farklı MSAP markörü kullanılarak aralarındaki DNA metilasyon seviyeleri metilasyona duyarlı amplifikasyon polimorfizmi (MSAP) tekniği kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Bu teknikle CCGG dizileri HpaII ve MspI enzimleriyle eşit olarak kesilmiştir. Metillenmiş CGG dizileri Hpa II le kesilmemiş MspI ile kesilmiş olup metillenmemiş diziler ise iki enzimle birlikte kesilmiştir. PZR aşamasında gende metilasyon varsa HpaII DNA dizisini kesemeyecek ve amplifikasyon başarıyla sonuçlanacaktır (Tekin 2003).

HpaII / MspI restriksiyon enzimleriyle metilasyonla ilgili ilk çalışmayı 1978 yılında Waal Wisk ve Flavell, 1979 yılında Sinzeret ve arkadaşları, Cedar ve arkadaşlarıda 1979 yılında yapmışlardır. Böylece CCGG bölgesinin analizi yapılarak toplam metilasyonun %6'sı belirlenebilir (Tekin 2003).

Çalışmamızda toplam 194 tane bant elde edilmiştir. Bu bantların 113 tanesi (% 75) polimorfik MSL iken 6 tanesi (% 14) NML olarak hesaplanmıştır.

Metillenmiş sitozin gen ifadesinin düzenlenmesinde etkili olduğu önemli rolü ve normal sitozinden farklı olmasından dolayı "DNA'nın beşinci bazı" olarak adlandırılmasına sebep olmuştur (Lister ve Ecker, 2009). Bu sebeple, nükleotid dizilerinin yanında metilasyon deseni bakımından da değerlendirilmesinin gerekliliğini göstermektedir (Toparslan ve ark. 2015).

Çalışmamızda 4 farklı metilasyon deseni gözlemledik. 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 eder. Tüm haşhaş çeşitlerde en çok gözlemlenen desen metillenmemiş fragman olmuştur daha sonra tam metillenmiş ve en az olarakta hemimetilasyonlu ve iç sitozinin metillediği fragmanlar görülmüştür.

Sonuçlara bakıldığında dendogram bize farklı BIA içeriğine sahip afyon haşhaş çeşitlerinin metilasyon profilininin farklı olduğunu göstermektedir.Ayrıca Çeşitlerin kapsül ve yaprak doku örnekleri bakımından da farklı metilasyon profiline sahip olduğu görülmektedir.

Ofis 1ve Ofis 2 çeşitleri ortak köken almış 2 temel gruba ayrılmış ve daha sonra kapsüller ve gövdeler yapraklardan belirgin farkla ayrıldığı gözlemlenmiştir.Farklı olarak Ofis 2 çeşidinin kapsülü de diğerlerinden farklı bir epigenetik profil göstermiştir.

Ayrıca metilasyon bakımından genetik yakınlıklarının gösterildiği dendogramda Ofis 1'in farklı olarak Ofis 96 ile ortak köken aldığı ve ayrıldığı gözlemlenmiştir. Ofis 95'in ise diğer çeşitlerden ayrılarak tek başına bir grup oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Alkaloitlerin alındığı doku ve çevre koşulları alkoloit içeriğini değiştirmektedir ve alkoloitler, gen ifadelerini etkilediği için büyük oranda önem taşımaktadır (Facchini 2001; Ziegler vd. 2006). Morfin biyosentezinde etkili olan bazı genlerin susturulması ile morfin miktarı azalmaktadır (Facchini ve Wijekoon 2012). Gen ifadesini düzenleyiciler gen ekspresyonunu dokuya özgü etkileyerek bizim çalışmamızda farklı metilasyon profilini görmemize sebep olmuştur. Kapsül ve yapraklarda ortaya çıkan farklı epigenetik profiler de bize DNA metilasyonun BİA biyosentezi üzerindeki etkili olabileceğini göstermiştir.

Gürkök ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada, BIA biyosentezinde rol alan dokuya göre farklılık gösteren düzenleyicilerin etkilerini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak biyosentezde görevli olan genlerin aşırı ekspresyonu ve genlerin susturulması alkaloit miktarını dokuya göre farklılılık gösterecek şekilde etkilemiştir. Gen susturulmasının morfin içeriğini azalttığını, aşırı gen ekspresyonunun morfin içeriğini arttırdığını tespit etmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada Pandey vd. (2016) haşhaş bitkisinde farklı bölgelerde bulunan, dokuya özgü işlevleri yerine getiren endofitlerin, bitki üretkenliği açısından ve benzilizokinolin alkaloid (BIA) biyosentezinde etkili olabildiğini araştırdılar. İzole ettikleri endofitlerden yaprak endofitleri fotosentetik verimliliğini ve bitki büyümesini modüle ederken, kapsül endofitleri alkaloid biyosentezini modüle ettiğini açıkladılar. Bu da bizim çalışmamızda kapsül ve yapraklardan farklı metilasyon profilinin çıkmasıyla bu çalışmadaki dokuya özgü rolün farklılık gösterdiğini doğrulamaktadır.

Kapsül ve diğer organlardan çıkan farklı epigenetik profiller, metilasyonun BIA Biyosentezi üzerindeki etkisininin olduğunu düşündürmektedir. Sonuç olarak, farklı DNA metilasyon durumu, afyon haşhaşındaki alkaloit içeriği söz konusu olduğunda önemli biyolojik anlamlara sahip olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

Alaca, F. 2015. Farklı haşhaş tiplerinde alkaloitler yönünden morfolojik ve ontogenetik varyabilite, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

Anonim, 2013a. Toprak Mahsülleri Ofisi Genel Müdürlüğü, [http://www.tmo. gov.tr/Upload/ Document/raporlar/HashasRaporu2012.pdf], Erişim Tarihi: 12.07.2013.

Anonim, 2015. 2014 Yılı Haşhaş Sektör Raporu. http://tarim.kalkinma.gov.tr/wpcontent/uploads/2015/12/2014 hashaş sektorraporu.pdf, (Erişim Tarihi: 15.08.2017).

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

Arslan, N., Büyükgöçmen, R., Gümüşçü, A. 2000. Oil and Morphine Contents of Turk ish Poppy Populations. Field Crops Central Research Institute Journal.

Arslan, N., İpek,A., Rahimi, A. ve İpek, G. 2011. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Genetik kaynaklarının Morfin ve Bazı Özellikler Yönünden Değerlendirilmesi, Bursa,Tarım Kongresi, II. Cilt: 1185 – 1190.

Chen, Z.J., Şarkı, O., Zhang, T., Stelly, D.M. 2017. Qingxin Song et al, Epigenomic and functional analyses reveal roles of epialleles in the loss of photoperiod sensitivity during domestication of allotetraploid cottons, Genome Biology. DOI: 10.1186/s13059-017-1229-8.

Chwialkowska, K., Korotho U., Kosinska, J., Szarejko, I., 2017. Methylation Sensitive Amplification Polymorphism Sequencing (MSAP-Seq)—A Method for High-Throughput Analysis of Differentially Methylated CCGG Sites in Plants with Large Genomes; Front. Plant Sci., 30 November 2017.

Demirci, Y. 2016. Morfin ve Noskapin içeriği yüksek haşhaş (*Papaver somniferum* L.) genotiplerinde RNA kütüphanelerinden transkripsiyon faktörlerinin tespiti ve ifade analizi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ,Yüksek Lisans Tezi.

Erdurmuş A 1989. In Poppy Lines (Papaver somniferum L.) Relationships With The Morphine and Seed Yield of Phonological and Morphological Characters. PhD Thesis, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara University-Ankara.

Eser, B., Saygılı, H., Gökçöl, A. ve İlker, E. 2006. Tohum Bilimi ve Teknolojisi. Ege Üniversitesi Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi Yayınları. Cilt:1. İZMİR.

Facchini, P.J. and Park, S.U. 2003. Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. Phytochemistry, 64, 177–186.

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

Facchini, P.J., Huber-Allanach, K.L., Tari, L.W., 2000. Plant aromatic L-aminoacid decarboxylases, evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering

applications. Phytochemistry, 54,121-138.
Furner, IJ., Matzke, M. 2011. Methylation and demethylation of the Arabidopsis ge nome. Curr. Opin. in Plant Biol., 14:137- 141.
Grant-Downton, R.T., Dickinson HG. 2005. Epigenetics and its implicaitons for plant biology.1. The epigenetic networks in plants. Ann. Bot., 96: 1143-1164.
Güler, C., Peynircioğlu, B. 2016. DNA metilasyonu ve hastalıklarla ilişkisi ACU Sağlık Bilimleri Dergisi 2016(2):61-68.
Gürkök, T. 2013. Morfin İçeriği İndüklenmiş Haşhaş *(Papaver somniferum* L.) Bitkisinde Genom Düzeyinde Transkriptom Analizi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi 2013:340 sayfa.
Güven, A., Gürsul, I. 2014. Bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit sentezi, doi: 10.15237/gida.GD13060. Tunceli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Derleme.
Holková, I., Bezáková, L., Bilka F, Balažová, A., Vanko, M., Blanáriková, V. 2010. Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in Papaver somniferum suspension cultures. Plant Physiology and Biochemis try. ; 48(10):887-92.
İnan, Ş. 2013. Haşhaşta (Papaver somniferum L.) bazı tarımsal özellikler ile yağ ve morfin miktarının belirlenmesi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013-YL-070.
İnan, Ş., Kaynak, M.A., Küçüktaban, F., 2006. Haşhaşta (Papaver somniferum L.) Bazı Fizyolojik ve Morfolojik Özellikler ile Yağ ve Morfin Miktarının Belirlenmesi, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 25 (Özel sayı-2):296-300 Araştırma Makalesi (Research Article).
İncekara, F. 1949. Türkiye Haşhaş Çeşitleri ve Bunların Tohum ve Afyon Verimi Bakımından Değerleri. Toprak Mahsulleri Ofisi Yayınları, Ankara.
İpek, Ş. 2011. Seçilmiş yüksek morfinli haşhaş(Papaversomniferum L.) hatlarının bazı bitkisel ve tarımsal özellikleri üzerine araştırmalar, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
İzmirli, M., Tufan, T., Alptekin, D. 2012. DNA Metilasyonu (Arşiv Tıbbi İnceleme Dergisi) 2012; 21 (4): 274-282.
Liscombe, D.K., Facchini, P.J. 2008. Evolutionary and cellular webs in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. Current Opinion in Biotechnology 19:173–180.
Mishra, S., Triptahi, V., Singh, S., 2013. Wound Induced Tanscriptional Regulation of Benzylisoquinoline Pathway and Characterization of Wound Inducible PsWRKY Transcription Factor from *Papaver somniferum.*
Nestler, EJ. 2014. Epigenetic mechanisms of drug addiction.Neuropharmacology, *76: 259-268.*
Novak, J., Strakova, V., 1989. Evaluation of Selected Poppy (Papaver somniferum L.) Varieties. Rostlinna Vyroba. Vysoka Skola Zemedelska, 16521 Prague.
Quint, A., Cedar, H., 1981. In vitro methylation of DNA with HpaII methylase. Pub lished in Nucleic acids research.
Soyalp, C. 1996. Morfin oranı yüksek Haşhaş (Papaver somniferum L.) hatlarının kapsül ve tohum verimleri üzerine bir araştırma. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

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

Tanker, N., Koyuncu, M. ve Coşkun, M. 2007. Farmasötik Botanik II (III. Baskı). Ankara Ünv. Ecz. Fak. Yay., Yay. No:93, 397s, Ankara.

Tekin, S., Ok, E., Cücer, N. 2003. DNA Metilasyon Faktörünün Meme Kanseri Oluşumundaki Rolünün Araştırılması. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (E.Ü. Journal of Health Sciences) 12(3) 35-43, 2003.

Verhoeven, K.J.F., Jansen, J.J., Van.D.i.j.k, P.J., Biere, A. 2010. Stressinduced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. New Phytol., 185: 1108-1118.

Wang, Z., Gerstein, M., Snyder M:, 2009. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. Nature Rewiew Genetics, 10, 57-63.

Wu, K., Zhang,L., Zhou,C., Yu,C.W., Chaikam,V., 2008. HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany, 59,225–234.

Wu, S., and Chappell, J., 2008. Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. Current Opin ion in Biotechnology,19, 145–152.

Yaish, M.W., Peng M., Rothstein S.J. 2014. Global DNA Methylation Analysis Using Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP). In: Sanchez-Serrano J., Salinas J. (eds) Arabidopsis Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1062. Humana Press, Totowa, NJ.

Yazıcı, L. 2017. Haşhaş (Papaver somniferum L.) Yarım Diallel Melez Kombinasyonlarında Melezleme Başarısı ve Melez Tohum Verimlerinin Belirlenmesi, Cilt 26 , Sayı , Sayfalar 155 – 160.

Yazıcı, L., Yılmaz, G., Gökalp S., 2017. Bazı Haşhaş (Papaver somniferum L.) Çeşit ve Genotiplerinin Alkaloid ve Yağ Oranlarının Belirlenmesi Cilt 20, Sayı , Sayfalar 313 – 317.

Yokuş, B. 2013. Epigenom ve Epigenetik, Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 2013:1(2):5-13.

Zhang, H., Hedhili, S., Montiel, G., Zhang, Y., Chatel, G., Pre´, M., Gantet, P., Memelink, J., 2011. The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the ORCA genes that regulate alkaloid biosynthesis in Catharanthus roseus. The Plant Journal, 67, 61–71.

Temizkan, G., Arda, N., Sarıkaya, A., 2004 Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM) Yayın No: 2.

Dilsiz N. (2004). Moleküler Biyoloji. Palme Yayıncılık, 55-56, Ankara.

Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983). "A Plant DNA Minipreparation: Ver sion Ii". Plant Molecular Biology Reporter., 1/4, 19-21.

Qi, L.J., Fu, Y., Shi, W.X., Wu, B.Y., Wang, Z.Y., Zhang, Q.D. and Shi, W.Q. (2008). Sesquiterpene Lactones and their Anti-Tumor Activity from the Flowers of Inula britannica. Letters in Drug Design and Discovery., 5, 433-436.

Qui, Y.L., Lee, J.H., Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zanis, M., Zimmer, E.A., Chen, Z.D., Savolainen, V. and Chase, M.W. (1999). The Ear liest Angiosperms, Evidence from Mitochondrial, Plastid and Nuclear

Genoms. Nature., 402, 404-407.
Rhoades, J.D. (1982). Soluble Salts. Methods of Soil Analysis. Part 2, Chemical and Microbiological Properties. Edit: A.L. Page, R.H. Miller, D.R. Keeney., 167-179. Wisconsin; USA.
Yang Y.J., & Pak H.J. (2006). Phylogeny of Korean Rubus (Rosaceae) Based on ITS(nrDNA) and trnL/F Intergenic Region (cpDNA). Journal of Plant Biolo gy., February, 49(1), 44-54.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Betül BULUT

Doğum Yeri : Çankırı

Doğum Tarihi : 08/02/1992

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Almanca

Eğitim Durumu

Lisans: Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Fen ve Teknoloji Öğretmenliği Bölümü (2015)

Yüksek Lisans: Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2020)