
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

HAŞHAŞ BİTKİSİNDE EPİGENOMİK YAKLAŞIMLAR İLE ALKALOİD YOLAK ANALİZİ

Tuba AKSOYLU

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OCAK 2026

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tuba AKSOYLU

14/01/2026

HAŞHAŞ BİTKİSİNDE EPİGENOMİK YAKLAŞIMLAR İLE ALKALOİD YOLAK ANALİZİ

(Doktora Tezi)

Tuba AKSOYLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2026

ÖZET

Papaver somniferum L.*,* morfin ve noskapin gibi farmasötik açıdan önemli benzilizokinolin alkaloidlerinin (BIA) başlıca kaynağıdır. BIA yolağında görev alan birçok enzim tanımlanmış olsa da halen ilgili yolak tümüyle çözümlenememiştir. Klasik genetik ve biyokimyasal düzenleme mekanizmalarının yanı sıra, epigenetik süreçlerin de bu biyosentezde belirleyici olabileceği düşünülmektedir. Ancak, haşhaşta BIA biyosentezinin epigenetik kontrolüne yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu tez çalışmasının amacı, farklı haşhaş çeşitleri arasında gözlenen BIA içeriği varyasyonunun epigenetik temellerini araştırmaktır. Bu doğrultuda tez çalışmasında alkaloid içerikleri farklılık gösteren haşhaş çeşitlerine ait kapsül ve gövde organlarında azaltılmış temsili bisülfit dizileme (RRBS) gerçekleştirilmiştir. Analizler, çeşit ve organlara özgü DNA metilasyon modellerini ortaya koymuş; özellikle BIA düzeyi yüksek çeşitlerin belirgin epigenetik farklılıklar sergilediğini göstermiştir. Bulgular, morfin ve noskapin biyosentezinin farklı epigenetik düzenleme yollarıyla kontrol edildiğine işaret etmiş; fotosentez ve karbon metabolizmasının morfin biyosentezinde, ribozomal ve çekirdek ilişkili süreçlerin ise noskapin biyosentezinde öne çıktığını göstermiştir. Ayrıca Sitokrom P450 enzimleri, F-box proteinleri ve ABC taşıyıcılarını kodlayan genlerin epigenetik düzenleme altında farklı şekilde ifade edildiği belirlenmiş, bu da alkaloid biyosentezi, taşınması ve detoksifikasyonunun çok katmanlı bir düzenleyici ağ tarafından kontrol edildiğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, bu tez çalışması haşhaşta BIA biyosentezinin epigenetik düzenlenmesinde DNA metilasyonunun rolünü ilk kez kapsamlı biçimde ortaya koymuş ve özellikle morfin ile noskapin biyosentezi arasındaki farklılıkların epigenetik açıdan nasıl şekillendiğine dair önemli bilgiler sağlamıştır. Bu bulgular, Papaver'de biyosentez yolaklarının daha iyi anlaşılmasına katkı sunmakta ve gelecekte biyoteknolojik uygulamalara temel oluşturacak yeni araştırmalara ışık tutmaktadır.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : Biyoinformatik, alkaloid, morfin, noskapin, epigenomik
Sayfa Adedi : 165
Danışman : Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ

ALKALOID PATHWAY ANALYSIS WITH EPIGENOMIC APPROACHES IN POPPY PLANT

(Ph. D. Thesis)

Tuba AKSOYLU

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2026

ABSTRACT

Papaver somniferum L. is the principal source of pharmaceutically important benzylisoquinoline alkaloids (BIAs), such as morphine and noscapine. Although many enzymes involved in the BIA pathway have been identified, the complete elucidation of this pathway remains unresolved. In addition to classical genetic and biochemical regulatory mechanisms, epigenetic processes are also thought to play a decisive role in this biosynthesis. However, studies addressing the epigenetic regulation of BIA biosynthesis in poppy are still very limited. The aim of this dissertation is to investigate the epigenetic basis underlying the variation in BIA content observed among different poppy varieties. Accordingly, reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) was performed on capsule and stem tissues of poppy varieties exhibiting distinct alkaloid profiles. The analyses revealed cultivar- and organ-specific DNA methylation patterns and demonstrated that high-BIA varieties display pronounced epigenetic differences. The findings suggest that morphine and noscapine biosynthesis are controlled through distinct epigenetic regulatory mechanisms; photosynthesis and carbon metabolism were found to be associated with morphine biosynthesis, while ribosomal and nuclear-related processes were implicated in noscapine biosynthesis. In addition, genes encoding cytochrome P450 enzymes, F-box proteins, and ABC transporters were shown to be differentially regulated under epigenetic control, highlighting that alkaloid biosynthesis, transport, and detoxification are governed by a multilayered regulatory network. In conclusion, this dissertation provides the first comprehensive evidence for the role of DNA methylation in the epigenetic regulation of BIA biosynthesis in poppy, and offers novel insights into how epigenetic mechanisms differentially shape morphine and noscapine biosynthesis. These findings contribute to a deeper understanding of biosynthetic pathways in Papaver and shed light on new research avenues that may form the basis for future biotechnological applications.

Science Code	:	20309
Key Words	:	Bioinformatics, alkaloid, morphine, noscapine, epigenomics
Page Number	:	165
Supervisor	:	Prof. Dr. Mine TURKTAS

TEŞEKKÜR

Doktora sürecimin her aşamasında engin bilgi ve tecrübesiyle bana yol göstererek yardımlarını benden esirgemeyen, değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarımda yardımını eksik etmeyen Arş. Gör. Zehra Kübra YILMAZ, Bil. Uzm. Biyolog Setenay AYKANAT ve diğer tüm hocalarıma teşekkür ederim.

FDK-2023-8427 no' lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığına ve çalışmamızda kullandığımız haşhaş çeşitlerini bizlere temin ettiği için Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü, Haşhaş ve Alkaloid İşleri Dairesi Başkanlığına teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hayatımın her anında benden desteğini, sevgisini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi

RESİMLERİN LİSTESİ xvii

SİMGELER VE KISALTMALAR xviii

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 3

2.1. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) ve Önemi 3

2.2. Alkaloidler 5

2.3. Benzilizokinolin Alkaloidleri (BIA) ve Biyosentezi 5

2.3.1. Morfin 8

2.3.2. Noskapin 9

2.3.3. BIA biyosentezinin moleküler ve genetik incelenmesi 9

2.4. Epigenetik 11

2.5. Epigenetik Analiz Yöntemleri 14

2.6. Bisülfit Dizileme (Bi-Seq) 14

2.7. Azaltılmış Temsili Bisülfit Dizileme (RRBS) 15

2.8. Biyoinformatik 18

3. MATERYAL VE METOT 21

3.1. Bitki Materyali 21

Sayfa

3.2. DNA İzolasyonu 22

3.3. Bisülfit Dönüşüm ve Yeni Nesil Dizileme 23

3.4. Adaptör Dizilerinin Temizlenmesi ve Kalite Kontrolü 24

3.5. Hizalama 24

3.6. Metilasyon Çağrısı 26

3.7. Gen Ontolojisi ve Fonksiyonel Anotasyon Analizi 28

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 29

4.1. DNA İzolasyonu 29

4.2. Dizileme Kalitesi 30

4.3. Ham Dizilerdeki Adaptör Dizilerinin Temizlenmesi ve Kalite Kontrolü 33

4.4. Hizalama 69

4.5. Örneklerin Genom Metilasyon Düzeyi 71

4.6. Toplam Metilasyon Bölgeleri İçerisindeki CpHpH, CpHpG ve CpG Metilasyon Desenlerinin Oranları 72

4.7. Metilasyon Çağrısı Analiz Sonuçları 73

4.7.1. Tüm örneklerin epigenom patternlerine ait yüzde (%) metilasyon histogram sonuçları 73

4.7.2. Tüm örneklerin epigenom patternlerine ait okuma .kapsam histogram sonuçları 85

4.8. Karşılaştırma Grupları 95

4.8.1. Pearson korelason katsayısı analizi 95

4.8.2. Kümeleme ve temel bileşen analizi 97

4.8.3. Karşılaştırma grupları için farklı metillenmiş bölgelerdeki (DMR) .CpHpH, CpHpG ve CpG metilasyon yüzdeleri 101

4.8.4. DMR'ların hipermetilasyon/hipometilasyon açısından analizi 102

4.8.5. DMR'ların gen bölgelerindeki dağılımı 103

Sayfa

4.8.6. Karşılaştırma gruplarına ait doğrusal Manhattan Plot grafikleri 105

4.8.7. DMR'ler ile ilişkili genlerin gen ontolojisi analizi 107

4.8.8. Promoter bölgelerinde DMR ile ilişkili genlerin gen ontolojisi analizi 124

4.9. Anotasyon Analizi 125

4.9.1. Organ bazlı DMR'lerin anotasyonu analizi 125

4.9.2. Çeşit bazlı DMR'lerin anotasyon analizi 126

4.10. BIA Yolakta Görev Alan İyi Karakterize Edilmiş Genlerin Analizi 127

5. TARTIŞMA 129

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 141

KAYNAKLAR 143

ÖZGEÇMİŞ 165

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. Analizlerde kullanılan örnek isimleri ve sayıları 22

Çizelge 3.2. Hizalama programlarının kullandığı algoritmalar 25

Çizelge 4.1. Bitkilerden elde edilen DNA'ların konsantrasyonları 29

Çizelge 4.2. MspI enzim kesim verimliliği (%) 30

Çizelge 4.3. Bisülfit dönüşüm oranı 31

Çizelge 4.4. Ham veriler 32

Çizelge 4.5. Adaptör dizilerinin temizlenme analiz sonuçları 34

Çizelge 4.6. O1K1 örneğinde hizalama adımı için denenen programların yüzde verimlilikleri 69

Çizelge 4.7. Bwa-Meth ve Bsmapz programları ile elde edilen hizalama yüzde verimlilik değerleri 70

Çizelge 4.8. Ham verilerin haşhaş genomundaki yüzdeleri 71

Çizelge 4.9. Karşılaştırma grupları 95

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Dünyadaki yasal haşhaş ekim alanları 4

Şekil 2.2. BIA yolağı 7

Şekil 2.3. Morfin alkaloidinin kimyasal yapısı 8

Şekil 2.4. Noskapin alkaloidinin kimyasal yapısı 9

Şekil 2.5. Bisülfit aracılı metilsitozin (mC) haritalama ilkesi 15

Şekil 2.6. RRBS kütüphane oluşturma sürecinin akış şeması 17

Şekil 2.7. DNA metilasyon analizinin iş akışı 19

Şekil 4.1. O1G1 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 35

Şekil 4.2. O1G1 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 36

Şekil 4.3. O1G2 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu…….. 37

Şekil 4.4. O1G2 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 38

Şekil 4.5. O1G3 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 39

Şekil 4.6. O1G3 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 40

Şekil 4.7. O1K1 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 41

Şekil 4.8. O1K1 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 42

Şekil 4.9. O1K2 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 43

Şekil 4.10. O1K2 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 44

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.11. O1K3 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 45

Şekil 4.12. O1K3 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 46

Şekil 4.13. O96G1 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 47

Şekil 4.14. O96G1 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 48

Şekil 4.15. O96G2 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 49

Şekil 4.16. O96G2 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 50

Şekil 4.17. O96G3 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 51

Şekil 4.18. O96G3 Örneği İçin a) 2. İplik Temizleme Öncesi FastQC Raporu b) 2. İplik Temizleme Sonrası FastQC Raporu 52

Şekil 4.19. O96K1 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 53

Şekil 4.20. O96K1 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 54

Şekil 4.21. O96K2 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 55

Şekil 4.22. O96K2 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 56

Şekil 4.23. O96K3 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 57

Şekil 4.24. O96K3 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 58

Şekil 4.25. ONPG1 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 59

Şekil 4.26. ONPG1 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 60

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.27. ONPG2 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 61

Şekil 4.28. ONPG2 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 62

Şekil 4.29. ONPG3 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 63

Şekil 4.30. ONPG3 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 64

Şekil 4.31. ONPK1 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 65

Şekil 4.32. ONPK1 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 66

Şekil 4.33. ONPK2 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 67

Şekil 4.34. ONPK2 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu 68

Şekil 4.35. Toplam metilasyon bölgeleri içinde CpHpH, CpHpG ve CpG metilasyon desenlerinin oranı (Mavi: CpG, Turuncu: CpHpG, Yeşil: CpHpH) 72

Şekil 4.36. O96G1/O96G2/O96G3/O1G1/O1G2/O1G3 örneklerine ait yüzde (%) CpHpH metilasyon histogram grafikleri 74

Şekil 4.37. ONPG1/ONPG2/ONPG3/O96K1/O96K2/O96K3 örneklerine ait yüzde (%) CpHpH metilasyon histogram grafikleri 75

Şekil 4.38. O1K1/O1K2/O1K3/ONPK1/ONPK2 örneklerine ait yüzde (%) CpHpH metilasyon histogram grafikleri 76

Şekil 4.39. O96G1/O96G2/O96G3/O1G1/O1G2/O1G3 örneklerine ait yüzde (%) CpHpG metilasyon histogram grafikleri 78

Şekil 4.40. ONPG1/ONPG2/ONPG3/O96K1/O96K2/O96K3 örneklerine ait yüzde (%) CpHpG metilasyon histogram grafikleri 79

Şekil 4.41. O1K1/O1K2/O1K3/ONPK1/ONPK2 örneklerine ait yüzde (%) CpHpG metilasyon histogram grafikleri 80

Şekil 4.42. O96G1/O96G2/O96G3/O1G1/O1G2/O1G3 örneklerine ait yüzde (%) CpG metilasyon histogram grafikleri 82

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.43. ONPG1/ONPG2/ONPG3/O96K1/O96K2/O96K3 örneklerine ait yüzde (%) CpG metilasyon histogram grafikleri 83

Şekil 4.44. O1K1/O1K2/O1K3/ONPK1/ONPK2 örneklerine ait yüzde (%) CpG metilasyon histogram grafikleri 84

Şekil 4.45. O96G1/O96G2/O96G3/O1G1/O1G2/O1G3 örneklerine ait CpHpH metilasyon kapsam histogram grafikleri..... 86

Şekil 4.46. ONPG1/ONPG2/ONPG3/O96K1/O96K2/O96K3 örneklerine ait CpHpH metilasyon kapsam histogram grafikleri..... 87

Şekil 4.47. O1K1/O1K2/O1K3/ONPK1/ONPK2 örneklerine ait CpHpH metilasyon kapsam histogram grafikleri..... 88

Şekil 4.48. O96G1/O96G2/O96G3/O1G1/O1G2/O1G3 örneklerine ait CpHpG metilasyon kapsam histogram grafikleri..... 89

Şekil 4.49. ONPG1/ONPG2/ONPG3/O96K1/O96K2/O96K3 örneklerine ait CpHpG metilasyon kapsam histogram grafikleri..... 90

Şekil 4.50. O1K1/O1K2/O1K3/ONPK1/ONPK2 örneklerine ait CpHpG metilasyon kapsam histogram grafikleri..... 91

Şekil 4.51. O96G1/O96G2/O96G3/O1G1/O1G2/O1G3 örneklerine ait CpG metilasyon kapsam histogram grafikleri 92

Şekil 4.52. ONPG1/ONPG2/ONPG3/O96K1/O96K2/O96K3 örneklerine ait CpG metilasyon kapsam histogram grafikleri 93

Şekil 4.53. O1K1/O1K2/O1K3/ONPK1/ONPK2 örneklerine ait CpG metilasyon kapsam histogram grafikleri 94

Şekil 4.54. CpHpH metilasyonu için pearson korelasyon katsayısı..... 96

Şekil 4.55. CpHpG metilasyonu için pearson korelasyon katsayısı..... 96

Şekil 4.56. CpG metilasyonu için pearson korelasyon katsayısı..... 97

Şekil 4.57. CpHpH metilasyon kümeleme analizi 98

Şekil 4.58. CpHpG metilasyon kümeleme analizi 98

Şekil 4.59. CpG metilasyon kümeleme analizi 99

Şekil 4.60. CpHpH metilasyon PCA analizi. 99

Şekil 4.61. CpHpG metilasyon PCA analizi 100

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.62. CpG metilasyon PCA analizi 100

Şekil 4.63. Karşılaştırma gruplarına göre farklı metillenmiş bölgelerde (DMR) CpG, CpHpG ve CpHpH metilasyon yüzdeleri 101

Şekil 4.64. Karşılaştırma gruplarında tanımlanan DMR' ler arasında CpHpH metilasyonu için gözlemlenen hipermetilasyon ve hipometilasyon yüzde dağılımı 102

Şekil 4.65. Karşılaştırma gruplarında tanımlanan DMR' ler arasında CpHpG metilasyonu için gözlemlenen hipermetilasyon ve hipometilasyon yüzde dağılımı 102

Şekil 4.66. Karşılaştırma gruplarında tanımlanan DMR' ler arasında CpG metilasyonu için gözlemlenen hipermetilasyon ve hipometilasyon yüzde dağılımı 103

Şekil 4.67. CpHpH metilasyonunun gen bölgelerindeki dağılımı 104

Şekil 4.68. CpHpG metilasyonunun gen bölgelerindeki dağılımı 104

Şekil 4.69. CpG metilasyonunun gen bölgelerindeki dağılımı 104

Şekil 4.70. Manhattan grafiğine göre çeşit ve organlara bağlı olarak CpHpH metilasyonu açısından hipermetilasyon/hipometilasyon dağılımı (Kırmızı: Hipermetilasyon. Mavi: Hipometilasyon) 105

Şekil 4.71. Manhattan grafiğine göre çeşit ve organlara bağlı olarak CpHpG metilasyonu açısından hipermetilasyon/hipometilasyon dağılımı (Kırmızı: Hipermetilasyon. Mavi: Hipometilasyon) 106

Şekil 4.72. Manhattan grafiğine göre çeşit ve organlara bağlı olarak CpG metilasyonu açısından hipermetilasyon/hipometilasyon dağılımı (Kırmızı: Hipermetilasyon. Mavi: Hipometilasyon) 106

Şekil 4.73. O96G_O1G hipometilasyon GO terimleri 108

Şekil 4.74. O96G_O1G hipermetilasyon GO terimleri 109

Şekil 4.75. O96G_ONPG hipometilasyon GO terimleri 110

Şekil 4.76. O96G_ONPG hipermetilasyon GO terimleri 111

Şekil 4.77. ONPG_O1G hipometilasyon GO terimleri 112

Şekil 4.78. ONPG_O1G hipermetilasyon GO terimleri 113

Şekil 4.79. O96K_O1K hipometilasyon GO terimleri 114

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.80. O96K_O1K hipermetilasyon GO terimleri 115

Şekil 4.81 O96K_ONPK hipometilasyon GO terimleri 116

Şekil 4.82. O96K_ONPK hipermetilasyon GO terimleri 116

Şekil 4.83. ONPK_O1K hipometilasyon GO terimleri 118

Şekil 4.84. ONPK_O1K hipermetilasyon GO terimleri 118

Şekil 4.85. O1K_O1G hipometilasyon GO terimleri 120

Şekil 4.86. O1K_O1G hipermetilasyon GO terimleri 120

Şekil 4.87. O96K_O96G hipometilasyon GO terimleri 121

Şekil 4.88. O96K_O96G hipermetilasyon GO terimleri 122

Şekil 4.89. ONPK_ONPG hipometilasyon GO terimleri 123

Şekil 4.90. ONPK_ONPG hipermetilasyon GO terimleri 123

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. -80℃'den alınan bitkilerin sıvı azot ile toz haline getirilmesi 23

Resim 4.1. Bitkilerden elde edilen DNA'nın agaroz jel görüntüsü (1:Ofis_1 Gövde 1, 2:Ofis_1 Gövde 2, 3:Ofis_1 Gövde 3, 4:Ofis_1 Kapsül 1,5:Ofis_1 Kapsül 2, 6:Ofis_1Kapsül 3, 7:Ofis_96 Gövde 1, 8:Ofis_96 Gövde 2,9:Ofis_96 Gövde 3, 10:Ofis_96 Kapsül 1, 11:Ofis_96 Kapsül 2,12:Ofis_96 Kapsül 3, 13:Ofis_NP Gövde 1, 14: Ofis_NP Gövde 2,15: Ofis_NP Gövde 3, 16: Ofis_NP Kapsül 1, 17: Ofis_1 Kapsül 2) 30

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrat Derece
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
Gb	Gigabaz
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
rpm	Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar	Açıklamalar
4OMT	4′-O-metiltransferaz
6OMT	Norkoklaurin 6-O metiltransferaz
4-HPAA	4-hidroksifenilasetaldehit
5- mC	5-metilsitozin
BBE	Berberin Köprü Enzimi
BIA	Benzilizokinolin Alkaloid
Bi-Seq	Bisülfit Dizileme
BS	Biyolojik Süreç
CNMT	Koklaurin N-metiltransferaz
CODM	Kodein O-demetilaz
COR	Kodeinon Redüktaz
CMT2	Chromomethylase 2
CMT3	Chromomethylase 3
C	Sitozin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DMR	Farklı Metilasyon Gösteren Bölgeler

Kısaltmalar	Açıklamalar
DNMT	DNA metiltransferaz
GO	Gen Ontolojisi
HB	Hücresel Bileşen
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MF	Moleküler Fonksiyon
MET1	Methyltransferase 1
MS	Kütle Spektrometrisi
MeDIP-seq	Metillenmiş DNA İmmünopresipitasyon Dizilemesi
MeJA	Metil Jasmonat
MSAP	Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi
mC	Metillenmiş Sitozin
NCS	Norkoklaurin Sentaz
NOS	Noskapin Sentaz
NGS	Yeni Nesil Dizileme
Pi	İnorganik Fosfor
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCA	Temel Bileşen Analizi
RRBS	Azaltılmış temsili bisülfit dizileme yöntemi
REPI	Retikülin Epimeraz
RNA	Ribonükleik Asit
RNAi	RNA interferans
RdDM	RNA Yönlendirmeli DNA Metilasyonu
SalAT	Salutardinol 7-O-asetiltransferaz
SalR	Salutaridin Redüktaz
SalSyn	Salutaridin Sentaz
SOMT	Skoulerine 9-O-metiltransferaz
TyrAT	Tirozin Aminotransferaz
TMO	Toprak Mahsulleri Ofisi
TYDC	Tirozin/DOPA Dekarboksilaz
T	Timin
U	Urasil
WGBS	Tüm Genom Bisülfit Dizileme

Kısaltmalar	Açıklamalar
Q	Sıralama kalite puanları

1. GİRİŞ

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) *Rhoedales* takımından, *Papaveraceae* familyasının bir üyesidir. Eski çağlardan beri bilinen *Papaveraceae* familyası Kuzey Yarımkürenin ılıman ve subtropik bölgelerinde yayılış göstermektedir [1]. *Papaveraceae* familyası yaklaşık 28 cins ve 250 tür içermektedir. Haşhaş, *Papaveraceae* familyasından *Papaver* cinsinin bir üyesidir. Türkiye'de, *Papaveraceae* familyasına ait yedi cinsten biri olan *Papaver* cinsi içerisinde, 25'i tek yıllık**,** 20'si çok yıllık olmak üzere toplam 45 tür bulunmaktadır. Bunlardan 15'inin endemik olduğu bildirilmektedir. Anadolu'nun geleneksel bir ürünü olmakla birlikte yüzyıllardır ülkemizde tarımı yapılan oldukça önemli bir bitkidir. Haşhaş bitkisi 60-200 cm kadar boy alabilen, kapalı kapsüllere sahip, mor ve beyaz gibi farklı renklerde olabilen tek yıllık bir bitkidir. Endüstriyel açıdan, haşhaş tohumlarından elde edilen yağ gıda sektöründe değerlendirilirken, yağ çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspe hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Bitkinin kapsüllerinde bulunan alkaloidler ise tıbbi amaçlarla ilaç sanayisinde kullanılmaktadır [2-7].

Papaver türleri, sekonder metabolit olan alkaloidleri üretmektedir. Bu alkaloidlerin yapısal olarak farklı bir grubunu benzilizokinolin alkaloidler (BIA) oluşturmaktadır. BIA grubuna ait yaklaşık 2 500 metabolit tanımlanmış olup bunların büyük kısmı güçlü ekonomik ve farmakolojik öneme sahiptir. Haşhaş bitkisinde ise bu gruba ait 80'den fazla alkaloid izole edilmiştir. Morfin, noskapin, tebain, kodein ve papaverin majör alkaloidler olup tespit edilen alkaloidlerin çoğu karmaşık ve çok dallı BIA yolağındaki ara ürünlerdir. [8-10]. Bu majör alkaloidler yüksek tıbbi, farmakolojik ve endüstriyel değerleri nedeniyle haşhaş bitkisine stratejik önem sağlamaktadır [6, 11]. BIA' ların biyosentez yollarının aydınlatılmasına yönelik araştırmalar; hem tıbbi amaçlı kullanım potansiyelinin değerlendirilmesi hem de biyoteknolojik üretim süreçlerinin iyileştirilmesi açısından bilimsel olarak büyük önem taşımaktadır.

BIA'ların yapısal olarak karmaşık olmaları, bu bileşiklerin endüstriyel ölçekte üretimini önemli ölçüde sınırlamaktadır. Bu nedenle BIA üretim kapasitesini artırmaya yönelik alternatif yaklaşımlara duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır. Bu kapsamda metabolik mühendisliği uygulamalarına yönelik ilgi son yıllarda belirgin şekilde artmış olup, özellikle CRISPR/Cas9 tabanlı teknolojiler bu alanda önemli bir araç haline gelmiştir [12]. Nitekim

yapılan bir çalışmada, BIA biyosentez yolağında önemli bir basamak olan ve bu yolakta önemli bir ara ürün olan (S)-retikulinin oluşumunda görev yapan 4′-O-metiltransferaz (4′OMT) geninin CRISPR/Cas9 aracılığıyla devre dışı bırakılması hedeflenmiştir. 4′OMT geninin devre dışı bırakılması sonucunda (S)-retikulin ve toplam BIA düzeylerinde belirgin azalma gözlenmiş olup, BIA biyosentezinde düzenleyici bir rol oynadığı doğrulanmıştır [13]. Bu gibi çalışmaların yapılabilmesi için BIA biyosentez sürecinin ayrıntılı olarak bilinmesi gerekmektedir.

Bu doğrultuda tezin amacı; daha önce yapılan bir çalışmada [5] haşhaş bitkisinde BIA biyosentez yolakları üzerinde DNA (Deoksiribonükleik Asit) metilasyonunun önemli rol oynadığı gösterilmiş olması temel alınarak; farklı BIA içerikli haşhaş çeşitlerinin hem sentez (gövde) hem depolama (kapsül) organlarında epigenom paternini kapsamlı biçimde ortaya koymak, DNA metilasyonunun BIA biyosentezini hangi yolaklar üzerinden düzenlediğini aydınlatmak ve özellikle iki ayrı koldan sentezlenen temel alkaloidler olan morfin ile noskapinin bu kol ayrımında epigenetik düzenleme ile ilişkisinin bulunup bulunmadığını ve varsa bunun hangi genler aracılığıyla gerçekleştiğini belirlemektir. Bu kapsamda tezde morfin içeriği yüksek Ofis_1 çeşidi, noskapin içeriği yüksek Ofis_NP çeşidi ve kontrol grubu olarak Ofis_96 çeşidi kullanılmıştır. Söz konusu çeşitlerden, tam olarak aydınlatılamamış BIA biyosentezinin gerçekleştiği gövde organları ile alkaloidlerin depolandığı kapsül organlarından örnekler alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA örneklerinden, azaltılmış temsili bisülfit dizileme yöntemi (RRBS) kullanılarak metilasyon profilleri ilk kez elde edilmiştir. Veriler biyoinformatik araçlarla analiz edilerek, alkaloid biyosentezinin DNA metilasyonu aracılığıyla nasıl etkilendiği araştırılmış ve önemli bulgular elde edilmiştir. Ülkemizde geliştirilen haşhaş çeşitlerinin kullanılmış olması ile de ülkemiz biyolojik kaynakların korunması ve değerlendirilmesine katkı sağlayacak veriler elde edilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

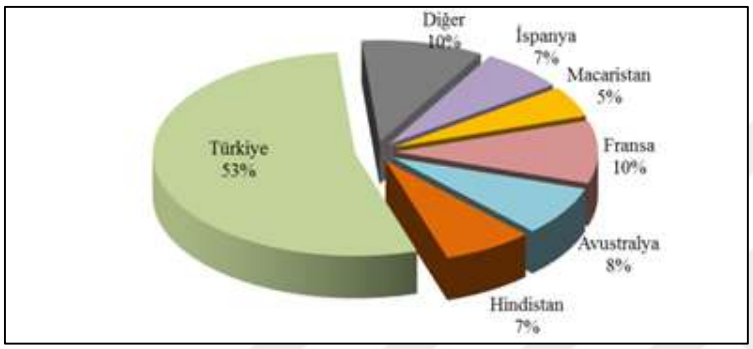
2.1. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) ve Önemi

Bitkiler, hastalıkların tedavisinde kullanılan birçok metaboliti üretme potansiyeline sahiptir ve çok eski zamanlardan beri ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu metabolitlerden olan alkaloidler farmakolojik aktiviteleri nedeniyle büyük öneme sahiptir [6]. Alkaloidler en yoğun olarak *Papaveraceae, Ranunculaceae, Berberidaceae, Menispermaceae* familyalarında bulunmaktadır. En çok araştırılan türler, *Papaveraceae* familyasından *P. somniferum* ve *Eschscholzia californica, Ranunculaceae* familyasından *Thalictrum flavum* ve *Coptis japonica*'dır [14].

Haşhaş (*P. Somniferum*), Türkiye'de geleneksel olarak yetiştirilen, yüksek ekonomik değere sahip, çiçekli ve tek yıllık stratejik bir kültür bitkisi olarak öne çıkmaktadır. Yenilebilir tohumları, süsleyici güzelliği, alkaloid içeren kapsülleri ve aynı zamanda ürettiği sekonder metabolitlerden kaynaklı tıbbi amaç için kullanılan oldukça önemli bir bitkidir. Anadolu'da ilk olarak Hititler döneminde yetiştirilmeye başlandığı bilinen haşhaş, arkeolojik kanıtlarla Neolitik ve Bronz çağlarından itibaren kültüre alınmış olup; antik Yunan, Mısır, Hint, Çin ve Roma medeniyetlerinin yazılı metinlerinde de yer almaktadır. Günümüzde Birleşmiş Milletler Teşkilatınca afyon haşhaşının başlıca yasal üreticileri Türkiye, Avustralya, İspanya, Fransa, Macaristan ve Hindistan olarak kabul edilmekte, Türkiye ve Hindistan ise geleneksel üretici ülkeler olarak öne çıkmaktadır (Şekil 2.1) [2, 4, 5, 15-17]. Türkiye'de başlıca üretim alanların Kütahya, Afyon, Burdur, Isparta, Balıkesir, Konya, Amasya, Çorum, Tokat, Manisa, Uşak, Denizli ve Eskişehir illerinde yoğunlaşmaktadır [18].

Afyon haşhaşı, farmasötik öneminin yanı sıra, yasadışı uyuşturucu üretiminde kullanılabilen bir morfin kaynağı olmasıyla da çift yönlü bir kullanımın tipik örneğini oluşturmaktadır. Türkiye hem morfin ve türevleri ihracatı hem de tohum ihracatı ile küresel farmasötik pazarında önemli bir paya sahip olup; her yıl yaklaşık 80-100 ton civarında morfin üretimi ile haşhaş kökenli tıbbi ve bilimsel amaçlı uyuşturucu madde üretiminde dünya pazarının yaklaşık %20'sini elinde bulundurmaktadır [3-5, 19]. Türkiye'de yetişen çeşitlerde majör alkaloid oranları sırasıyla morfin için %0,53–0,58, noskapin için %0,02–0,19, kodein için %0,02–0,08, papaverin için %0,01–0,09 ve tebain için %0,006–0,02 olarak rapor edilmiştir

[3]. Türkiye'de haşhaş ekimi, tarımı, satın alınması konularında tek yetkili kurum olan Toprak Mahsulleri Ofisi'nin (TMO) 2018 yılı verilerine göre, dünya genelinde kapsüllerdeki ortalama morfin içeriği %2 iken, Türkiye'de bu oran daha düşüktür. Ayrıca Türkiye, dünya genelindeki toplam haşhaş ekim alanlarının yarısından fazlasına sahip olmasına rağmen hektar başına verimlilik açısından diğer üretici ülkelerin gerisindedir (Şekil 2.1) [16] . Bu durum, geleneksel tarım yöntemlerinin sınırlılıkları ve çevresel faktörlerin etkisiyle ilişkilendirilmekte olup, modern biyoteknolojik yaklaşımların verimliliği artırmada önemli katkılar sağlayacağı öngörülmektedir [4, 20].



Şekil 2.1. Dünyadaki yasal haşhaş ekim alanları [16]

Haşhaşın önemi yalnızca ekonomik veya farmasötik boyutla sınırlı değildir. Tohumları gıda sektöründe (özellikle ekmek ve hamur işlerinde), kapsülleri ise hem geleneksel tıpta hem de modern farmasötik üretimde kullanılmaktadır. Anadolu'da tohumların yemek kültüründe yaygın olarak kullanılması, bitkinin ekonomik değerine kültürel bir boyut kazandırmaktadır [21].

Genetik açıdan bakıldığında, haşhaş yaklaşık 2,72 gigabaz (Gb) büyüklüğünde bir genoma ve 2n = 22 kromozoma sahiptir. Genomunun yaklaşık %66'sı transpozon elementlerinden oluşmakta ve yaklaşık 80 000 protein kodlayan gen içermektedir. Yapılan analizler, birçok metabolit yolağına ait genleri belirlemiş, özellikle BIA biyosentezine ilişkin genlerin organizasyonu ve işlevleri hakkında önemli bilgiler sunmuştur [17, 22].

Sonuç olarak, haşhaş; tarihsel, ekonomik ve kültürel değerinin yanı sıra, biyoteknolojik açıdan da stratejik bir bitki türüdür. Alkaloid biyosentezi, özellikle major alkaloidlerden morfin ve noskapin üretimi, yalnızca ilaç sanayiinde değil aynı zamanda temel bilim araştırmalarında da büyük önem taşımaktadır. Dolayısıyla, haşhaş üzerine yapılan

çalışmalar, genetik çeşitlilik ve biyosentez yolaklarının anlaşılması yanında, epigenetik düzenleme mekanizmalarının aydınlatılması açısından da gelecekteki araştırmalar için değerli bir temel sunmaktadır.

2.2. Alkaloidler

Bitkiler, yaşamları boyunca çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine maruz kalmakta olup bu koşullarda hayatta kalabilmek için çeşitli adaptasyonlar ve savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bitkiler, stres türüne bağlı olarak en uygun savunma stratejilerini devreye sokarak herbivorlar ve patojenlere karşı toksik etki gösterebilen çeşitli sekonder metabolitler üretebilmektedir. Sekonder metabolitler; fenolik bileşikler, azot içeren bileşikler, terpenler ve kükürt içeren bileşikler olmak üzere dört temel gruba ayrılmaktadır. Azot içeren bileşikler arasında yer alan alkaloidler, genellikle güçlü fizyolojik ve farmakodinamik etkilere sahiptir. Bu bileşikler, halka yapısı içerisinde bir veya daha fazla azot atomu bulundurur, bazik karakterlidir ve amino asit türevlerinden oluşur [2, 9]. Alkaloidler bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunur [23] ve bildirilen 27 000'den fazla yapısıyla aşırı çeşitli gösterirler. Bunların yaklaşık 21 000'i ise bitkilerde tespit edilmiştir. Alkaloidler yapısal olarak üç kategoriye ayrılır: a) Heterosiklik bir halkadaki amino asitlerden türetilen azot atomları içeren gerçek alkaloidler, b) amino asitlerden türetilen heterosiklik olmayan azot atomları içeren proto-alkaloidler, c) amino asitlerden türetilmemiş azot atomları içeren psödo-alkaloidler. BIA'lar gerçek alkaloidler grubuna ait olan bitkilerde sentezlenen sekonder metabolitlerdir [24-28].

2.3. Benzilizokinolin Alkaloidleri (BIA) ve Biyosentezi

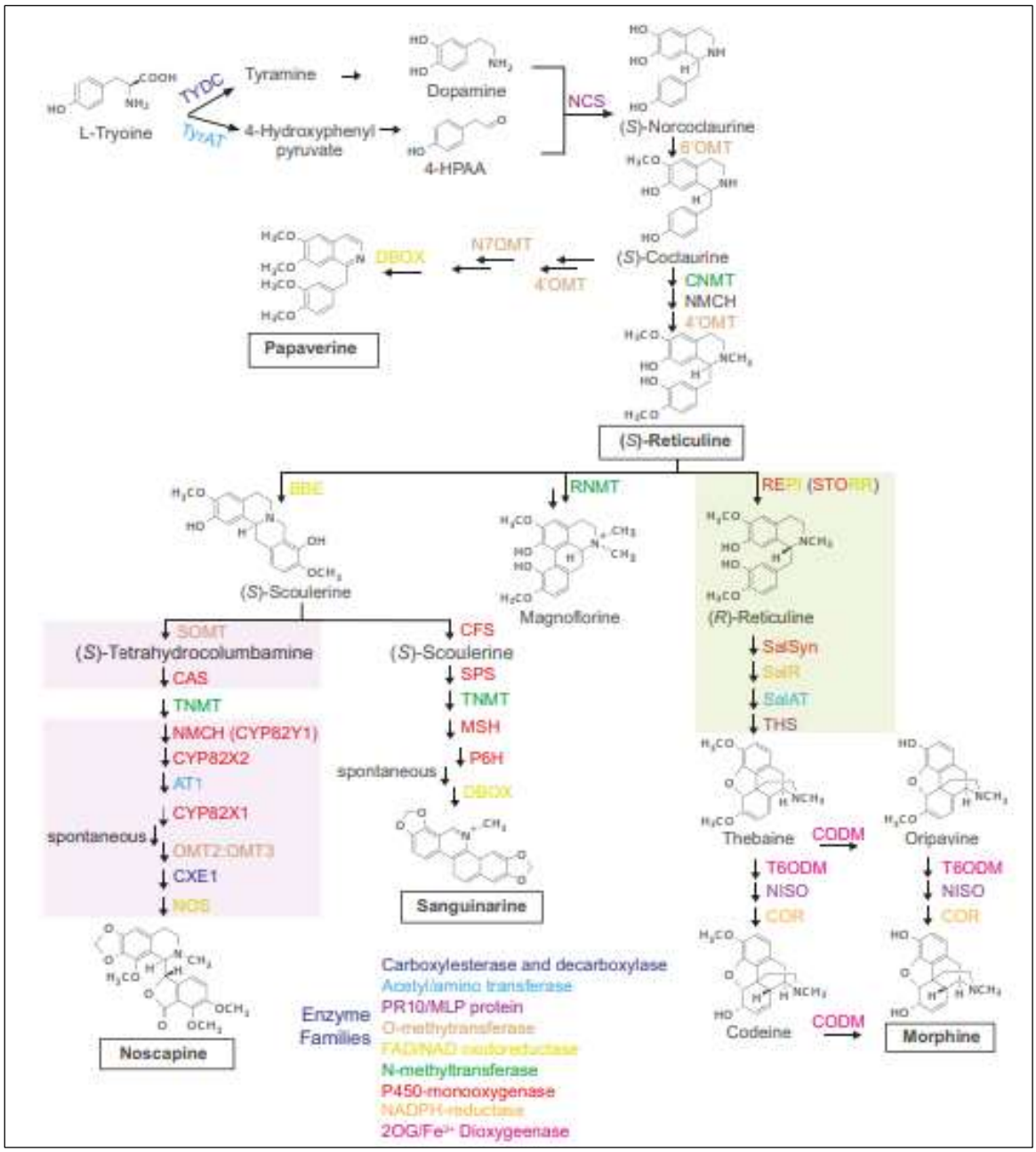
BIA'ların çok yönlü önemi nedeniyle, bitkilerin bu bileşikleri nasıl sentezlediği konusu araştırmacılar için ilgi çekici bir araştırma alanı olmuştur. BIA'lar, doğal olarak yalnızca kapalı tohumlu bitkilerden olan magnoliidlerde (angiospermlerin toplam tür çeşitliliğinin yaklaşık %3'ü) ve magnoliidlerden filogenetik olarak erken dallanan ödikotlarda (ör. *Thalictrum flavum, Coptis japonica* ve *Papaver somniferum*) sentezlenmektedir. BIA biyosentezinin bu bitki gruplarında gerçekleşme nedenini inceleyen bir çalışmada çoğu fonksiyonel BIA geninin yalnızca bu gruplarda belirli kümeler halinde bulunduğu görülmüştür [29]. BIA'lar üzerine ilk araştırmalar, 1806'da afyon haşhaş lateksinden morfinin saflaştırılmasıyla başlamıştır. Bu çalışma, herhangi bir alkaloidin ilk izolasyonu

olmasının yanı sıra, temel özelliklere sahip bitki kaynaklı bileşiklere yönelik bilimsel ilginin yoğunlaşmasını başlatmıştır [30]. Afyon haşhaşındaki BIA metabolizmasının biyokimyası, fizyolojisi uzun zamandır araştırılmaktadır. Bazı araştırmalar tıbbi ve endüstriyel açıdan katkı sağlayacak şekilde afyon haşhaşı genomunun evrimleşmeyi sürdürdüğünü göstermektedir [19, 31].

Afyon haşhaşı morfinan, protoberberin, benzofenantridin, ftalidizokinolin, aporfin, pavin, rhoeadin ve protopin alkaloidleri dahil olmak üzere farklı yapısal alt gruplara ait çok sayıda BIA biriktirir. BIA grubuna ait yaklaşık 2 500 metabolit tanımlanmıştır. Morfinan türevi BIA'ların bilinen tek üreticisi olan haşhaş bitkisinden ise 80'den fazla alkaloid izole edilmiştir. Haşhaş bitkisinde BIA alkoloidleri en çok olgun kapsülde depolanırken, biyosentezi gövdenin kalburlu borularında ve latisiferlerinde meydana gelmektedir. Farklı metabolit profillerine bağlı olarak, lateksteki en bol alkaloidler morfinanlar (örn. morfin, kodein ve tebain), ftalideizokinolin noskapin ve 1-benzilizokinolin papaverindir [10, 30, 32-34]. Bu alkaloidler arasında, öksürük kesici olarak kullanılan kodein, narkotik analjezik etkili morfin, kan damarlarını genişletici papaverin ve antimikrobiyal özellik gösteren sanguinarin gibi terapötik özellikleri nedeniyle farmasötik açıdan büyük önem taşımaktadır [2, 15].

BIA' ların biyosentezi ve birikimi, birden fazla floem hücre tipi gerektirmektedir. Biyosentez ve birikim bu hücre tiplerinden arkadaş hücreleri ve elek elemanları ile latisiferler arasındaki maddelerin taşınması vasıtasıyla gerçekleşmektedir. BIA biyosentezi gövde latisiferlerinde gerçekleşirken, depolanması esas olarak kapsülde olmaktadır [19, 33-36]. Afyon haşhaşının BIA biyosentezi, çeşitli enzimleri içeren karmaşık bir yolaktır. Bu yolağa norkolaurin sentaz (NCS), norkolaurin 6-O metiltransferaz (6OMT), koklaurin N-metiltransferaz (CNMT), 4′-O-metiltransferaz (4OMT)'ın da dahil olduğu 35'den fazla bir dizi enzimin yer aldığı tespit edilmiştir. BIA biyosentezi, tirozin aminotransferaz (TyrAT) ve tirozin/DOPA dekarboksilaz (TYDC) tarafından katalize edilen iki L-tirozinden türevlenen dopamin ve 4-hidroksifenilasetaldehit (4-HPAA)'in norkoklaurin sentaz enzimi tarafından, (S)-norkoklaurin'e dönüşümü ile başlamaktadır. (S)-norkoklaurin, çeşitli enzimler vasıtasıyla merkezi ara molekül olarak bilinen (S)-retiküline dönüşmektedir. (S)-Retikülinden itibaren yolak iki kola ayrılarak farklı alkaloidleri oluşturur [15, 19, 37-39]. Morfin kolunda retikülin epimeraz (REPI) [40], salutardin sentaz (SalSyn), salutardin redüktaz (SalR), salutardinol 7-O-asetiltransferaz (SalAT), kodeinon redüktaz (COR) veya kodein-O-demetilaz (CODM)

enzimleri işlev görmektedir [41-43]. Noskapin kolunda ise berberin köprü enzimi (BBE), skoulerin 9-O-metiltransferaz (SOMT) ve noskapin sentaz (NOS) enzimleri görev almaktadır [44]. Tirozin amino asidinden başlayan BIA yolağına ait tüm yol Şekil 2.2' de ayrıntılı olarak gösterilmiştir [15].

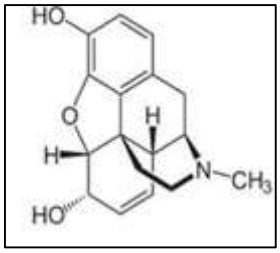


Şekil 2.2. BIA yolağı [38]

BIA yolağı, merkezi ara molekül (S)-retikülin'den itibaren morfin ve noskapin kollarına ayrılarak, bu kollar üzerinden majör alkaloidler olan morfin, noskapin, tebain, kodein ve papaverinin sentezini gerçekleştirir [38]. BIA yolaklarının bu şekilde kollara ayrılması, hem genetik ve enzimatik düzeyde hem de epigenetik gibi henüz tam olarak açıklanamayan diğer mekanizmalar aracılığıyla kontrol edilerek, her bir alkaloid için özgün metabolit profillerinin oluşmasına olanak tanır.

2.3.1. Morfin

BIA'lar arasında en önemli ve en yüksek miktarda bulunan alkaloid morfindir. Morfin, 1805 yılında Friedrich Sertürner tarafından afyondan izole edilmiştir. Adını uyku tanrısı Morpheus'tan almıştır. Kimyasal yapısı 1925'te belirlenmiş olup 1952-1956 [45, 46] yılları arasında laboratuvarda sentez çalışmaları yapılmıştır. Ancak sentez süreci, çok basamaklı ve zahmetli olup düşük verimlilik göstemiş ve sonuç olarak ekonomik açıdan uygulanabilir bulunmamıştır. Bu sebeplerle de günümüzde farmasötik üretimde kullanılan morfinin bilinen tek doğal kaynağı afyon haşhaşı olup yalnızca *Papaver somniferum* ve *Papaver setigerum* türlerinde sentezlenmektedir. Tıpta ağrı kesici olarak kullanılan morfinin kapalı formülü $C_{17}H_{19}NO_3$ olurken molekül ağırlığı 285,34 g/mol, erime noktası 255 °C'dir (Şekil 2.3) [6, 8].



Şekil 2.3. Morfin alkaloidinin kimyasal yapısı [8]

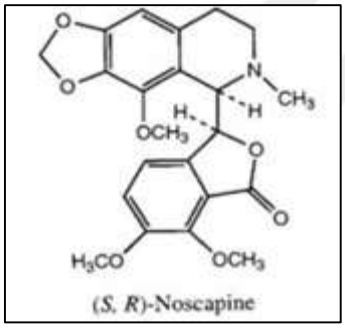
Morfin, güçlü bir opioid analjezik olarak modern tıbbın temel taşlarından biridir. Hem akut hem de kronik ağrı yönetiminde özellikle kanser hastalarında ve palyatif bakım uygulamalarında vazgeçilmez bir tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir [47].

Morfin küresel farmasötik ekonomide stratejik bir konuma sahiptir. Bu stratejik konumu, hem düşük maliyetli güçlü bir analjezik olarak tıbbi kullanımdaki merkezi rolü hem de yarı sentetik opioidlerin üretiminde temel hammadde işlevi görmesinden kaynaklanmaktadır.

Morfin, üretim ve dağıtımının afyon haşhaşına bağımlı olması nedeniyle, uluslararası ticaret ve düzenleyici politikalar açısından kritik bir ilaç olarak kabul edilmektedir [48, 49].

2.3.2. Noskapin

Haşhaş bitkisinde morfinden sonra en bol bulunan alkaloid olan noskapin, ilk kez 1817 yılında izole edilmiş olup toksik özellik göstermemektedir. Morfin biyosentezinden farklı bir yol ile biyosentezi gerçekleştiği için kimyasal ve yapısal olarak diğer alkaloidlerden farklı olan noskapinin, kapalı formülü $C_{22}H_{23}NO_7$ olurken molekül ağırlığı 413,421 g/mol, erime noktası ise 176 °C'dir (Şekil 2.4). Noskapin oldukça önemli bir alkaloid olsa da morfin gibi diğer alkaloidler kadar biyosentezi açısından geniş çaplı araştırmalar yapılmamıştır [6, 8]. Noskapinin nöroprotektif rol oynadığına dair bilgiler de mevcuttur [50]. Noskapinin bağımlılık oluşturmaması nedeniyle özelikle son dönemlerde Covid-19 salgını tedavisine yönelik kullanılması açısından bu alkaloide olan ilgi oldukça artmış durumdadır [51, 52].



Şekil 2.4. Noskapin alkaloidinin kimyasal yapısı [8]

2.3.3. BIA biyosentezinin moleküler ve genetik incelenmesi

Farmakolojik ve ekonomik açıdan büyük önem taşıyan BIA'ların biyosentez yolağı oldukça karmaşık olup günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu yolağın aydınlatılması, hem bitki biyolojisinin anlaşılmasına hem de biyoteknolojik yöntemlerle değerli alkaloidlerin üretim stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır [53-55]. Bugüne kadar haşhaş üzerine moleküler düzeyde yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu trankript düzeyinde gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalar sonucunda çok sayıda gen ile bunlara ait biyolojik fonksiyonlar tanımlanmıştır [22, 39, 56, 57].

Bu bağlamda yapılan bir çalışmada Metil Jasmonat (MeJa) uygulaması ile alkaloid sentezi indüklenmiş örneklerde noskapin ve morfin biyosentezinde görev alan yolak genlerinin ifade seviyelerini artırdığı bildirilmiştir [58]. Elisitör uygulanan haşhaş örneklerinde RNA jel blot analizi kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, farklı dokularda üç enzime (COR, BBE ve NMCH (CYP80B1)) ait gen transkriptleri izole edilmiştir [59]. *P. somniferum* bitkisinde RNA interferans (RNAi) kullanılarak COR enzimini kodlayan genin susturulmasına yönelik yapılan bir çalışmada, COR enziminin önemli bir kontrol noktası olduğu ve aşırı ifadesinin morfinan alkaloid üretimini artırdığı bildirilmiştir [60]. Bir diğer çalışmada, haşhaş alkaloid içeriğinde SalAT geninin ifadesi kritik olup, RNAi ile baskılanması salutaridin ve salutaridinol birikimine yol açmış ve morfin biyosentezinde SalAT ile SalR enzimleri arasında olası bir etkileşim olduğunu göstermiştir. Bu da iki enzim arasında bir etkileşim olabileceğini düşündürmüştür [61]. Başka bir çalışmada ise SalAT enzimini kodlayan genin aşırı ifadesinin morfin, kodein ve tebain miktarlarında artışa neden olduğu bildirilmiştir [62]. Fungal elisitör ile muamele edilerek yapılan bir diğer çalışmada, haşhaş hücre kültürlerinden alınan örneklerle yapılan pirosekanslama analizinde yaklaşık bin peptit tanımlanmış ve sanguinarin üretiminde görevli BIA biyosentez genlerinin ifadesi doğrulanmıştır. LC-MS/MS peptit analizi ile NCS, 6OMT, CNMT, NMCH, 4'OMT, BBE dahil olmak üzere hemen hemen tüm BIA biyosentez enzimleri tespit edilmiştir [56]. Bir diğer çalışmada ise afyon haşhaş çeşidi için derin transkriptom dizileri kullanılmış ve LC–MS/MS analizi ile her bir haşhaş çeşidinin alkaloid seviyeleri çıkarılmıştır [57].

Sekonder metabolitler grubunda yer alan BIA'lar üzerine yapılan son çalışmalar bu bileşiklerin sentezinin yalnızca enzimatik basamaklarla sınırlı olmadığını, aynı zamanda bu süreçlerin epigenetik düzeydeki düzenlemelerin de önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur [5, 63]. Ancak önemli bir BIA üreticisi olan haşhaş bitkisindeki epigenetik düzenlemelere dair bilgiler son derece azdır.

2.4. Epigenetik

DNA dizi bilgisinin elde edilmesi birçok yolağın aydınlatılmasını sağlamıştır. Bu bilgiler, çok sayıdaki biyolojik sürecin işleyişini anlamamızda önemli katkı sağlamıştır. Primer DNA dizisinde herhangi bir değişikliğe neden olmadan genlerin ifadelerinin düzenlenmesinde, farklı düzenlemelerin bulunduğu ve bu düzenlemelerin etkilerinin düşünülenin çok daha ötesinde olduğunun görülmesi farklı bir bakış açısına neden olmuştur. İlk kez 1942 yılında kullanılan epigenetik terimi, primer DNA dizisindeki herhangi bir değişikliğe neden olmayan ve kalıtsal genlerin düzenlenmesi olarak açıklanmaktadır [64, 65]. Bu bağlamda, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadesinin düzenlenmesinde epigenetik mekanizmalar etkin rol oynamaktadır.

Epigenetik mekanizmalar**;** DNA metilasyonu, kodlanmayan RNA (Ribonükleik Asit)' ların düzenlenmesi ve histon modifikasyonlarının geri dönüşümlü değişimlere yol açan süreçlerini içermekte olup bu mekanizmalar birçok biyolojik süreçlerde önemli rol oynar [66, 67]. Bu mekanizmaların en yaygını DNA metilasyonu; bitkilerde, hayvanlarda, mantarlarda ve bakterilerde gözlenmektedir. Ancak metilasyonun gerçekleştiği dizilim motifleri ve üstlendiği biyolojik işlevler organizmalar arasında farklılık gösterebilmektedir [68-70]. DNA metilasyonu iki farklı şekilde gerçekleşir. Bunlardan birisi, sitozin bazının 5. karbonuna metil grubunun ($-CH_3$) eklenmesiyle, diğeri ise adenin bazının 6. pozisyonundaki azotun metillenmesiyle oluşur. Prokaryotlarda her iki tür metilasyon görülürken, ökaryotlarda genellikle sitozin metilasyonu gerçekleşmektedir [71, 72].

Bitki genomlarında metilasyon genellikle DNA metiltransferaz (DNMT) adı verilen spesifik enzimlerin aktivitesi yoluyla sitozin bazlarında meydana gelir [73]. Dimetilaz enzimi ise metilasyonun tersine çevrilmesininde rol almaktadır [74]. Bitkilerde DNA metilasyonu, DNMT enzimlerinin rol aldığı üç farklı dizi paterninde gerçekleşir: CpG, CpHpG ve CpHpH (burada C = Sitozin, G = Guanin, H = Adenin, Sitozin veya Timin, p = Fosfat bağı). Bu metilasyonlar sırasıyla methyltransferase 1 (MET1), chromomethylase 3 (CMT3) ve chromomethylase 2 (CMT2) enzimleri tarafından gerçekleştirilir. DNA metilasyon seviyeleri bitki türleri arasında büyük değişkenlik gösterebilmektedir [73, 75]. Bunlardan en fazla CpG metilasyonu görülürken en düşük seviyede CpHpH metilasyonu bulunmaktadır. DNA metilasyon seviyeleri ve desenleri bitki çeşitleri arasında farklılık göstermektedir [76]. Bitki çeşitleri arasında farklılık gösteren bu metilasyon desenleri, yalnızca gen ifadesinin

düzenlenmesinde değil, aynı zamanda transpozon elementlerinin susturulması ve genom stabilitesinin korunması gibi birçok önemli yolaklarda kritik roller üstlenmektedir. DNA metilasyonunun bitkilerde üreme ve gelişim gibi farklı süreçlerde oldukça önemli roller oynadığına dair çalışmalar da bulunmaktadır [77-80].

Epigenetik mekanizmalar çevresel uyaranlardan doğrudan etkilenirler [81]. Bu nedenle, bitkiler gen ifadesini kontrol etmek amacıyla epigenetik mekanizmaları bir adaptasyon stratejisi olarak kullanırlar [64, 82]. Bitkiler olumsuz çevresel koşullardan kaçamayacağından DNA metilasyonu hassas bir şekilde düzenlenmelidir. Bu düzenleme, bitkilerin uygun büyüme ve gelişmesini sağlamak için büyük önem taşır [81, 83]. Dönemsel olarak epigenetik çeşitliliğin önemli bir kısmının çevresel faktörler tarafından kalıtsal olmayacak şekilde indüklendiği bir kısmının ise bir sonraki nesile aktarıldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak DNA metilasyonunda da metillenmiş bir bölgenin tekrar eski formuna dönmesi muhtemeldir [84]. Mayoz bölünmede stabil kalan doğal bazı epi-alleler sonraki jenerasyonlara aktarılmaktadır. Bu nedenle epigenetik regülasyonlar yeni çeşit geliştirilmesi gibi çalışmalar için de önemli kaynaklar olarak görülmektedir [85].

Yapılan bir çalışmada, DNA metilasyonunun *Arabidopsis thaliana'da* trans düzeyindeki genleri hedefleyen küçük RNA üretimini değiştirerek, gen ifadesini düzenlenmesi yoluyla metabolik ve morfolojik fenotipleri etkilediğine dair kanıtlar elde edilmiştir [86]. Bir başka *A. thaliana* üzerinde yapılan çalışmada DNA metilasyonunun melez bitkilerin ebeveynlerine göre üstün özelliklere sahip olması anlamına gelen heterozis ile ilişkili olduğu ve heterozis seviyesini düşürdüğü ifade edilmiştir. Bu bulgu, DNA metilasyonunun bitkilerdeki verimi etkileyebileceğini göstermiştir [87]. *Coriandrum sativum* (kişniş) bitkisinin tuz stresine karşı verdiği epigenetik yanıtları inceleyen bir çalışmada, bitkinin tuz stresi altında DNA metilasyon seviyelerini artırdığı ve gen ekspresyonunu etkilediği bildirilmiştir [88]. Başka bir çalışma, *Arabidopsis thaliana* örneklerinin iki farklı sıcaklık koşulunda yetiştirilmesi sonucunda CpHpH metilasyonunun sıcaklıkla birlikte arttığı bulunmuştur [89]. Bir diğer çalışmada, *P. quinquefolium*'un kalitesini ginsenosid birikiminin belirlediği ve bu süreçte soğuk koşulların kritik bir rol oynadığı bildirilmiştir. Erken ilkbaharda genç yapraklarda gerçekleşen DNA demetilasyonunun, yeterli kış soğuğuna maruz kalmayla tetiklendiği ve köklerdeki ginsenosid birikimiyle yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir [90].

Epigenetik mekanizmalar, bitkilerde gen ifadesinin düzenlenmesi, çevresel streslere yanıt, verim, gelişimsel süreçler, adaptasyon gibi birçok biyolojik süreçte önemli bir rol oynarken sekonder metabolit üretiminde de önemli bir yere sahiptir [83, 87, 91-93].

Yapılan bir çalışmada, inorganik fosfor (Pi) eksikliğinin bazı bitki türlerinde sekonder metabolit olan antosiyanin birikimini tetiklediği bildirilmiştir. *Malus crabapple* kullanılarak, Pi eksikliğinin antosiyanin birikimini tetikleme mekanizması incelenmiş ve epigenetik mekanizmalardan histon deasetilasyonu ile DNA metilasyonunun, Pi eksikliği yaşayan bitkilerde antosiyanin birikimini artırmada rol oynadığı gösterilmiştir [94]. Başka bir çalışmada, meyve rengini belirleyen sekonder metabolitler arasında yer alan antosiyanin biyosentezi ile ilişkili genler ve MYB/bHLH transkripsiyon faktörlerinin DNA metilasyonu incelenmiştir. DNA metilasyonundaki artışının yanı sıra, flavonoid biyosentez yolundaki genlerde ve MYB10'un yukarı akış bölgesinde hipometilasyonu transkripsiyonel aktivasyonu artırarak antosiyanin birikimini desteklerken, bHLH74'teki hipermetilasyon antosiyanin birikimini engellemiştir [95]. Bir diğer çalışmada, *Platycodon grandiflorus'*ta CYP716 ve bAS genlerinin hipometile olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu, söz konusu gen ailelerinin epigenetik modifikasyonların, bitkilerin yaygın savunma fitokimyasalları arasında yer alan triterpenoid saponinlerden platikositin biyosentezini etkileyebileceğini düşündürmüştür [96].

Sekonder metabolit üretiminin artırılmasına yönelik genetik düzenleme yaklaşımları, epigenetik mekanizmaların gen ifadesini tam olarak aydınlatılamamış yollarla düzenlemesi nedeniyle çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle epigenetik, önemli genlerin ifadesini kontrol etmeye yönelik mühendislik stratejilerinde ve ürün veriminin artırılmasında güçlü bir araçtır [63].

Öte yandan sekonder metabolitlerin epigenetik mekanizmalarla düzenlenmesine dair farklı bitkilerde çalışmalar bulunmasına rağmen, özellikle BIA biyosentezi açısından büyük öneme sahip olan haşhaş bitkisinde epigenetik düzenlemeleri inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Bir çalışmada, haşhaş bitkisinin farklı çeşitleri arasında DNA metilasyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Metilasyona duyarlı amplifikasyon polimorfizmi (MSAP) tekniği kullanılarak, tebain biyosentezi yolunda görev alan gen ve gen bölgelerindeki epigenetik

düzenlemeler incelenmiştir. Sonuçlar, farklı alkaloid içeriklerine sahip haşhaş çeşitlerinde metilasyon profillerinin farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur [97]. Yapılan başka bir çalışmada da farklı BIA içeriklerine sahip olan altı haşhaş çeşidinin DNA metilasyon profilleri MSAP yöntemi ile karşılaştırılmış ve hem çeşit hem de organ bazında DNA metilasyon farklılıkları ortaya konularak haşhaştaki BIA içeriğindeki farklılıkların epigenetik düzenlemeler ile ilişkisi gösterilmiştir [5].

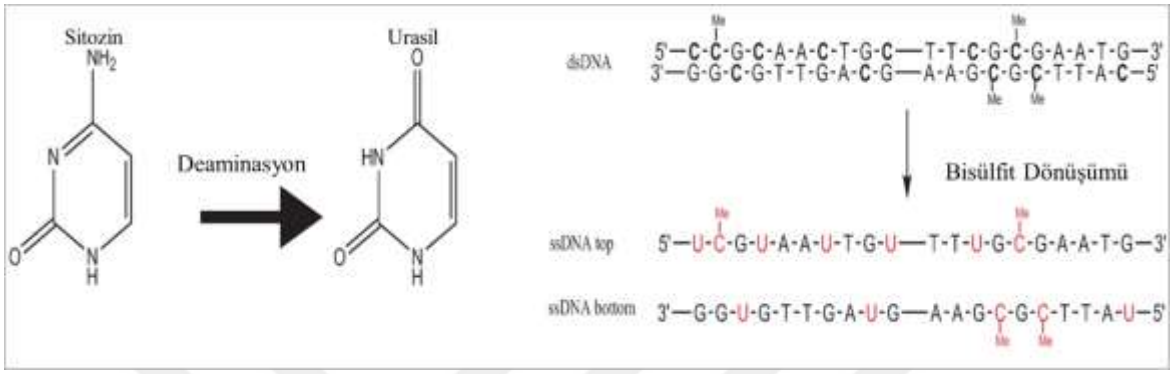
2.5. Epigenetik Analiz Yöntemleri

Epigenetik analiz yöntemleri, DNA dizisini değiştirmeden genlerin ifadesini düzenleyen mekanizmaları incelemeye yönelik çeşitli yaklaşımları kapsar. Bu yöntemler, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'ları kapsayan temel epigenetik mekanizmaların araştırılmasını sağlamaktadır [98]. DNA metilasyonunu tespit etmek için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında, MSAP, metillenmiş DNA immünopresipitasyon dizilemesi (MeDIP-seq), kütle spektrometrisi (MS) ve immüno-temelli teknikler bulunmaktadır [99]. Tüm bu tekniklerin arasında güvenilirliği ve sağladığı derinlemesine bilgi nedeniyle altın standart olarak kabul edilen bisülfit dizileme (Bi-Seq) en çok tercih edilen yaklaşımdır [100].

2.6. Bisülfit Dizileme (Bi-Seq)

Bisülfit dönüşümü ve yeni nesil dizileme (NGS) teknolojisinin bir arada kullanıldığı bu yöntem genomik DNA'daki metillenmiş sitozinleri tespit etmek için geliştirilmiş en yaygın kullanılan protokoldür. Yöntemde tek zincirli DNA'daki sitozin (C) bazının sodyum bisülfit aracılığıyla urasil (U) bazına dönüştürülmesine, ardından dönüştürülmüş DNA'nın PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılmasına, klonlanmasına ve dizilenmesine dayanmaktadır [99]. Sodyum bisülfit deaminasyonu, DNA'daki metillenmiş ve metillenmemiş sitozin nükleotidlerini ayırt etmeye yönelik bir teknik olarak ilk kez Frommer ve arkadaşları tarafından 1992 yılında tanıtılmıştır [100]. Bisülfit dönüşüm, metilasyon çalışmalarında oldukça yaygın kullanılmaktadır ve sürekli yeni tekniklerle desteklenen bir yöntemdir. DNA'nın bisülfit ile kimyasal modifikasyonu, birçok metilasyon analiz yönteminde kullanılabilen köklü ve güvenilir bir protokoldür. Bu yöntemde; DNA, metillenmemiş C bazlarını U bazlarına deamine eden ve metillenmiş sitozin bazlarına değiştirmeden bırakan sodyum bisülfit ile işlenmektedir. Urasil bazları, dizileme aşaması

sırasında timin (T) bazı olarak okunur. Her CpG bölgesindeki metilasyon seviyesi, basitçe C/(C+T) oranı sayılarak tahmin edilir. Metillenmiş ve metillenmemiş CpG bölgeleri arasında diziye özgü ayrım yapılmasına olanak sağlamaktadır (Şekil 2.5). Bu yöntem sitozin metilasyonunu ölçmek için 'altın standart' olarak kabul edilmektedir [101, 102].



Şekil 2.5. Bisülfit aracılı metilsitozin (mC) haritalama ilkesi [103]

Öte yandan tüm genom bisülfit dizileme (WGBS) analizi yüksek maliyeti nedeniyle, özellikle büyük genomlara sahip bitkilerde uygulanmasını sınırlamaktadır. Bu sorunu aşmak için geliştirilen azaltılmış temsili bisülfit dizileme (RRBS) yöntemi, son yıllarda bitkilerde metilasyon verilerinin analizinde en kapsamlı ve yaygın olarak tercih edilen bisülfit dizileme yaklaşımlarından biri olarak öne çıkmaktadır [98].

2.7. Azaltılmış Temsili Bisülfit Dizileme (RRBS)

RRBS, genomun metilasyon açısından yoğun bölgelerini zenginleştirmek için restriksiyon enzim kesimi ile bisülfit dizilemesini birleştiren bir yöntemdir [104]. RRBS, tek nükleotid değişimlerine odaklı maliyet açısından etkili ve hassas bir yöntemdir. Genomun küçük bir kısmı analiz edildiği için daha az hesaplama gücü gerektirir. Ayrıca, yalnızca 10 ng veya daha fazla bozulmamış, yüksek kaliteli genomik DNA'ya ihtiyaç duyar. CpG açısından zengin bölgeleri etkili bir şekilde hedefleyerek, azaltılmış dizileme derinliğiyle hassas metilasyon verileri sağlar. Genom çapındaki CpG bölgelerinin yalnızca %6-12' sini kapsamasına rağmen RRBS yöntemi DNA metilasyon modellerini baz düzeyinde ve nicel olarak analiz etmek amacıyla ilk kez Meissner ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [67, 99, 105, 106].

Öte yandan RRBS'in bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. CpG açısından zengin olmayan gen bölgeleri veya intergenik bölgeler gibi alanlarda kapsama oranı düşüktür. Seçilen bölgelerde yer almayan küçük metilasyon farklılıklarını gözden kaçırabilir. Ayrıca, PCR aşamasında bazı DNA bölgeleri yeterince çoğaltılamayabilir veya bazı bölgeler fazla çoğaltılabilir. Bu da elde edilen sonuçların tam olarak gerçek durumu yansıtmamasına yol açabilir [99].

RRBS yöntemi ile kütüphane oluşturma süreci, yüksek kaliteli genomik DNA'nın elde edilmesiyle başlar. DNA izolasyonu gerçekleştirilir. MspI enzimi (5'-CCGG-3' dizilerini hedef alarak) DNA'nın her iki sarmalında yer alan CpG bölgelerini tanıyarak (hem metillenmiş hem de metillenmemiş bölgeleri) sitozinlerden kesen restriksiyon endonükleazdır [105-107]. CpG açısından zengin genomik bölgeler MspI restriksiyon enzimi kullanılarak genomik DNA'nın kesilmesiyle zenginleştirilir. Bu DNA parçaları daha sonra sırasıyla 3' uç düzeltme/A-nükleotidi ekleme, adaptör dizilerinin ligasyonu şeklinde işlenir ve jel elektroforezi ile boyut seçimi (40–220 bp uzunluğunda) yapılırak RRBS kütüphanesi oluşturulur. Elde edilen fragmentler, ardından bisülfit dönüşüme tabi tutulur [105, 108]. Dönüştürülmüş DNA fragmentler daha sonra PCR ile çoğaltılır ve ardından dizileme işlemi gerçekleştirilir [108]. RRBS kütüphane oluşturma sürecinin akış şeması Şekil 2.6' te gösterilmiştir.



Şekil 2.6. RRBS kütüphane oluşturma sürecinin akış şeması [106, 109]

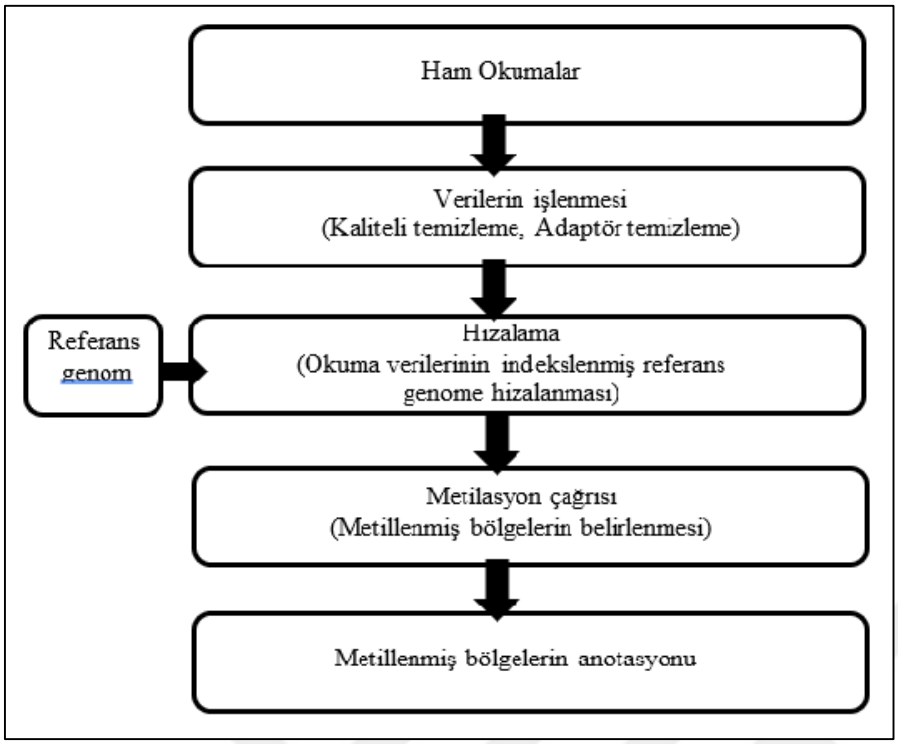
RRBS yöntemi ile elde edilen dizileme verilerin anlamlı biyolojik sonuçlara dönüştürülmesi için kapsamlı biyoinformatik analizler gereklidir. Ham dizileme verilerinin kalite kontrolü, hizalanması, metilasyon seviyelerinin hesaplanması ve farklı örnekler arasında karşılaştırmaların yapılması, biyoinformatik araçlar ve yazılımlar aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu nedenle RRBS ile metilasyon profillerinin doğru ve güvenilir şekilde yorumlanması, biyoinformatik analizlerin etkin uygulanmasına bağlıdır.

2.8. Biyoinformatik

Biyoinformatik, yazılım mühendisliği, bilgisayar bilimi, matematik ve moleküler biyoloji gibi birden fazla disiplinlerini kapsayan multidisipliner bir bilim dalıdır. Çeşitli algoritmalar ve biyoistatistiksel yöntemleri kullanarak büyük verilerden bilgi elde etme, giderek artan bilgiyi toplamak, bilgiye kolay bir şekilde ulaşılmasını sağlamak, biyolojik verileri inceleyerek anlaşılmasını sağlamak biyoinformatiğin asıl amacıdır. Biyoinformatiğin temelleri, 1951'de Pauling ve Corey'nin proteinlerin sekonder yapılarını tahmin etmeye yönelik çalışmalarıyla atılmış olsa da, modern anlamda biyoinformatik, bilgisayar desteğiyle 1966 yılında moleküler grafiklerin çizildiği ilk yayına dayandırılır. 1980'li yılların ortalarından itibaren biyoinformatik terimi kullanılmaya başlanmıştır. Biyoinformatiğin temel hedefi, biyolojik veriyi anlamlı bilgiye dönüştürmektir [110-112].

Son yıllarda teknolojik ilerlemeler ve yüksek verimli araştırma yöntemlerinin gelişmesiyle biyoteknoloji alanında büyük miktarda veri üretilmeye başlanmıştır. Bu durum, biyoloji ile bilgi teknolojisinin birleşiminden doğan ve biyoinformatik olarak adlandırılan yeni bir bilim alanının gelişimini hızlandırmıştır. Biyoinformatik, biyolojik verilerin anlamlı bir şekilde düzenlenip analiz edilmesini amaçlamaktadır. Özellikle genomik teknolojilerdeki ilerlemeler, biyoinformatiğin hem bitki biyoteknolojisi hem de biyomedikal araştırmalarda önemli bir rol oynamasını sağlamıştır. Genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik ve epigenomik gibi '-omik' teknolojilerin yaygınlaşmasıyla biyoinformatik, biyoteknolojinin birçok alanını kapsayan temel bir disiplin haline gelmiştir [113-115].

Biyoinformatik, epigenetik mekanizmaların anlaşılması ve epigenomik verilerin analizinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu alanda, epigenetik verilerin analizine yönelik birçok araç ve veritabanı geliştirilmiştir [116, 117]. Epigenetik mekanizmalardan biri olan DNA metilasyonunun analizinde biyoinformatik yöntemler önemli bir rol oynamaktadır. Yapılacak çalışmanın amacına uygun olarak birçok farklı analize ihtiyaç duyulabilmesiyle birlikte, temel adımlarıyla bir DNA metilasyon analizi iş akışı Şekil 2.7'de sunulmuştur.



Şekil 2.7. DNA metilasyon analizinin iş akışı [106, 118]

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bitki Materyali

Bitki materyali olarak TMO Afyon Alkaloidleri Fabrikası tarafından klasik ıslah yöntemleri ile geliştirilmiş alkaloid içerikleri açısından birbirlerinden farklı olan üç çeşit kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Bu üç çeşit; morfin içeriği yüksek Ofis_1 çeşidi (%1,8 morfin), noskapin içeriği yüksek Ofis_NP çeşidi (%1,3 noskapin) ve kontrol grubu olarak morfin ve noskapin içeriği düşük Ofis_96 (%0,6 morfin ve <%0,02 noskapin) çeşitleridir [5].

TMO ile Research Institute for Medicinal Plants (Macaristan) arasında yapılan iş birliği kapsamında, Macaristan tarafından melezlenmiş olarak gönderilen bir hat, TMO tarafından Ofis_1 ile M2xF13/6 ebeveynlerinin melezlenmesiyle ıslah sürecine dahil edilerek geliştirilmiştir. Tescile AAF3 çeşit adayı adı ile müracaat edilmiş tescil işlemi onaylanınca çeşit ismi Ofis_1 olarak belirlenmiştir. 1996 yılında tescillenmiş kontrol grubu olan Ofis_96 çeşidi seleksiyon ile ıslah edilmiştir. Ofis_NP; yarı yol materyali olarak alınarak TMO tarafından geliştirilmiştir. Melezleme yolu ile ıslah edilen Ofis_NP ve Ofis_1 çeşitleri ise sırasıyla 2014 ve 2016 yıllarında tescil edilmiştir [119].

Çalışmada haşhaş tohumları ilk (ana) kapsül oluşumu dönemine kadar büyütülmüştür. Bitkiler alkaloid üretiminin en yoğun olduğu dönem olan çiçeklenme döneminde kapsüller ve gövdeler (3 cm uzunluğunda) Haziran 2021 tarihinde toplanmıştır [120]. Bitkiler Afyonkarahisar İli Bolvadin İlçesi Afyon Alkaloidleri Fabrikası Müdürlüğüne ait ekim alanından alınmıştır ve DNA izolasyonunda kullanılmak üzere hemen sıvı azotta dondurularak kullanılana kadar -80 °C' de saklanmıştır. Örnekler için üçer biyolojik replikasyon kullanılmış olup, sadece Ofis_NP kapsül örneğinden iki adet replika ile analizlere devam edilmiştir.

Çizelge 3.1. Analizlerde kullanılan örnek isimleri ve sayıları

Örnekler	BIA Özelliği	Organ	Bisülfit Dizileme Örnek Sayısı
Ofis_96	Kontrol	Gövde	3 biyolojik replika
Ofis_96	Kontrol	Kapsül	3 biyolojik replika
Ofis_1	Morfince zengin	Gövde	3 biyolojik replika
Ofis_1	Morfince zengin	Kapsül	3 biyolojik replika
Ofis_NP	Noskanipce zengin	Gövde	3 biyolojik replika
Ofis_NP	Noskapince zengin	Kapsül	2 biyolojik replika

3.2. DNA İzolasyonu

Yapılacak olan dizileme çalışmalarında analizi etkileyen önemli etmenlerden bir DNA'nın kalitesidir. Hücresel proteinler, özellikle DNA'ya bağlanan proteinler, enzimatik reaksiyonların yanı sıra bisülfit dönüşümünü de olumsuz yönde etkileyebileceğinden ortamdan uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Bozulmamış ve temiz DNA elde etmek, RRBS kütüphanesinin doğruluğu açısından oldukça önemlidir [109, 121]. Bu çalışmada haşhaş bitkisinin her üç çeşidinin gövde ve kapsüllerinden biyolojik tekrarlı olarak toplamda 17 örnek üzerinden total DNA izole edilmiştir. DNA izolasyonu için GeneMATRIX Plant&Fungi DNA Purification Kit prosedürü (Cat No. E3595) uygulanmıştır.

DNA izolasyon aşamasında, örneklerin gövde ve kapsülleri -80 °C'den alınarak sıvı azot içerisinde seramik havanda toz haline gelinceye kadar homojenize edilerek 2 mL'lik tüplere alınmıştır (Resim 3.1). Her bir örnek için DNA spin kolonlarına 30 µL P tamponu eklenmiştir. Örneklerin olduğu tüplerin üzerine 400 µL Lyse P, 3 µL RNaseA ve 10 µL proteinkinaz K konulmuştur. Örnek tüpleri vortekslendikten sonra 65 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. Beklerken örnekler 5 dakikada bir alt üst edilmiştir. Su banyosundan alınan örneklere 130 µL AC tamponu eklenmiş ve 5 dakika buzda bekletilmiştir. Örnekler buzdan alındıktan sonra 10 dakika 14 000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlardan 400 µL alınarak yeni tüpe aktarılmıştır. Yeni tüpe aktarılan süpernatantların üzerine 350 µL Sol P tamponu ve 250 µL %96 etanol eklenmiştir. Hafifçe alt üst edilerek 1 dakika 12 000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden alınan

örneklerden 600 µL süpernatant alınarak daha önceden P tamponu konulan DNA spin kolonlarına eklenmiştir. 1 dakika 11 000 g'de santrifüj edilerek DNA'nın kolonlara tutunması, artıkların ise alt tüpe inmesi sağlanmıştır. Kolonların alt tüpleri santrifüj sonrası dökülmüştür. DNA kalan kolonlara 500 µL Wash PX konularak 1 dakika 11 000 g'de santrifüj edildikten sonra alt tüp dökülmüştür. İkinci kez 500 µL Wash PX konularak 1 dakika 11 000 g'de santrifüj edildikten sonra alt tüp dökülmüştür. Böylece kolonların artıklardan temizlenmesi sağlanmıştır. DNA tutunan kolonlara 50-150 µL Elution tamponu konularak 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 1 dakika 11 000 g' de santrifüj edilmiştir. Elution ile kolonlara tutunan DNA'nın alt tüpe inmesi sağlanmıştır. Örneklerin görüntüleme ve konsantrasyon ölçümü için DNA bulunan alt tüp buzda beklemeye alınmıştır. Örneklerin konsantrasyonunu belirlemek için 2 µL Elution tamponu (kör olarak) ve 2 µL örneklerden alınarak NanoDrop spektrofotometresinde ölçüm sağlanmıştır. Örneklerin konsantrasyonları belirlendikten sonra DNA kalitesinin kontrolü için %1' lik agaroz jelde görüntülemesi yapılmıştır. İzole edilen örnekler kullanılıncaya kadar -20 ˚C'de saklanmıştır.



Resim 3.1. -80℃'den alınan bitkilerin sıvı azot ile toz haline getirilmesi

3.3. Bisülfit Dönüşüm ve Yeni Nesil Dizileme

Bu çalışmada, farklı haşhaş çeşitleri arasındaki BIA içeriği varyasyonunun epigenetik düzeyde DNA metilasyonu ile ilişkisinin araştırılması amacıyla RRBS yöntemi kullanılmıştır. Konsantrasyonları belirlenen ve agaroz jelde görüntülemesi yapılan örneklere ait yüksek kaliteli DNA'lar, hizmet alımı yapılan firmanın belirttiği şartlara göre (örnek

konsantrasyonları 50 ng/µL'den az olmamak ve her bir örnek için toplamda 5 µg DNA olacak şekilde) soğuk zincirde hazırlanarak gönderilmiştir. Bisülfit dönüşüm ve dizileme analizi, hizmet alımı ile profesyonel bir servis sağlayıcısı firma tarafından yapılmıştır.

Bisülfit dönüşümünün etkinliğini ve hata oranını değerlendirmek amacıyla, örneklerde metillenmemiş lambda DNA kullanılmıştır. Dizileme işlemi, Illumina HiSeqX Ten platformunda çift uçlu olarak gerçekleştirilmiştir. Her biri 150 baz çifti uzunluğunda okuma verileri elde edilmiştir. Firma tarafından her bir örnek için yaklaşık 10 GB büyüklüğünde veri elde edilmiştir ve ham dizi verisi dijital ortamda tarafımıza FASTQ dosya formatında gönderilmiştir. Ham dizi verileri, SRP566503 erişim numarası ile NCBI SRA veri tabanına yüklenmiştir.

3.4. Adaptör Dizilerinin Temizlenmesi ve Kalite Kontrolü

DNA metilasyon analizinin iş akışının en önemli adımlarından birisi ham dizilerdeki adaptör dizilerin ve okuma kalitesi düşük olan bölgelerin (Phred skoru <20) temizlenme aşamasıdır. Phred skoru 20'nin altında olan düşük kaliteli bölgeler, bazların hatalı tanımlanma olasılığının yüksek olmasıyla ilişkilidir [122]. Doğru temizleme işleminin yapılamaması ileri aşamalarda yanlış hizalamaya sebep olacağından bu bölgelerin veri setinden uzaklaştırılması gereklidir [123, 124].

Bu çalışmada ham dizilerin temizlenmesinde kullanılan TrimGalore aracı, temizleme hızı ve doğruluğu açısından yaygın olarak kullanılan diğer temizleme araçlarına kıyasla üstün performans sergilemektedir. Otomatik adaptör tanıma özelliğine sahip FastQC ile kalite kontrolü de gerçekleştirilebilmesi TrimGalore'u araştırmacılar için cazip ve pratik bir seçenek haline getirmektedir [124]. Illumina dizileme platformu tarafından FASTQ formatında elde edilen ham okuma dizilerinden, TrimGalore (v.0.6.10) aracı kullanılarak düşük kaliteli bazlar ve adaptör dizileri temizlenmiştir. Ardından kütüphanelerin kalitesinin kontrol işlemi FastQC (v.0.11.9) ile değerlendirilmiştir.

3.5. Hizalama

Bisülfit dizileme verilerinin referans genoma hizalanmasında iki temel algoritma yaklaşımı kullanılmaktadır.

1. Joker Kart (Wild card) hizalayıcı: Bu yöntemde referans genomdaki tüm sitozin (C) bazları, hem sitozin (C) hem de timin (T) bazlarıyla eşleşebilen joker bir karakter (genellikle Y) ile değiştirilir. Bu yaklaşım, genellikle daha yüksek oranda genomik kapsama sağlar; ancak metillenmiş C bazlarının fazla olması durumunda, okuma dizilerindeki çeşitlilik artacağından dizi karmaşıklığını olumsuz etkileyebilir [122, 125-128].

2. Üç harfli (Three- letter) hizalayıcı: Bu yöntemde hem okuma dizileri hem de referans genomda yer alan her iki iplikteki tüm sitozinler timine (C→T) dönüştürülerek hizalama işlemi gerçekleştirilir. Bu dönüşüm, bisülfit dizilemeye özgü varyasyonları ortadan kaldırarak hizalama işlemini basitleştirir. Ancak yüksek metilasyon düzeyine sahip bölgelerde daha az sayıda C→T dönüşümü gerçekleştiğinden, dizi karmaşıklığı korunur ve bu da kapsama oranının azalmasına neden olabilir [122, 125-128].

Literatürde joker karakter tipi hizalayıcıların hizalama oranında (hizalanan okumaların yüzdesi) daha yüksek genomik kapsama sağlarken, hizalama doğruluğu (doğru konumlarda hizalanan okumaların yüzdesi) konusunda zorluk yaşadığı bildirilmektedir. Üç harfli hizalayıcılar ise tam tersi bir eğilim göstermektedir [125, 128, 129]. Hizalama aşamasında hizalayıcı programın seçimi oldukça önemli bir konudur. Epigenetik çalışmalarda hizalama amacıyla sıklıkla kullanılan dört farklı programa ait algoritma içeriği Çizelge 3.2'de gösterilmiştir [127-131].

Çizelge 3.2. Hizalama programlarının kullandığı algoritmalar

Hizalama programları	Joker karakter	Üç harfli
Bsmapz	+	
Bismark		+
BS-Seeker2		+
Bwa-Meth		+

Hizalama amacı için epigenetik çalışmalarda en çok kullanılan dört farklı program öncelikle tek örneğe (Ofis1_kapsül) ait diziler ile denenerek hizalama yüzde verimlilikleri ölçülmüştür. Yüksek verimlilik verdiği tespit edilen Bwa-Meth ve Bsmapz programları ile referans genoma tüm örnekler hizalanmıştır. Her iki programla gerçekleştirilen karşılaştırma sonucunda, nispeten daha yüksek hizalama verimliliği sağlayan Bwa-Meth [v.0.2.2]

programı tercih edilmiş ve ileri düzey veri işleme adımları bu programdan elde edilen veriler kullanılarak yürütülmüştür.

3.6. Metilasyon Çağrısı

Örnekler arasındaki farklı metilasyon gösteren bölgelerin (DMR) belirlenmesi amacıyla, yanlış pozitif oranının düşük olması, güvenilir sonuçlar üretmesi ve verilerin işlenmesinde hızlı olmaları nedeniyle sıkça tercih edilen *R* tabanlı analiz araçları MethylKit ve MethylSig kullanılmıştır [132, 133]. Gerçekleştirilen tüm analizlerde her iki aracın benzer sonuçlar ürettiği gözlenmiştir. Kullanılan araç ve programların analizin amacına uygun olduğu doğrulanmıştır.

MethylKit aracı, DMR tespitini kısa sürede gerçekleştirebilmesi, DMR çağırma açısından en etkili araçlar arasında yer alması, düşük yanlış pozitiflik oranı göstermesi ve veri setinde yer alan DMR'lerin yüksek oranını başarıyla tespit etmesi gibi üstünlükleri nedeniyle tercih edilerek ileri veri işlemesi gerçekleştirilmiştir [132, 134-136]. Bwa-Meth verilerinin MethylKit (v.1.29.1) aracı ile işlenmesinde aşağıdaki adımlar yürütülmüştür.

- Bisülfit dönüşüm oranlarına dayalı olarak DNA metilasyon düzeylerinin güvenilir şekilde tahmin edilebilmesi için, genellikle en az 5X okuma kapsaması yeterlidir [137, 138]. Metilasyon seviyelerinin daha güvenilir şekilde değerlendirilmesi amacıyla örnekler 10X (her bölgenin en az on kez dizilenmesi) dizileme derinliğine sahip olacak şekilde filtrelenmiştir. Böylece az sayıda okumayla desteklenmiş düşük kapsama sahip bölgelerin analizde yer alması engellenmiş olup sonuçların güvenirliği artırılmıştır.

- %99,9 üzerinde olan yüksek kapsama sahip bazı bölgeler (bir bölgenin normalden çok daha fazla okunması) PCR çoğaltma aşamasında bazı DNA parçalarının gereğinden fazla çoğaltılması gibi biyolojik olmayan dizileme sürecindeki teknik hatalardan kaynaklanabilir. Bu tür hatalar analiz sonucunda yanıltıcı verilere yol açabilir [139-145]. Aşırı yüksek kapsama sahip bölgeler sonuçları bozabileceğinden bu bölgeler analizden çıkarılarak analiz daha güvenilir bir hale getirilmiştir.

- Dizileme verilerinde, her bir örnek için elde edilen okuma kapsamları farklılık gösterebilir. Dolayısıyla, örnekler arasındaki okuma kapsamı dağılımlarındaki eşitsizliklerin giderilerek

verilerin karşılaştırılabilirliğinin ve homojenliğinin sağlanması önemlidir. Bu doğrultuda normalizasyon işlemi yapılmaktadır [124, 143, 144]. Bu çalışmada normalizasyon işlemi yapılarak örneklerdeki okuma kapsamları eşitlenmiştir. Bu sayede, her bir örneğe ait metilasyon oranları karşılaştırılabilir hale getirilmiş ve metilasyon seviyelerindeki gerçek biyolojik farklılıkların daha net bir şekilde ortaya konması sağlanmıştır.

- Metilasyon değişimlerinin rastgele oluşan değişimlerden ayırt edilmesi amacıyla örnekler replikalı olarak çalışılmaktadır [146]. Bu çalışmada örnekler üç biyolojik replikalı olarak çalışılmıştır. Böylece örnekler arasındaki metilasyon düzeylerinin aynı genetik bölgelerde eşleşmesi sağlanarak her bir örneğe ait metilasyon verilerinin bir araya getirilmesi amacıyla biyolojik tekrarların okuma verileri birleştirilmiştir. Farklı replikalarda aynı bölgelerdeki metilasyon değişimlerinin gözlenmesi metilasyon bölgelerinin gerçek biyolojik farklar olduğunu desteklemiştir. Bu şekilde güvenilir ve biyolojik olarak anlamlı farklılaşmış metilasyon bölgeleri tespit edilmiştir.

- Metilasyon farkları, iki grup arasındaki metilasyon oranlarının farkı alınarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sırasında istatistiksel anlamlılığın belirlenmesinde iki temel kriter esas alınmıştır. Birinci kriter olarak, q değeri < 0,01 olan bölgeler seçilmiştir. Bu eşik değeri, daha sıkı bir hata oranı kontrolü sağlayarak yanlış pozitiflik oranının %1'in altında tutulmasına olanak tanımakta ve sitozin metilasyonundaki farklılıkların daha güvenilir biçimde saptanmasını mümkün kılmaktadır. İkinci kriter olarak ise, metilasyon farkının %25' in üzerinde olması esas alınmıştır. Bu eşik değeri ise, genetik ve epigenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmakta olup, gruplar arasında epigenetik açıdan anlamlı farklılıkların bulunduğunu ve bu farklılıkların potansiyel olarak biyolojik sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir [136, 145, 147-150].

Analiz sürecinin işleyişinde, her aşamada en uygun parametrelerin ve araçların belirlenebilmesi için farklı programlar ile doğrulama yapılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler arasında CpG, CpHpG ve CpHpH metilasyon çeşitlerinin DNA metilasyon düzeyleri ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Manhattan grafikleri, ggplot2 (v.3.5.1)' ye sahip R paketi kullanılarak oluşturulmuştur.

3.7. Gen Ontolojisi ve Fonksiyonel Anotasyon Analizi

Hipermetillenmiş ve hipometillenmiş DMR' lerle ilişkili genlerin gen ontolojisi (GO) fonksiyonel zenginleştirme analizi, DAVID aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [151]. Bu analizde biyolojik süreç (BS), hücresel bileşen (HB) ve moleküler fonksiyon (MF) olmak üzere üç alt ontoloji grubunda incelenmiştir. *q* değeri 0,01' in altında, metilasyon farkı %25' den büyük olan GO terimleri, istatistiksel olarak anlamlı biçimde zenginleştirilmiş olarak kabul edilmiştir. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veritabanına dayalı zenginleştirme analizi de gerçekleştirilmiştir [152]. Referans genoma haritalanan verilerden ilgili gen bölgeleri çıkarılmış ve anotasyon amacıyla elde edilen diziler NCBI Batch Entrez üzerinden çekilerek tanımlanmıştır.

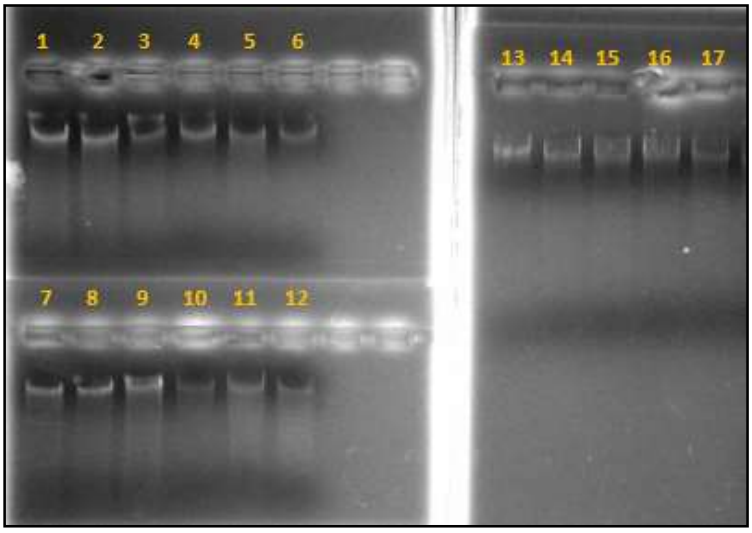
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DNA İzolasyonu

Haşhaş bitkisinin her üç çeşidinin gövde ve kapsüllerinden biyolojik tekrarlı olarak toplamda 17 örnek üzerinden total DNA izole edilmiştir. Deney sonucunda elde edilen örneklerin DNA konsantrasyonları ve miktarları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Örneklerin DNA kalitesini kontrol etmek için % 1'lik agaroz jelde yapılan görüntüleme sonuçları Resim 4.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Bitkilerden elde edilen DNA'ların konsantrasyonları

Örnek sırası	Örnekler	Örnek adlarının kısaltması	A260/A280	ng/µL
1	Ofis_1 Gövde 1	O1G1	1,984	140
2	Ofis_1 Gövde 2	O1G2	1,841	109
3	Ofis_1 Gövde 3	O1G3	1,730	69
4	Ofis_1 Kapsül 1	O1K1	1,897	100
5	Ofis_1 Kapsül 2	O1K2	1,833	85
6	Ofis_1 Kapsül 3	O1K3	1,846	95
7	Ofis_96 Gövde 1	O96G1	1,741	64
8	Ofis_96 Gövde 2	O96G2	1,849	59
9	Ofis_96 Gövde 3	O96G3	1,824	88
10	Ofis_96 Kapsül 1	O96K1	1,913	59
11	Ofis_96 Kapsül 2	O96K2	1,849	77
12	Ofis_96 Kapsül 3	O96K3	1,832	62
13	Ofis_NP Gövde 1	ONPG1	1,782	70
14	Ofis_NP Gövde 2	ONPG2	1,712	61
15	Ofis_NP Gövde 3	ONPG3	1,771	80
16	Ofis_NP Kapsül 1	ONPK1	1,844	72
17	Ofis_NP Kapsül 2	ONPK2	1,855	67



Resim 4.1. Bitkilerden elde edilen DNA'nın agaroz jel görüntüsü (1:Ofis_1 Gövde 1,2:Ofis_1 Gövde 2, 3:Ofis_1 Gövde 3, 4:Ofis_1 Kapsül 1, 5:Ofis_1 Kapsül 2, 6:Ofis_1Kapsül 3, 7:Ofis_96 Gövde 1, 8:Ofis_96 Gövde 2, 9:Ofis_96 Gövde 3, 10:Ofis_96 Kapsül 1, 11:Ofis_96 Kapsül 2, 12:Ofis_96 Kapsül 3, 13:Ofis_NP Gövde 1, 14: Ofis_NP Gövde 2, 15: Ofis_NP Gövde 3, 16: Ofis_NP Kapsül 1, 17: Ofis_1 Kapsül 2)

4.2. Dizileme Kalitesi

RRBS yöntemi uygulanan örneklerin, yüksek oranda MspI enzim kesim verimliliğine sahip olduğu görülmüştür. Bu durum sonraki analiz basamaklarında elde edilen verilerin doğruluğunu ve verimliliğini artırmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. MspI enzim kesim verimliliği (%)

Örnekler	% MspI enzim kesim verimliği
O1G1	% 99,3
O1G2	% 99,3
O1G3	% 99,0
O1K1	% 99,4
O1K2	% 98,7
O1K3	% 99,1
O96G1	% 98,6
O96G2	% 99,5
O96G3	% 99,2
O96K1	% 97,7
O96K2	% 98,4
O96K3	% 98,4
ONPG1	% 99,5
ONPG2	% 99,3
ONPG3	% 99,4
ONPK1	% 99,3
ONPK2	% 99,1

Kütüphanenin doğru bir şekilde hazırlanmasında ikinci önemli aşama bisülfit dönüşümdür. Kesim sonrası dizilerdeki metillenmemiş C'ler yüksek oranda dönüşüme uğramıştır. Bisülfit dönüşüm verimliliği ortalama %99,3 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Bu durum metillenmiş sitozinlerin güvenilir bir şekilde tespit edildiğini göstermiştir.

Çizelge 4.3. Bisülfit dönüşüm oranı

Örnekler	Metilasyona Uğramış C	Metilasyona Uğramamış C	Bisülfit Dönüşüm (%)
O1G1	209 856	31 930 796	%99,3
O1G2	134 132	20 023 362	%99,3
O1G3	219 838	37 033 301	%99,4
O1K1	78 033	13 454 435	%99,4
O1K2	106 552	18 577 689	%99,4
O1K3	93 327	15 965 917	%99,4
O96G1	111 285	20 317 012	%99,5
O96G2	218 079	34 470 895	%99,4
O96G3	90 705	15 261 889	%99,4
O96K1	228 972	41 147 900	%99,4
O96K2	208 792	38 854 057	%99,5
O96K3	201 755	31 646 368	%99,4
ONPG1	206 643	34 924 548	%99,4
ONPG2	312 786	52 442 708	%99,4
ONPG3	220 370	35 404 625	%99,4
ONPK1	54 778	9 089 773	%99,4
ONPK2	141 150	21 348 707	%99,3

Sıralama kalite puanları (Q), bir bazın yanlış çağrılması olasılığını ölçer. Daha yüksek Q puanları daha küçük bir hata olasılığını göstermektedir. Dizilere ait Q değerleri oldukça önemlidir. Q20 kalite puanı; 100 bp'lik sıralama okumasında bir hata bulunabileceğini ifade etmektedir. Q30 kalite puanı ise; 1 000 bp'lik sıralama okumasında bir hata bulunabileceğini ifade etmektedir. Sıralama kalitesi Q30' a ulaştığında neredeyse tüm okumaların hiçbir hata olmadan mükemmel olacağını göstermektedir. Bu nedenle Q30 yeni nesil dizilemelerde kalite açısından bir referans noktası olarak kabul edilmektedir [122, 131, 153]. Bu çalışmada elde edilen diziler için Q20 ve Q30 kalite puanlarının oldukça yüksek olduğu Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Dizileme kalitesinin yüksekliği, Q20 ve Q30 skorlarının yüksek çıkmasıyla doğrulanmıştır.

Bisülfit dizileme yönteminde, metillenmemiş sitozin (C) bazları urasile dönüşmekte ve dizileme aşamasında timin (T) olarak okunmaktadır. Bu dönüşüm sonucunda yalnızca metillenmiş sitozin (C) bazları korunmakta ve analizlerde tespit edilebilmektedir. Bisülfit dizileme verilerinde gözlemlenen %GC içeriği, sitozinlerin çoğunun metillenmemiş olması ve metillenmemiş sitozin bazlarının urasile dönüşmesi nedeniyle genomun gerçek %GC içeriğine kıyasla yaklaşık %50 oranında daha düşüktür [154]. Bu çalışmada elde edilen okumalara ait ortalama GC içeriği %26,7 olarak tespit edilmiş olup bu oran bisülfit ile işlenmiş kütüphaneler için beklenen aralıkla uyumluluk göstermiştir. Bu çalışma kapsamında tüm örnekler için yaklaşık 10 GB yüksek kaliteli dizileme verisi üretilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Ham veriler

Örnekler	Okuma Sayıları	Baz Sayısı	Q20 Baz Sayısı	Q20 (%)	Q30 Baz Sayısı	Q30 (%)	GC (%)
O1G1	38 215 361	11 464 608 300	11 105 592 520	%96,9	10 504 134 275	%91,6	%27,5
O1G2	34 166 560	10 249 968 000	9 893 371 565	%96,5	9 343 120 610	%91,2	%29,2
O1G3	42 254 479	12 676 343 700	12 250 769 975	%96,6	11 590 583 520	%91,4	%29,8
O1K1	37 624 061	11 287 218 300	10 983 626 148	%97,3	10 409 160 899	%92,2	%25,1
O1K2	35 078 956	10 523 686 800	10 246 312 416	%97,4	9 725 727 302	%92,4	%25,2
O1K3	38 295 233	11 488 569 900	11 174 711 848	%97,3	10 584 269 358	%92,1	%24,7
O96G1	41 947 087	12 584 126 100	12 215 505 699	%97,1	11 533 910 541	%91,7	%26,8
O96G2	38 471 381	11 541 414 300	11 230 010 797	%97,3	10 652 286 391	%92,3	%25,4
O96G3	37 453 458	11 236 037 400	10 938 858 511	%97,4	10 367 489 276	%92,3	%25,8
O96K1	34 702 506	10 410 751 800	10 101 823 660	%97,0	9 545 259 953	%91,7	%28,3
O96K2	39 449 203	11 834 760 900	11 504 327 394	%97,2	10 895 659 913	%92,1	%26,8
O96K3	34 326 535	10 297 960 500	10 018 524 663	%97,3	9 503 076 646	%92,3	%26,4
ONPG1	34 094 788	10 228 436 400	9 937 150 831	%97,2	9 412 801 137	%92,0	%26,6
ONPG2	34 892 821	10 467 846 300	10 173 240 361	%97,2	9 661 893 121	%92,3	%28,6
ONPG3	35 526 436	10 657 930 800	10 365 146 451	%97,3	9 837 903 587	%92,3	%26,6
ONPK1	34 056 611	10 216 983 300	9 953 164 145	%97,4	9 438 693 084	%92,4	%24,8
ONPK2	38 097 740	11 429 322 000	11 131 784 727	%97,4	10 573 587 114	%92,5	%25,6

4.3. Ham Dizilerdeki Adaptör Dizilerin Temizlenmesi ve Kalite Kontrolü

Illumina dizileme platformu ile elde edilen ham dizi verilerinde adaptör dizilerinin yer alması, biyoinformatik analizlerin doğruluğunu olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu nedenle, analiz öncesinde adaptör dizilerin temizliğinin yapılması büyük önem taşımaktadır. FastQC kalite kontrol aracı, ham verilerdeki adaptör dizileri otomatik olarak tanımlayabilmekte ve bu bölgeleri pikler şeklinde raporlamaktadır [155]. Adaptör temizleme işlemi sonrasında oluşturulan FastQC raporlarındaki piklerin ortadan kalkması ya da belirgin bir şekilde azalması, temizleme işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini göstermiştir. Adaptör temizliği öncesi ve sonrası toplam dizi sayıları arasındaki fark, temizlenen dizi sayısını ifade etmektedir ve adaptör dizilerinin uzaklaştırıldığını doğrulamıştır. Bu farkın örnekler arasında değişiklik göstermesi, adaptör dizilerinin yanı sıra düşük kaliteli dizilerin de temizlendiğini ortaya koymuştur. Elde edilen bu veriler, kullanılan program ve parametrelerin adaptör temizliği için uygun olduğunu ve temizleme işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini doğrulamıştır.

DNA molekülü, birbirine karşılıklı olarak bağlanan ve zıt yönlerde uzanan iki iplikten oluşmaktadır [156]. Çizelge 4.5’da, her bir örnek için birinci ve ikinci ipliğe ait adaptör dizilerinin temizlenme işlemi öncesi toplam dizi sayıları ile temizleme işlemi sonrası toplam dizi sayıları arasındaki fark gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Adaptör dizilerinin temizlenme analiz sonuçları

Örnekler	Temizlenme işlemi öncesi baz sayısı	Temizlenme işlemi sonrası baz sayısı	Fark (baz)	Temizlenme işlemi öncesi baz sayısı	Temizlenme işlemi sonrası baz sayısı	Fark (baz)
	1. iplik (baz)	1.iplik (baz)		2.iplik (baz)	2.iplik (baz)	
O1G1	38 215 361	38 173 057	42 304	38 215 361	38 173 057	42 304
O1G2	34 166 560	34 148 115	18 445	34 166 560	34 148 115	18 445
O1G3	42 254 479	42 226 094	28 385	42 254 479	42 226 094	28 385
O96G1	41 947 087	41 939 986	7 101	41 947 087	41 939 986	7 101
O96G2	38 471 381	38 467 532	3 849	38 471 381	38 467 532	3 849
O96G3	37 453 458	37 447 828	5 630	37 453 458	37 447 828	5 630
ONPG1	34 094 788	34 082 122	12 666	34 094 788	34 082 122	12 666
ONPG2	34 892 821	34 866 600	26 221	34 892 821	34 866 600	26 221
ONPG3	35 526 436	35 507 596	18 840	35 526 436	35 507 596	18 840
O1K1	37 624 061	37 620 244	3 817	37 624 061	37 620 244	3 817
O1K2	35 078 956	35 074 852	4 104	35 078 956	35 074 852	4 104
O1K3	38 295 233	38 290 541	4 692	38 295 233	38 290 541	4 692
O96K1	34 702 506	34 691 595	10 911	34 702 506	34 691 595	10 911
O96K2	39 449 203	39 442 214	6 989	39 449 203	39 442 214	6 989
O96K3	34 326 535	34 321 031	42 304	34 326 535	34 321 031	42 304
ONPK1	34 056 611	34 053 518	18 445	34 056 611	34 053 518	18 445
ONPK2	38 097 740	38 093 154	28 385	38 097 740	38 093 154	28 385

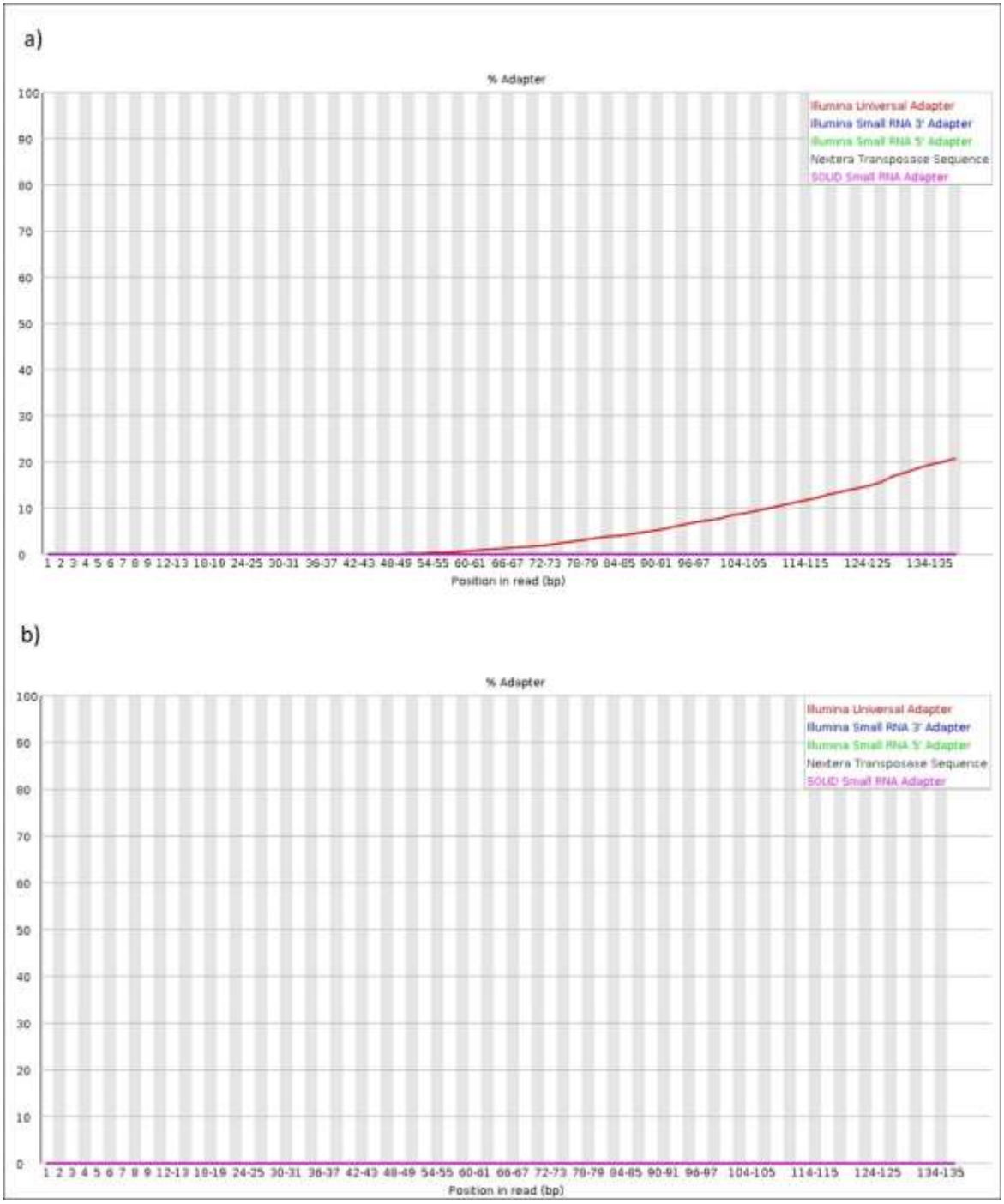
Örneklerin adaptör dizilerine ait temizleme işlemi öncesi ve sonrasına ait FastQC rapor görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34) (Kırmızı Pik= Illumina Evrensel Adaptörü, Mavi Pik= Illumina Küçük RNA 3’ Adaptörü, Yeşil Pik= Illumina Küçük RNA 5’ Adaptörü, Siyah Pik= Nextera Transpozaz Dizisi, Pembe Pik= SOLiD Küçük RNA Adaptörü). Şekillerin a maddesinde FastQC tarafından otomatik olarak algılanan temizleme öncesine ait Illumina platformu okumalarını temsil eden adaptör bölgesi kırmızı renkli pik açıkça görülürken, b maddesinde bu pik ortadan kalkmış olup temizleme işleminin başarıyla gerçekleştirildiği gösterilmiştir.



Şekil 4.1. O1G1 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.2. O1G1 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.3. O1G2 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



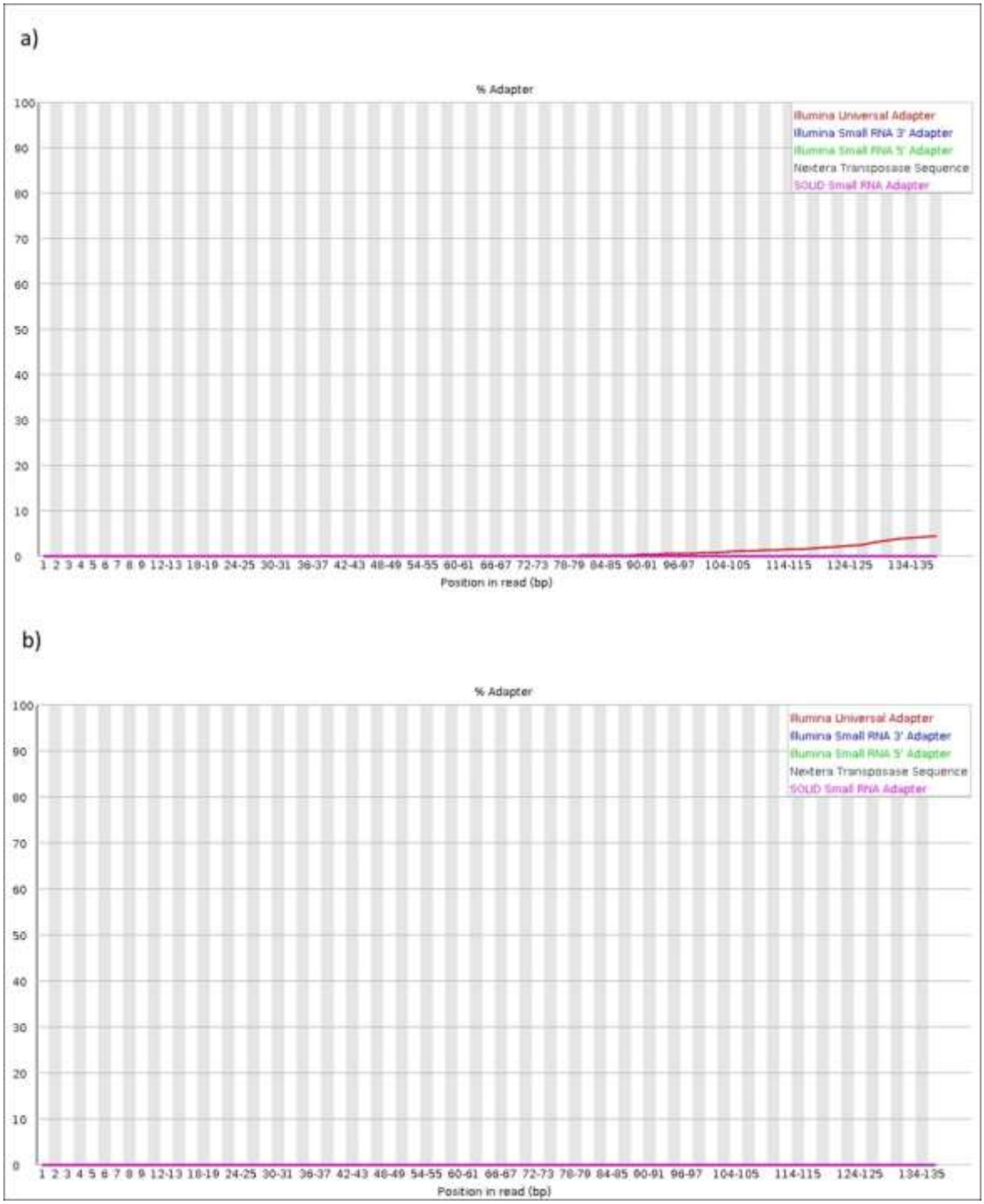
Şekil 4.4. O1G2 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



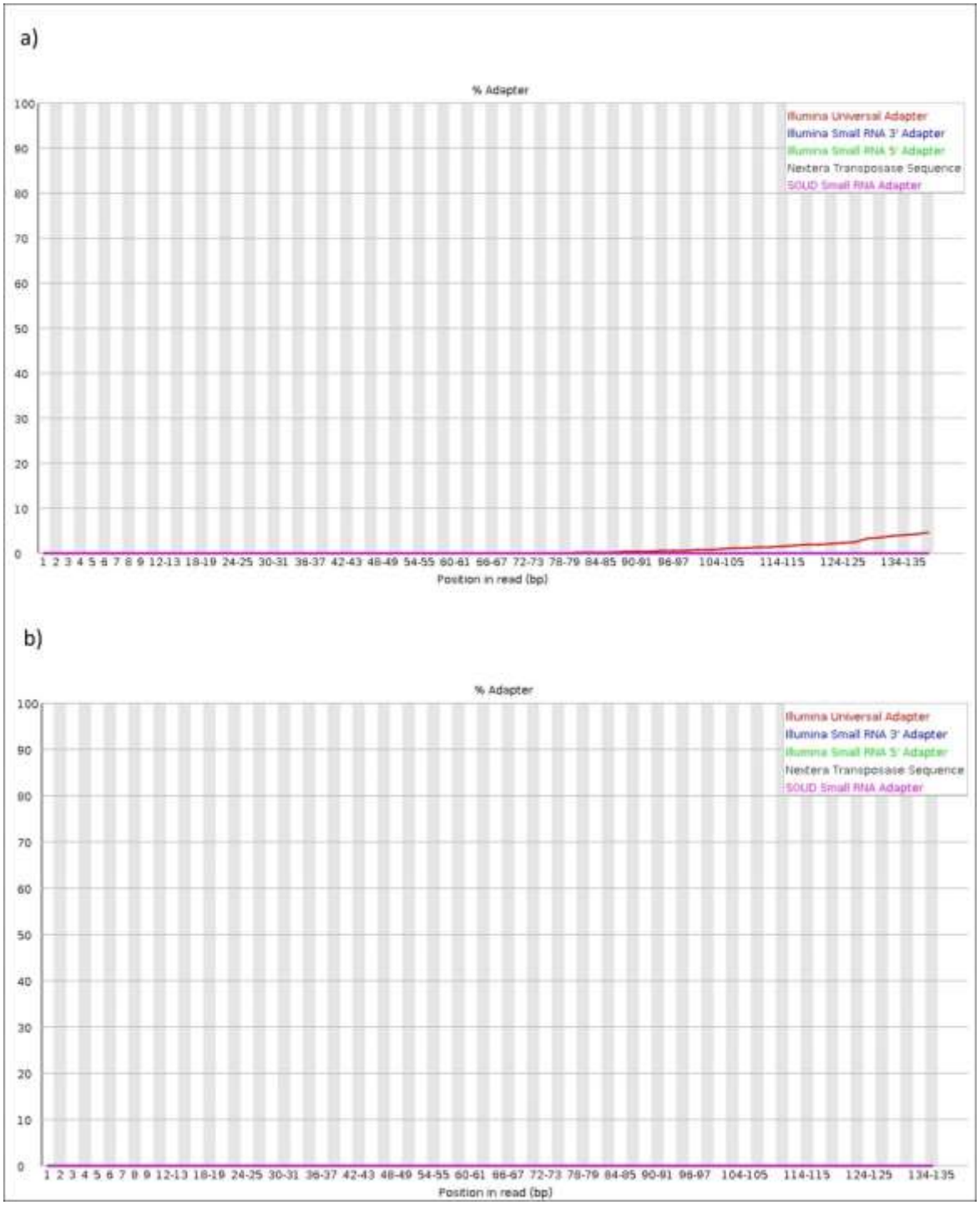
Şekil 4.5. O1G3 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.6. O1G3 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



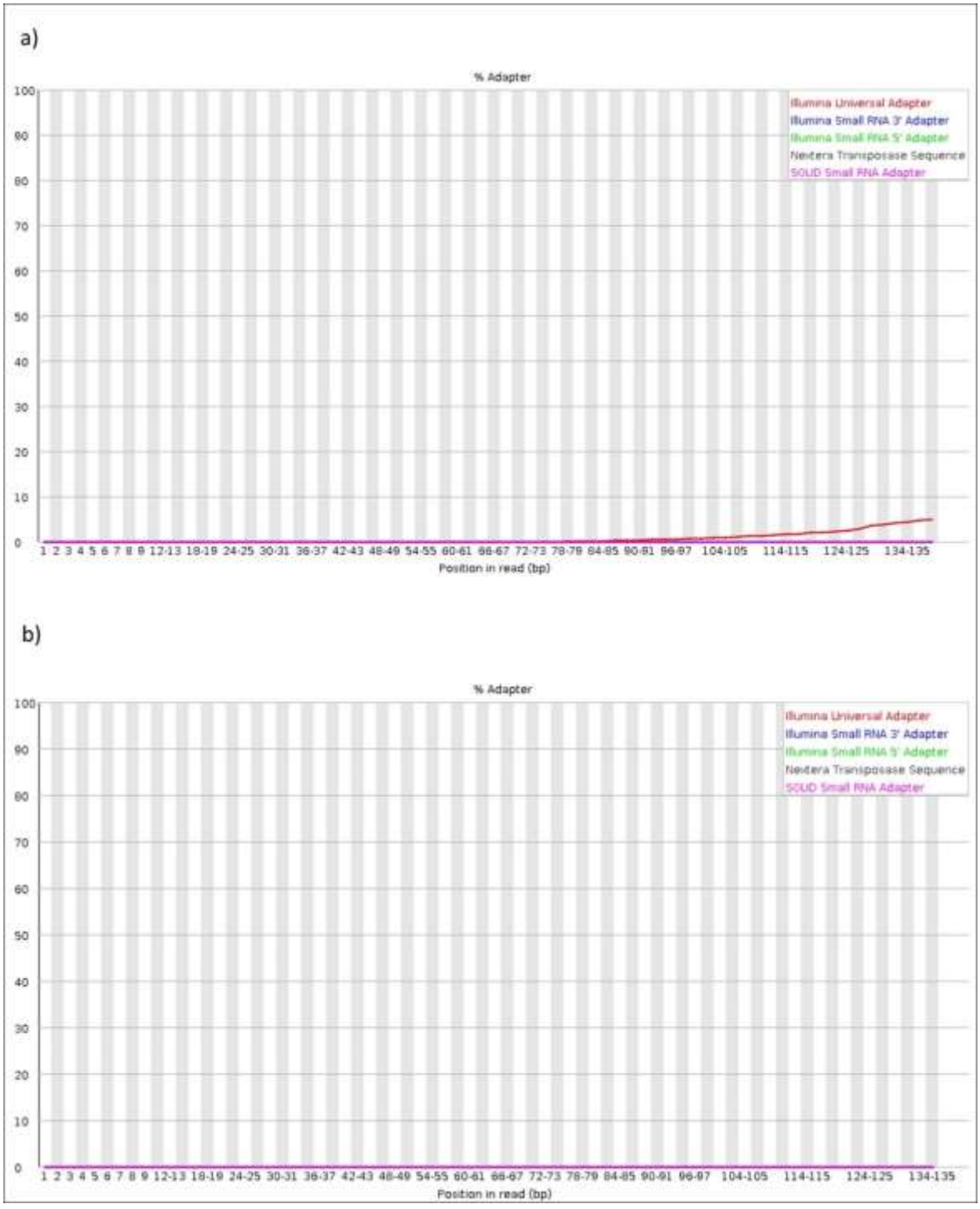
Şekil 4.7. O1K1 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



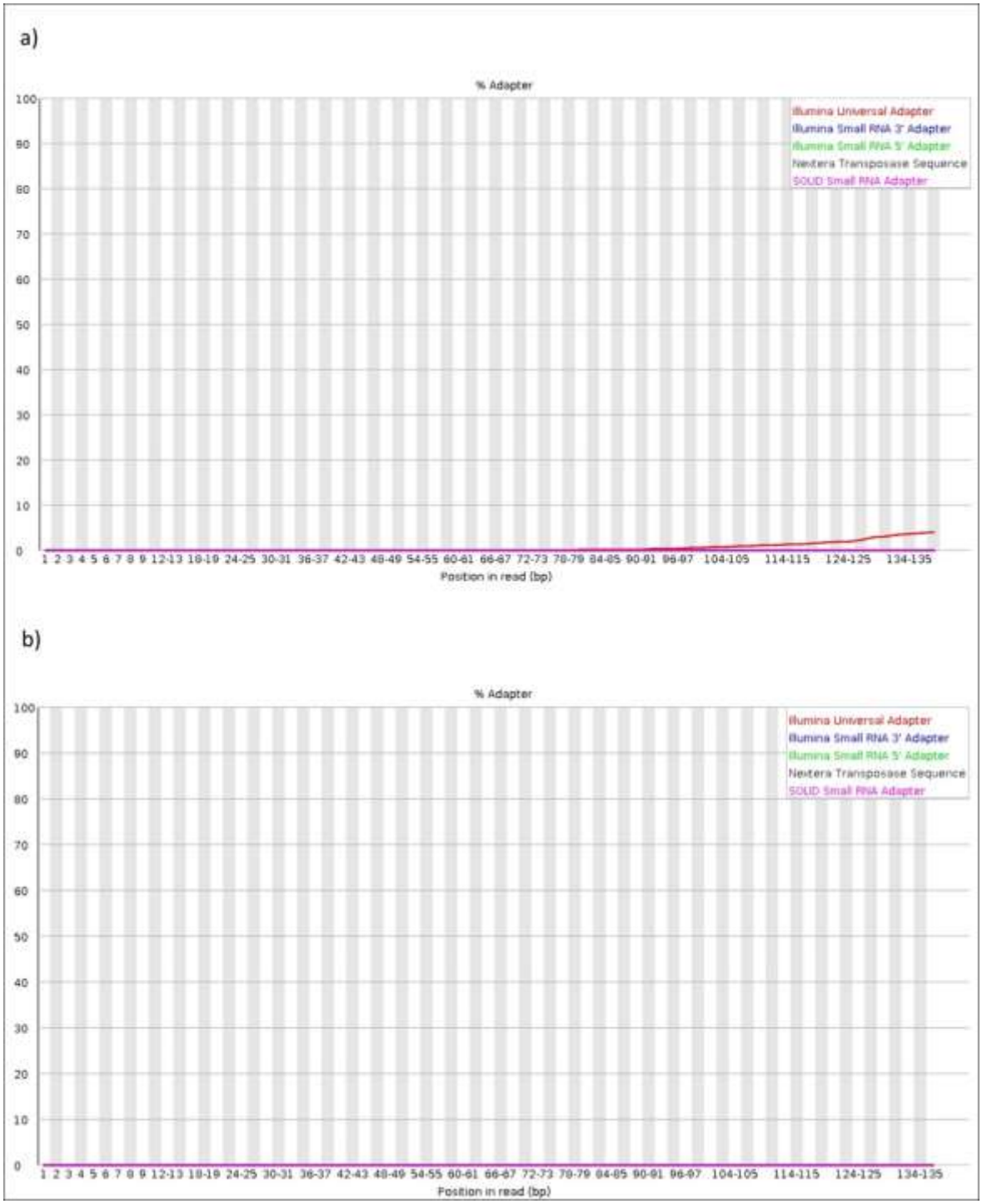
Şekil 4.8. O1K1 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



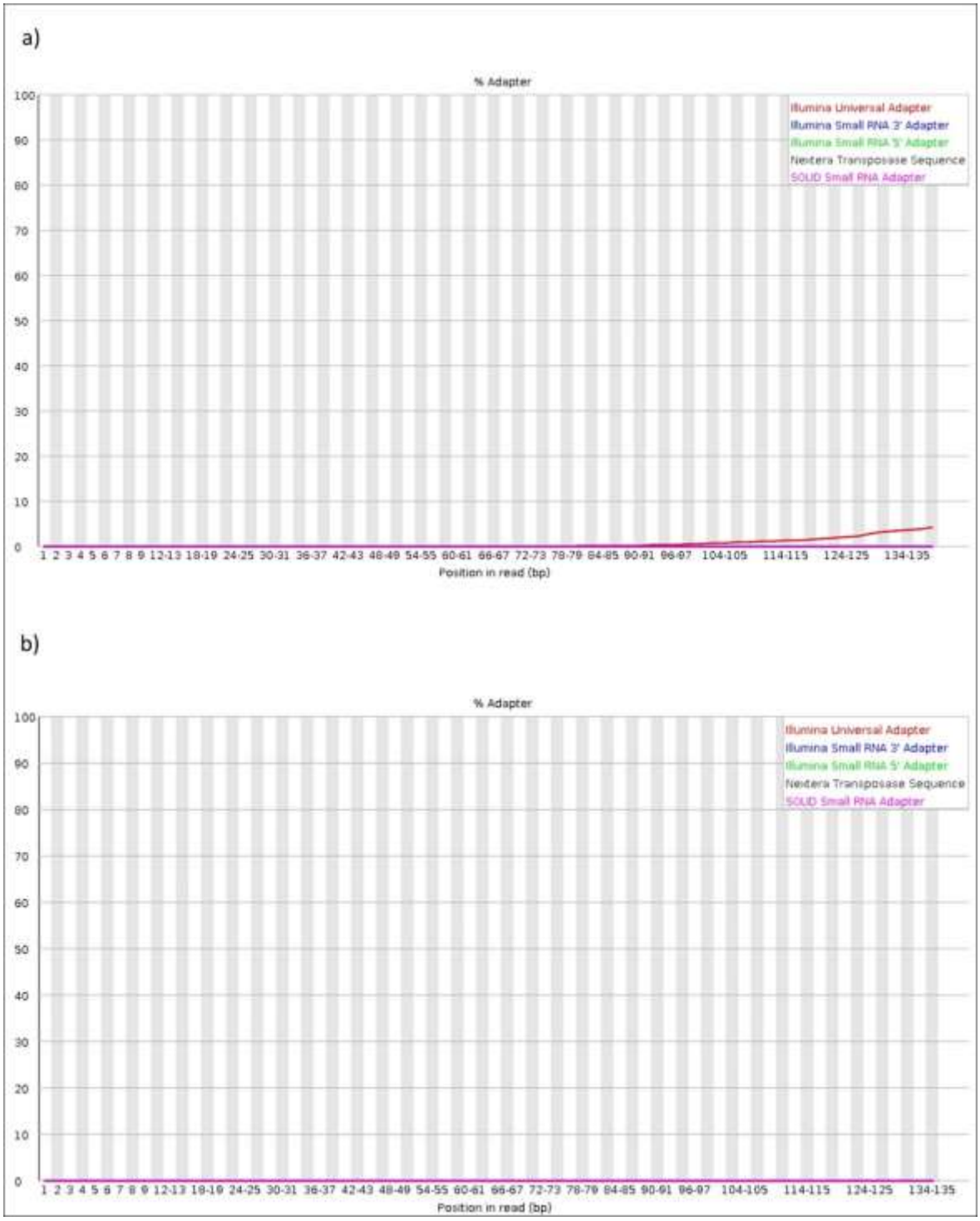
Şekil 4.9. O1K2 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



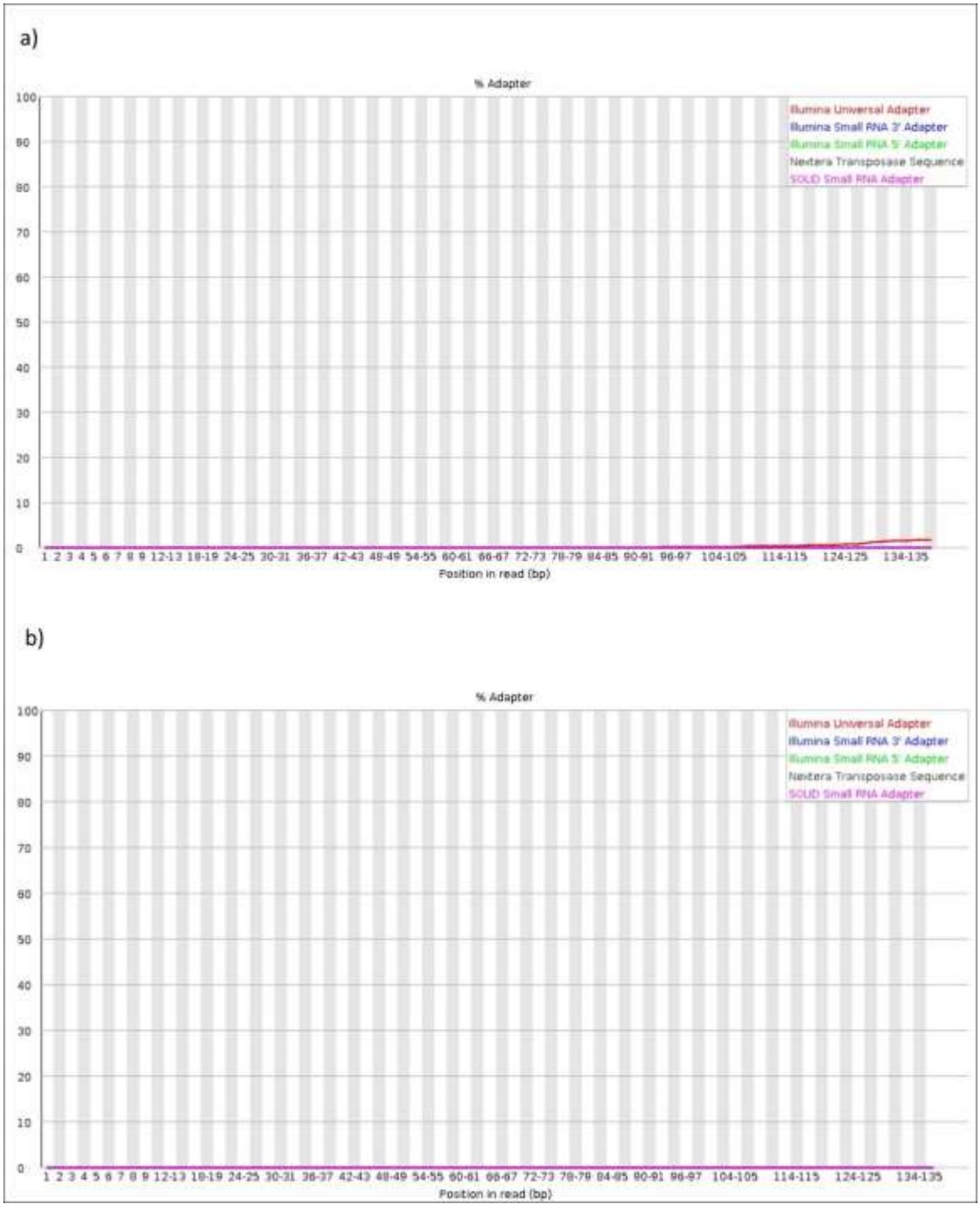
Şekil 4.10. O1K2 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. İplik temizleme sonrası FastQC raporu



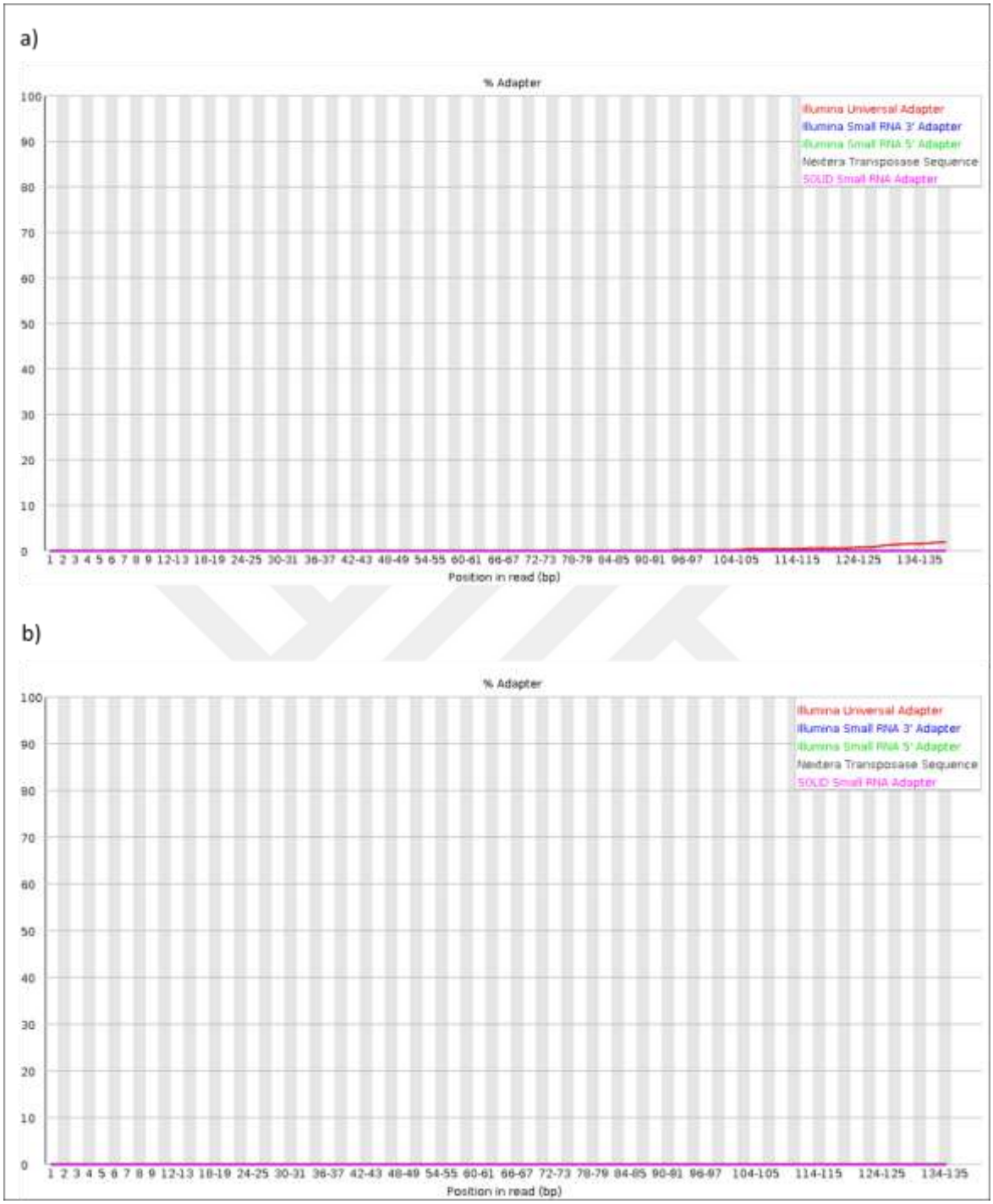
Şekil 4.11. O1K3 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.12. O1K3 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. İplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.13. O96G1 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. İplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.14. O96G1 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. İplik temizleme sonrası FastQC raporu



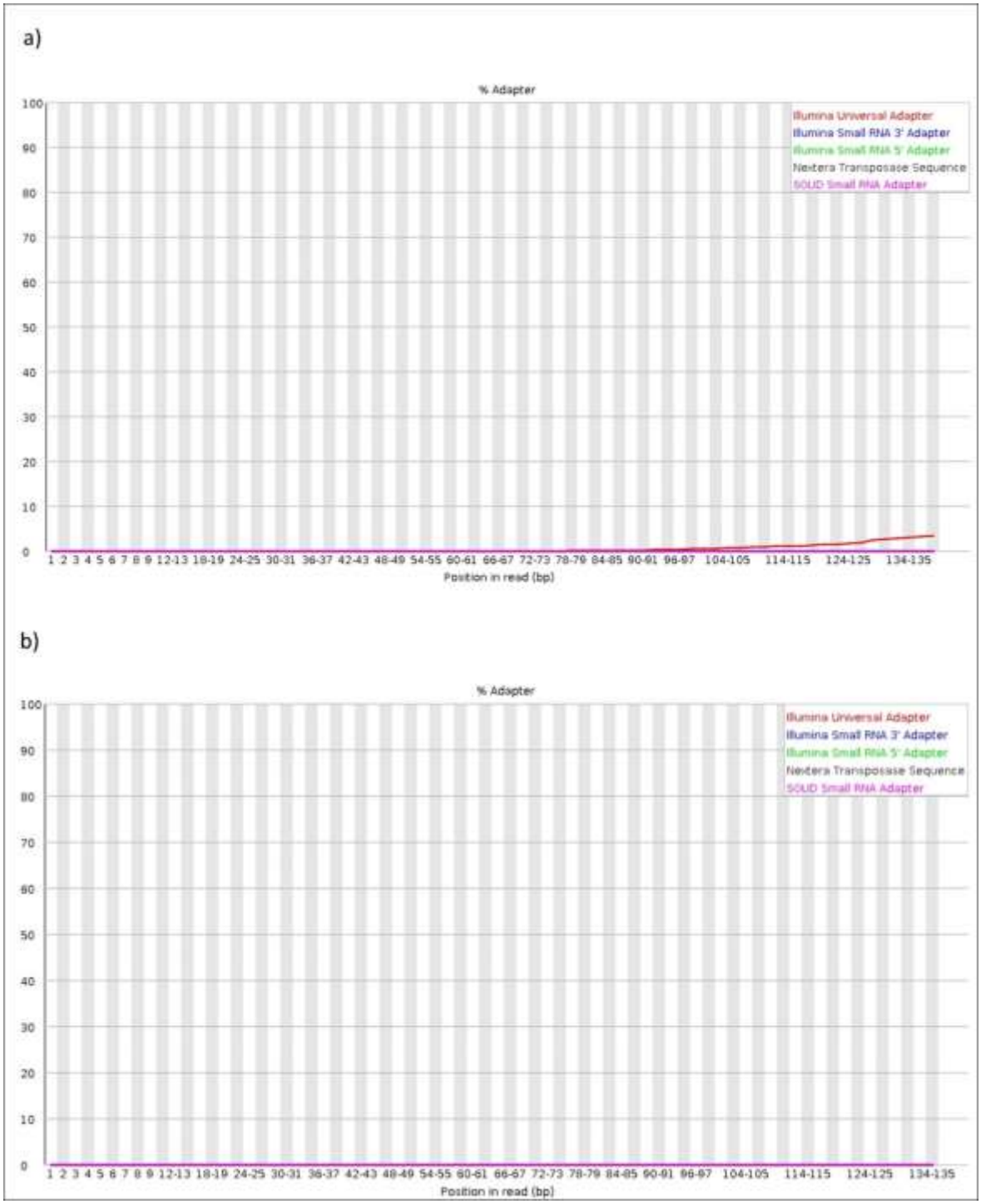
Şekil 4.15. O96G2 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.16. O96G2 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



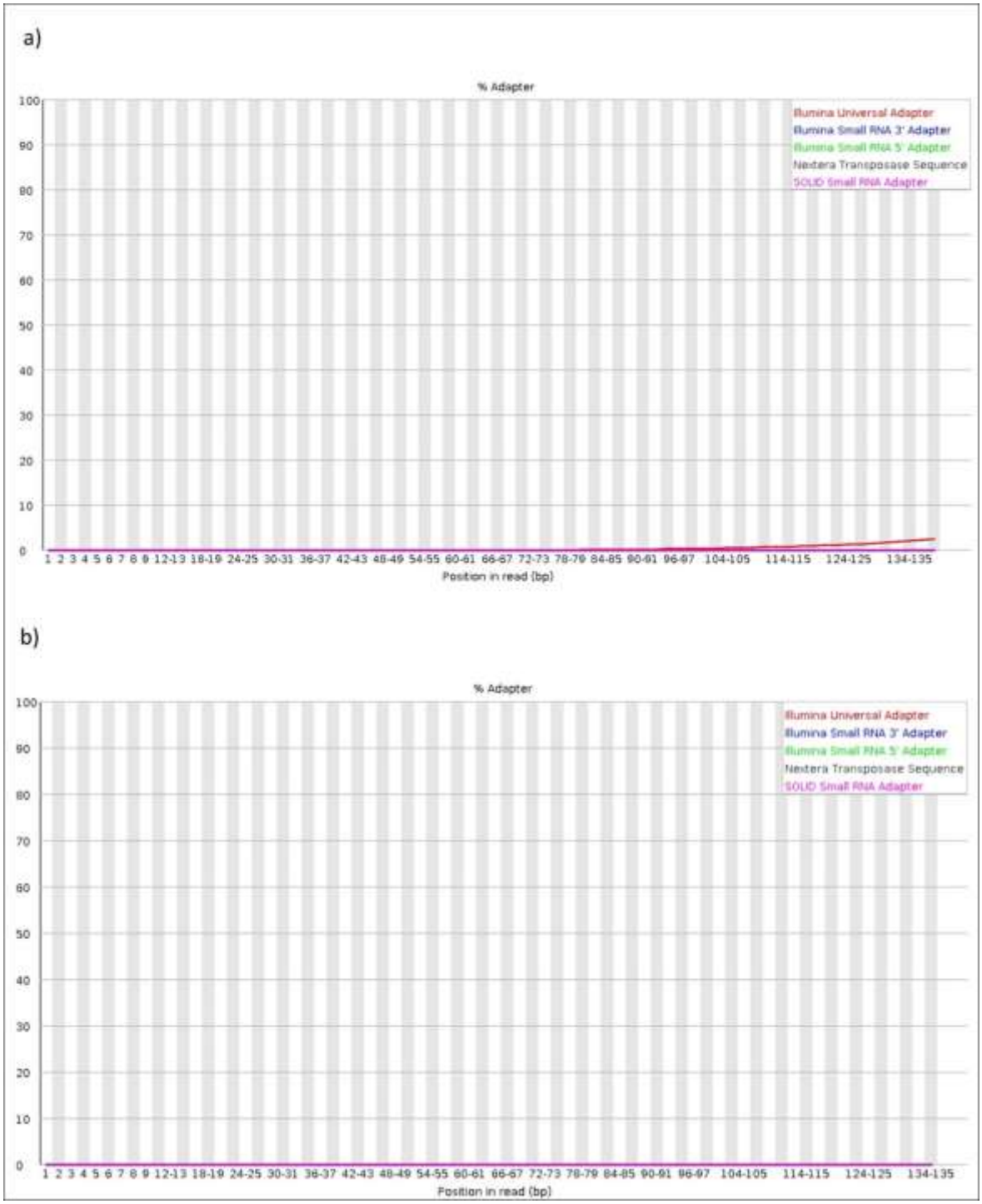
Şekil 4.17. O96G3 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.18. O96G3 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



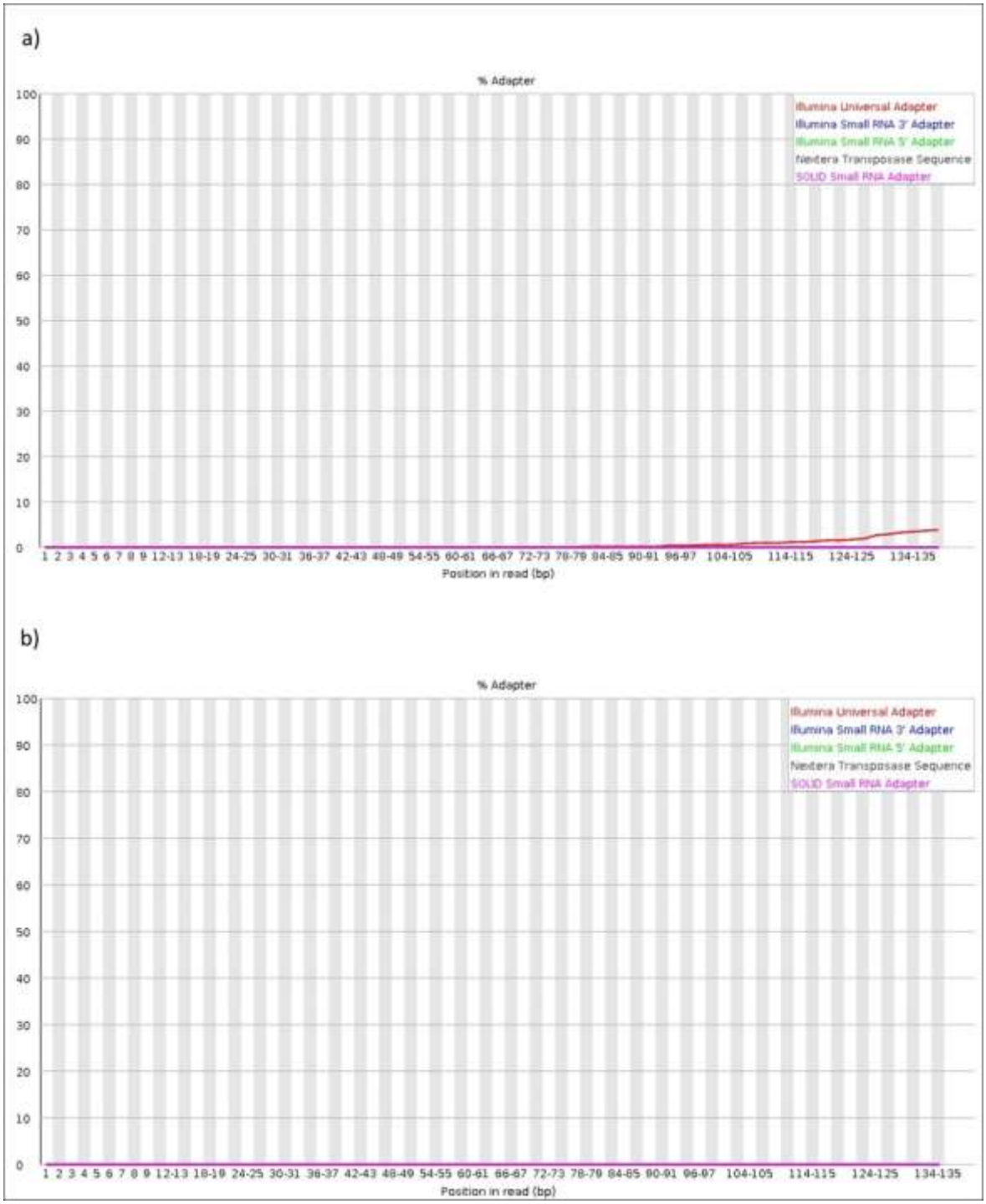
Şekil 4.19. O96K1 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



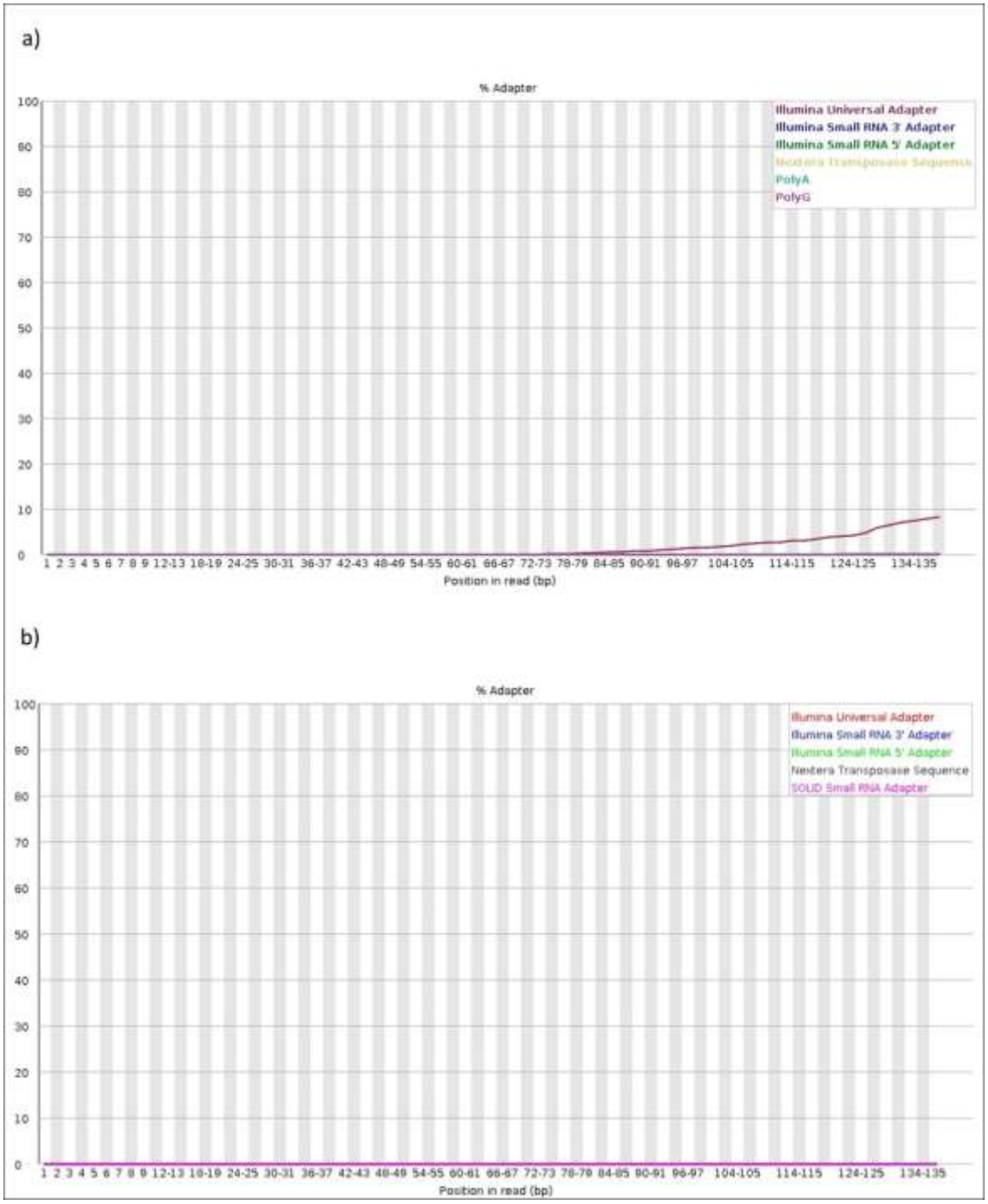
Şekil 4.20. O96K1 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



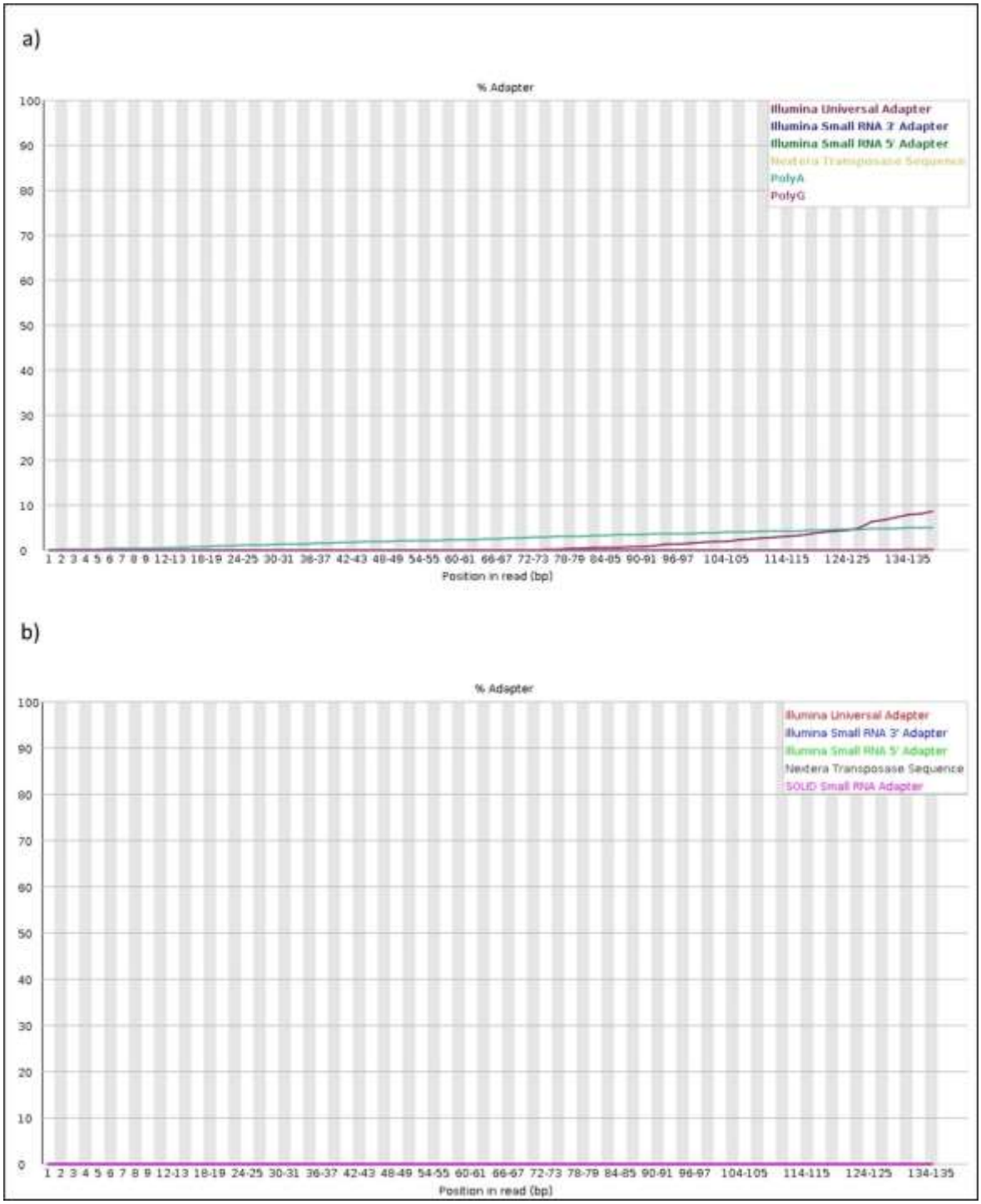
Şekil 4.21. O96K2 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.22. O96K2 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



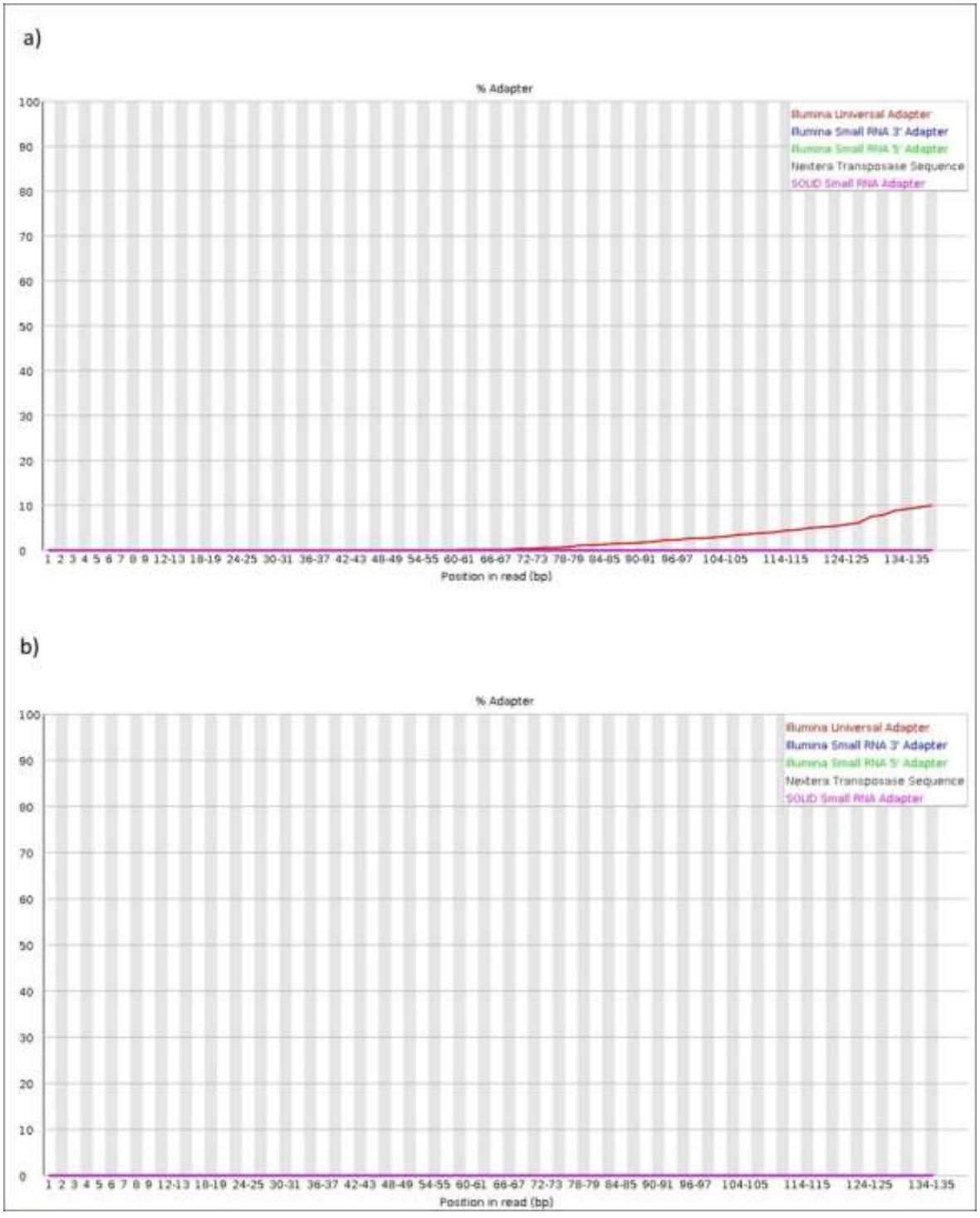
Şekil 4.23. O96K3 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.24. O96K3 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. İplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.25. ONPG1 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.26. ONPG1 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.27. ONPG2 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.28. ONPG2 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



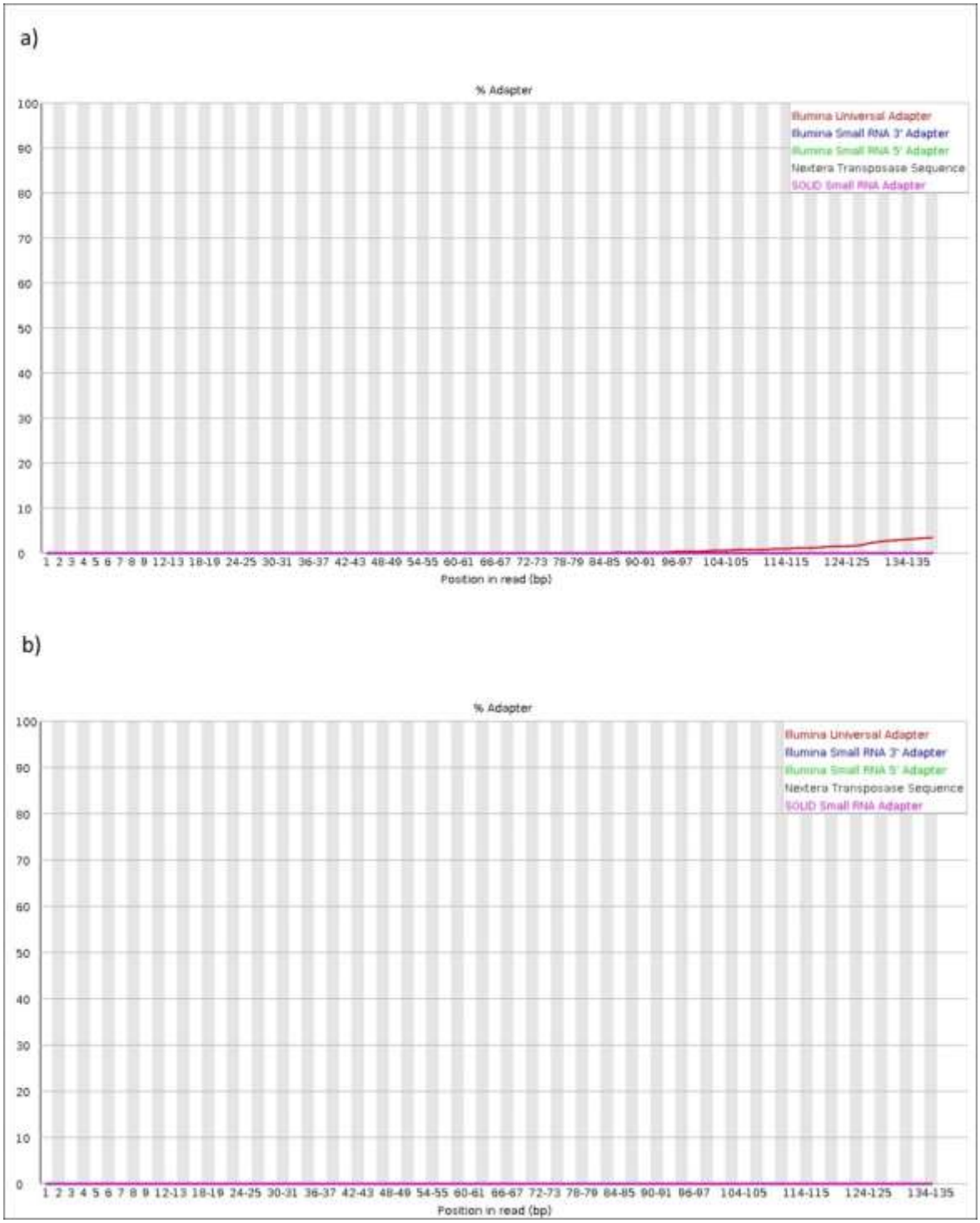
Şekil 4.29. ONPG3 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.30. ONPG3 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.31. ONPK1 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.32. ONPK1 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.33. ONPK2 örneği için a) 1. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 1. iplik temizleme sonrası FastQC raporu



Şekil 4.34. ONPK2 örneği için a) 2. iplik temizleme öncesi FastQC raporu b) 2. iplik temizleme sonrası FastQC raporu

4.4. Hizalama

Temizlenmiş okumaların referans genoma hizalanması için epigenetik çalışmalarda en çok kullanılan dört farklı program öncelikle tek örneğe (O1K1) ait diziler ile denenerek hizalama yüzde verimlilikleri ölçülmüştür (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. O1K1 örneğinde hizalama adımı için denenen programların yüzde verimlilikleri

Programlar	Hizalama verimliliği
Bismark	% 62,3
Bsmapz	% 88,7
BSseeker2	% 64,1
Bwa-Meth	% 99,1

Yüksek verimlilik verdiği tespit edilen Bwa-Meth ve Bsmapz programları ile analizler GCF_003573695.1_ASM357369v1 kodu ile veri bankasında mevcut olan referans genoma tüm örnekler hizalanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Bwa-Meth ve Bsmapz programları ile elde edilen hizalama yüzde verimlilik değerleri

Örnekler	Bwa-Meth	Bsmapz
O1G1	%98,0	%73,6
O1G2	%92,2	%44,6
O1G3	%91,2	%42,9
O1K1	%99,1	%88,7
O1K2	%98,6	%86,5
O1K3	%99,1	%88,3
O96G1	%98,9	%87,9
O96G2	%99,1	%86,8
O96G3	%92,9	%71,4
O96K1	%98,0	%84,0
O96K2	%98,9	%88,1
O96K3	%99,2	%87,9
ONPG1	%98,4	%81,2
ONPG2	%96,8	%70,0
ONPG3	%98,2	%80,0
ONPK1	%99,5	%91,3
ONPK2	%99,3	%89,2

Tüm örneklerde en yüksek haritalama oranı Bwa-Meth programından elde edildiği için ileri düzey veri işleme adımları Bwa-Meth verileri kullanılarak yapılmıştır.

4.5. Örneklerin Genom Metilasyon Düzeyi

Ham verilerin toplam haşhaş genomunun ne kadarını oluşturduğuna dair bilgi Çizelge 4.8' de gösterilmiştir. Ham verilerin genomdaki kapsam yüzdesi; metillenmiş baz sayısı / (metillenmiş baz sayısı+ metillenmemiş baz sayısı) * 100 formülü ile hesaplanmıştır [157].

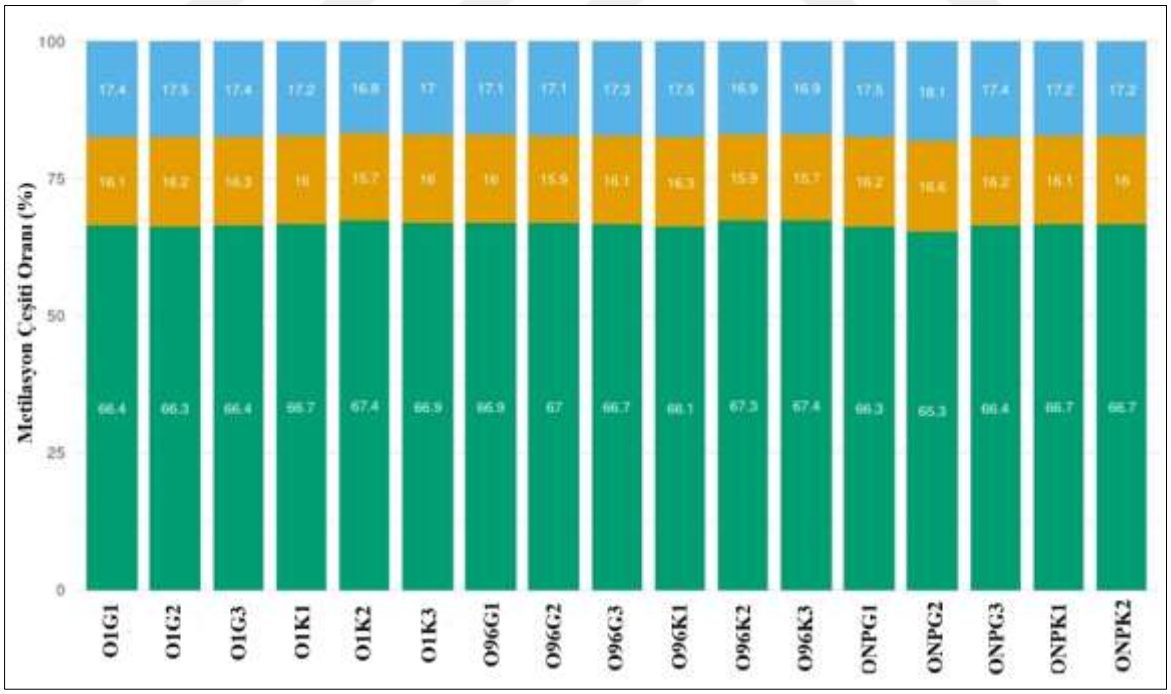
Bitkilerde genomun tamamı metillenmemektedir. Önceki çalışmalarda, *Arabidopsis thaliana* genomundaki metillenmiş sitozin (mC) yüzdesinin yaklaşık %5,8 olduğu, *Oryza sativa* örneklerinde %10-14 ve *Oryza glumaepatula* örneklerinde ise %8-15 arasında değiştiği bildirilmiştir [158, 159]. Bu çalışmada elde edilen genom metilasyon oranları tüm örneklerde %10-16 aralığında bulunmuş olup literatürde bildirilen değerlerle uyumlu olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.8. Ham verilerin haşhaş genomundaki yüzdeleri

Örnekler	Metillenmemiş baz sayısı	Metillenmiş baz sayısı	Toplam baz sayısı	Yüzde (%) genom kapsamı
O1G1	2 385 420 000	330 111 742	2 715 531 742	12
O1G2	2 398 170 000	317 360 323	2 715 530 323	12
O1G3	2 327 230 000	388 300 801	2 715 530 801	14
O96G1	2 300 950 000	414 577 930	2 715 527 930	15
O96G2	2 414 440 000	301 095 140	2 715 535 140	11
O96G3	2 364 810 000	350 717 017	2 715 527 017	13
ONPG1	2 428 910 000	286 618 795	2 715 528 795	11
ONPG2	2 425 480 000	290 045 480	2 715 525 480	11
ONPG3	2 413 400 000	302 130 971	2 715 530 971	11
O1K1	2 413 980 000	301 552 781	2 715 532 781	11
O1K2	2 327 230 000	361 867 577	2 689 097 577	13
O1K3	2 415 120 000	300 410 840	2 715 530 840	11
O96K1	2 379 100 000	336 432 289	2 715 532 289	12
O96K2	2 275 460 000	440 074 479	2 715 534 479	16
O96K3	2 298 780 000	416 750 474	2 715 530 474	15
ONPK1	2 444 510 000	271 020 926	2 715 530 926	10
ONPK2	2 420 650 000	294 878 003	2 715 528 003	11

4.6. Toplam Metilasyon Bölgeleri İçerisindeki CpHpH, CpHpG ve CpG Metilasyon Desenlerinin Oranları

5-metilsitozin (5-mC) işaretleri CpHpH, CpHpG ve CpG için de gözlenmiştir. Tüm örneklerde CpHpG ve CpHpH desenlerinin ortalama metilasyon düzeyleri sırasıyla %16 ve %67 olarak belirlenirken, CpG bölgesindeki metilasyon seviyesi %17 olarak saptanmıştır (Şekil 4.35). Bir bitkide CpHpH metilasyonunun yüksek düzeyde gözlenmesi, tekrarlayan dizilerin ve transpozon elementlerinin susturulmasına yönelik RNA yönlendirmeli DNA metilasyonu (RdDM) yolaklarının aktif olduğunu, genom stabilitesinin korunduğunu ve bitkinin çevresel veya gelişimsel sinyallere karşı epigenetik esnekliğe sahip olduğunu göstermektedir [160]. Bu nedenle CpHpH metilasyonu, bitkilerde gen ifadesinin ince ayarlı düzenlenmesinde kritik rol oynar. Bu çalışmada gözlemlenen CpHpH metilasyonundaki artışın farklı bir bitki türünde yürütülmüş daha önceki bir araştırmanın bulguları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bu durumun, farklı taksonlar arasında korunmuş olabilecek epigenetik yanıt mekanizmasına işaret ettiği gösterilmiştir [161].



Şekil 4.35. Toplam metilasyon bölgeleri içinde CpHpH, CpHpG ve CpG metilasyon desenlerinin oranı (Mavi: CpG, Turuncu: CpHpG, Yeşil: CpHpH)

4.7. Metilasyon Çağrısı Analiz Sonuçları

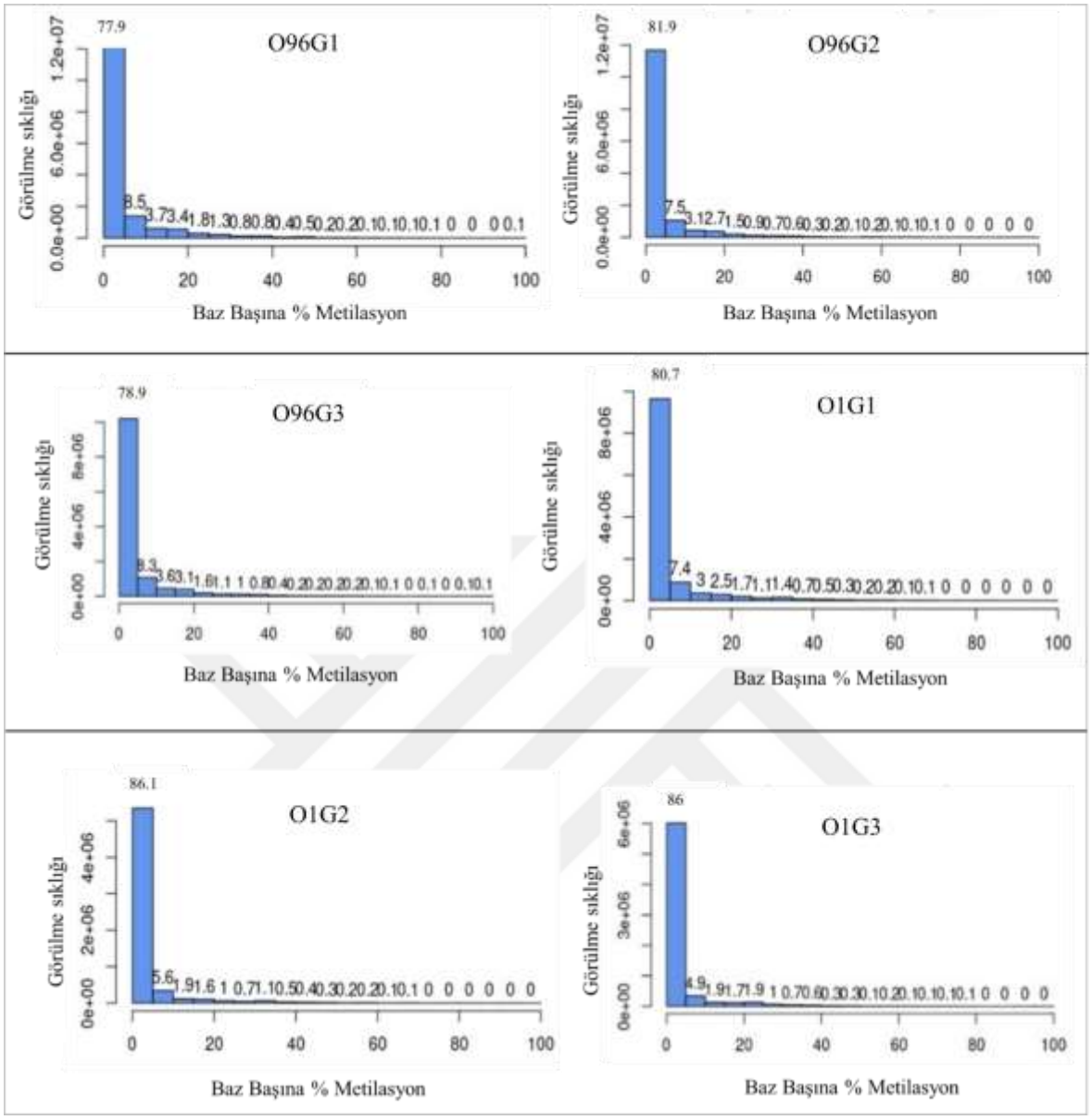
Tüm örneklerin hizalaması, yüksek verimlilik sağlayan Bwa-Meth programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler üzerinden MethylKit aracılığıyla ileri analizler gerçekleştirilmiş, metilasyon çağrısı yapılmış ve ilgili metilasyon verileri elde edilmiştir.

4.7.1. Tüm örneklerin epigenom patternlerine ait yüzde (%) metilasyon histogram sonuçları

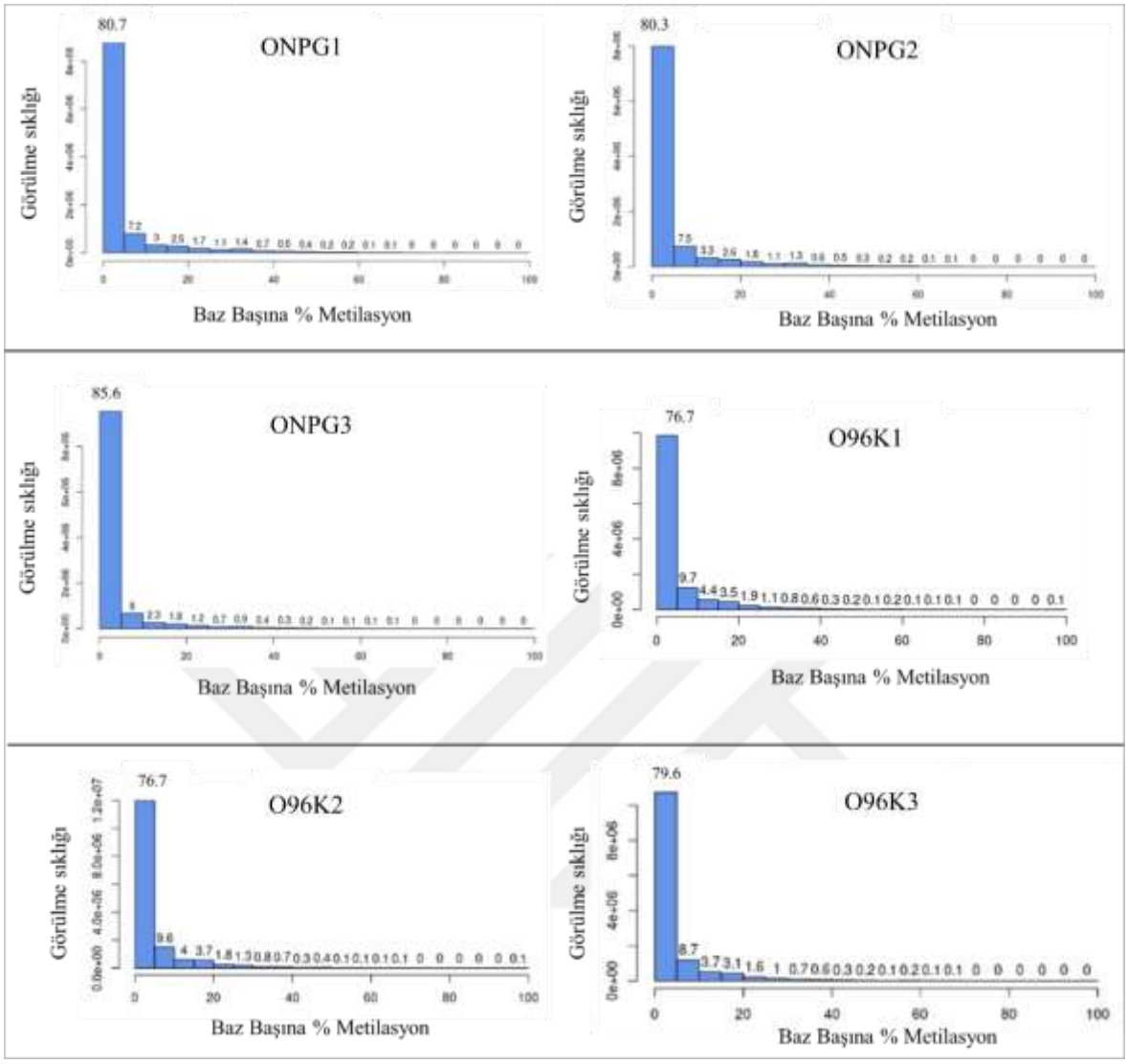
Tüm örneklerin epigenom patternlerine ait üç metilasyon çeşidinin (CpHpH, CpHpG ve CpG) metilasyon oranlarının dağılımını gösteren yüzde (%) metilasyon histogramları oluşturulmuştur. Bu analizden elde edilen grafikler, belirli bir DNA bölgesindeki metilasyonun hangi metilasyon seviyelerinde yoğunlaştığını yansıtmıştır.

CpHpH metilasyonu için yüzde (%) metilasyon histogram grafikleri

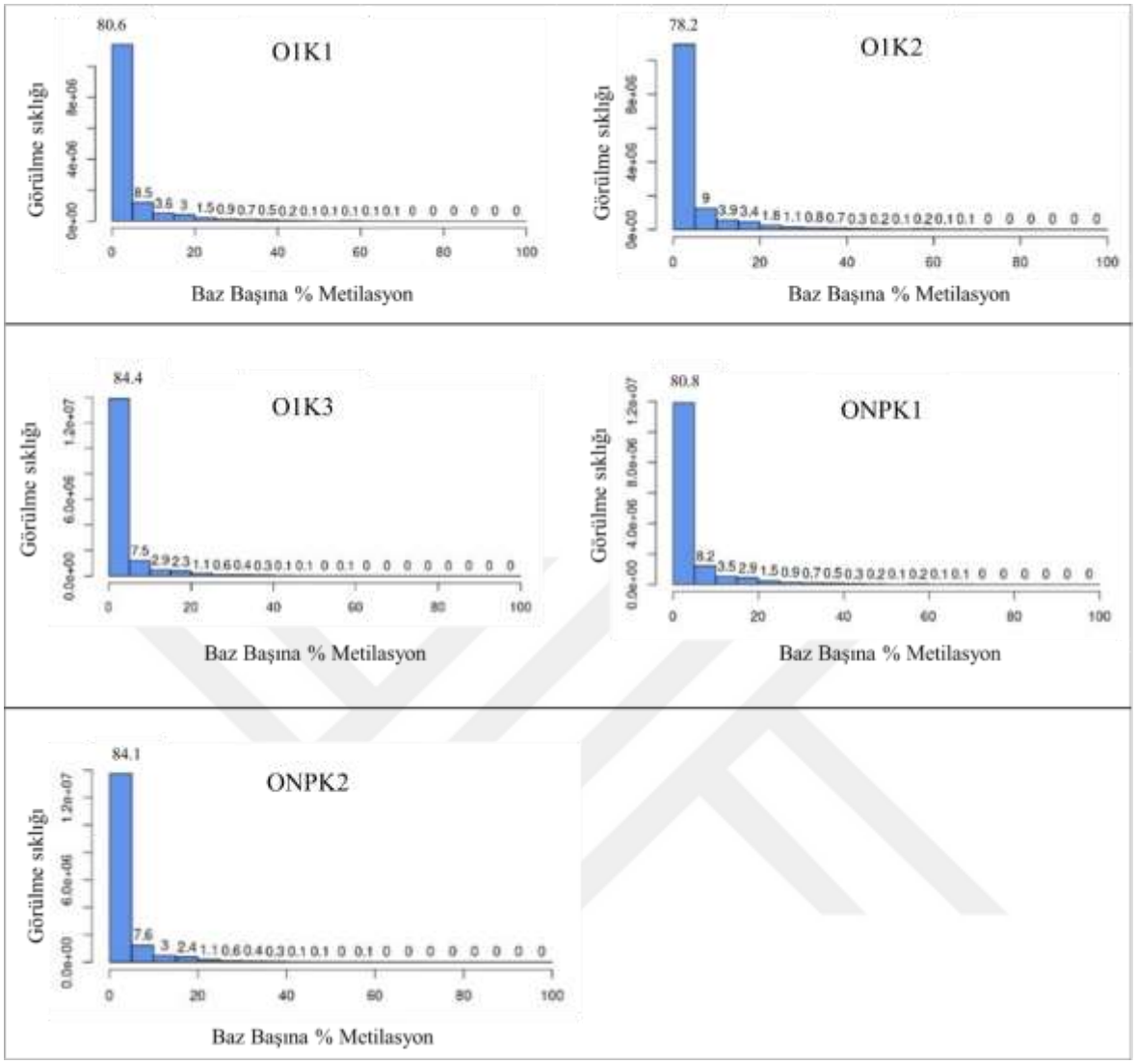
Tüm örneklerdeki CpHpH metilasyonu değerlendirildiğinde CpHpH'lerin tamamının yaklaşık %75–90'ının <%5 metilasyona sahip olduğu, yok denecek kadar az bir miktarının ise >%95 metilasyona sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum, ilgili DNA bölgelerinin büyük bir kısmının düşük metilasyon düzeylerine sahip olduğunu göstermiştir. Örnekler arasında metilasyon dağılımları açısından ise anlamlı bir sapma gözlenmemiştir (Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38).



Şekil 4.36. O96G1/O96G2/O96G3/O1G1/O1G2/O1G3 örneklerine ait yüzde (%) CpHpH metilasyon histogram grafikleri



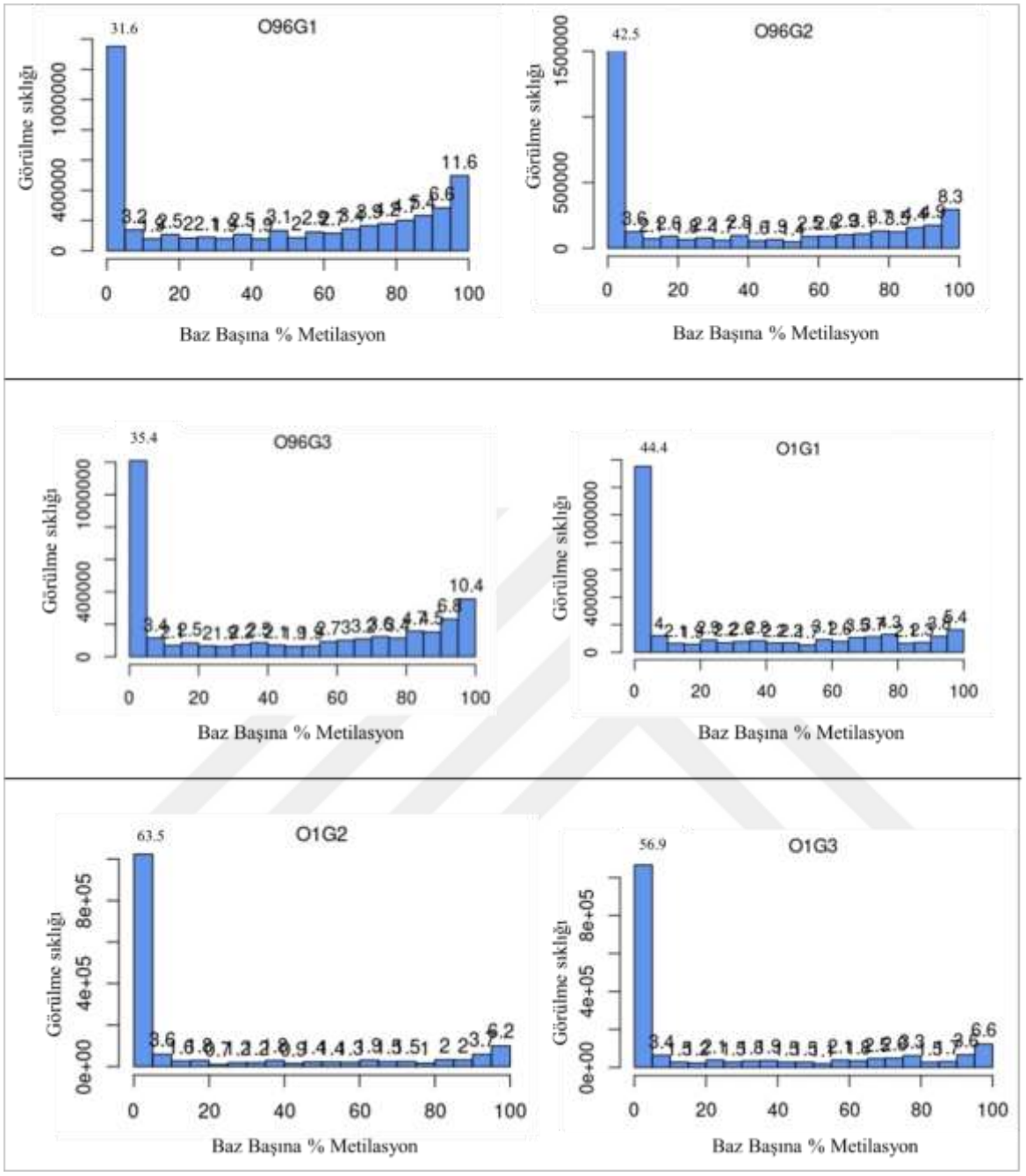
Şekil 4.37. ONPG1/ONPG2/ONPG3/O96K1/O96K2/O96K3 örneklerine ait yüzde(%) CpHpH metilasyon histogram grafikleri



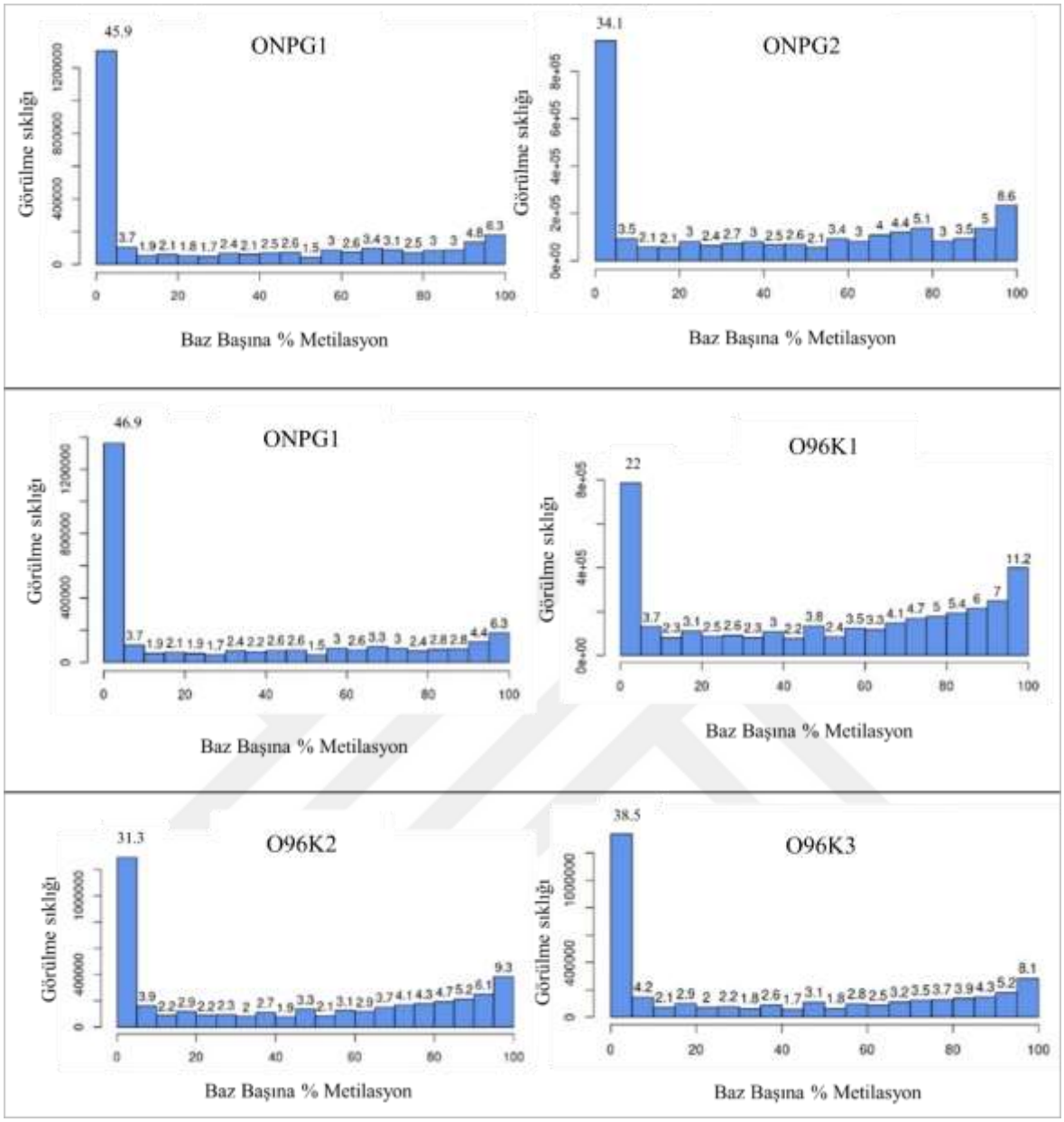
Şekil 4.38. O1K1/O1K2/O1K3/ONPK1/ONPK2 örneklerine ait yüzde (%) CpHpH metilasyon histogram grafikleri

CpHpG metilasyonu için yüzde (%) metilasyon histogram grafikleri

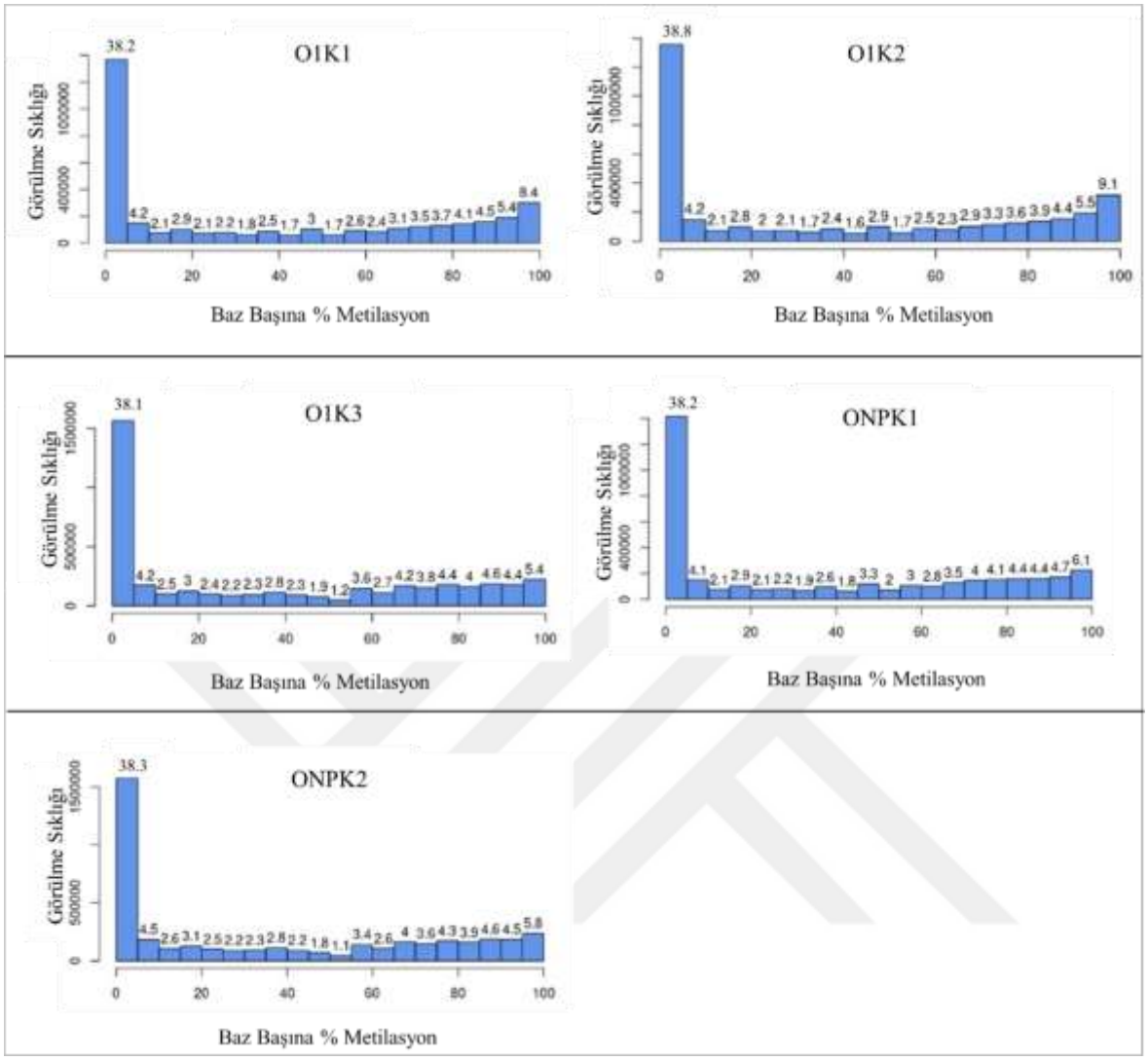
Tüm örneklerin CpHpG metilasyonu değerlendirildiğinde tüm CpHpG'lerin yaklaşık %20–65'inin <%5 metilasyona sahip olduğu, yaklaşık %5–12'sinin ise >%95 metilasyona sahip olduğu gözlenmiştir. Burada yüksek metilasyon oranlarındaki dağılımda nispi bir artış gözlemlenirken ilgili DNA bölgelerinin büyük bir kısmının düşük metilasyon düzeylerine sahip olduğu görülmüştür. Bu durum, hücresel süreçlerde daha özelleşmiş bir epigenetik düzenlemeye işaret etmiştir (Şekil 4.39, Şekil 4.40, Şekil 4.41).



Şekil 4.39. O96G1/O96G2/O96G3/O1G1/O1G2/O1G3 örneklerine ait yüzde (%) CpHpG metilasyon histogram grafikleri



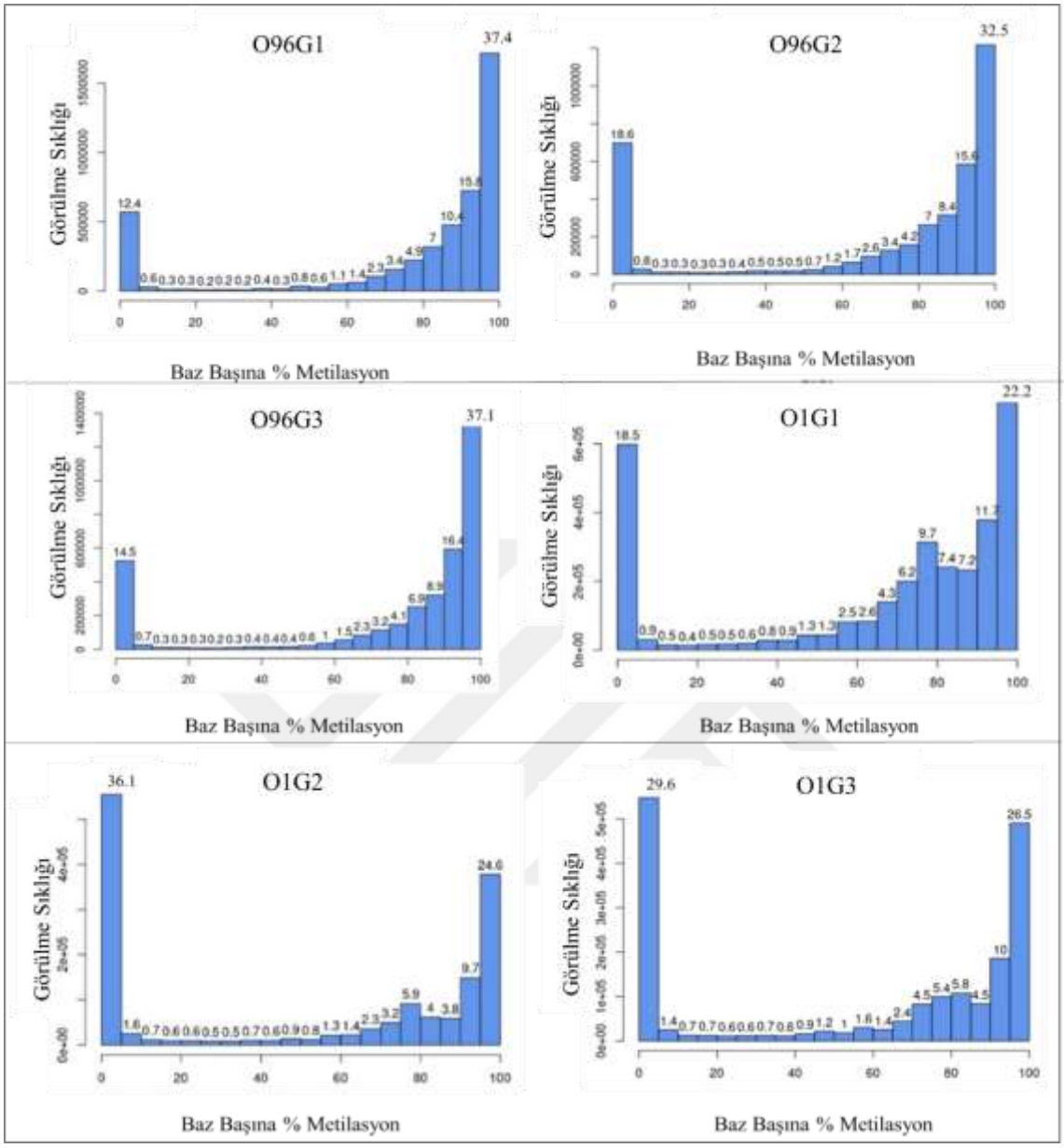
Şekil 4.40. ONPG1/ONPG2/ONPG3/O96K1/O96K2/O96K3 örneklerine ait yüzde (%) CpHpG metilasyon histogram grafikleri



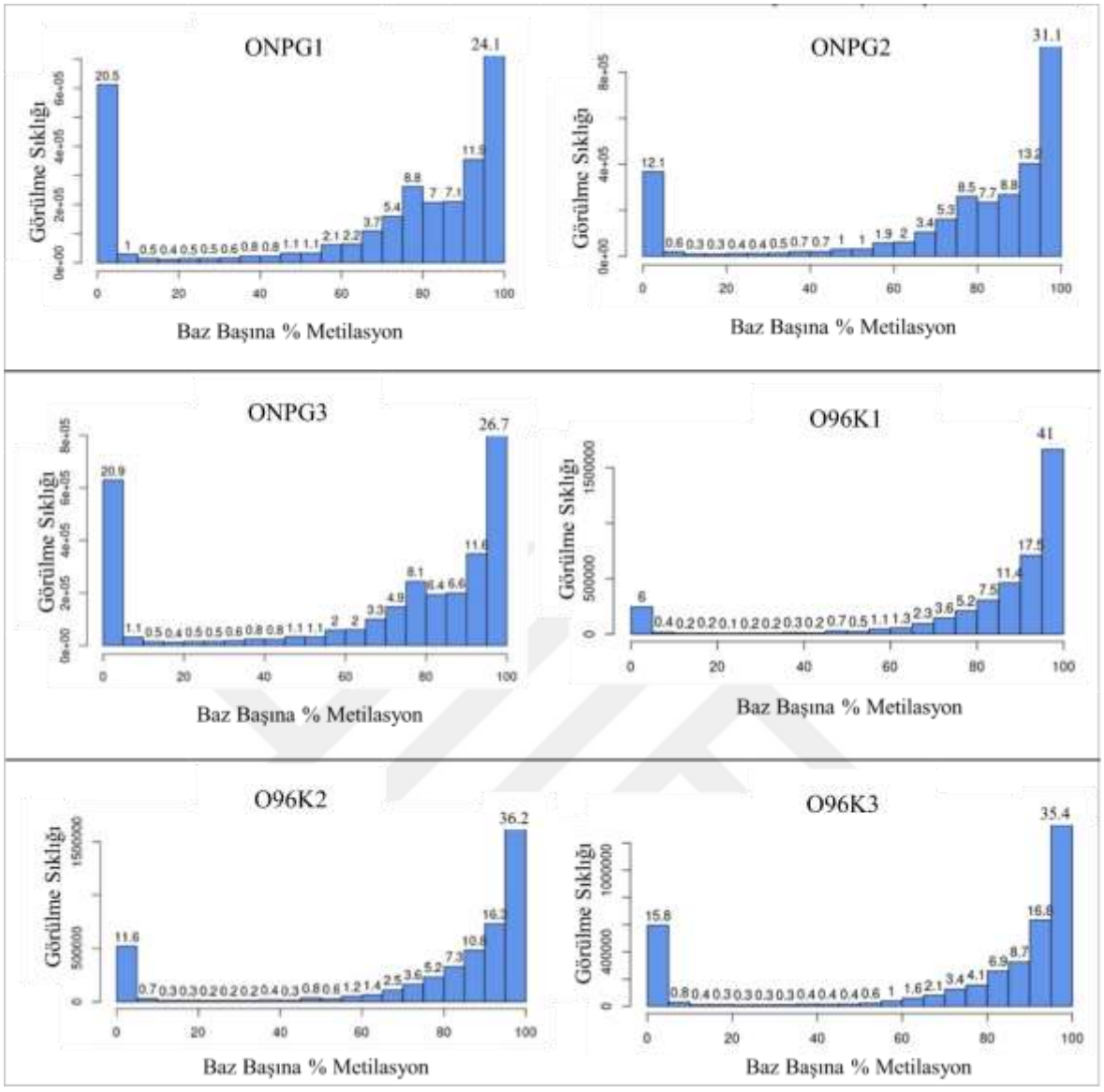
Şekil 4.41. O1K1/O1K2/O1K3/ONPK1/ONPK2 örneklerine ait yüzde (%) CpHpG metilasyon histogram grafikleri

CpG metilasyonu için yüzde (%) metilasyon histogram grafikleri

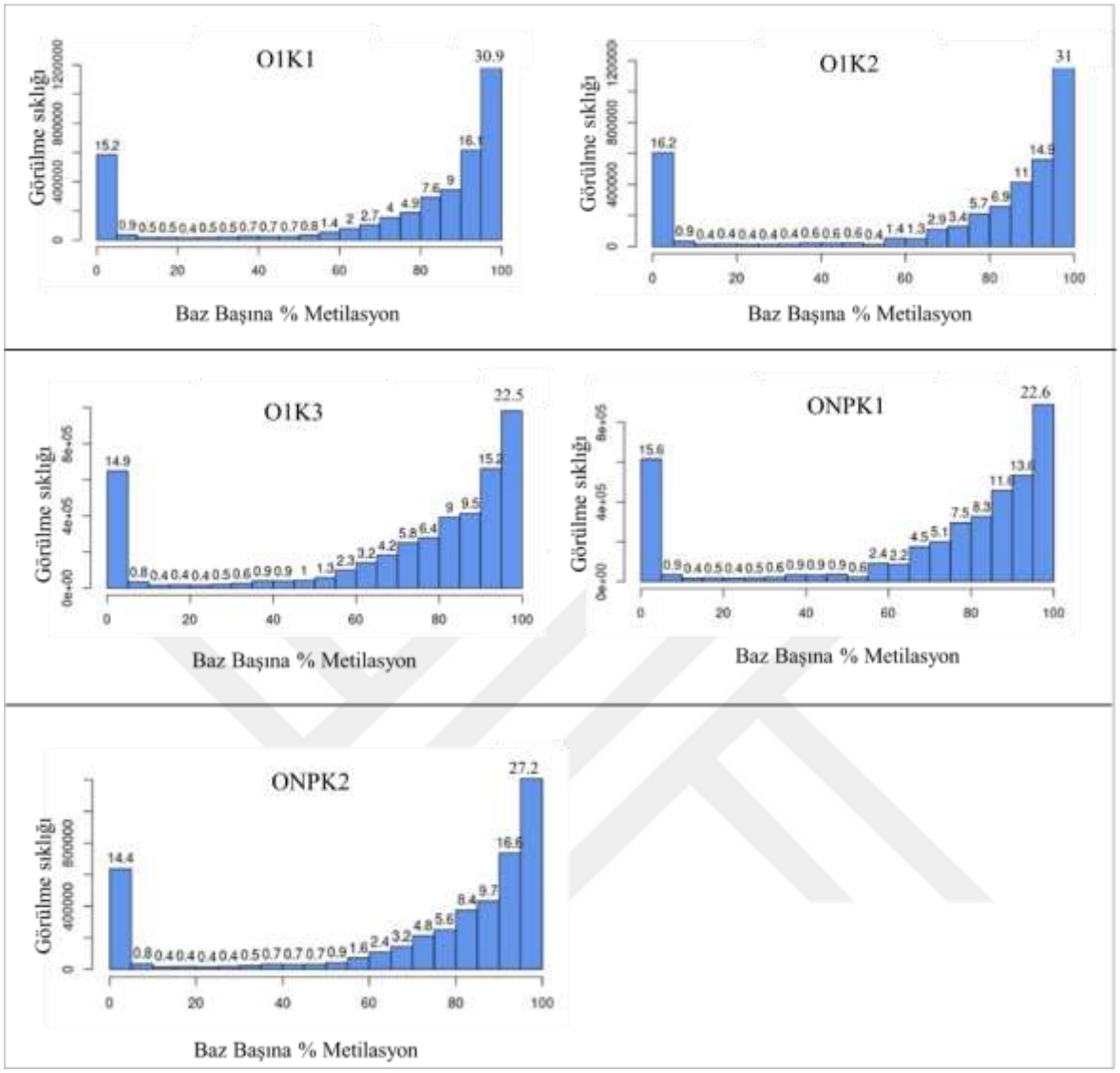
Tüm örneklerin CpG metilasyonu değerlendirildiğinde, dağılımın hem düşük hem de yüksek metilasyon oranlarında yoğunlaştığı ve iki belirgin zirve oluşturduğu görülmüştür. Tüm CpG' lerin yaklaşık %6–40'ının <%5 metilasyona sahip olduğu, yaklaşık %20–45'inin ise >%95 metilasyona sahip olduğu gözlenmiştir. Bu dağılım, diğer aralıklarda daha sınırlı olmakla birlikte özellikle yüksek metilasyon düzeylerinde yoğunlaşma eğilimi göstermiştir. Elde edilen bulgular, epigenetik düzenlemeye ilişkin farklılaşmanın belirgin şekilde ortaya çıktığını işaret etmiştir (Şekil 4.42, Şekil 4.43, Şekil 4.44).



Şekil 4.42. O96G1/O96G2/O96G3/O1G1/O1G2/O1G3 örneklerine ait yüzde (%) CpG metilasyon histogram grafikleri



Şekil 4.43. ONPG1/ONPG2/ONPG3/O96K1/O96K2/O96K3 örneklerine ait yüzde (%) CpG metilasyon histogram grafikleri



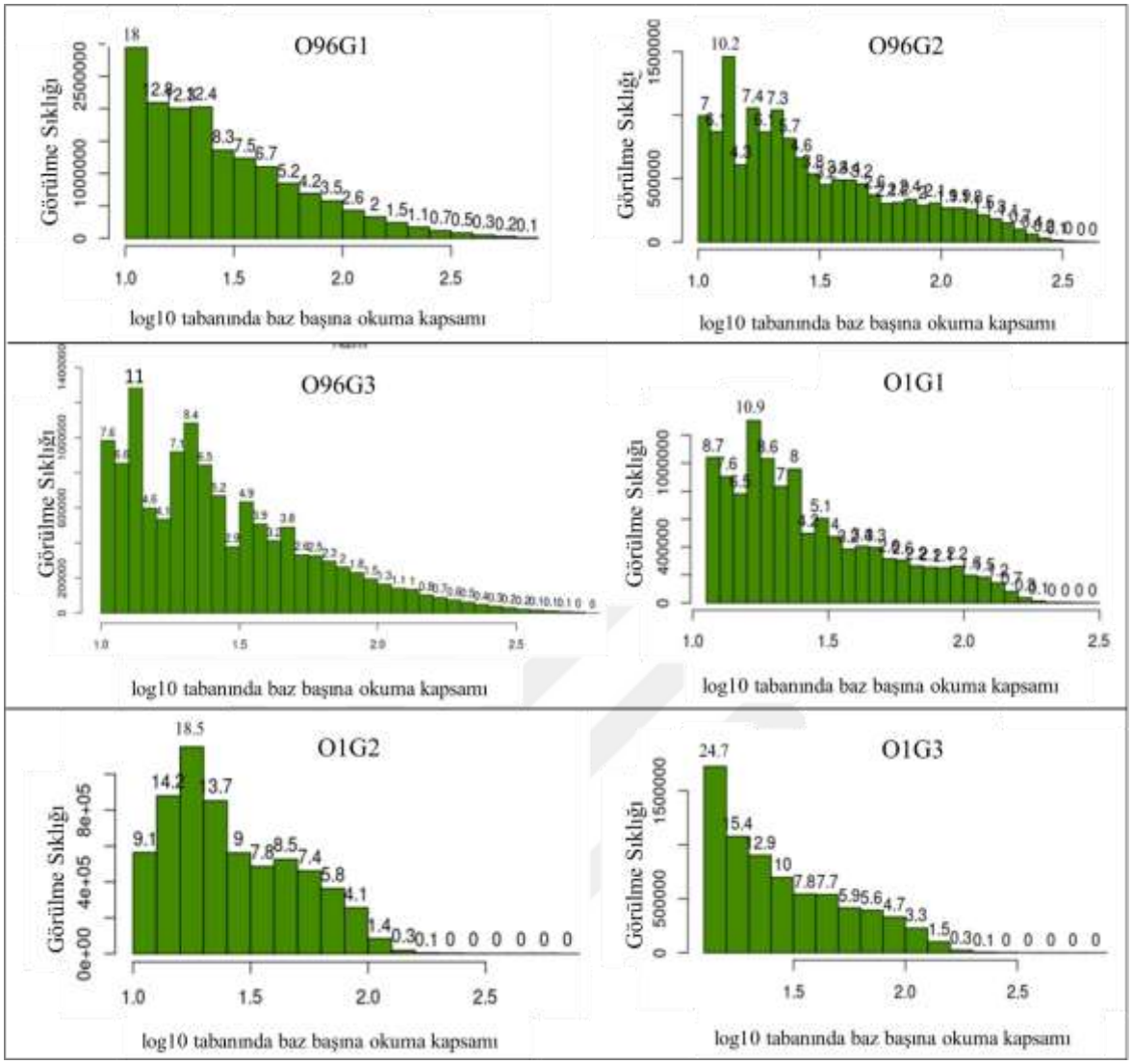
Şekil 4.44. O1K1/O1K2/O1K3/ONPK1/ONPK2 örneklerine ait yüzde (%) CpG metilasyon histogram grafikleri

4.7.2. Tüm örneklerin epigenom patternlerine ait okuma kapsam histogram sonuçları

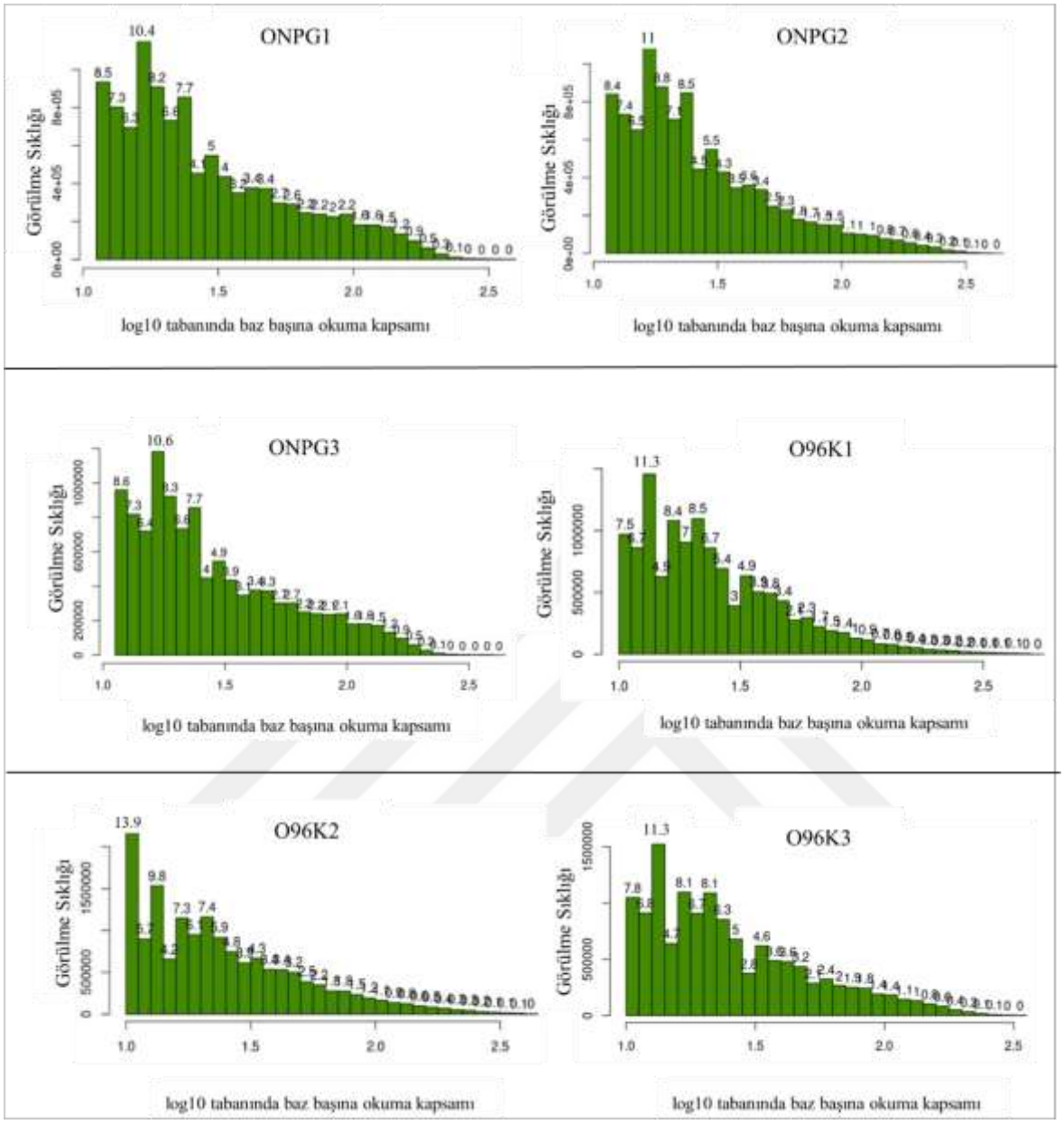
Okuma kapsam dağılımı, örneklerde PCR çoğaltma yanlılığının (klonal okumalar) varlığını değerlendirmede önemli bir ölçüttür. Bu tür bir yanlılık meydana geldiğinde bazı okumalar asimetrik olarak çoğalır ve okuma kapsamı dağılımının sağ tarafında ikincil bir tepe noktası gözlenir. Bu durum, ilgili bölgelerde yüzde (%) metilasyon oranlarının doğru biçimde belirlenmesini olumsuz etkilemektedir [136]. Tüm örnekler için her üç metilasyon çeşidinin (CpHpH, CpHpG, CpG) ortalama kapsam değerini ve bu değerin X eksenindeki log10 ölçeğinde (1 = 10X kapsama) olduğu yeri göstermek için histogram grafikleri çıkarılmıştır.

CpHpH metilasyonu için kapsam histogram grafikleri

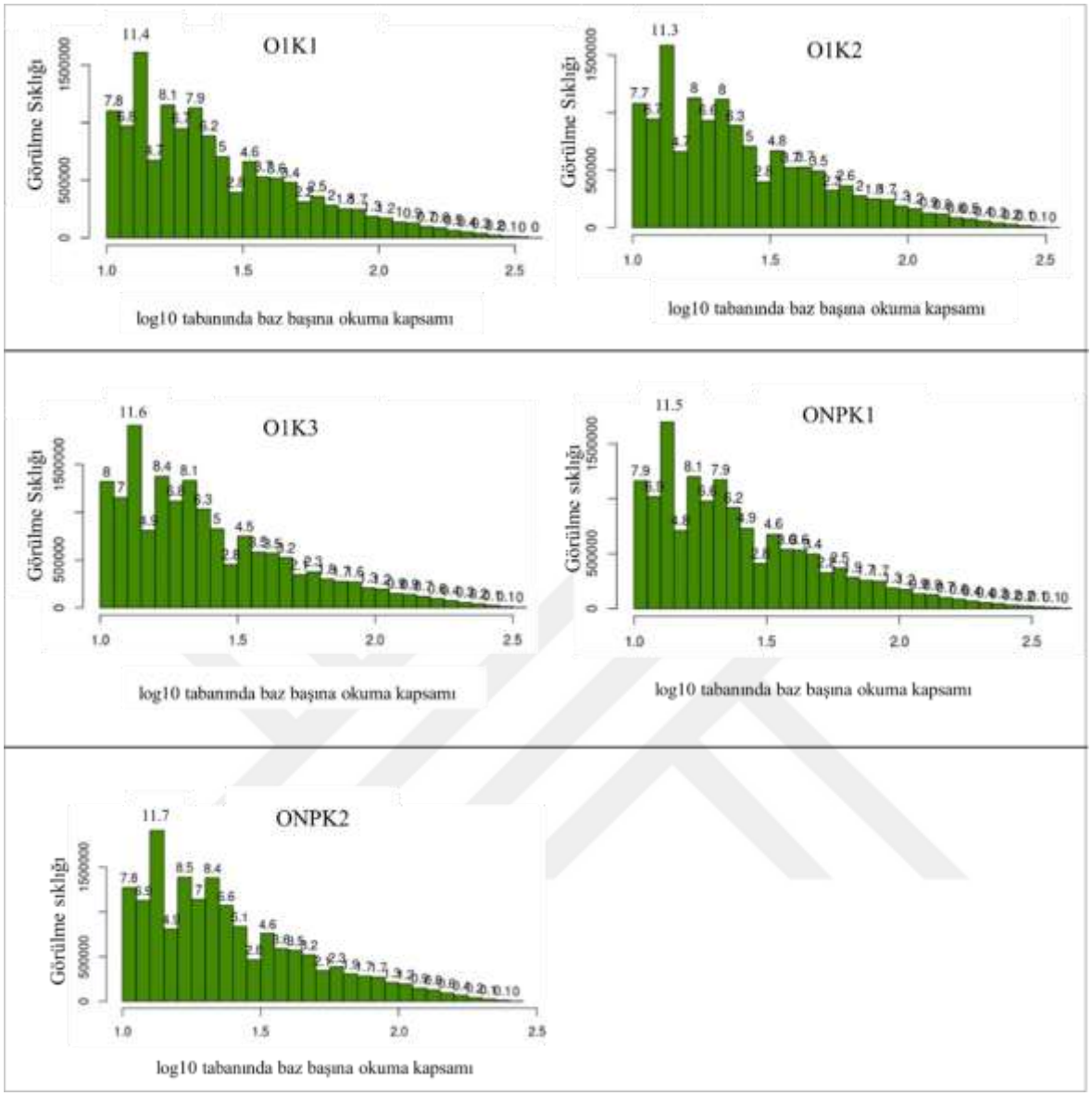
Tüm örneklerin CpHpH metilasyonu değerlendirildiğinde, örneklerin en az 10X kapsama sahip olacak şekilde filtrelendiği doğrulanmış ve analiz edilen bölgelerin güvenilir olduğu teyit edilmiştir. Örnekler arasındaki histogram deseni çok benzerdir ve herhangi bir sapma gözlenmemiştir (Şekil 4.45, Şekil 4.46, Şekil 4.47).



Şekil 4.45. O96G1/O96G2/O96G3/O1G1/O1G2/O1G3 örneklerine ait CpHpH metilasyon kapsam histogram grafikleri



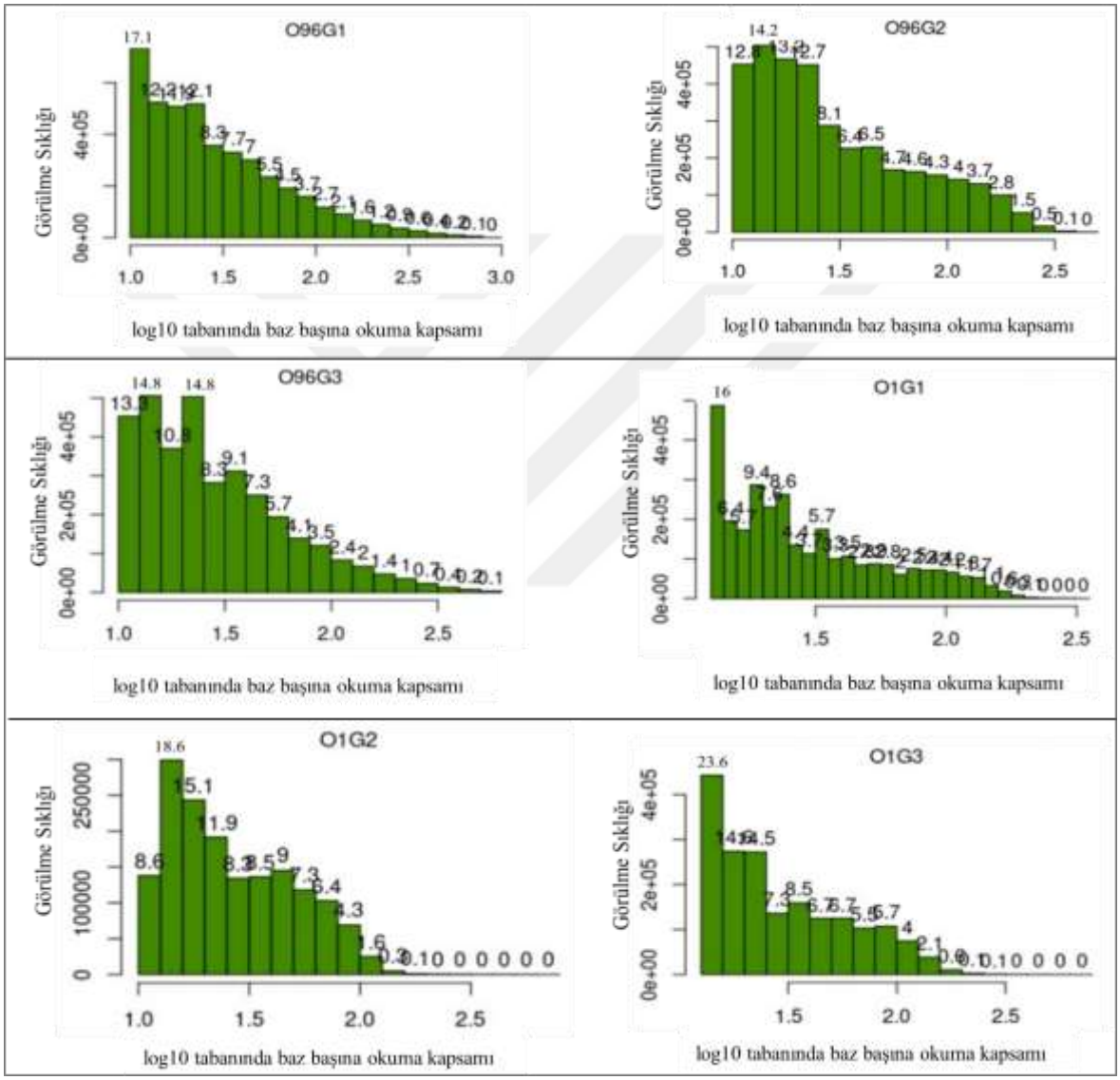
Şekil 4.46. ONPG1/ONPG2/ONPG3/O96K1/O96K2/O96K3 örneklerine ait CpHpH metilasyon kapsam histogram grafikleri



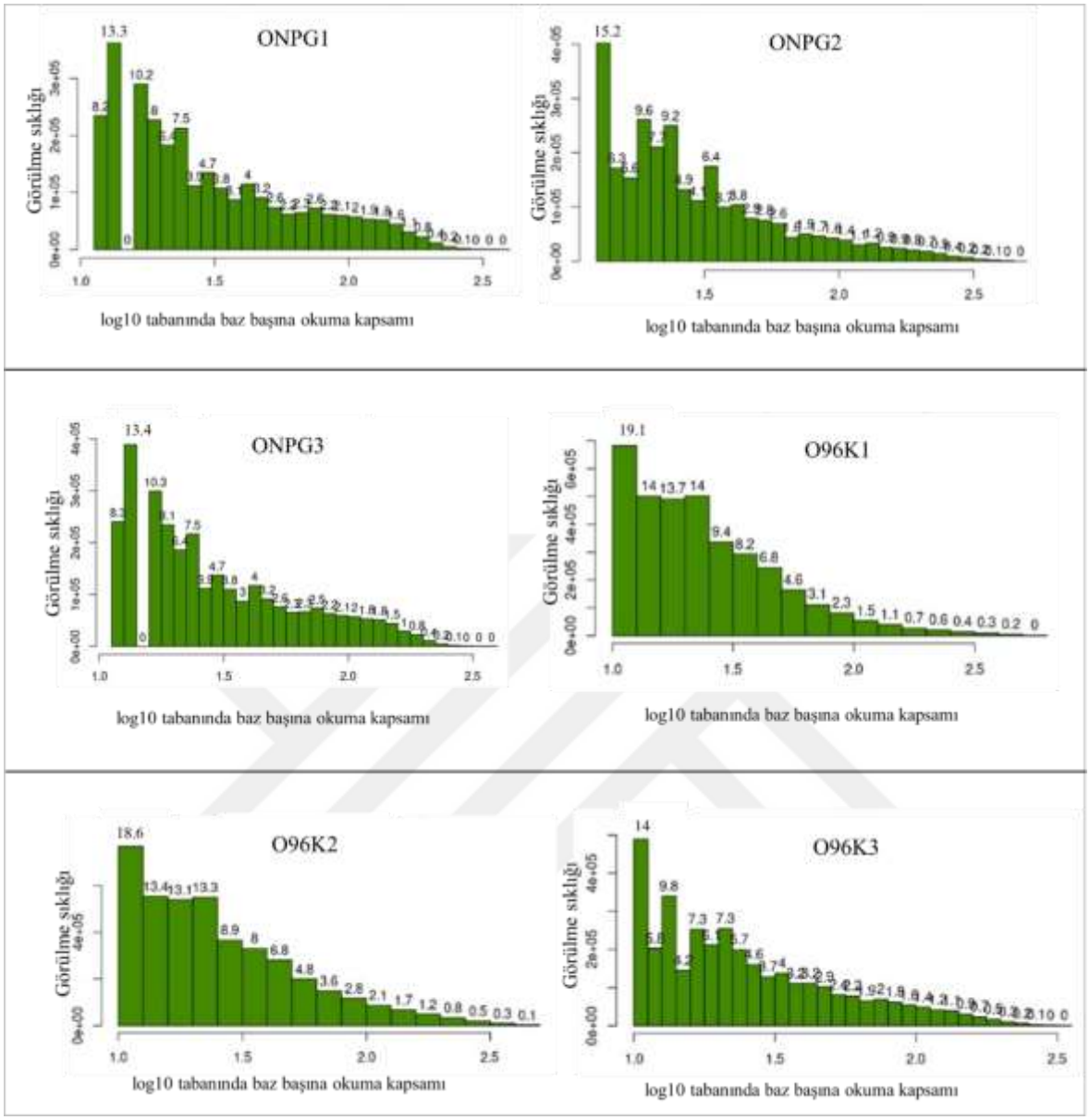
Şekil 4.47. O1K1/O1K2/O1K3/ONPK1/ONPK2 örneklerine ait CpHpH metilasyon kapsam histogram grafikleri

CpHpG metilasyonu kapsam histogram grafikleri

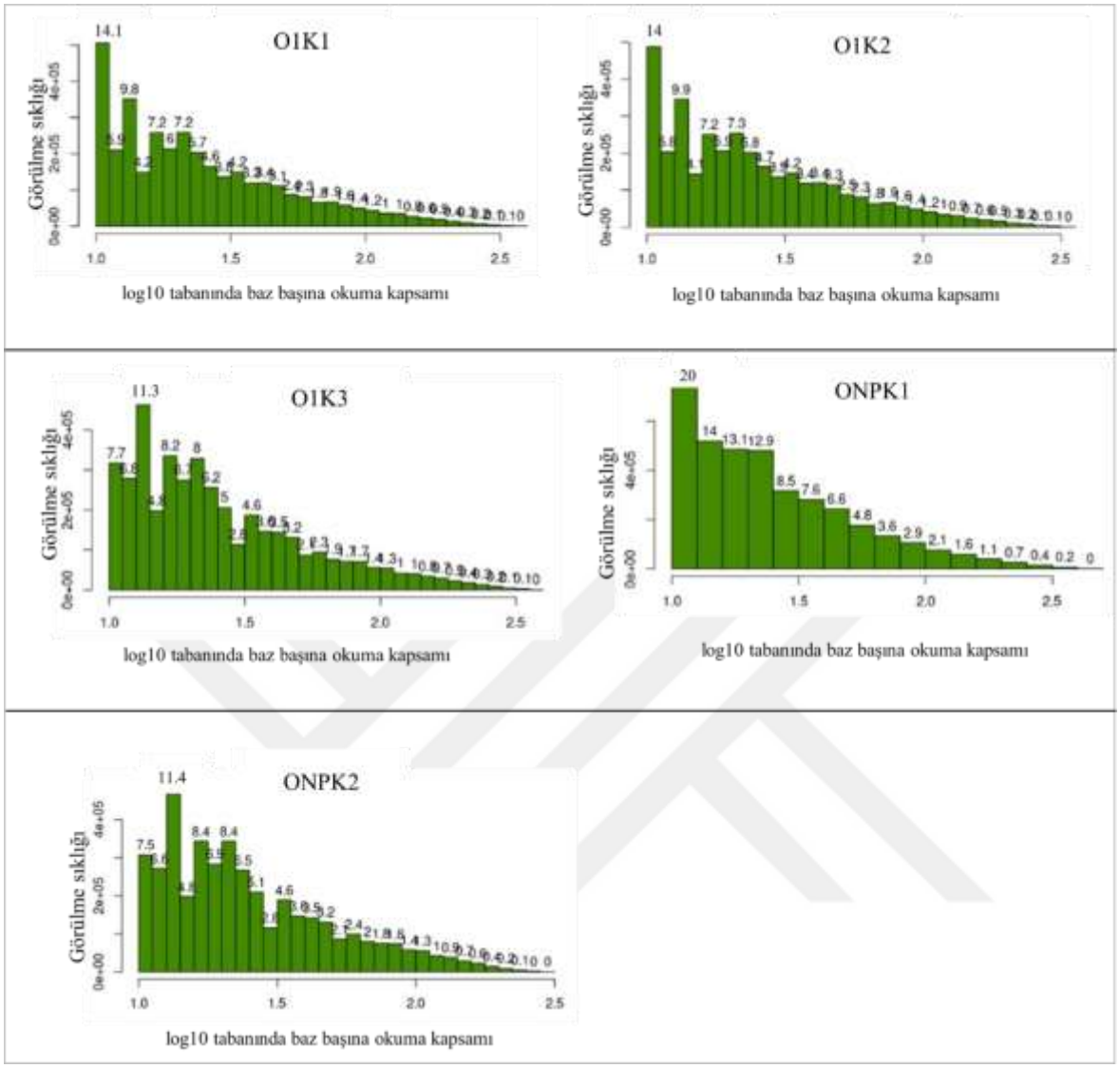
Tüm örneklerin CpHpG metilasyonu değerlendirildiğinde, örneklerin en az 10X kapsama sahip olacak şekilde filtrelendiği doğrulanmıştır. Örnekler arasındaki histogram deseni çok benzerdir ve herhangi bir sapma gözlenmemiştir (Şekil 4.48, Şekil 4.49, Şekil 4.50).



Şekil 4.48. O96G1/O96G2/O96G3/O1G1/O1G2/O1G3 örneklerine ait CpHpG metilasyon kapsam histogram grafikleri



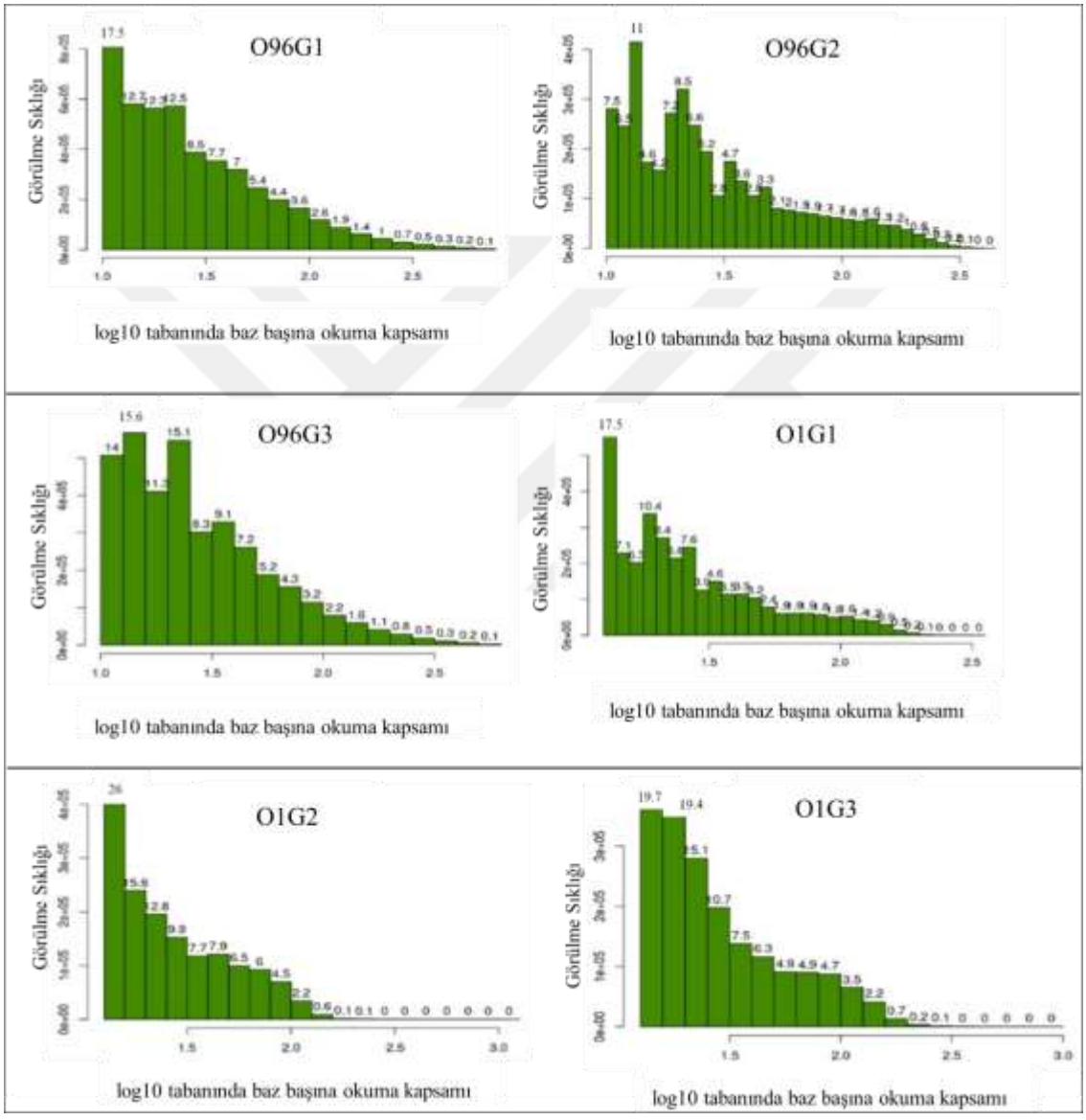
Şekil 4.49. ONPG1/ONPG2/ONPG3/O96K1/O96K2/O96K3 örneklerine ait CpHpG metilasyon kapsam histogram grafikleri



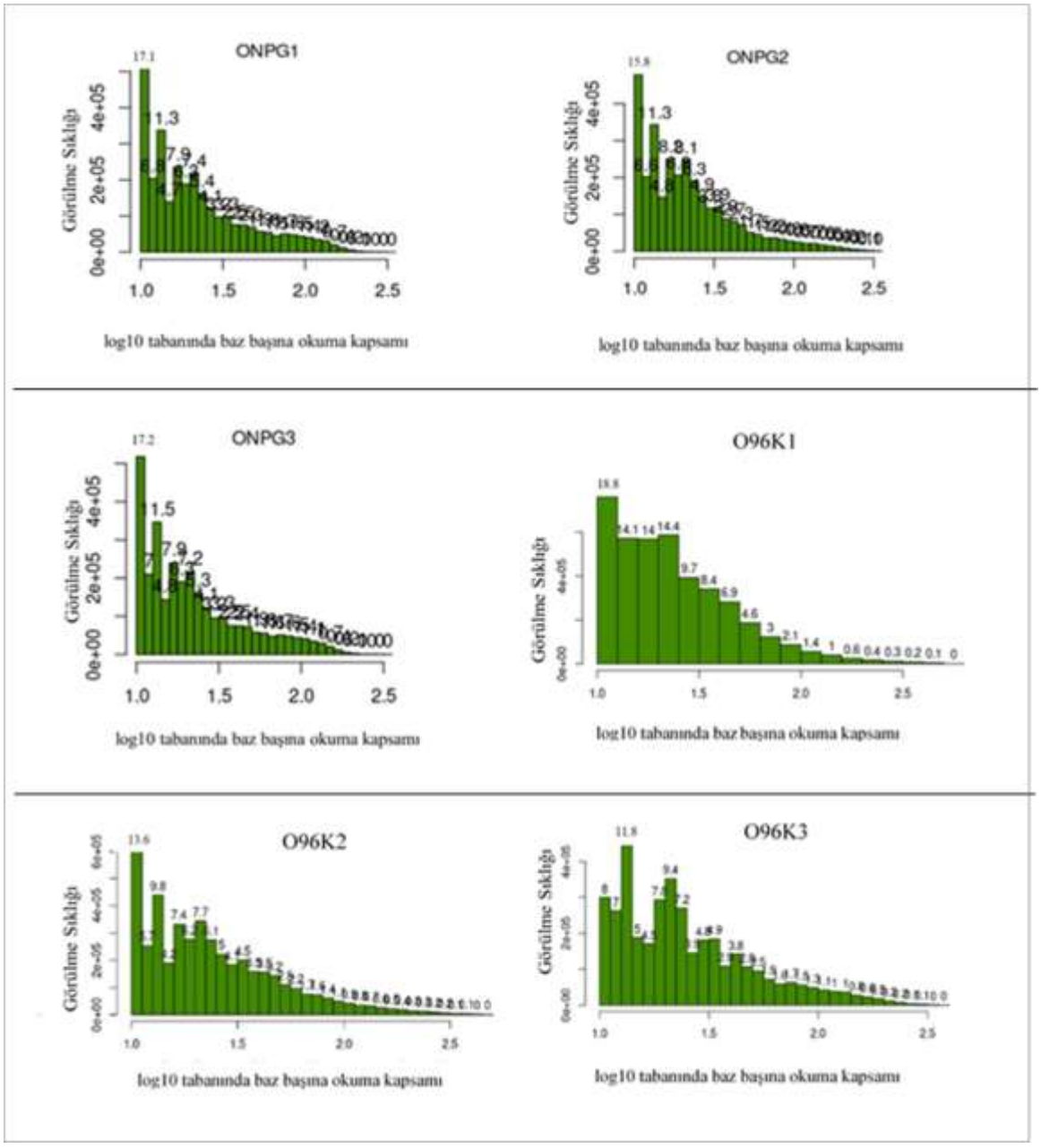
Şekil 4.50. O1K1/O1K2/O1K3/ONPK1/ONPK2 örneklerine ait CpHpG metilasyon kapsam histogram grafikleri

CpG metilasyonu için kapsam histogram grafikleri

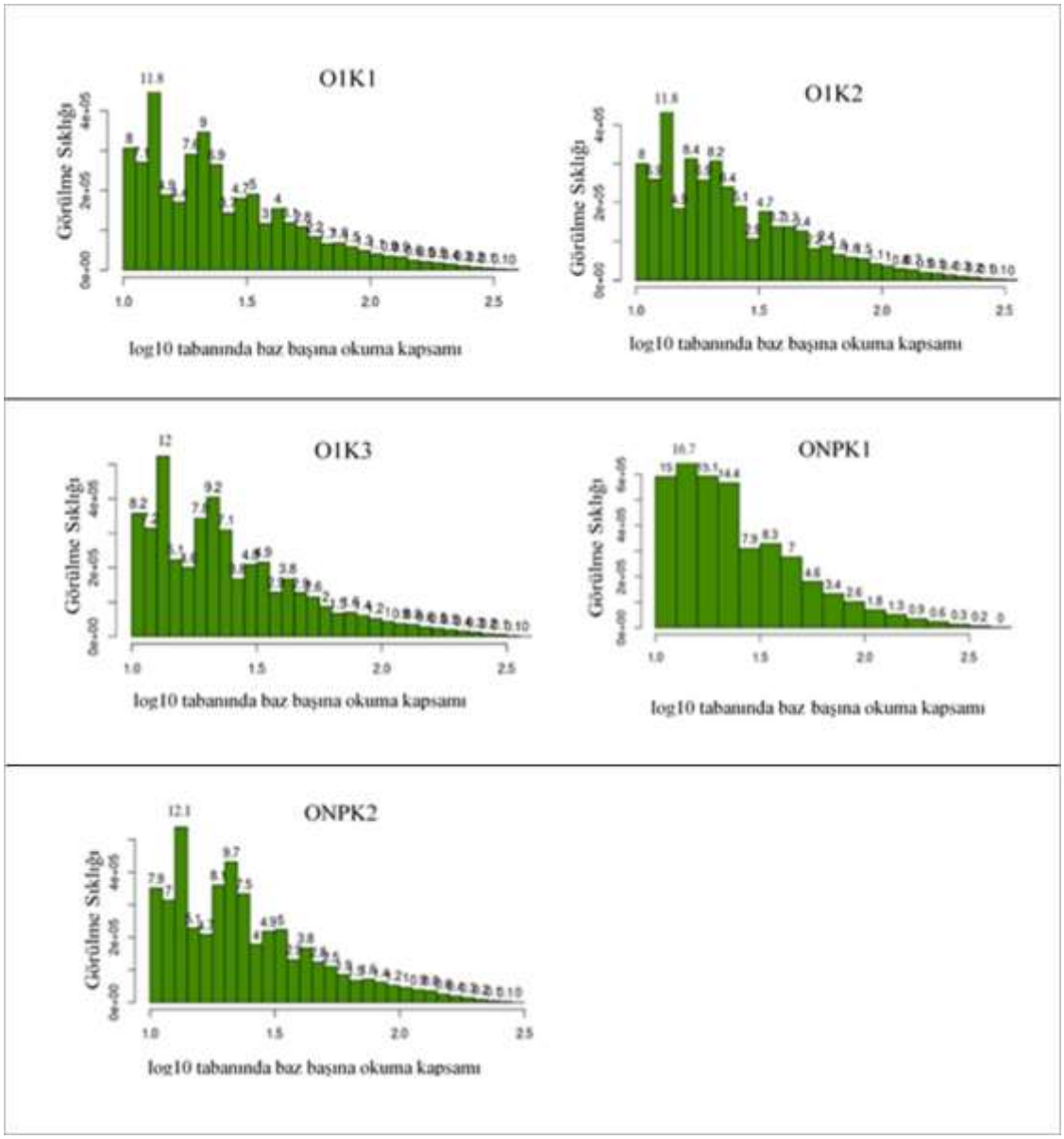
Tüm örneklerin CpG metilasyonu değerlendirildiğinde, örneklerin en az 10X kapsama sahip olacak şekilde filtrelendiği doğrulanmıştır. Örnekler arasındaki histogram deseni çok benzerdir ve herhangi bir sapma gözlenmemiştir (Şekil 4.51, Şekil 4.52, Şekil 4.53).



Şekil 4.51. O96G1/O96G2/O96G3/O1G1/O1G2/O1G3 örneklerine ait CpG metilasyon kapsam histogram grafikleri



Şekil 4.52. ONPG1/ONPG2/ONPG3/O96K1/O96K2/O96K3 örneklerine ait CpG metilasyon kapsam histogram grafikleri



Şekil 4.53. O1K1/O1K2/O1K3/ONPK1/ONPK2 örneklerine ait CpG metilasyon kapsam histogram grafikleri

4.8. Karşılaştırma Grupları

Alkaloidlerin depolanması ve sentezi farklı organlarda gerçekleştiği için yolağın daha iyi anlaşılması açısından elde edilen veriler farklı gruplar arasında karşılaştırılarak incelenmiştir. Tez kapsamındaki analizler hem çeşit bazında hem de organ bazında olmak üzere dokuz karşılaştırma grubu için yapılmıştır (Çizelge 4.9).

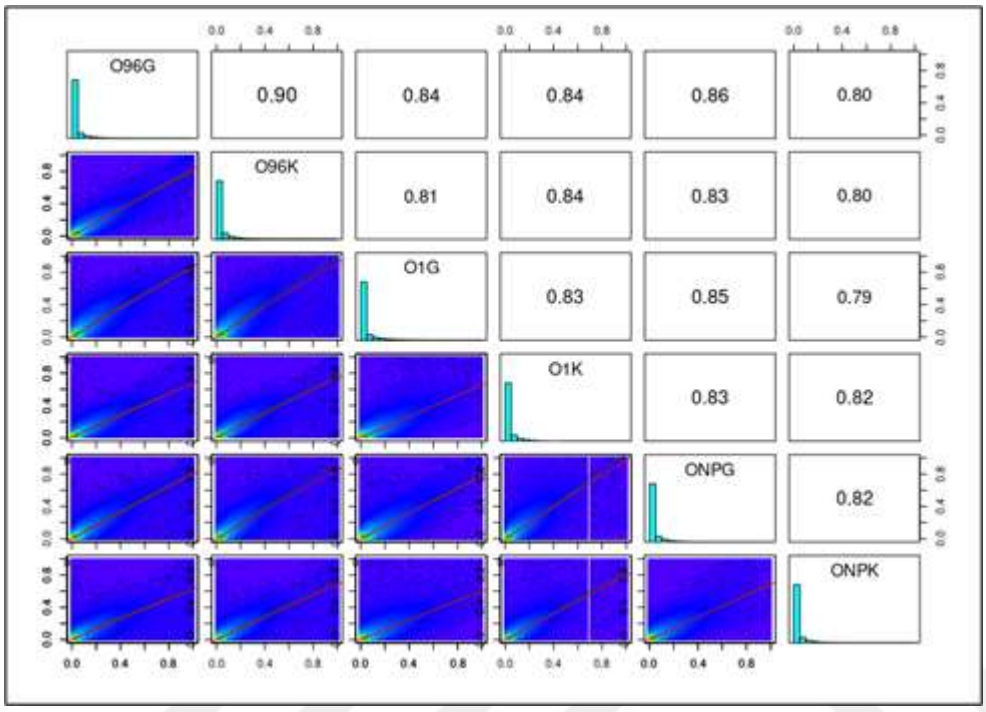
Çizelge 4.9. Karşılaştırma grupları

		Referans Örneği	Test Örneği	Karşılaştırma Gruplarının Kısaltılmış Adları
Çeşiit Bazında	1	Ofis_96 Gövde	Ofis_1 Gövde	O96G_O1G
	2	Ofis_96 Gövde	Ofis_NP Gövde	O96G_ONPG
	3	Ofis_NP Gövde	Ofis_1 Gövde	ONPG_O1G
	4	Ofis_96 Kapsül	Ofis_1 Kapsül	O96K_O1K
	5	Ofis_96 Kapsül	Ofis_NP Kapsül	O96K_ONPK
	6	Ofis_NP Kapsül	Ofis_1 Kapsül	ONPK_O1K
Organ bazında	7	Ofis_96 Kapsül	Ofis_96 Gövde	O96K_O96G
	8	Ofis_1 Kapsül	Ofis_1 Gövde	O1K_O1G
	9	Ofis_NP Kapsül	Ofis_NP Gövde	ONPK_ONPG

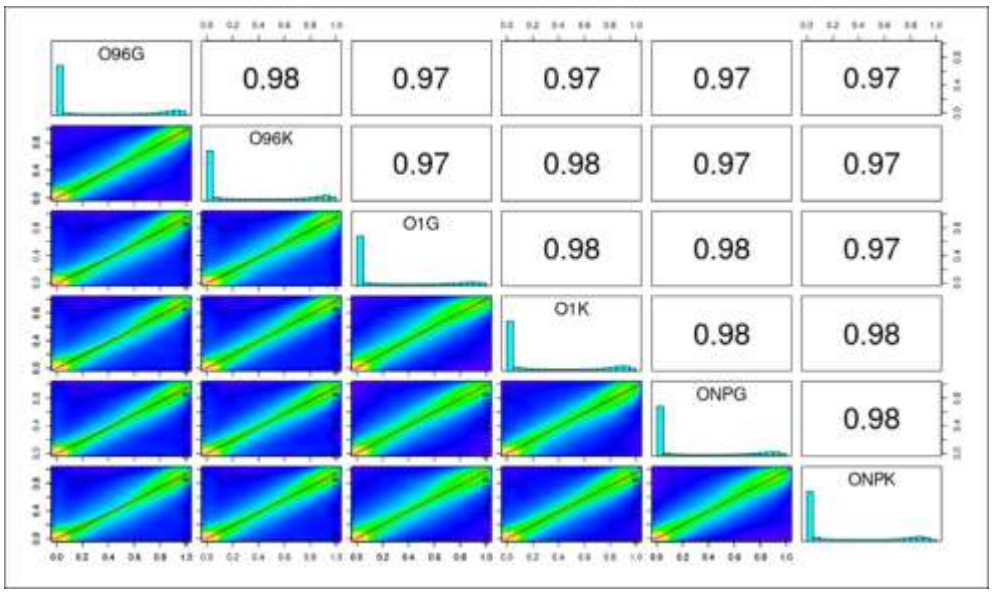
4.8.1. Pearson korelason katsayısı analizi

Pearson korelasyon katsayısı, bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirleyen bir katsayıdır [136]. Bu analizde CpHpH, CpHpG ve CpG metilasyonları açısından gerek organ bazında gerekse çeşit bazında dokuz karşılaştırma grubu arasında güçlü pozitif korelasyonlar gösterdiği gözlenmiştir. Yüksek korelasyon katsayısı, karşılaştırma grupları arasında belirli metilasyon bölgelerindeki metillenme seviyelerinin (metillenmiş yüzde sitozin oranı) büyük ölçüde benzer olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak karşılaştırma gruplarındaki kontrol grubunda metilasyon seviyeleri yüksek ya da düşük olan bölgeler, örnek grubunda da büyük oranda benzerlik göstermiştir. Pearson korelasyon katsayılarının; CpHpH metilasyon

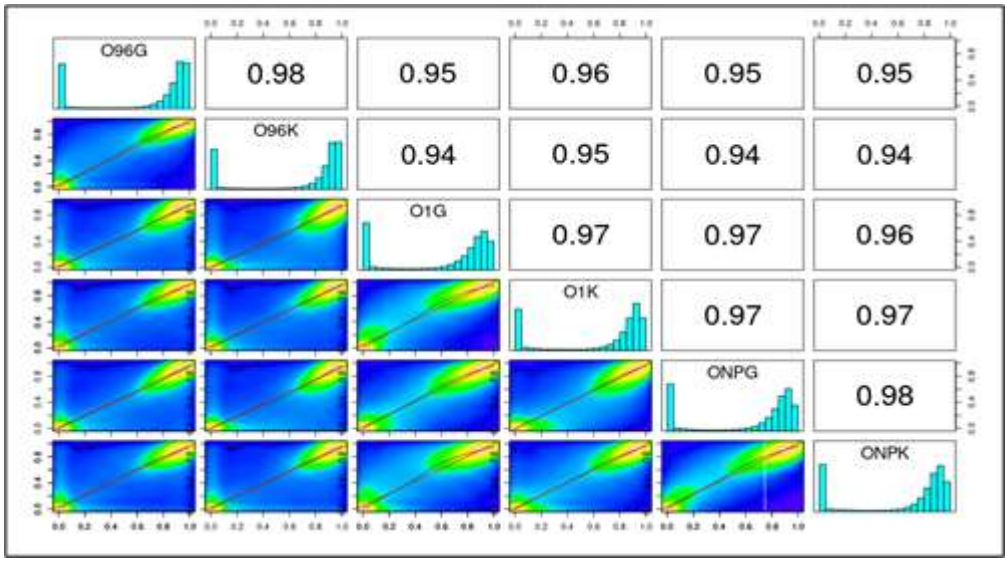
profilleri için 0,79 ila 0,90 (Şekil 4.54), CpHpG metilasyon profilleri için 0,97 ila 0,98 (Şekil 4.55), CpG metilasyon profilleri için 0,94 ila 0,98 (Şekil 4.56) arasında değiştiği gözlenmiştir.



Şekil 4.54. CpHpH metilasyonu için pearson korelasyon katsayısı



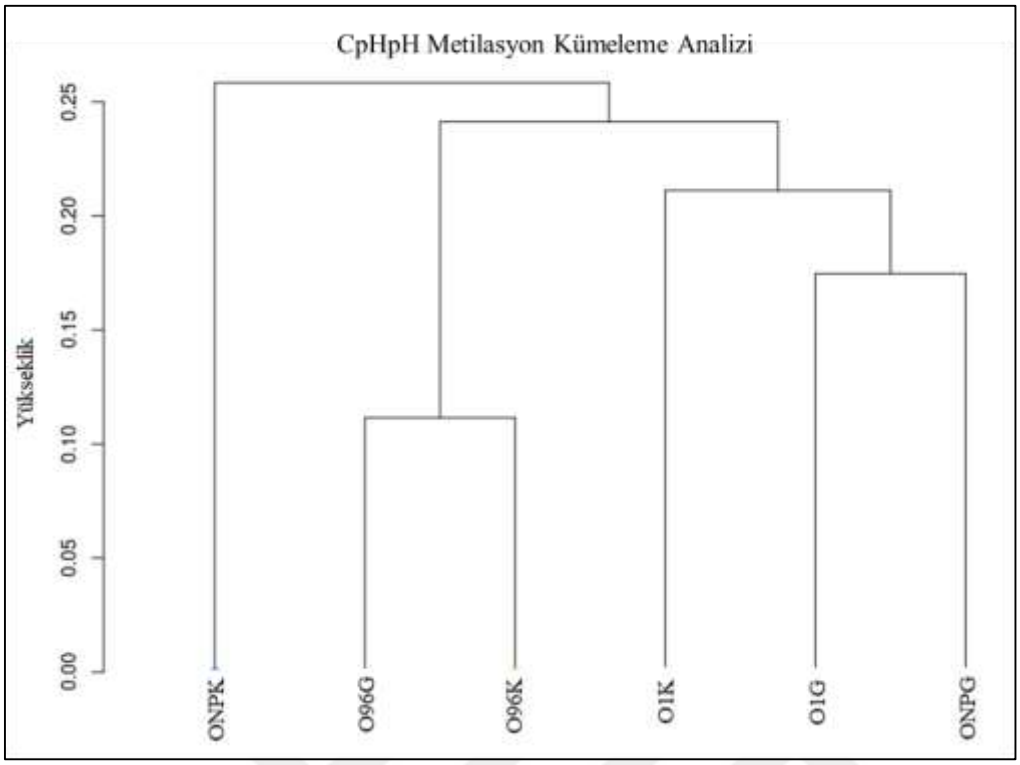
Şekil 4.55. CpHpG metilasyonu için pearson korelasyon katsayısı



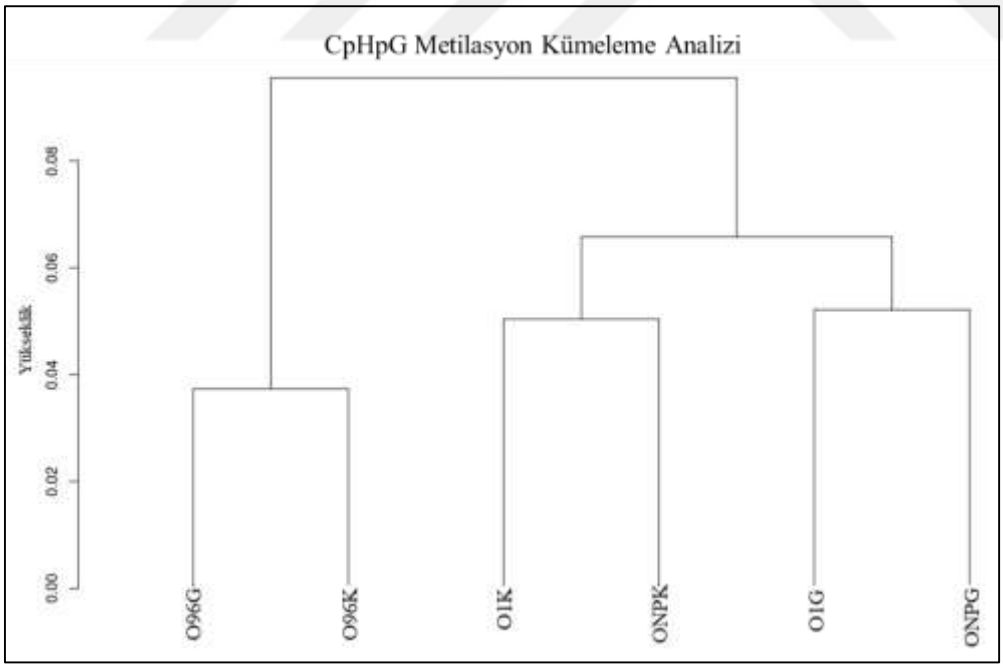
Şekil 4.56. CpG metilasyonu için pearson korelasyon katsayısı

4.8.2. Kümeleme ve temel bileşen analizi

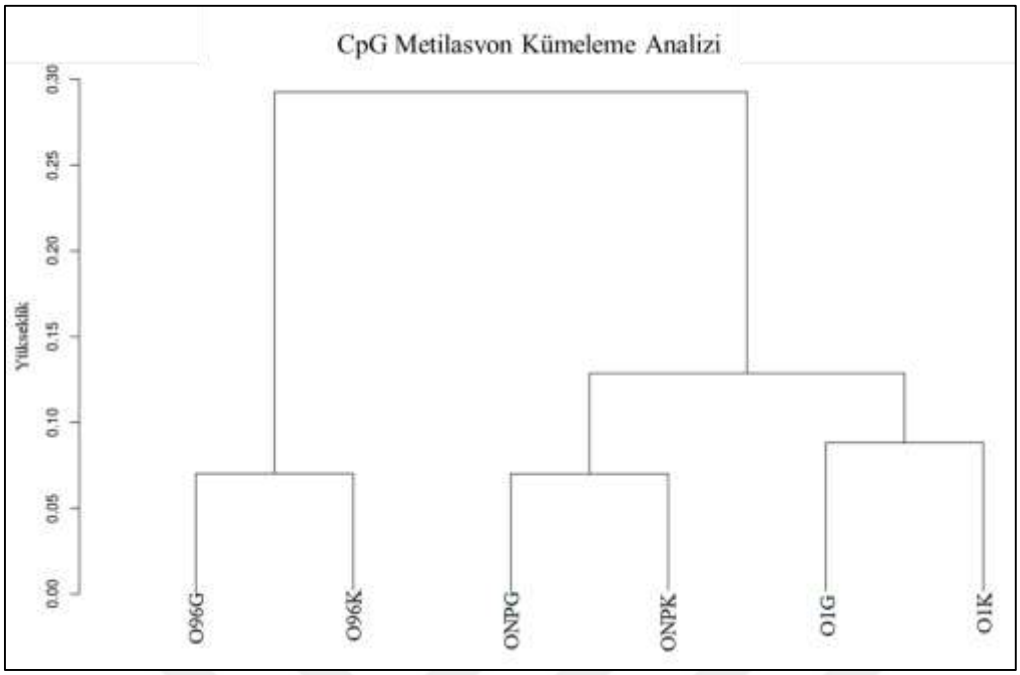
Bu analizde CpHpH, CpHpG ve CpG metilasyonları açısından gerek organ bazında gerekse çeşit bazında kümeleme ve temel bileşen analiz sonuçları gösterilmiştir. Örneklerin ortalama metilasyon oranlarına göre yapılan hiyerarşik kümelenmesi, farklı kümeler oluşturan örneklerin BIA içerikleri bakımından ayrıştığını göstermiştir (Şekil 4.57, Şekil 4.58, Şekil 4.59). Temel bileşen analizi (PCA)' nde karşılaştırma gruplarının dağılımı farklı BIA içeriklerine sahip olan haşhaş çeşitlerinin farklı metilasyon profilleri sergilediği görülmüştür (Şekil 4.60, Şekil 4.61, Şekil 4.62). Bu bulgular, her iki analiz sonucunun birbirini desteklediğini göstermiştir.



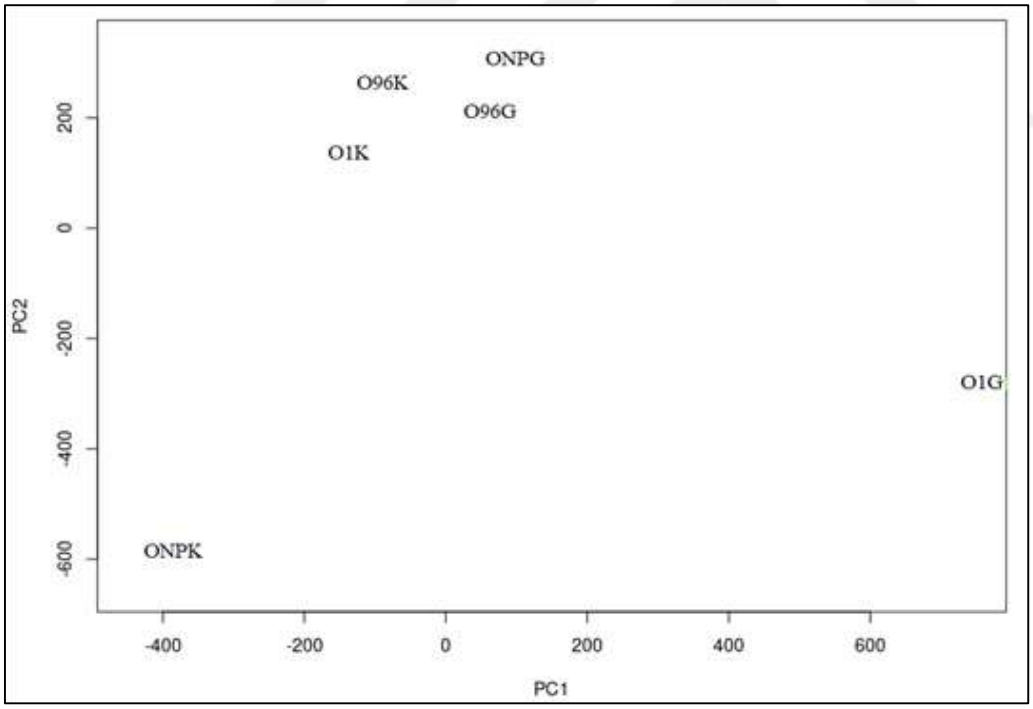
Şekil 4.57. CpHpH metilasyon kümeleme analizi



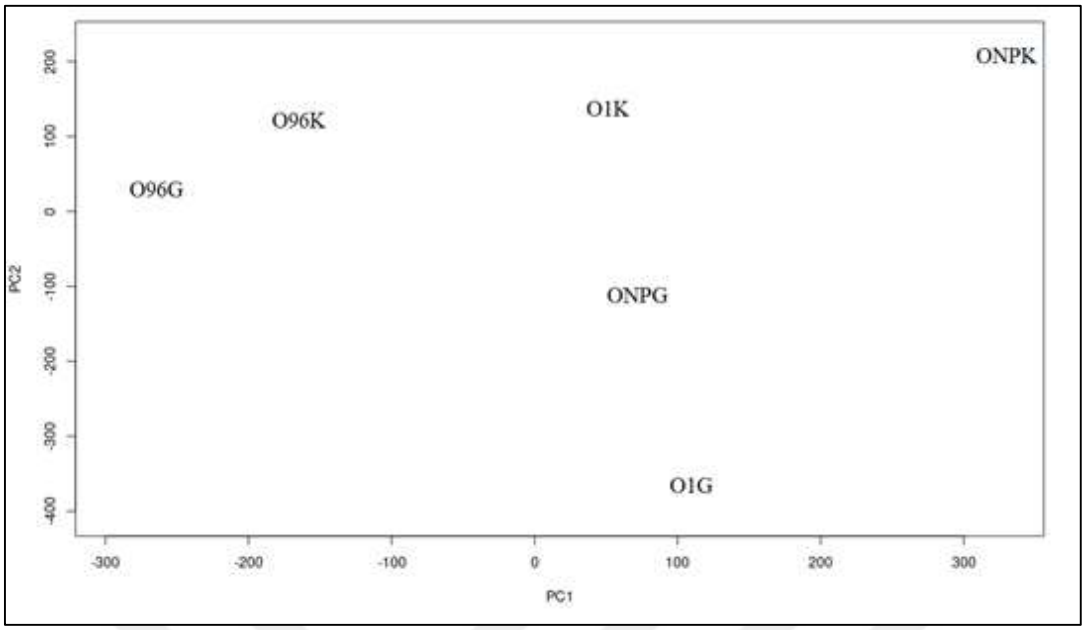
Şekil 4.58. CpHpG metilasyon kümeleme analizi



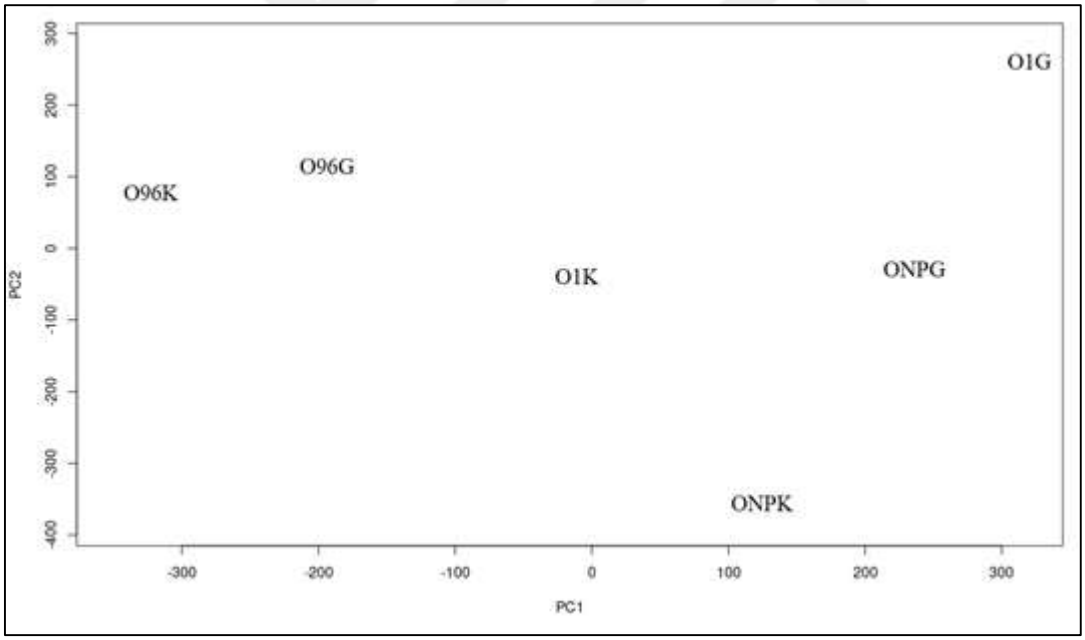
Şekil 4.59. CpG metilasyon kümeleme analizi



Şekil 4.60. CpHpH metilasyon PCA analizi



Şekil 4.61. CpHpG metilasyon PCA analizi

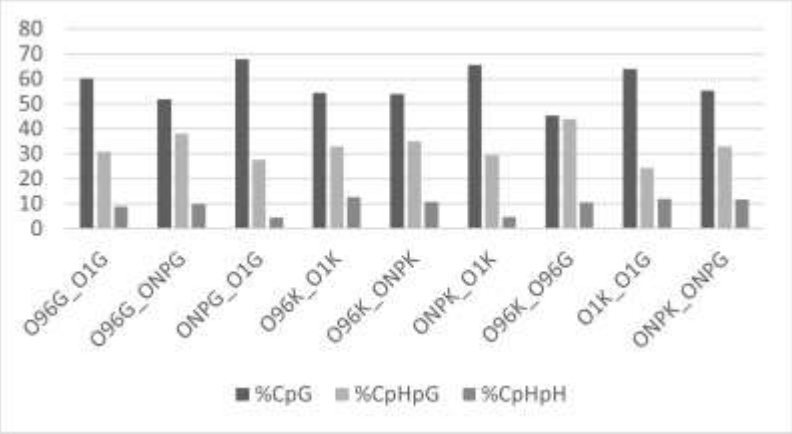


Şekil 4.62. CpG metilasyon PCA analizi

4.8.3. Karşılaştırma grupları için farklı metillenmiş bölgelerdeki (DMR) CpHpH, CpHpG ve CpG metilasyon yüzdeleri

Bitki genomlarının önemli bir bölümünü, çoğunlukla intergenik bölgelerde yoğunlaşan hareketli elemanlar olan transpozonlar oluşturur. CpG ve CpHpG metilasyonları öncelikli olarak heterokromatik (gen aktivitesi düşük bölgeler) transpozonlarda ve tekrarlayan dizilerde görülürken, CpHpH metilasyonu ökromatik (gen aktivitesi yüksek bölgeler) transpozonların uç bölgelerinde yoğunlaştığı bildirilmiştir [162, 163]. Bu tez çalışmasında, tüm örneklerde yüksek düzeyde CpHpH metilasyonu gözlenmiş, ancak karşılaştırma gruplarının DMR analizlerinde CpG metilasyonunun daha baskın olduğu ortaya konulmuştur.

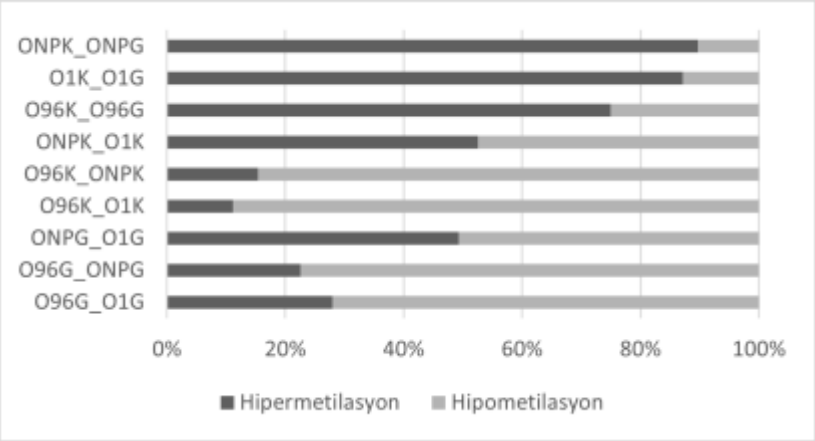
Her bir karşılaştırma grubu için DMR' lerin DNA metilasyon düzeyleri üç farklı metilasyon için (CpHpH, CpHpG ve CpG) profillenmiştir. En yüksek DNA metilasyon düzeyi CpG metilasyon çeşidinde gözlemlenirken bunu sırasıyla CpHpG ve CpHpH çeşitlerinin takip ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.63).



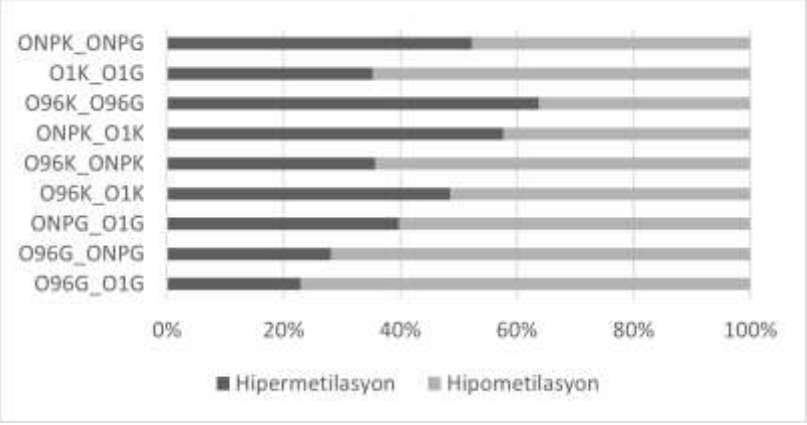
Şekil 4.63. Karşılaştırma gruplarına göre farklı metillenmiş bölgelerde (DMR) CpG, CpHpG ve CpHpH metilasyon yüzdeleri

4.8.4. DMR'ların hipermetilasyon/hipometilasyon açısından analizi

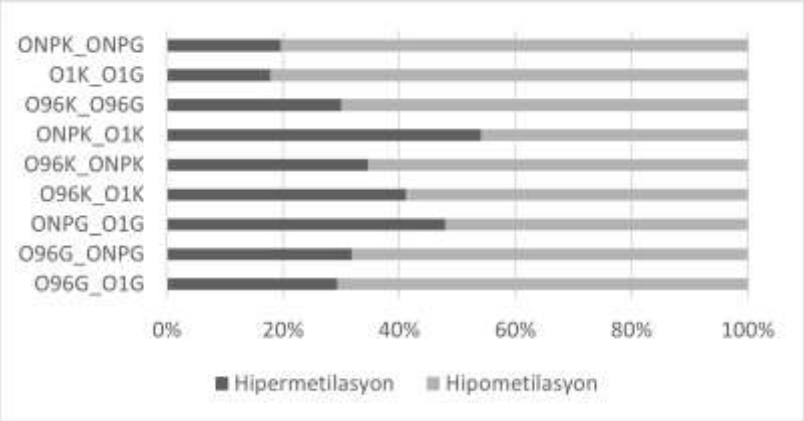
Yoğun metilasyon durumunu ifade eden DNA hipermetilasyonu, genlerin susturulmasına neden olur. DNA hipometilasyonu ise metillenmiş sitozin bazlarının sayısında azalma olduğu durumu ifade eder. DNA hipometilasyonu esas olarak genomun normalde yoğun metillenmiş bölgelerindeki metilasyon kaybından kaynaklanmaktadır. Bu durum gen ifadelerinde bir artış olacağına işaret etmektedir [164, 165]. Bu analizde, çeşitler arası karşılaştırmada kontrol grubuna göre alkaloid içerikleri zengin çeşitlerin gövde ve kapsül organlarında; organ kıyasında ise özellikle CpG metilasyonu açısından, kapsül organlarına göre gövde organlarında hipometilasyon oranının daha fazla gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.64, Şekil 4.65, Şekil 4.66).



Şekil 4.64. Karşılaştırma gruplarında tanımlanan DMR' ler arasında CpHpH metilasyonu için gözlemlenen hipermetilasyon ve hipometilasyon yüzde dağılımı



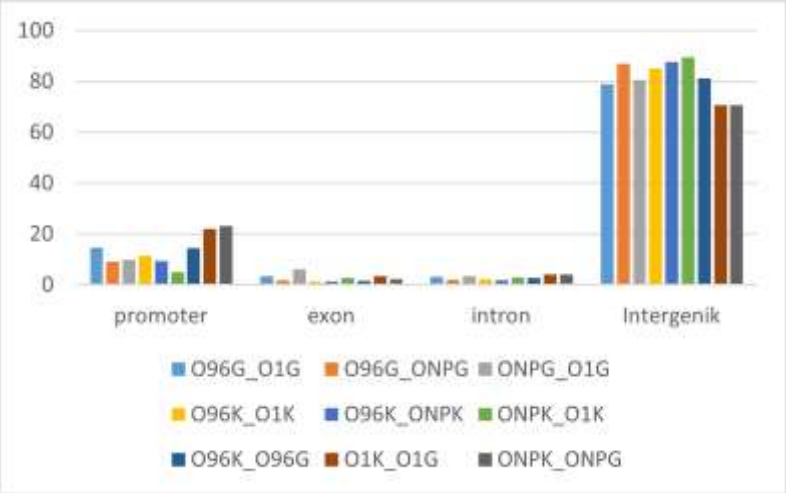
Şekil 4.65. Karşılaştırma gruplarında tanımlanan DMR' ler arasında CpHpG metilasyonu için gözlemlenen hipermetilasyon ve hipometilasyon yüzde dağılımı



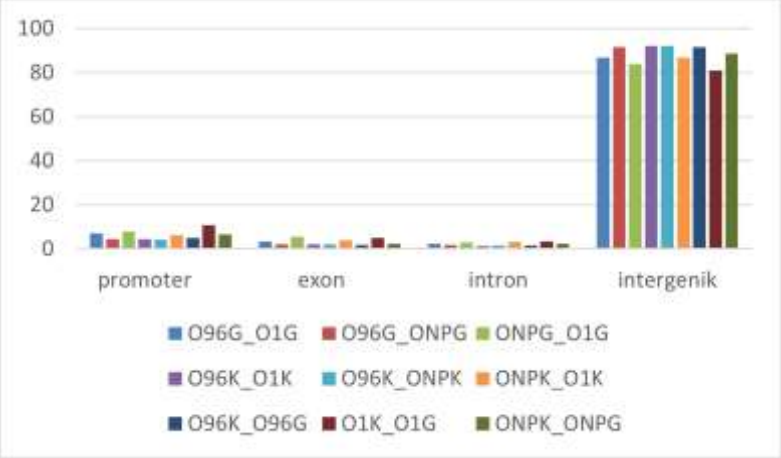
Şekil 4.66. Karşılaştırma gruplarında tanımlanan DMR' ler arasında CpG metilasyonu için gözlemlenen hipermetilasyon ve hipometilasyon yüzde dağılımı

4.8.5. DMR'ların gen bölgelerindeki dağılımı

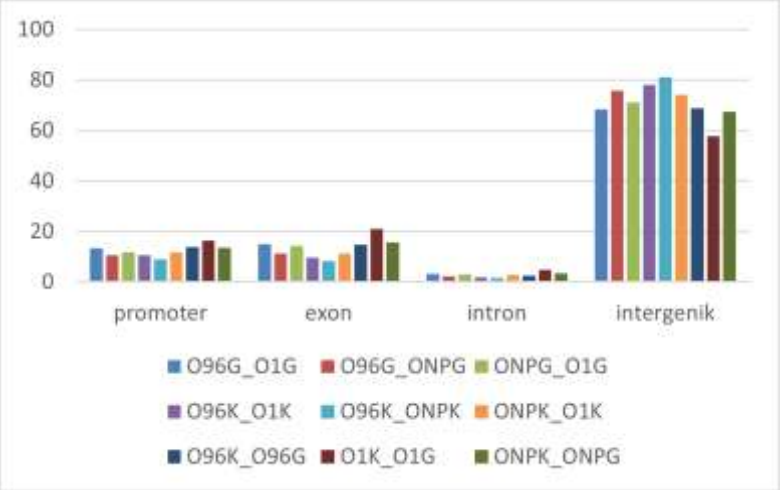
Karşılaştırma gruplarında metilasyon farklılıklarının en çok genler arası bölge olan intergenik bölgelerde ardından da promotor bölgelerde meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.67, Şekil 4.68, Şekil 4.69). İntergenik bölgeler, transpozonlar açısından yoğun bölgelerdir. Bu bölgelerde görülen yoğun metilasyon, transpozonların baskılanmasıyla ilişkilidir ve genom stabilitesinin korunması ile gen ifadesinin düzenlenmesi açısından beklenen bir durumdur [22, 166-170]. Promoter bölgeler ise transkripsiyonun başlamasını sağlayan, farklı hücre tipleri arasında gözlemlenen hücresel çeşitliliğin oluşmasını sağlayan temel düzenleyicilerdir. Aynı zamanda epigenetik düzenlemelere açık bölgelerdir [171, 172]. Haşhaş bitkisi özelinde intergenik ve promoter bölgelerde görülen yoğun metilasyon, örnekler arasında BIA biyosentezi ile ilişkili genlerin ifade düzeylerini farklı biçimlerde düzenlediğine ve genom stabilitesini etkileyebileceğine dikkati çekmiştir.



Şekil 4.67. CpHpH metilasyonunun gen bölgelerindeki dağılımı



Şekil 4.68. CpHpG metilasyonunun gen bölgelerindeki dağılımı

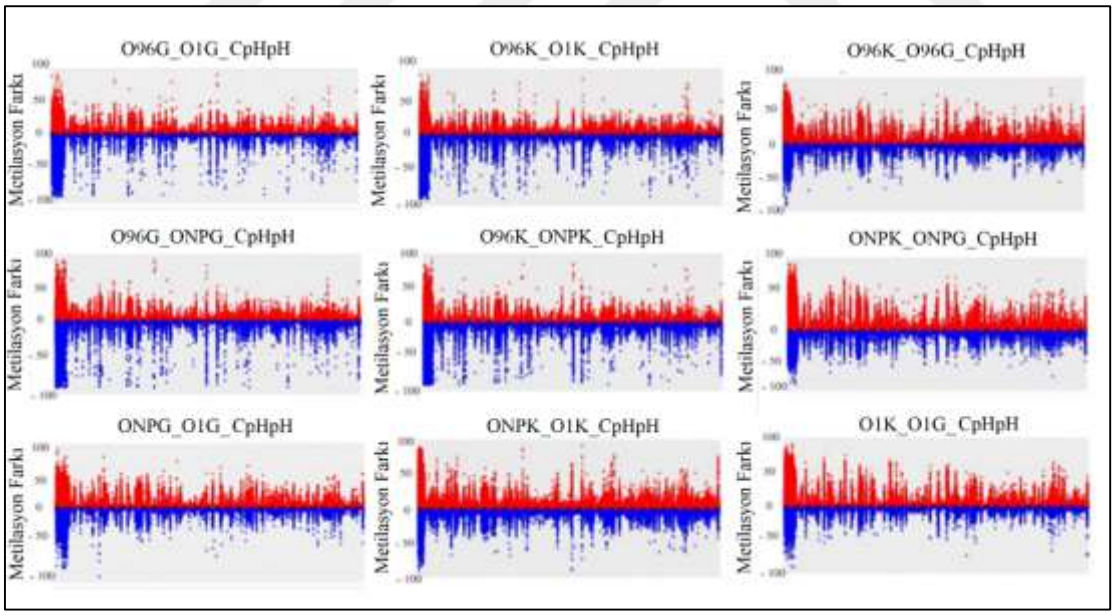


Şekil 4.69. CpG metilasyonunun gen bölgelerindeki dağılımı

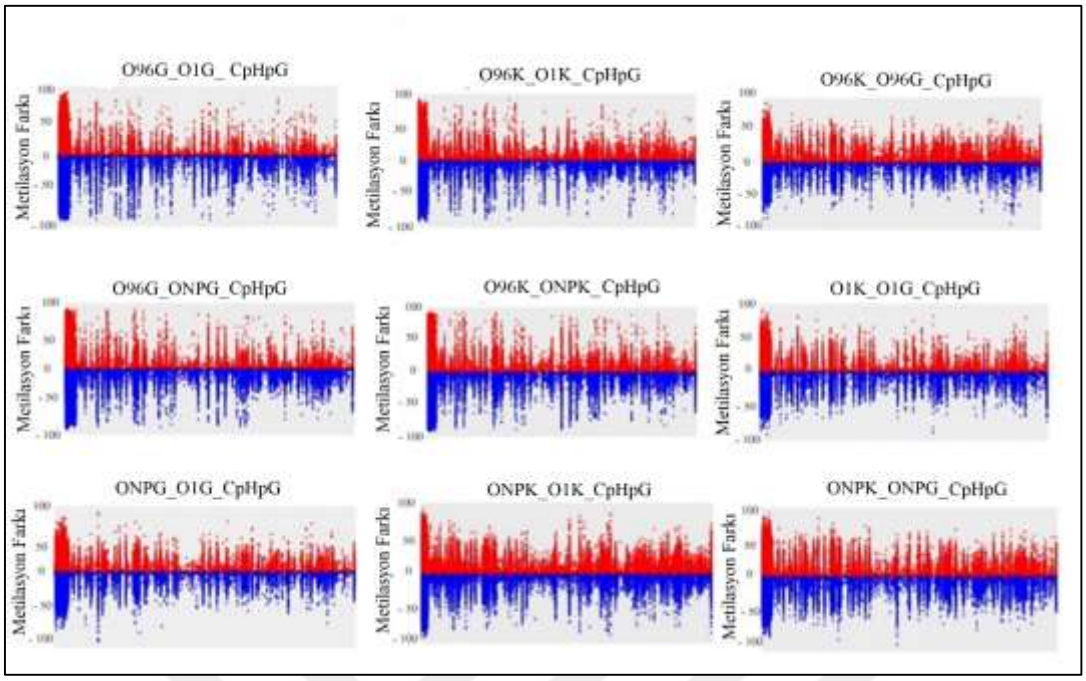
Ek olarak CpHpH, CpHpG patternlerinden farklı olarak, CpG metilasyonunun genomun kodlayan bölgeleri olan ekzonlarda da aktif rol oynadığı önemli bir bulgu olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 4.69).

4.8.6. Karşılaştırma gruplarına ait doğrusal Manhattan Plot grafikleri

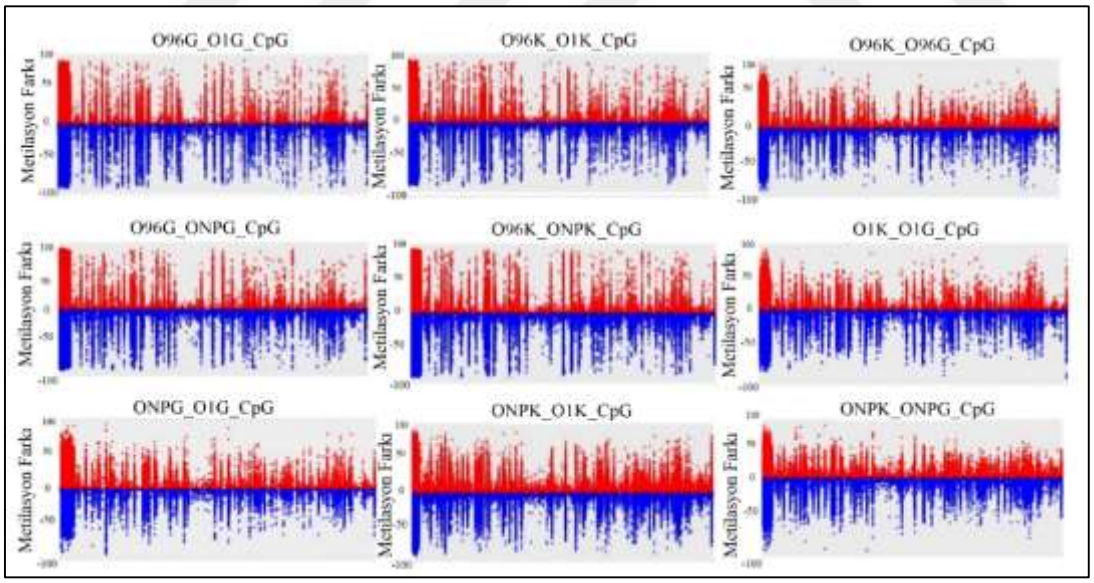
Tüm karşılaştırma gruplarına ait CpHpH, CpHpG ve CpG metilasyonlarını gösteren Manhattan grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.70, Şekil 4.71, Şekil 4.72). Bu grafiklerde, çoğu gen bölgesinin %50'nin altında düşük metilasyon farkı gösterdiği ve bu farkların genellikle %25 civarında yoğunlaştığı gözlenmiş olup genom stabilitesinin korunması açısından önemli bir gösterge olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, CpG metilasyon deseninde diğer metilasyon desenlerine (CpHpG ve CpHpH) göre daha fazla sayıda genin yüksek metilasyon gösterdiği (>%50) görülmüştür. Bu yüksek metilasyon farkları kontrol grubuna kıyasla alkaloidce zengin çeşitlerin gövde ve kapsül organlarında, organ kıyasında ise gövde organlarında daha belirgin olarak dikkat çekmiştir.



Şekil 4.70. Manhattan grafiğine göre çeşit ve organlara bağlı olarak CpHpH metilasyonu açısından hipermetilasyon/hipometilasyon dağılımı (Kırmızı: Hipermetilasyon. Mavi: Hipometilasyon)



Şekil 4.71. Manhattan grafiğine göre çeşit ve organlara bağlı olarak CpHpG metilasyonu açısından hipermetilasyon/hipometilasyon dağılımı (Kırmızı: Hipermetilasyon. Mavi: Hipometilasyon)



Şekil 4.72. Manhattan grafiğine göre çeşit ve organlara bağlı olarak CpG metilasyonu açısından hipermetilasyon/hipometilasyon dağılımı (Kırmızı: Hipermetilasyon. Mavi: Hipometilasyon)

Karşılaştırmalardaki genlerin dağılımları detaylı bir şekilde incelendikten sonra gen ontolojileri ve yolak analizleri yapılmıştır.

4.8.7. DMR'ler ile ilişkili genlerin gen ontolojisi analizi

Herbir çeşit ve organlar arasında farklılık gösteren genlerin ontoloji ve yolak analizleri yapılmıştır. GO analizindeki kategorilerde genlerin en sık görüldüğü süreçlere ve yolak analizine ait terimler hakkında detaylı bilgi elde edilmiştir.

Analizler sonucunda organ tipleri ve çeşitler dikkate alındığında genel olarak Biyolojik Süreç (BS) kategorisinde "protein fosforilasyonu*"* ve *"*zarlar arası taşınım", Hücresel Bileşen (HB)kategorisinde "çekirdek", Moleküler Fonksiyon (MF) kategorisinde ise "protein bağlanması" ve "ATP bağlanması" tüm karşılaştırma gruplarında en sık temsil edilen terimler arasında yer almıştır.

Ofis_96 Gövde / Ofis_1 Gövde

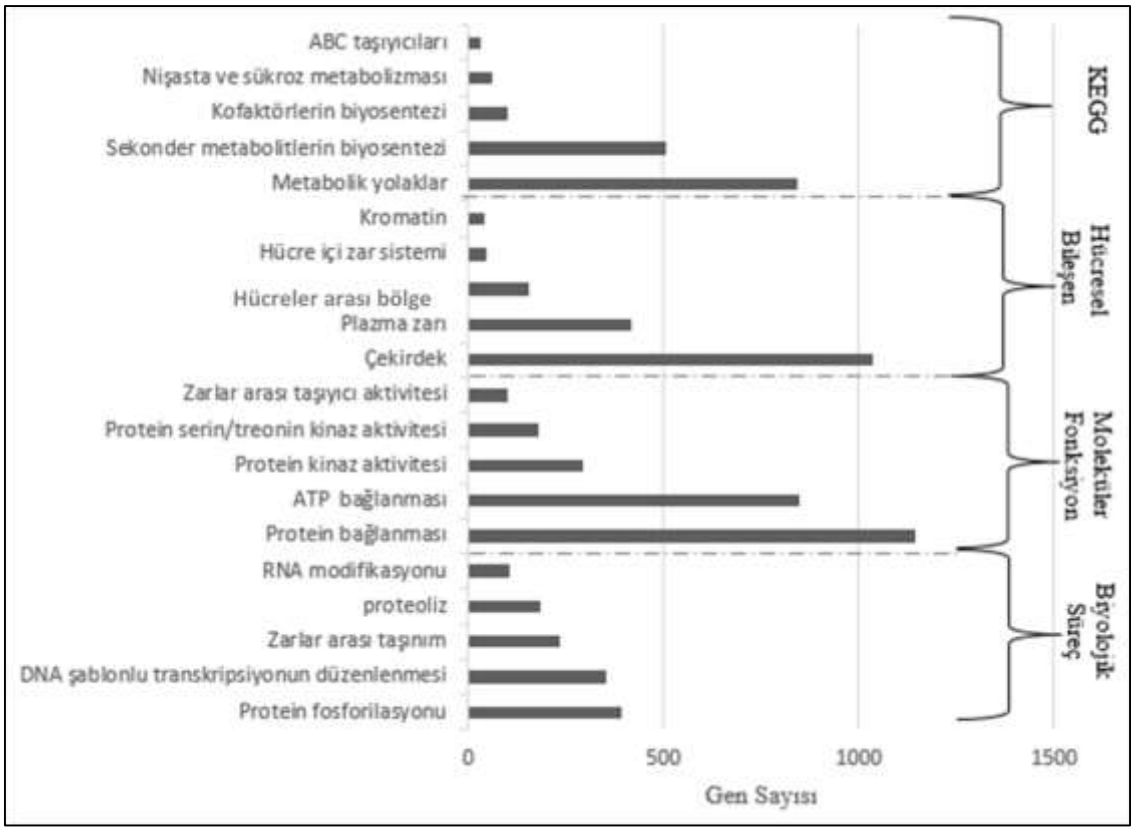
Ofis_1 çeşidinin gövde organı ile referans grubu olan Ofis_96 çeşidinin gövde organı karşılaştırmasına yönelik ontoloji analizi yapılmıştır. Hipometilasyonla ilişkili en yaygın terimler Şekil 4.73' da, hipermetilasyonla ilişkili en yaygın terimler ise Şekil 4.74'de gösterilmiştir.

Bu karşılaştırmada hipometillenmiş DMR'ler arasında dikkat çeken "protein fosforilasyonu" BS terimi, "çekirdek" HB terimi en zenginleşmiş terim olarak ortaya çıkmıştır. BS ve HB terimleriyle bağlantılı olarak MF terimlerinden "protein bağlanması" ve "ATP bağlanması" terimlerinde anlamlı bir zenginlik görülmüştür.

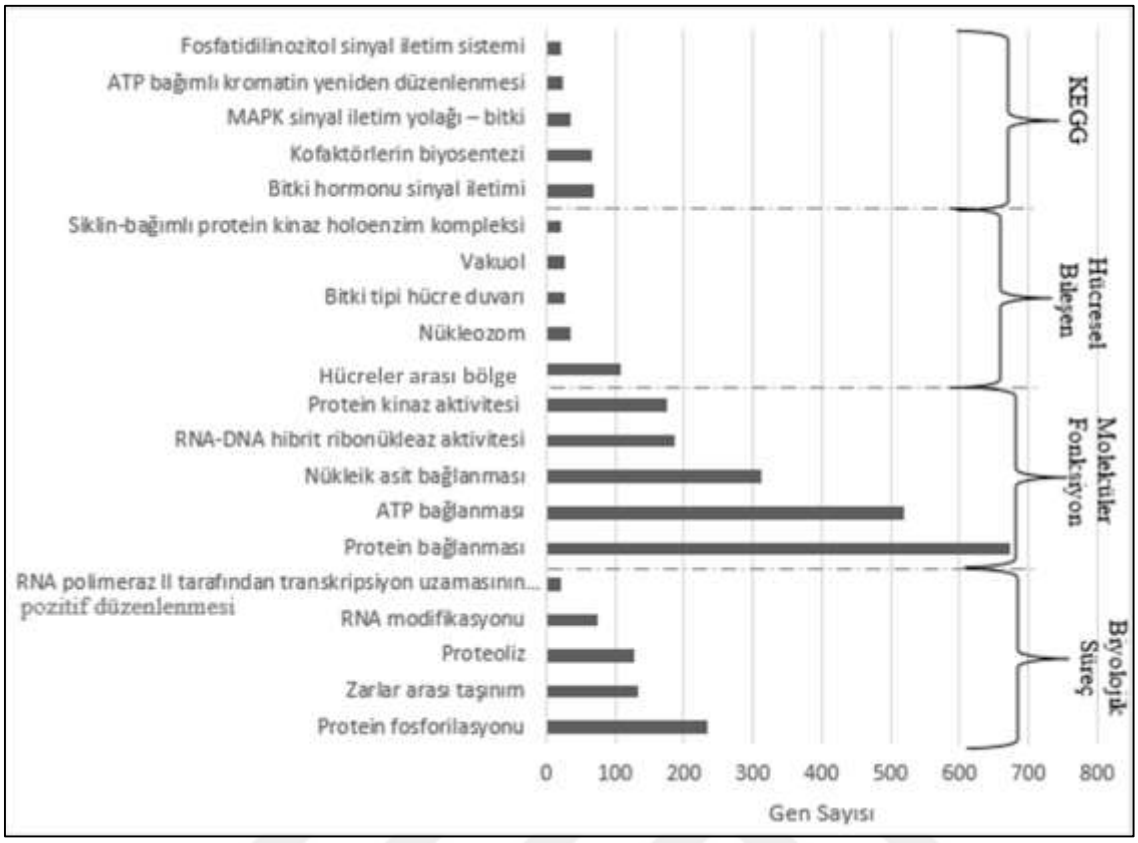
Dikkat çekici diğer bir bulgu, kontrol grubuna kıyasla Ofis_1 çeşidinde hipometillenmiş DMR' lerle ilişkili olarak "DNA şablonlu transkripsiyonun düzenlenmesi" teriminin en zenginleşmiş BS terimlerinden biri olarak öne çıktığı belirlenmiştir. Yolak zenginleştirme analizine göre, gövde organlarında BIA üretiminin DNA metilasyonu üzerindeki etkisi ağırlıklı olarak *"*sekonder metabolitlerin biyosentezi*"*, *"*kofaktör biyosentezi*"* ve *"*metabolik yolaklar*"* terimleri ile ilişkili bulunmuştur.

Yolak zenginleştirme analizinde diğer dikkat çekici bulgu, kontrol grubuna kıyasla Ofis_1 çeşidinin gövde organında "Bitki hormonu sinyal iletimi" ve *"*MAPK sinyal iletim yolağı-bitki*"* terimlerinin baskılanmış olduğu görülmüştür. MAPK yolu bitkilerde stres ve savunma

tepkilerinde kritik bir rol oynar [173]. Bu yolun baskılanması, savunma yanıtı genlerinin ifadesinin düşmesi anlamına gelir. Ancak, alkaloid açısından zengin çeşitlerde klasik savunma yolakları (MAPK kaskadı) baskılanmış olsa da savunma fonksiyonlarının büyük ölçüde sekonder metabolitler aracılığıyla sağlandığına işaret etmiştir.



Şekil 4.73. O96G_O1G hipometilasyon GO terimleri



Şekil 4.74. O96G_O1G hipermetilasyon GO terimleri

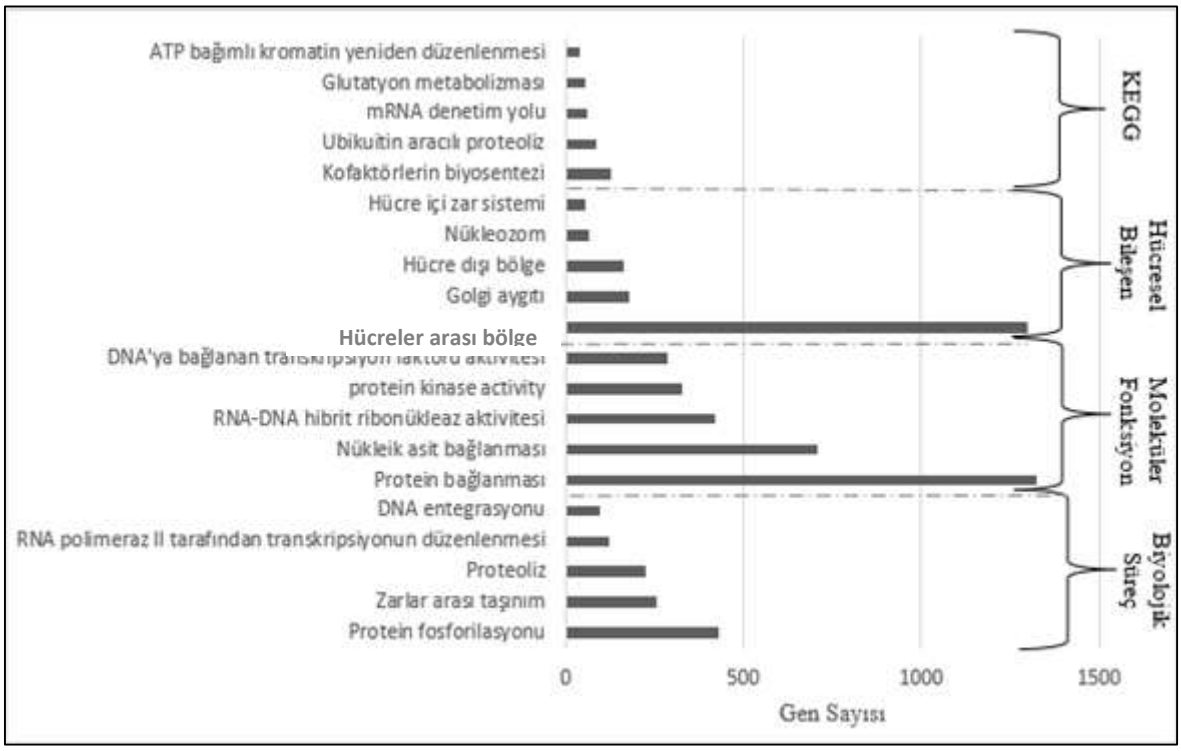
Ofis_96 Gövde / Ofis_NP Gövde

Ofis_NP çeşidinin gövde organı ile referans olarak kontrol grubu olan Ofis_96 çeşidinin gövde organı karşılaştırmasına yönelik ontoloji analizi yapılmıştır. Hipometilasyonla ilişkili en yaygın terimler Şekil 4.75'da, hipermetilasyonla ilişkili en yaygın terimler ise Şekil 4.76'de gösterilmiştir.

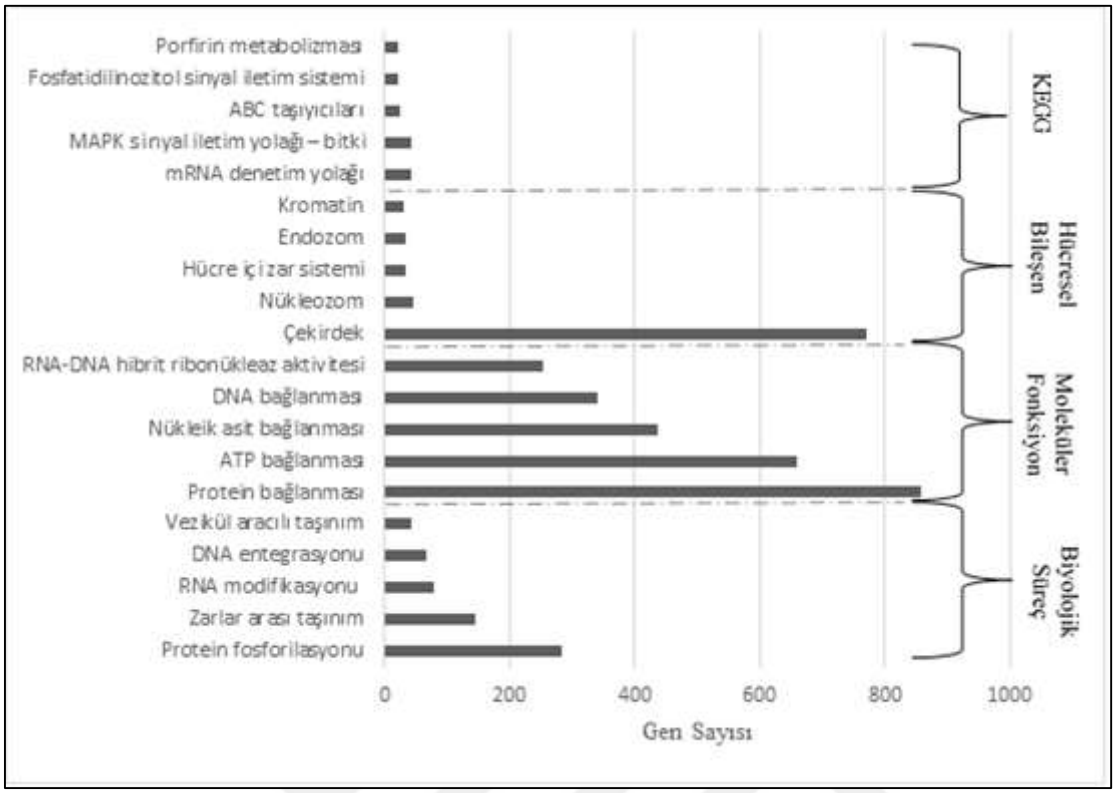
Bu karşılaştırmada BIA açısından zengin çeşit olan Ofis_NP çeşidinin kontrol örneğiyle karşılaştırılmasında hipometillenmiş DMR'ler arasında dikkat çeken "protein fosforilasyonu" BS terimi, "çekirdek" HB terimi en zenginleşmiş terim olarak ortaya çıkmıştır. BS ve HB terimleriyle bağlantılı olarak MF terimlerinden "protein bağlanması" nda anlamlı bir zenginlik görülmüştür.

Kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında noskapin açısından zengin çeşidin gövde organlarındaki hipometillenmiş DMR'lere özgü olarak yalnızca "kofaktör biyosentezi", "ubikitin aracılı proteoliz" ve "mRNA denetim yolağı" KEGG yolaklarının zenginleştiği

bulunmuştur. Bu sonuç noskapin açısından zengin çeşitte translasyon sonrası modifikasyonların rolüne işaret etmiştir. Ayrıca bu zenginleşme noskapin biyosentezini etkileyen genetik veya epigenetik farkları yansıtabilecek mRNA denetim aktivitesindeki farklılıklara da dikkati çekmiştir. Yolak zenginleştirme analizinde diğer dikkat çekici bulgu kontrol grubuna kıyasla Ofis_NP çeşidi gövdesinde *"*MAPK sinyal iletim yolağı-bitki*"* teriminin baskılanmış olduğu görülmüştür.



Şekil 4.75. O96G_ONPG hipometilasyon GO terimleri



Şekil 4.76. O96G_ONPG hipermetilasyon GO terimleri

Ofis_NP Gövde / Ofis_1 Gövde

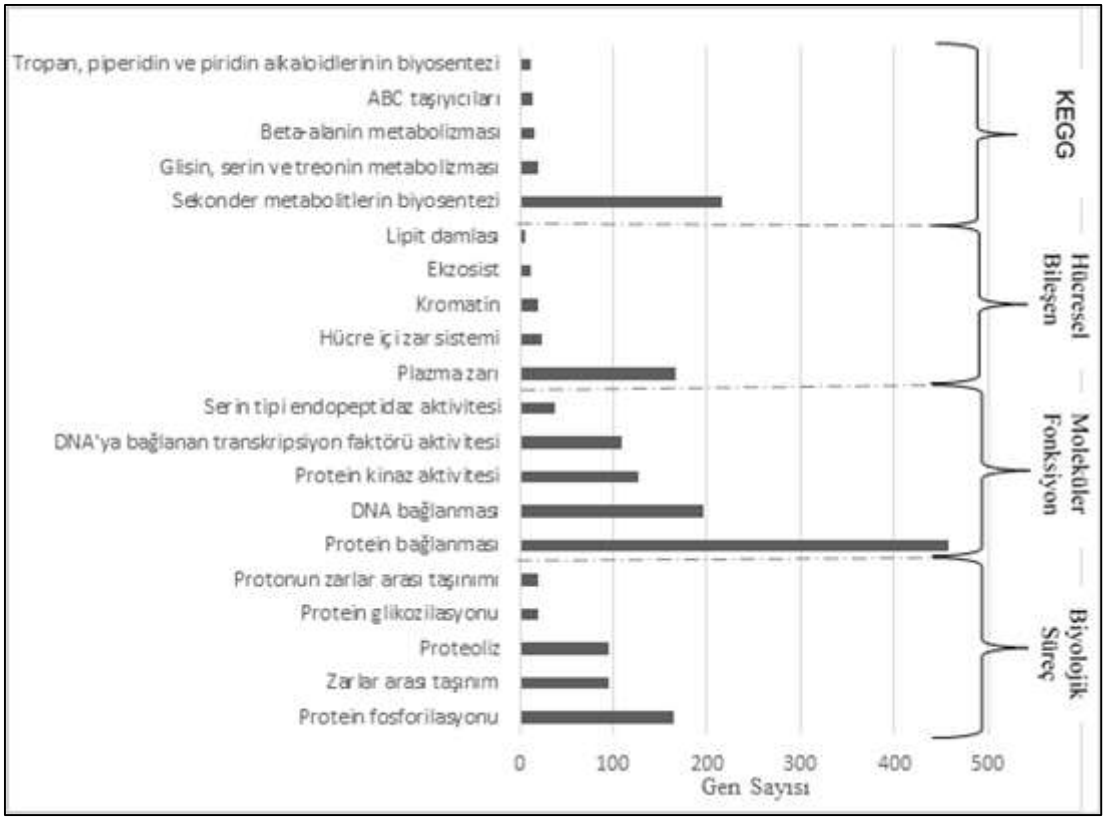
Ofis_1 çeşidinin gövde organı ile referans olarak Ofis_NP çeşidinin gövde organı karşılaştırmasına yönelik ontoloji analizi yapılmıştır. Hipometilasyonla ilişkili en yaygın terimler Şekil 4.77'da, hipermetilasyonla ilişkili en yaygın terimler ise Şekil 4.78'de gösterilmiştir.

BIA açısından zengin iki çeşidin gövde organları arasındaki DMR'lerin özellikle membranla ilişkili terimlerin zenginleştiği gözlenmiştir. İki BIA açısından zengin çeşidin gövde organlarının karşılaştırmalı analizinde tanımlanan hipermetillenmiş DMR'lerin GO analizi, alt hücresel lokalizasyona ilişkin belirgin modelleri ortaya koymuştur.

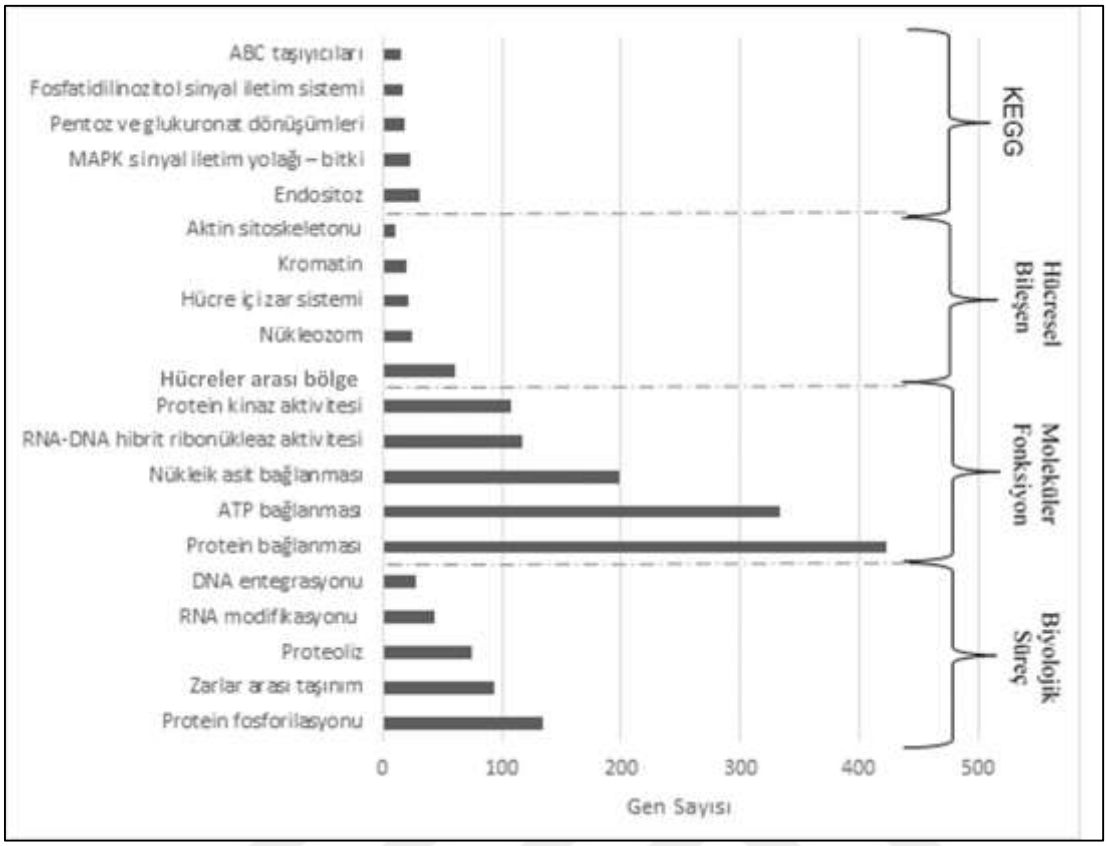
BIA açısından zengin iki çeşidin gövde organları karşılaştırıldığında Ofis_1 çeşidinde hipometillenmiş DMR'ler "plazma zarı" terimi ile anlamlı biçimde zenginleşirken, hipermetilasyon ise daha çok "hücreler arası bölge" ile ilişkili bölgelerde yoğunlaşmıştır. Bu bulgular alkaloid biyosentezi ile ilişkili hücresel bölünmeyi etkileyebilecek çeşitlere özgü epigenetik değişiklikleri işaret etmiştir. BIA bileşik çeşitliliğinin en güçlü şekilde etkilediği

yolak ise “endositoz” olmuştur. Noskapin açısından zengin çeşide kıyasla morfin açısından zengin çeşitte “endositoz” yolaklarıyla ilişkili genlerin hipermetillenmiş olduğu belirlenmiştir. Bu durum artan morfin biyosenteziyle ilişkili olarak endositozla ilişkili genlerin epigenetik baskılanmasına işaret etmiştir.

Bu karşılaştırmanın yolak zenginleştirme analizindeki diğer dikkat çekici bulgu Ofis_NP çeşidine kıyasla Ofis_1 çeşidinde *“*MAPK sinyal iletim yolağı-bitki*”* teriminin baskılanmış olduğu görülmüştür. Bu da Ofis_1 çeşidinde morfin gibi alkaloidin, güçlü sitotoksik özellikleri sayesinde bitki için kimyasal savunmada önemli bir rol oynadığını göstermiştir.



Şekil 4.77. ONPG_O1G hipometilasyon GO terimleri



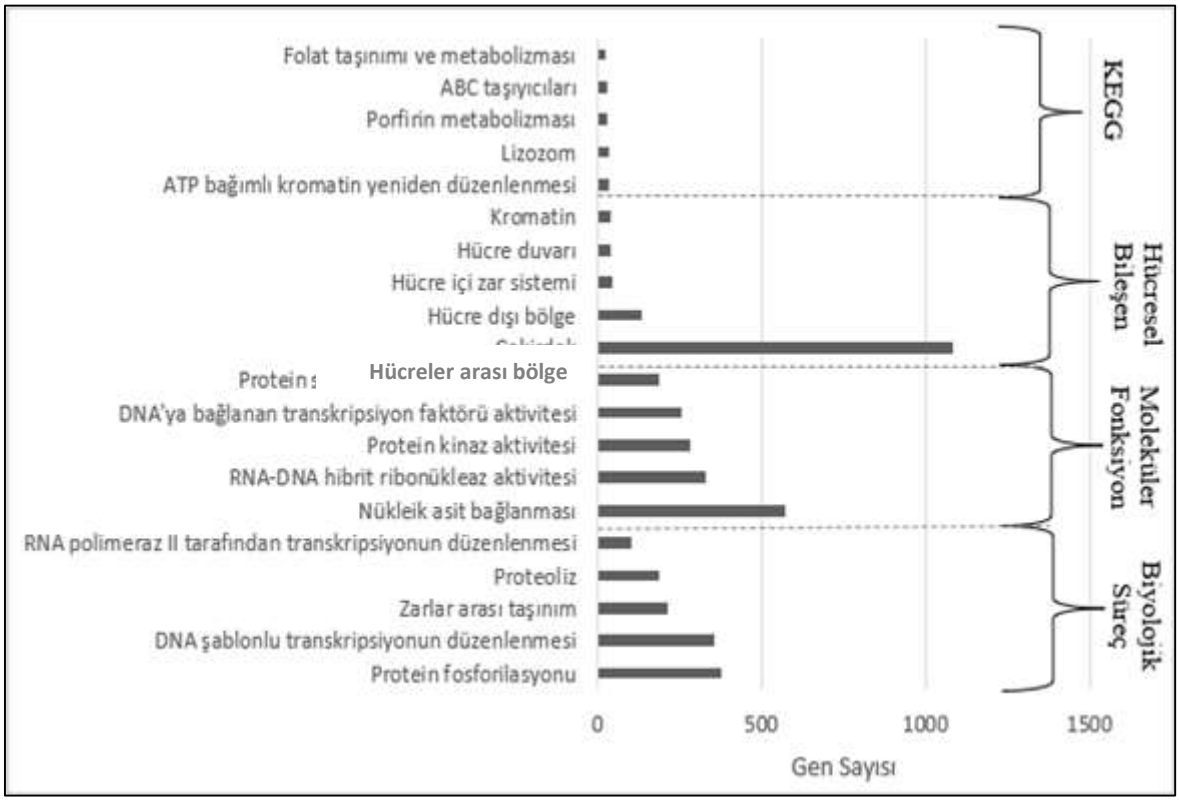
Şekil 4.78. ONPG_O1G hipermetilasyon GO terimleri

Ofis_96 Kapsül / Ofis_1 Kapsül

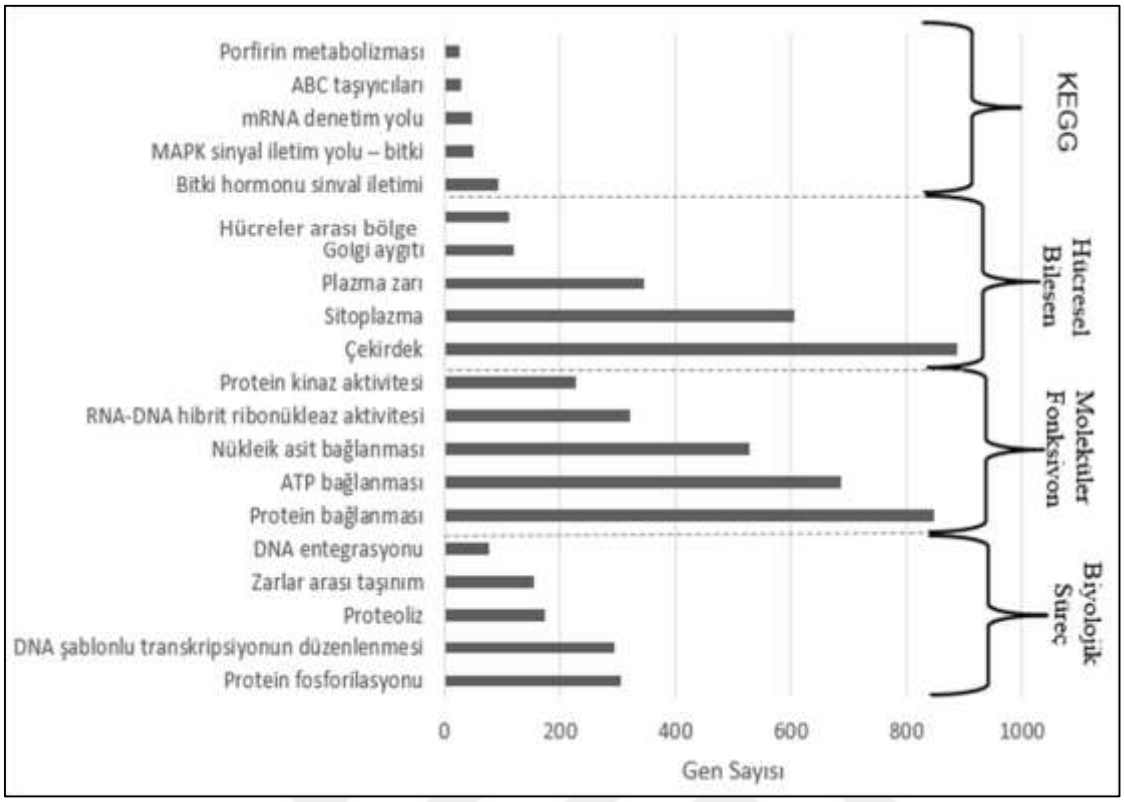
Ofis_1 çeşidinin kapsül organı ile referans olarak alınan kontrol grubu olan Ofis_96 çeşidinin kapsül organı karşılaştırmasına yönelik ontoloji analizi yapılmıştır. Hipometilasyonla ilişkili en yaygın terimler Şekil 4.79'da, hipermetilasyonla ilişkili en yaygın terimler ise Şekil 4.80'de gösterilmiştir.

Bu karşılaştırmada kontrol grubuna kıyasla Ofis_1 çeşidi kapsül organında hipometilasyon açısından dikkat çeken BS terimi *"*protein fosforilasyonu*"* olmuştur. BIA açısından zengin Ofis_1 çeşidinin kapsül organında hipometillenmiş DMR'ler arasında en zenginleşmiş terim *"*çekirdek*"* HB terimi olduğu bulunmuştur. BS ve HB terimleriyle bağlantılı olarak MF terimlerinden *"*nükleik asit bağlanması*"* nda anlamlı bir zenginlik görülmüştür. Ofis_1 çeşidinin kapsül organında hipometillenmiş DMR'lerin yolak analizinde en fazla zenginleşen yolak "ATP bağımlı kromatin yeniden şekillendirilmesi" belirlenmiştir. Yolak zenginleştirme analizindeki diğer dikkat çekici bulgu olarak kontrol grubuna kıyasla Ofis_1

çeşidinin kapsül organında "bitki hormonu sinyal iletimi" ve *"*MAPK sinyal iletim yolağı-bitki*"* terimlerinin baskılanmış olduğu görülmüştür.



Şekil 4.79. O96K_O1K hipometilasyon GO terimleri

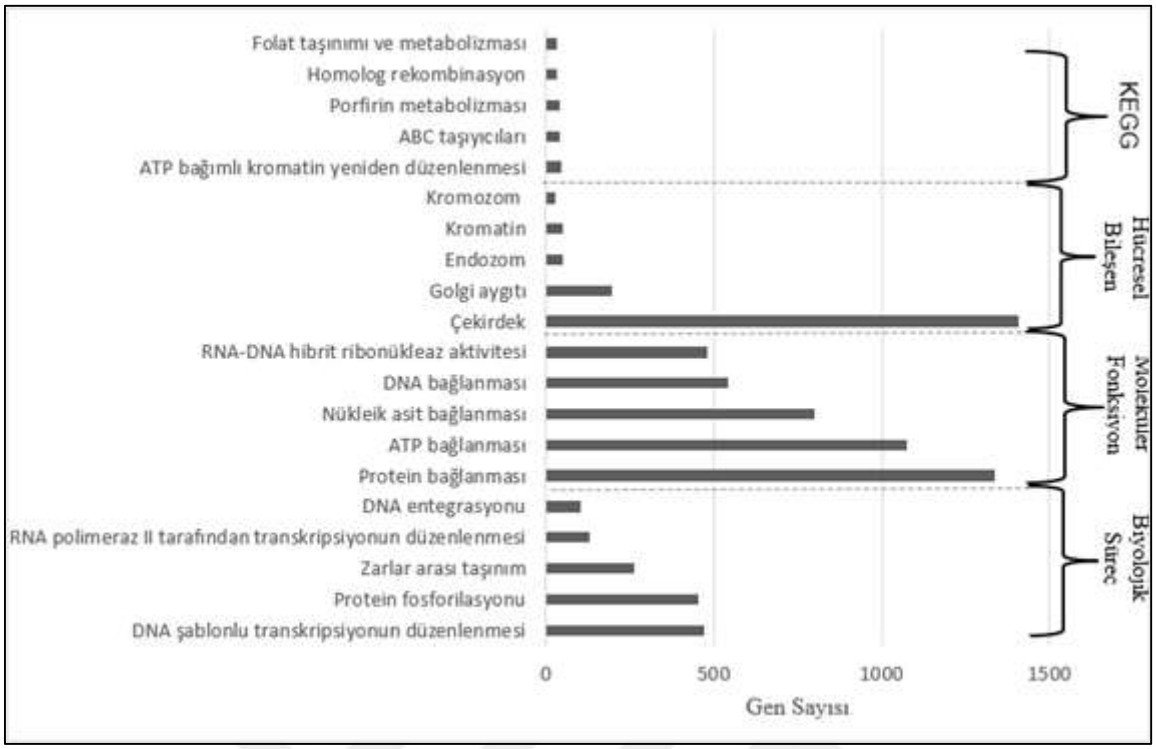


Şekil 4.80. O96K_O1K hipermetilasyon GO terimleri

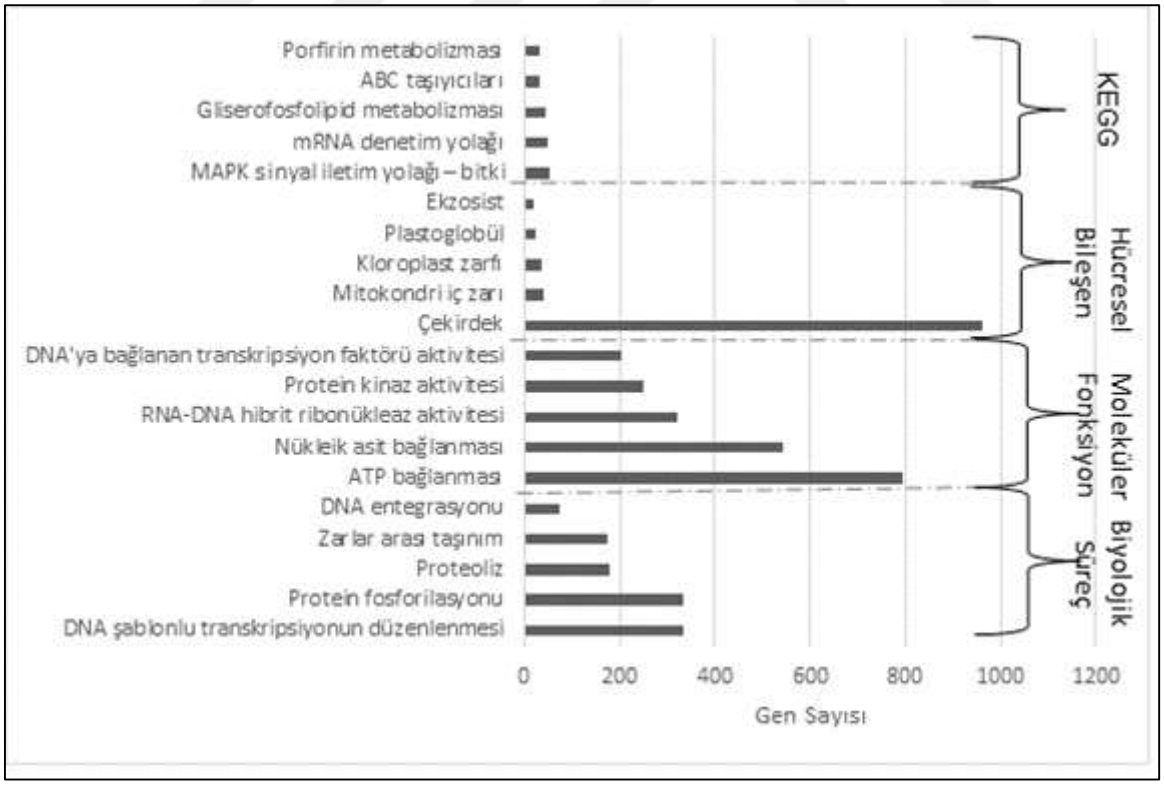
Ofis_96 Kapsül / Ofis_NP Kapsül

Ofis_NP çeşidinin kapsül organı ile referans olarak alınan kontrol grubu olan Ofis_96 çeşidinin kapsül organı karşılaştırmasına yönelik ontoloji analizi yapılmıştır. Hipometilasyonla ilişkili en yaygın terimler Şekil 4.81'da, hipermetilasyonla ilişkili en yaygın terimler ise Şekil 4.82'de gösterilmiştir.

Bu karşılaştırmada kontrol grubuna kıyasla Ofis_NP çeşidi kapsül organında hipometilasyon açısından dikkat çeken BS terimleri "DNA şablonlu transkripsiyonun düzenlenmesi*"* ve *"*protein fosforilasyonu*"*, HB terimi *"*çekirdek*"* olarak en zenginleşmiş terimler arasında bulunmuştur. BS ve HB terimleriyle bağlantılı olarak MF terimlerinden *"*protein bağlanması*"*nda anlamlı bir zenginlik görülmüştür. Ofis_NP çeşitlerinin kapsül organlarında hipometillenmiş DMR'lerin yolak analizinde ise en fazla zenginleşen yolak "ATP bağımlı kromatin yeniden düzenlenmesi" olarak belirlenmiştir. Yolak zenginleştirme analizinde kontrol grubuna kıyasla Ofis_NP çeşidinin kapsül organında *"*MAPK sinyal iletim yolağı-bitki*"* teriminin baskılanmış olduğu görülmüştür.



Şekil 4.81. O96K_ONPK hipometilasyon GO terimleri



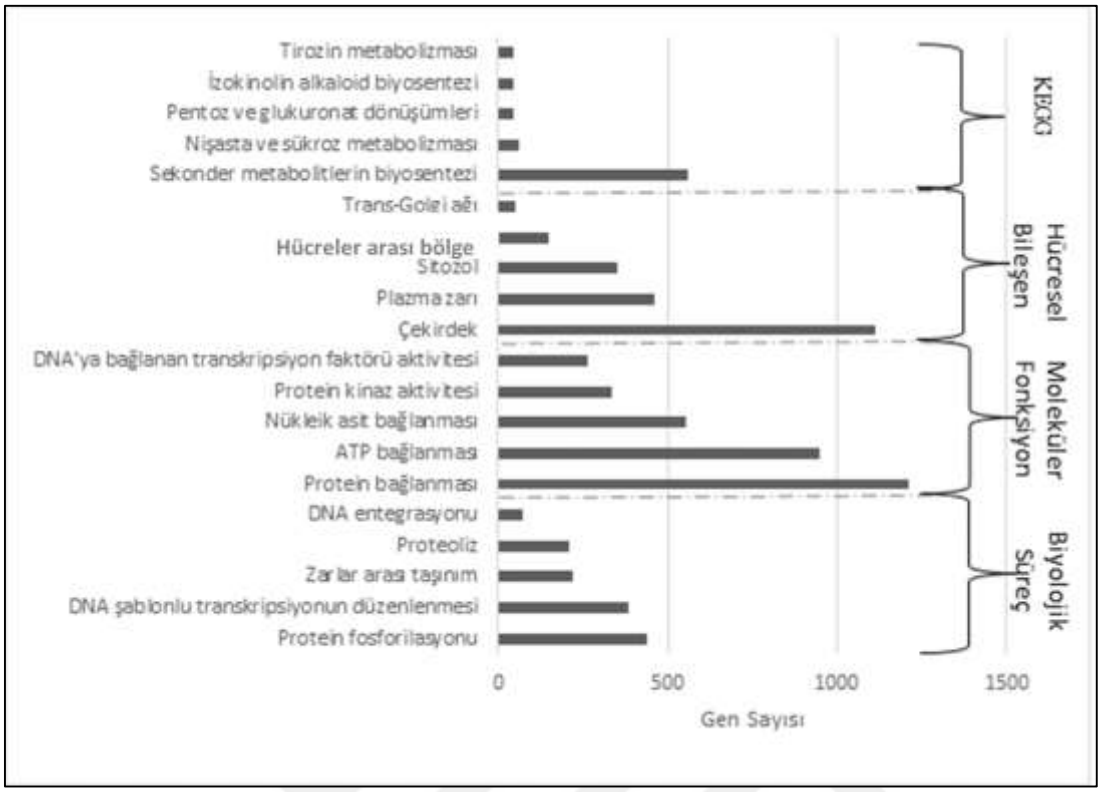
Şekil 4.82. O96K_ONPK hipermetilasyon GO terimleri

Ofis_NP Kapsül / Ofis_1 Kapsül

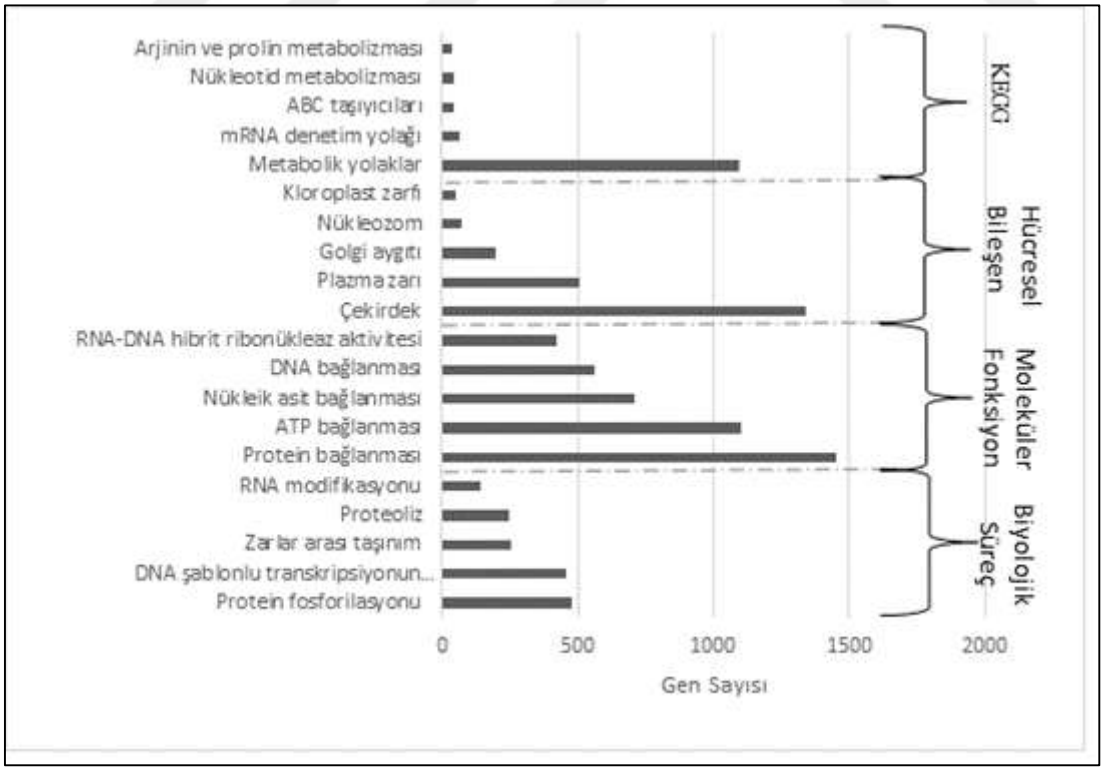
Ofis_1 çeşidinin kapsül organı ile referans olarak alınan noskapince zengin olan Ofis_NP çeşidinin kapsül organı karşılaştırmasına yönelik ontoloji analizi yapılmıştır. Hipometilasyonla ilişkili en yaygın terimler Şekil 4.83'da, hipermetilasyonla ilişkili en yaygın terimler ise Şekil 4.84'de gösterilmiştir.

Ofis_NP çeşidine kıyasla Ofis_1 çeşidinin kapsül organında "Golgi aygıtı" HB terimi hipermetillenmiş DMR'ler arasında anlamlı biçimde zenginleşmiştir. Bu zenginleşme Golgi ile ilişkili süreçlerin potansiyel epigenetik düzenlemesini ve bunun hücresel taşıma ile işleme yollarındaki değişikliklerle bağlantılı olabileceğini göstermiştir.

Alkaloid açısından zengin örnekler karşılaştırıldığında en fazla zenginleşen yolak, Ofis_NP'ye göre Ofis_1 kapsüllerinde "sekonder metabolitlerin biyosentezi" yolunun hipometilasyon gösterdiği saptanmıştır. Dikkat çekici bir diğer bulgu Ofis_1'e kıyasla Ofis_NP çeşidinin kapsül organında "metabolik yolaklar" ile ilişkili bölgelerde belirgin bir hipometilasyonun gözlenmiştir. Bu durum özellikle, morfince zengin çeşide kıyasla Ofis_NP çeşidinde noskapin biyosentezinde yer alan henüz tanımlanmamış bazı ara yolakların varlığına işaret etmiştir.



Şekil 4.83. ONPK_O1K hipometilasyon GO terimleri

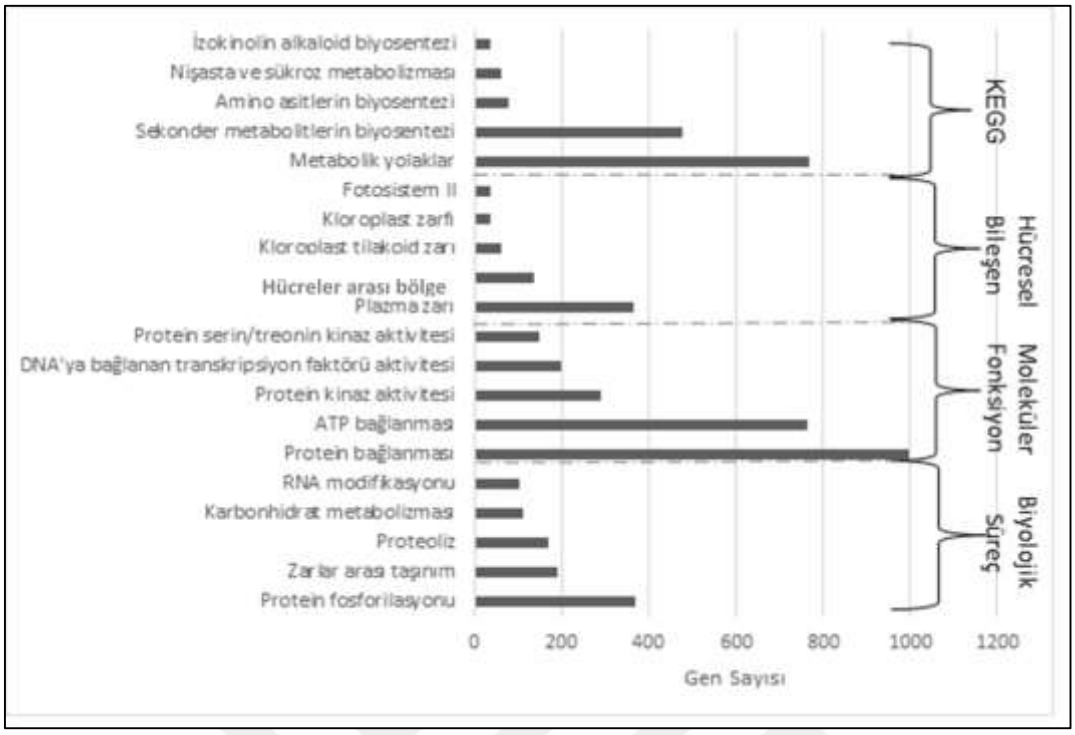


Şekil 4.84. ONPK_O1K hipermetilasyon GO terimleri

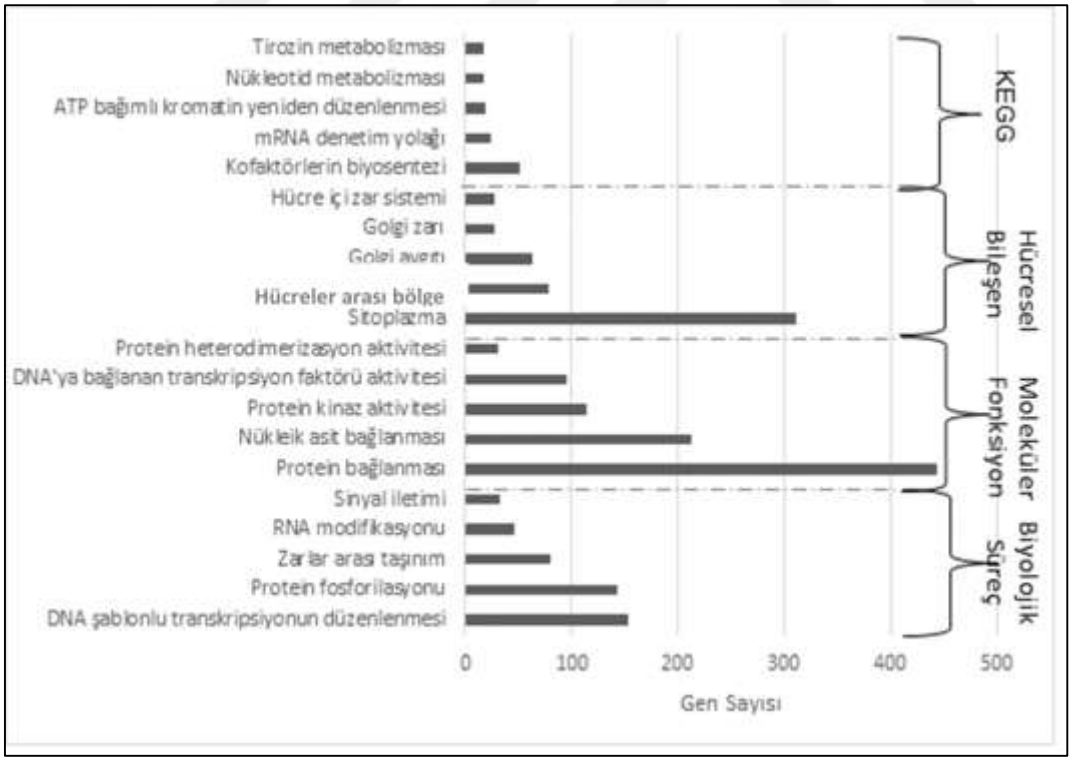
Ofis_1 Kapsül / Ofis_1 Gövde

Ofis_1 çeşidinin kapsül organı ve referans olarak alınan gövde organı karşılaştırmasına yönelik ontoloji analizi yapılmıştır. Hipometilasyonla ilişkili en yaygın terimler Şekil 4.85'da, hipermetilasyonla ilişkili en yaygın terimler ise Şekil 4.86'de gösterilmiştir.

Ofis_1 çeşidinin gövde organında "plazma zarı" terimi en baskın HB terimi olarak tanımlanmıştır. Özellikle gövde organında hipometillenmiş DMR'lerle "plazma zarı" terimi ilişkiliyken kapsül organında "sitoplazma" terimi zenginleşmiştir. Buna karşılık Ofis_1 çeşidinde dikkate değer bir şekilde, fotosentetik aktiviteyle yakından ilişkili olan "karbonhidrat metabolizması" BS teriminin, en sık tanımlanan hipometillenmiş DMR ile ilişkili kategoriler arasında anlamlı biçimde zenginleştiği gözlenmiştir. Bu bulgu hipometillenmiş bölgelerde "nişasta ve sükroz metabolizması" KEGG yolunun aşırı temsil edilmesiyle desteklenmiştir. Böylece Ofis_1 gövde organında enerji metabolizmasının olası rolü vurgulanmıştır. Alkaloid biyosentezinin yüksek enerji gereksinimi göz önüne alındığında bu bulgular fotosentez yoluyla elde edilen karbonhidrat yollarının bu süreci destekleyebilecek birincil metabolik kaynaklar olabileceğini düşündürmüştür. Özellikle Ofis_1 çeşidinde fotosentezle ilişkili terimlerde belirgin hipometilasyon, fotosentetik verimliliğin epigenetik olarak düzenlenmiş bir şekilde arttırılabileceğini ve bunun da daha yüksek morfin biyosentezine katkı sağlayabileceğini düşündürmüştür. Bu bulgular *Papaver somniferum* çeşitleri arasında gözlenen fizyolojik ve biyokimyasal çeşitliliğin epigenetik temeline ışık tutan çeşide özgü epigenetik modülasyonları ortaya koymuştur.



Şekil 4.85. O1K_O1G hipometilasyon GO terimleri

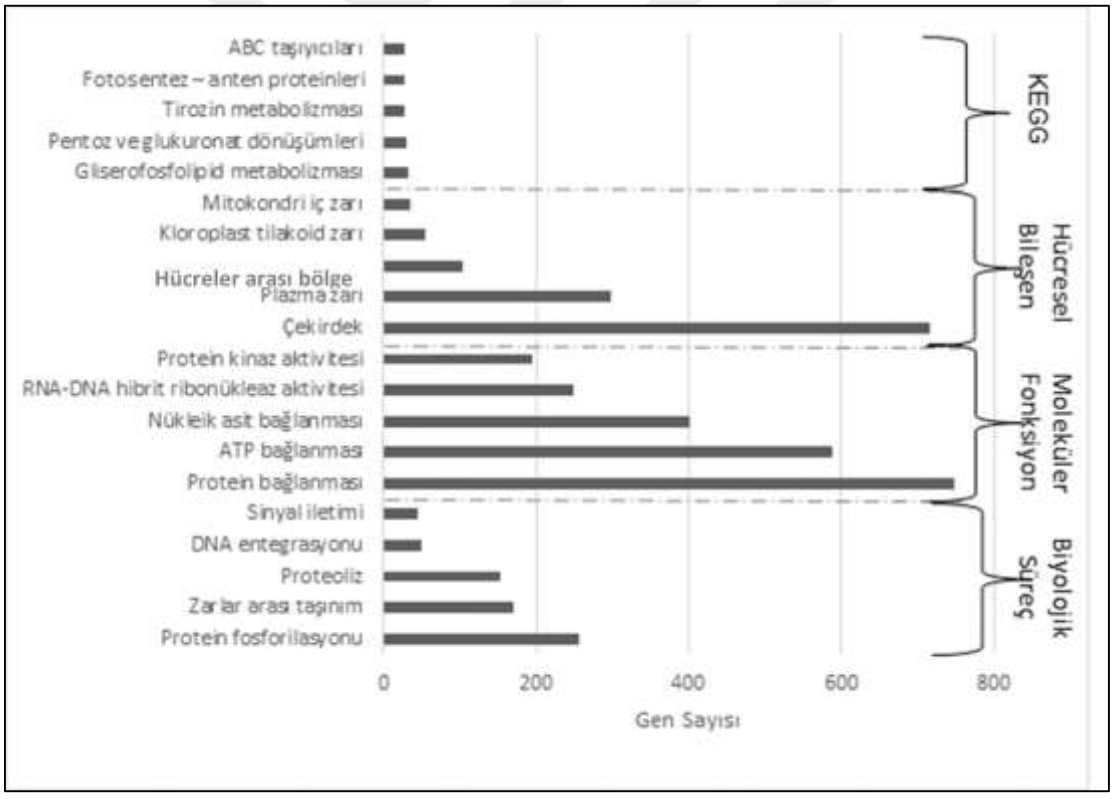


Şekil 4.86. O1K_O1G hipermetilasyon GO terimleri

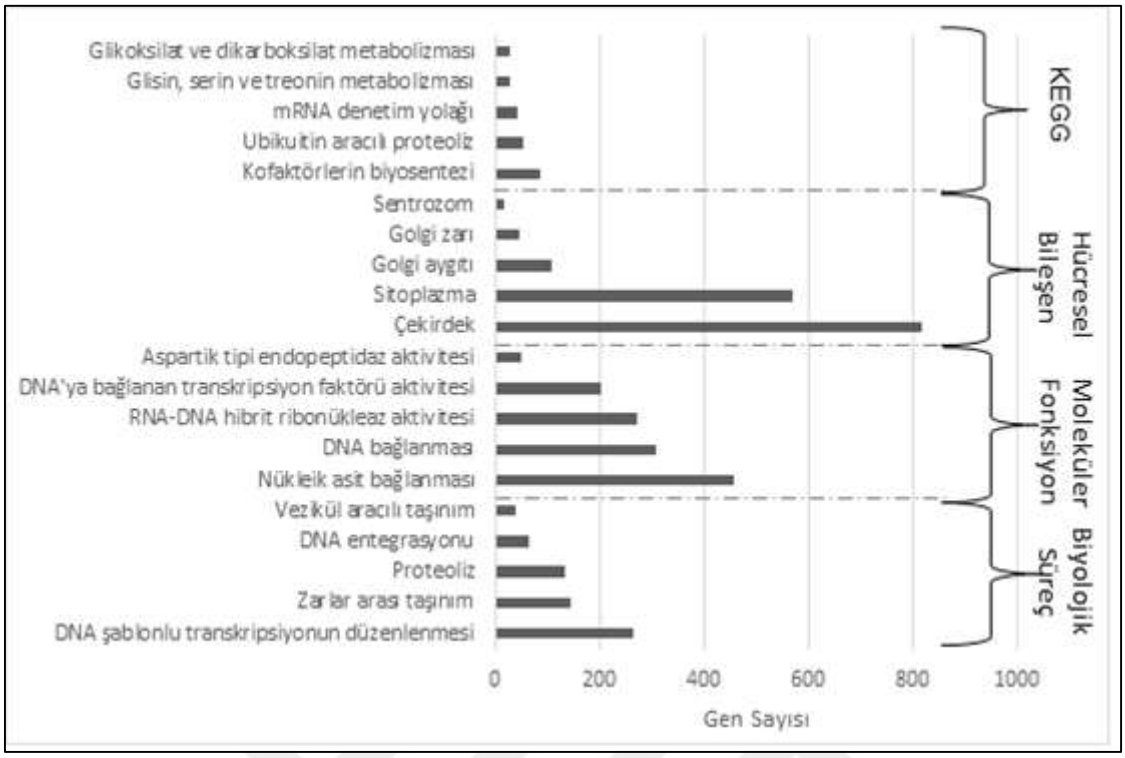
Ofis_96 Kapsül / Ofis_96 Gövde

Kontrol grubu olan Ofis_96 çeşidinin kapsül organı ve referans olarak alınan gövde organı karşılaştırmasına yönelik ontoloji analizi yapılmıştır. Hipometilasyonla ilişkili en yaygın terimler Şekil 4.87'da, hipermetilasyonla ilişkili en yaygın terimler ise Şekil 4.88'de gösterilmiştir.

Organ bazlı karşılaştırmada Ofis_96 çeşidinde kapsüle göre gövde organlarında hipometillenmiş DMR'ler için en zengin BS terimleri sırasıyla "protein fosforilasyonu", "zarlar arası taşınım" ve "proteoliz" öne çıkmıştır. BS terimleriyle bağlantılı olarak MF terimlerinden "protein bağlanması" ve "ATP bağlanması" nda anlamlı bir zenginlik görülmüştür.



Şekil 4.87. O96K_O96G hipometilasyon GO terimleri

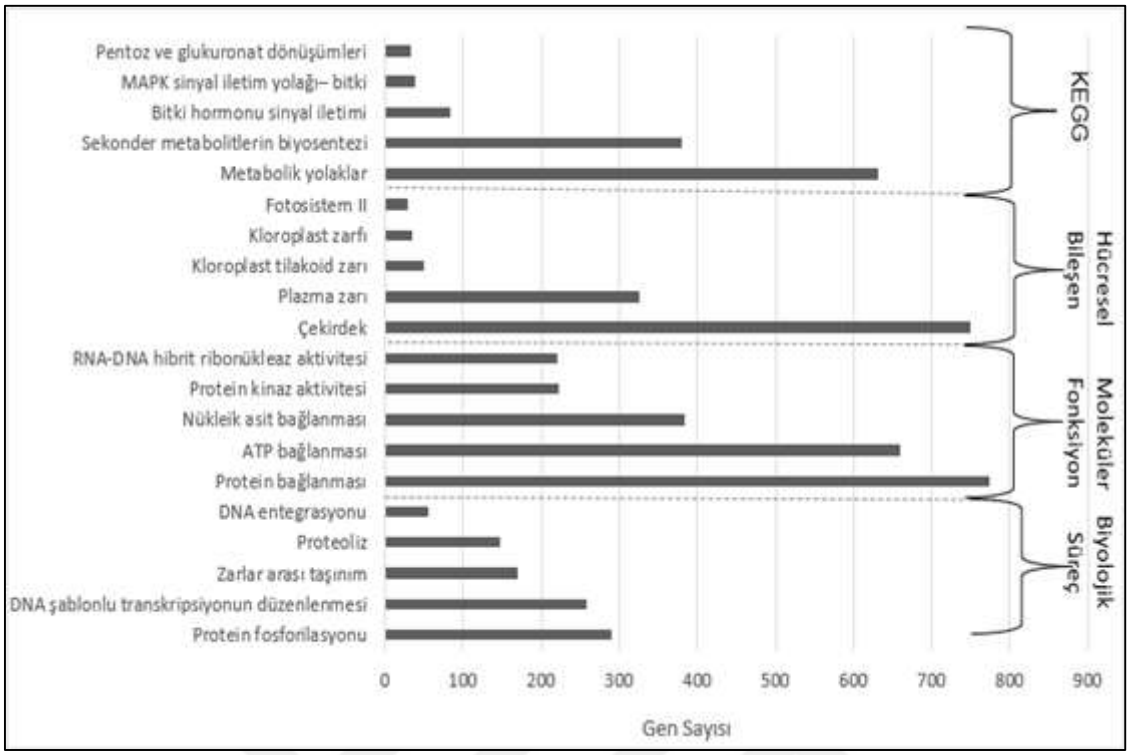


Şekil 4.88. O96K_O96G hipermetilasyon GO terimleri

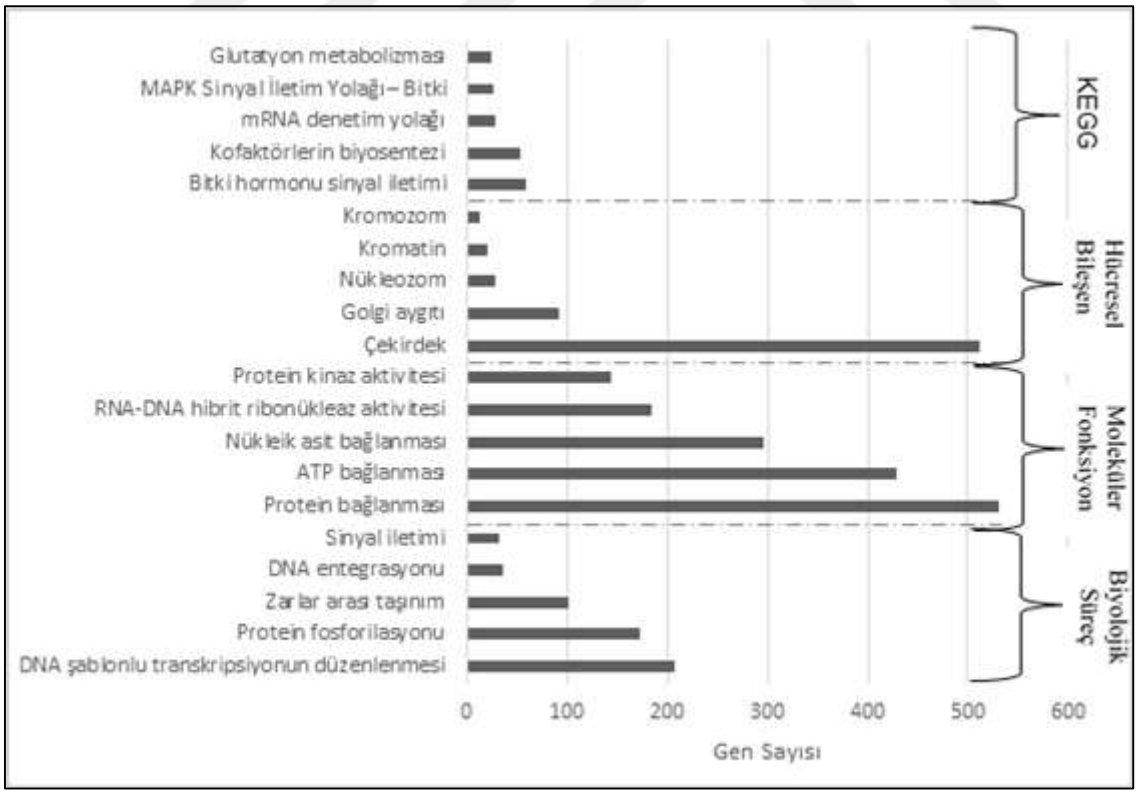
Ofis_NP Kapsül / Ofis_NP Gövde

Ofis_NP çeşidinin kapsül organı ve referans olarak alınan gövde organı karşılaştırmasına yönelik ontoloji analizi yapılmıştır. Hipometilasyonla ilişkili en yaygın terimler Şekil 4.89'da, hipermetilasyonla ilişkili en yaygın terimler ise Şekil 4.90'de gösterilmiştir.

Ofis_NP gövde organlarında kapsül organına kıyasla hipometillenmiş DMR'lerle ilişkili en zengin BS terimleri sırasıyla "protein fosforilasyon", "DNA şablonlu transkripsiyonun düzenlenmesi ", "zarlar arası taşınım" ve "proteoliz" olmuştur. HB terimi olarak "çekirdek" Ofis_NP çeşidi gövde organında en belirgin HB terimi olarak "çekirdek" öne çıkmıştır. HB ve BS terimleriyle bağlantılı olarak MF terimlerinden "protein bağlanması" ve "ATP bağlanması" nda anlamlı bir zenginlik görülmüştür. Yolak analizinde ise *"*metabolik yolaklar*"* terimi dikkati çekmiştir.



Şekil 4.89. ONPK_ONPG hipometilasyon GO terimleri



Şekil 4.90. ONPK_ONPG hipermetilasyon GO terimleri

Analizler, daha ayrıntılı bir şekilde gen ifadesinin düzenlenmesinde kritik rol oynayan promotör bölgelerine odaklanılarak yürütülmüştür.

4.8.8. Promoter bölgelerinde DMR ile ilişkili genlerin gen ontolojisi analizi

Promoter bölgelerindeki DNA metilasyonunun gen ifadesini düzenlediği iyi bilinmektedir ve bu epigenetik modifikasyon çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde temel bir mekanizma olarak görev yapmaktadır [174]. Bu bağlamda genom bölgeleri düzeyindeki analizler daha da detaylandırılmış ve özellikle promoter bölgelerine odaklanılarak bir Gen Ontolojisi (GO) zenginleştirme analizi gerçekleştirilmiştir.

Kontrol grubuna kıyasla alkaloid açısından zengin çeşitlerin gövde organlarında, genom genelinde gözlemlenen modelleri yansıtarak “protein fosforilasyonu” (BS) ve “plazma zarı” (HB) terimlerinin promoter bölgelerinde en zenginleşmiş terimler olduğu belirlenmiştir. Bu terimler, sinyal iletimi ve membranla ilişkili süreçlerin alkaloid sentezindeki kritik rollerine işaret etmiştir. Ayrıca Ofis_NP ile karşılaştırıldığında, Ofis_1 gövde organında hipermetillenmiş DMR’lerde “hücreler arası bölge” (HB) ve “plazma zarı” (HB)terimlerinin zenginleştiği gözlenmiştir. Bu durum iki çeşit arasındaki metabolik aktivite farklılıklarına katkı sağlayabilecek hücre dışı matriks ve sinyal yollarındaki değişikliklere dikkati çekmiştir. Bir diğer bulgu olarak, organ karşılaştırmalarında tüm çeşitlerin gövde organlarında hipometillenmiş DMR’ların “fotosentez, fotosistem I'de ışık toplama” (BS) terimiyle ilişkili anlamlı bir şekilde zenginleştiği görülmüştür. Bu bulgu gövde organlarında beklenen aktif fotosentetik süreçle örtüşmüştür. Özellikle alkaloid üretimi için gerekli olan enerjinin sağlanması açısından bu bulgu fizyolojik gereklilikle uyumlu olduğu görülmüştür.

Kontrol grubuna kıyasla Ofis_1 çeşidi kapsül organında, “fotosistem II”, “kloroplast zarı “, “fotosistem I” ve “plastoglobül” HB terimlerinin hipometilasyon açısından en fazla temsil edilen ifadeler olduğu gözlenmiştir. Bu terimler, kloroplastla ilişkili yapıların bitkideki enerji ihtiyacına katkısını vurgulamakta; özellikle morfin açısından zengin çeşitlerde fotosentezin yüksek metabolik aktiviteyi desteklemedeki rolünü ön plana çıkarmıştır. Bunun yanı sıra KEGG yolak analizinde Ofis_NP’nin gövde organlarında Ofis_96’ya kıyasla “ribozom” yolunun hipometilasyon açısından anlamlı şekilde zenginleştiği belirlenmiştir. Bu bulgu söz konusu çeşitte artmış translasyonel düzenleme sürecine dikkati çekmiştir.

Bu detaylı bulgular yalnızca metabolik süreçlerin farklı düzeylerde düzenlenmesine ışık tutmakla kalmayıp aynı zamanda *P. somniferum* çeşitlerinde alkaloid biyosentezi, hücresel taşınım ve enerji üretimi süreçlerini yönlendiren epigenetik mekanizmaların daha derinlemesine anlaşılmasına da katkı sağlamıştır.

Gen ontolojisi bulgularına dayanarak elde edilen veriler üzerinden detaylı anotasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.9. Anotasyon Analizi

Bu çalışmada, her bir karşılaştırma grubu için tespit edilen DMR'lerin detaylı tanımlanması amacıyla ilgili bölgelerin anotasyon analizleri yapılmıştır.

4.9.1. Organ bazlı DMR'lerin anotasyonu analizi

Üç çeşidin tamamında gen ifade düzeylerinin kapsül organlarına kıyasla gövde organlarında daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu kapsamda ABC taşıyıcıları, F-box proteinleri, sitokrom P450'ler ve pentatrikopeptid tekrar içeren proteinler gibi genlerin ifade düzeylerinin tüm çeşitlerin gövde organlarında üç katına kadar artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu gen aileleri işlevsel olarak çeşitlilik göstermelerine rağmen; sekonder metabolizma, stres yanıtları ve hücresel düzenleme ile yaygın olarak ilişkilidir. Gövde organlarında koordineli olarak ifade artışı görülmesi bu genlerin, özellikle BIA gibi özel metabolitlerin biyosentezi, taşınımı ve düzenlenmesini destekleyen entegre bir rol üstlendiklerine işaret etmiştir. Biyosentezin esas olarak gövde organlarında gerçekleştiği beklendiğinden analiz sonuçları bu beklentiyi doğrulamıştır.

Buna ek olarak WRKY transkripsiyon faktörünün ekspresyon düzeyinin, Ofis_96 ve Ofis_1 çeşitlerinin gövde organlarında yaklaşık 20 kat artış göstermiştir. Buna karşın Ofis_NP' de anlamlı bir yukarı regülasyon gözlenmediği belirlenmiş olup, bu durum özellikle dikkat çekicidir olmuştur. Analizler, daha yüksek metilasyon düzeyine (≥%50) sahip bölgeler üzerinde odaklanarak daha da detaylandırılmıştır. Bu inceleme, benzer şekilde gen ailelerinin ifade artışına dair bir model ortaya koymuştur. Bu bulgular, söz konusu gen ailelerinin organlara özgü biçimde anlamlı epigenetik düzenlemelere tabi olduğunu göstermiştir.

4.9.2. Çeşit bazlı DMR'lerin anotasyon analizi

"ABC taşıyıcı", "pürin permeaz", "çinko parmak proteini" ve "F-box proteini" genlerinin ifade düzeyleri metabolit açısından zengin her iki çeşitte de kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu belirlenmiştir. Analizler ayrıca, fotosentez sürecinde görev alan genlerin ifadelerinde dikkate değer değişiklikleri de ortaya koymuştur. "fotosistem II", "şeker taşıyıcı proteinler", "pentatrikopeptid tekrar içeren proteinler" ve "sitokrom P450" gibi genler metabolit açısından zengin çeşitlerde kontrol grubuna göre daha yüksek ifade artışı göstermiştir. Ayrıca, "LHCII' ye ait klorofil a-b bağlayıcı protein" geninin ifadesi, Ofis_1 çeşidinde kontrol grubuna göre artmıştır. Ancak bu artışa karşın özellikle Ofis_NP çeşidinin gövde organında anlamlı bir baskılanma gözlenmiştir.

Analizler, metilasyon düzeyi %50'yi aşan bölgeler üzerinde odaklanılarak çeşit düzeyinde daha ayrıntılı şekilde yürütülmüştür. WRKY ve MYB transkripsiyon faktörlerinin Ofis_1 ve Ofis_NP çeşitlerinde kontrol grubuna göre daha yüksek ifade düzeylerine sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, "F-box proteinleri" ve "sitokrom P450" genlerinin özellikle metabolit açısından zengin çeşitlerin gövde organlarında kontrol grubuna kıyasla daha yüksek ifade gösterdiği belirlenmiştir. "Pentatrikopeptid tekrar içeren proteinler" de özellikle Ofis_NP çeşitlerinde kontrol grubuna göre daha yüksek ifade sergilemiştir. Bu bulgular metabolit açısından zengin çeşitlerde beklenen yüksek biyosentez düzeylerini desteklemiştir. Ayrıca, yüksek metilasyon düzeyine sahip bölgelerdeki gen dağılımının bu çeşitlerde genel olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu da çeşide özgü epigenetik düzenlenmeyi pekiştirmiştir.

Promoter bölgelerinde yer alan DMR'larla ilişkili olarak anotasyon analizleri, ilişkili gen ifade modellerini belirlemek amacıyla daha da detaylandırılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla, alkaloid açısından zengin çeşitlerde "F-box proteini" genlerinin ifade düzeylerinde dikkate değer bir artış gözlenmiş ve bu durum, söz konusu genlerin sekonder metabolizmanın düzenlenmesindeki potansiyel rollerine işaret etmiştir. Metabolit açısından zengin iki çeşit (Ofis_1 ve Ofis_NP) karşılaştırıldığında ise, özellikle Ofis_1'in gövde organlarında "F-box proteini", "pentatrikopeptid tekrar içeren protein" ve "sitokrom P450" genlerinin belirgin şekilde ifade artışı olduğu tespit edilmiştir. Bu genler, translasyon sonrası düzenleme, RNA işlenmesi ve sekonder metabolizmaya özgü enzimatik modifikasyonlarla yakından ilişkili olup Ofis_1 çeşidinde bu genlerin yüksek ifadesi, sekonder metabolit biyosentez yollarında dinamik bir transkripsiyonel düzenlenmeye işaret etmiştir. Bu bulgular, söz konusu çeşitte

gözlenen artırılmış biyosentetik aktiviteyle tutarlıdır ve yüksek alkaloid üretiminin altında yatan epigenetik ve transkripsiyonel koordinasyonu desteklemiştir.

4.10. BIA Yolakta Görev Alan İyi Karakterize Edilmiş Genlerin Analizi

Haşhaş bitkisinde BIA biyosentez yolunda görev alan temel enzimler daha önceki çalışmalarda tanımlanmıştır. Bu çalışmada söz konusu enzimler arasında yer alan "tirozin/DOPA dekarboksilaz" ve "S-norkoklaurin sentaz" genlerinin Ofis_1 ve Ofis_NP çeşitlerinde kontrol grubuna kıyasla daha yüksek düzeyde ifade edildiği belirlenmiştir. Ayrıca, morfin biyosentez yolunda görev alan enzimlerden "kodein O-demetilaz" ve "salutaridinol 7-O-asetiltransferaz" genlerinin de Ofis_1 ve Ofis_NP çeşitlerinde kontrol grubuna göre artmış ifade düzeylerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Haşhaş, yapısal ve işlevsel açıdan geniş çeşitlilik gösteren BIA'ları sentezleyebilme yeteneği sayesinde farmasötik açıdan önemli bir bitki türüdür [15]. Bugüne kadar majör alkaloidlerden olan morfin, noskapin ve kodeinin dahil olduğu BIA'ların biyosentezi ve bitkide birikimi ile ilişkili biyolojik süreçlerin aydınlatılmasına yönelik kapsamlı çalışmalar yürütülmüştür. Bu alanda gerçekleştirilen araştırmalar, çok basamaklı ve karmaşık alkaloid biyosentez yolaklarının anlaşılmasında gen düzeyindeki değişimlerin önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır [10, 22, 39, 56, 57, 146, 175-178]. Öte yandan epigenetik mekanizmaların da sekonder metabolit biyosentezinde önemli değişimlere yol açtığı bildirilmiştir [63, 179]. Bu kapsamda da önemli bir sekonder metabolit kaynağı olan haşhaş bitkisinde de farklı epigenetik mekanizmalara yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

MSAP tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada haşhaşın farklı çeşitleri arasında DNA metilasyon profilleri karşılaştırılmış; tebain biyosentezinde görevli gen bölgelerindeki epigenetik düzenlemeler incelenmiş ve alkaloid içeriği farklı olan çeşitlerde farklı metilasyon profilleri olduğu ortaya konmuştur [97]. Benzer şekilde bir diğer çalışmada da altı farklı haşhaş çeşidinin çeşit ve organ düzeyindeki DNA metilasyon farklılıklarının BIA içeriğindeki değişimlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir [5]. Başka bir çalışmada, haşhaş kapsül organında BIA gen kümesinin ifadesini düzenleyen HB6 adlı transkripsiyon faktörünün önemli bir rol oynadığı ve bu düzenlemenin kromatinin yapısal olarak daha açık bölgeleriyle ilişkili epigenetik bir mekanizma üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir [180]. Bir diğer çalışmada haşhaşta küçük RNA kütüphanelerinin sekanslanmasıyla 316 tane bilinen ve 11 tane de yeni miRNA tespit edilmiş olup organa özgü farklı ifade düzeylerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, miRNA hedef transkriptlerinin tanımlanmasıyla bu miRNA'ların BIA biyosentezinde rol oynayabileceği bildirilmiştir [181]. *P. somniferum* ve *P. bracteatum* türlerinin transkriptom verilerine dayalı olarak gerçekleştirilen bir çalışmada ise, belirli bir miRNA kümesi tanımlanmış ve bu miRNA'ların organa özgü ifade düzeyleri ortaya konmuştur. Elde edilen bulgular, bazı miRNA'ların belirli organlarda daha aktif olduğu ve bu farklılaşmanın BIA biyosentez süreciyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir [182].

Bu çalışmalar farklı epigenetik mekanizmaların sekonder metabolit biyosentezinde rol oynadığını ortaya koysa da, bu ilişkilerin kapsamının ve düzenleyici ağların tam olarak anlaşılabilmesi için ayrıntılı analizlere ihtiyaç vardır.

Bu doğrultuda, bu tez çalışmasında TMO tarafından geliştirilmiş ve BIA içerikleri birbirinden farklı haşhaş çeşitlerinin gövde ve kapsül organlarında epigenetik mekanizmalardan en çok görülen DNA metilasyon paternleri ilk kez belirlenmiştir. Tez kapsamında haşhaş örneklerinin metilasyon profillerinin çıkarılması ve aralarındaki farklılıkları tespit etmek amacıyla Bisülfit dizileme (Bi-seq) yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen veriler biyoinformatik analizlerle işlenmiş ve haşhaşın epigenomik yapısının anlaşılmasına yönelik değerli bilgiler sunmuştur. Bu çalışmada iki temel kapsamda veriler elde edilmiştir: İlki, haşhaş bitkisinin epigenom yapısının ilk kez kapsamlı biçimde ortaya konması; ikincisi ise DNA metilasyonunun belirli genler ve biyosentetik yolaklar üzerinden BIA sentezine nasıl yansıdığının ortaya çıkarılmasıdır.

İlk kapsamda elde edilen veriler doğrultusunda haşhaş örneklerinde genom metilasyon oranları %10-16 aralığında bulunmuştur. Bitkilerde genomun tamamının metillenmediği bilinmekte olup [183], bu durum genlerin büyük kısmının susturulmaması ve temel biyolojik süreçlerin aksatılmaması açısından önemlidir. Önceki çalışmalarda, *Arabidopsis thaliana* genomundaki metillenmiş sitozin (mC) yüzdesinin yaklaşık %5,8 olduğu, *Oryza sativa* örneklerinde %10-14 ve *Oryza glumaepatula* örneklerinde ise %8-15 arasında değiştiği bildirilmiştir [158, 159]. Bu çalışmada elde edilen genom metilasyon oranlarının literatürdeki veriler ile tutarlılık gösterdiği ortaya konmuştur.

Genomda metilasyon, her biri farklı biyolojik rollere sahip üç farklı desen bulunur (CpG, CpHpG ve CpHpH) ve farklı enzimler tarafından düzenlenirler [68]. Metilasyon desenleri, aynı türe ait farklı genotiplerde birbirlerine büyük ölçüde benzerdir ve genom stabilitesi açısından büyük değişimler beklenmez [76]. DNA metilasyonundaki büyük değişiklikler, kromatin yapısını etkileyerek genomun kararlılığını bozabilir [184, 185]. Nitekim literatürde de, aynı tür içerisindeki farklı genotiplerde genellikle epigenetik düzenlemenin büyük oranda korunduğu bildirilmiş olup [76, 186, 187], bu tez çalışmasında da Pearson korelasyon katsayısı ile haşhaş çeşitlerinde genel metilasyon desenlerinin benzer olduğu doğrulanmıştır. Desen yapısı çeşitler arasında benzer olmakla beraber metilasyon profillerinin çeşitlerin BIA içeriklerine bağlı olarak gruplandığı görülmüştür. Bu çalışmada

PCA analizleri sonucunda alkaloidce zengin çeşitlerin kontrol örneklerinden net bir biçimde ayrılması, BIA içeriklerinin epigenetik düzenleme süreçlerinden etkilendiği yönündeki hipotezimizi desteklemiştir.

Öte yandan desenlerin genomdaki dağılımları rastgele olmayıp, belirli bölgelerde farklı desenler daha yoğun yer almaktadır. Dolayısıyla genel metilasyon düzeylerinin yanı sıra, bu metilasyonun genom boyunca nasıl dağıldığı ve hangi metilasyon desenlerinin baskın olduğunun belirlenmesi önemlidir. CpHpH metilasyon artışının, bitkilerde transpozon aktivitesini baskılayarak genom bütünlüğü ve stabilitesinin korunmasına katkı sağladığı bildirilmiştir [160, 188]. Bir bitki genomunun yaklaşık %3 ila %80'i transpozon elementlerinden oluştururken [189] haşhaş genomununda bu oran yaklaşık %66'dır [22]. Literatür ile uyumlu olarak, bu çalışmada tüm örneklerin genomunda CpHpH metilasyonunun yüksek düzeyde olduğu (ortalama %67) belirlenmiş olup, haşhaş genomundaki yüksek transpozon yoğunluğu ile yakından ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde, şeker pancarı (*Beta vulgaris*) genomunda yapılan bir çalışmada, özellikle transpozon elemanlarının yoğun olduğu DNA bölgelerinde yüksek seviyelerde CpHpH metilasyonu gözlenmiştir. Bu durum, CpHpH metilasyonunun transpozon baskılanmasındaki rolünü desteklemiştir [190]. Bir diğer çalışmada, mevsime bağlı olarak CpHpH metilasyonunun özellikle transpozon elemanlarınca zengin olan genler arası bölgelerde tespit edildiği bildirilmiş olup bu bulgu RNA yönlendirmeli DNA metilasyonu (RdDM) yolaklarının çevresel koşullara duyarlı işlevini desteklemektedir [191].

Genom stabilitesi açısından metilasyon desenlerinin genomdaki dağılımlarının yanısıra metilasyon oranları da önemli bir faktördür. Genomdaki metillenen bölgelerin tamamen metillenmediği farklı genomlarda yapılan çalışmalarla da ortaya konmuş olup [192-194], çalışmamızda elde edilen verilerle de doğrulanmıştır. Dolayısıyla her üç desen de aslında çok yüksek oranlarda metile değildir. Nitekim çalışmada üç desenin de yoğun olarak %25 metilasyonun altında olduğu, sadece küçük oranda yüksek düzeyde metillendiği görülmüştür. Buna karşın çalışmamızda ilginç bir biçimde CpG deseninde büyük oranda yüksek metilasyon düzeylerinde bir dağılım gözlenmiştir. Bitkilerde CpG metilasyonunun gen gövdelerinde (özellikle ekzonlarda) ve promotörlerde gen ifadesinin düzenleyici bir mekanizması olarak rol aldığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [69, 195-203]. Dolayısıyla

bu durum, CpG metilasyonunun gen baskılanmasına ve aktifleşmesine işaret eden çift yönlü bir epigenetik kontrol mekanizması olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada BIA içerikleri farklı olan çeşitler arasındaki ayrımı belirleyen metilasyon değişimleri, DMR analizleri ile incelenmiştir. Tüm örneklerin genom yapısında CpHpH metilasyonu yüksek düzeyde gözlemlenirken, örnekler arasındaki karşılaştırmalarda CpG metilasyonunun daha baskın olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, transkripsiyonel aktiviteyi etkilediği bilinen CpG metilasyonunun [190–194] çeşitler arasında gen ifadesi farklılıklarının epigenetik olarak şekillenebileceğine işaret etmiştir. Nitekim kontrol grubuna kıyasla alkaloidce zengin çeşitlerin gövde ve kapsül organlarında belirgin bir hipometilasyon gözlenmesi, ilgili genlerin ifade artışını yansıtmış ve buna bağlı olarak metabolit sentezindeki artışı desteklemiştir. Önceki çalışmalar hipometilasyon artışının gen ifadesini artırarak metabolit birikimini desteklediğini [204], kuraklık sırasında promotör bölgelerindeki hipometilasyonun ise sekonder metabolit biyosentezinde önemli bir enzim olan fenilalanin amonyak-liyaz (PAL) ifadesini artırdığı bildirmiştir [205].

Metabolit üretimi genomdaki farklı bölgelerin aktiviteleri ile ilişkilidir [63, 206]. Analizlerde üç metilasyon desenine ait DMR'ların en yoğun intergenik bölgelerde bulunması, hem genom stabilitesinin alkaloid sentezinde oynadığı rolü hem de transkripsiyonel düzenlemede önemli işlevleri olan düzenleyici elementlerin varlığını yansıtmaktadır [207]. Bu durum, genler ile birlikte genler arası bölgelerin önemini vurgulamaktadır. Benzer şekilde, literatürde gen dışı bölgelerdeki metilasyon varyasyonlarının önemli olduğu bildirilmiştir [208]. İntergenik bölgeleri takiben, metilasyon farklılıklarının, transkripsiyonun başlatılmasında temel düzenleyici rol oynayan promotör bölgelerde [171, 172] yoğunlaştığı görülmüş olup, bu durum gen ifadesinin organ ve çeşide özgü olarak epigenetik mekanizmalarla düzenlendiğini göstermektedir. Bununla birlikte metilasyon farklılıklarının, yalnızca intergenik veya promotör bölgelerle sınırlı kalmadığı özellikle CpG metilasyonunun ekzon bölgelerinde yoğunlaştığı görülmüştür. Ekzonlardaki CpG metilasyonu, promoter metilasyonundan farklı bir işlev gösterir. Promoter bölgelerindeki metilasyon gen ifadesinin başlatılması veya baskılanmasıyla ilişkilendirilirken [171, 172, 174], ekzon bölgelerindeki CpG metilasyonunun RNA polimeraz II'nin gen boyunca düzgün bir şekilde ilerlemesini kolaylaştırarak transkripsiyonun düzenli ve doğru biçimde gerçekleşmesine katkı sağladığı düşünülmektedir [209]. Elde edilen sonuçlar literatürle tutarlı biçimde, ekzon CpG

metilasyonunun alkaloid biyosentezinde görev alan genlerin düzenli ve dengeli ifade edilmesinde rol oynayabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada elde edilen ikinci temel kapsam, DNA metilasyonunun, hangi genler ve biyosentetik yolaklar aracılığıyla BIA sentezine yansıdığının ortaya çıkarılmasıdır. Bu kapsamda metilasyon farklılıklarının, gen ifadesi üzerindeki olası etkilerinin detaylı anlaşılması açısından DMR bölgelerinin hangi biyolojik süreçlerle ilişkili olabileceğini ortaya koymak amacıyla yapılan ontoloji analizleri son derece önemlidir. Bu çerçevede biyolojik süreç (BS), hücresel bileşen (HB) ve moleküler fonksiyon (MF) olmak üzere üç ontoloji kategorisinde incelenmiş ve yolak analizleri KEGG veri tabanından elde edilmiştir. Bu farklı ontoloji kategorilerdeki veriler, çeşitler ve organlar arasında BIA süreci ile ilgili detaylı bilgi sunmuştur. Buradaki karşılaştırma analizleri, BIA düzeyi yüksek çeşitlerin kontrol grubuna kıyası ve BIA düzeyi yüksek çeşitlerin birbirleriyle kıyası esas alınarak iki aşamada değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım, metilasyon değişimlerinin fonksiyonel etkilerini ve biyosentetik yolaklarla ilişkilerini sistematik biçimde ortaya koyarak, epigenetik farklılıkların BIA sentezine katkısını daha bütüncül bir şekilde değerlendirmemizi sağlamaktadır.

Yapılan analizler, BIA düzeyi yüksek çeşitlerin kontrol grubuna kıyasla gövde ve kapsül organlarında belirgin DNA metilasyon farklılıkları sergilediğini ortaya koymuştur. Bu doğrultuda kontrol grubunun gövde organına kıyasla yüksek alkaloid içeriğine sahip çeşitlerin gövde organlarında BS terimlerinden protein fosforilasyonu ile ilişkili DMR'ların belirgin şekilde öne çıktığı gözlenmiştir. Protein fosforilasyonu, en yaygın post-translasyonel modifikasyonlardan birisidir. Bu modifikasyon, protein kinazlar tarafından katalize edilir ve protein fosfatazlar tarafından tersine çevrilir. Protein kinazlar, ATP'den hedef proteindeki belirli amino asitlerin hidroksil gruplarına (serin, treonin veya tirozin) fosfor grubu aktarımını katalize ederek sinyal aktarmını gerçekleştirir [210]. Protein fosforilasyonu; protein aktivitelerini, protein–protein etkileşimlerini, hücre içi lokalizasyonu ve sinyal iletim kaskadlarını düzenleyerek bitki büyümesi ile gelişiminin yanı sıra biyotik ve abiyotik stres yanıtlarını kontrol eden temel bir mekanizmadır. Bu süreç, ilgili proteinlerin aktive edilmesi yoluyla gen ifadesinin artırılmasına aracılık eder [210-215]. DNA metilasyonu ise bu süreçlerle bütünleşik biçimde işleyen karmaşık bir ağın parçası olup, epigenetik düzenleme ile sinyal ağlarının koordine bir biçimde işlediğini göstermektedir [211]. Alkaloid bakımından zengin çeşitlerde fosforilasyon seviyelerinin kontrol örneğine

kıyasla daha yüksek olması, bu çeşitlerde toplam gen aktivitesinin arttığını göstermektedir. Dolayısıyla, BIA biyosentezinden sorumlu genlerin daha yoğun şekilde aktive olması, söz konusu çeşitlerin yüksek BIA içeriklerine sahip olmasını açıklamaktadır. Bunu destekler nitelikte, özellikle kontrol grubuna kıyasla Ofis_1 gövde organında KEGG yolaklarından metabolik yolaklar ve sekonder metabolit biyosentezi terimlerinde görülen zenginleşme, BIA üretiminde görev alan genlerin bu çeşitte daha yüksek aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur.

Moleküler Fonksiyon (MF) terimlerinden elde edilen bulgular da, haşhaş çeşitlerinde gözlenen alkaloid birikiminin fosforilasyonla ve ek olarak bununla ilişkili diğer yakın süreçlerle bağlantılı olduğunu göstermektedir. Sinyal iletimiyle bağlantılı olan protein bağlanması ve ATP bağlanması MF terimleri alkaloidce zengin çeşitleride tespit edilmiştir. Sinyal iletim sürecinde ilgili protein ATP'den aldığı fosfat grubunu etkileşime geçtiği diğer proteine aktarmaktadır [216-218]. Protein–protein etkileşimlerinde fosforlanmış amino asitleri tanıyan özel bağlanma bölgelerine (örneğin fosfo-bağlayıcı domainlere) sahip proteinler, bu fosforlanmış bölgeyi tanıyarak proteine bağlanır ve böylece fosforilasyonla başlatılan sinyal bir sonraki basamağa aktarılır [219]. Hücre dışı ATP'nin bitkilerde bir sinyal molekülü olarak işlev gördüğüne dair bulgular elde edilmiş ve bunun bitki büyümesi, gelişimi ve stres yanıtlarında kritik roller üstlendiği ortaya konmuştur [220, 221]. Bitki hücre dışı matriksi, ATP tarafından fosforile edilebilen proteinler içerir ve hücre dışı ATP doğrudan bir reseptöre bağlanmak yerine bu proteinleri fosforile ederek hücre içine sinyal iletimini başlatabilir [222]. Dolayısıyla fosforilasyon ile yakın ilişkili bu sinyal iletimi mekanizmaları BIA sentezi üzerinde etkili olup, daha önceki çalışmalarda BIA sentezinin özellikle gövde organında yoğun olduğu bildirilmiştir [10, 19, 22, 30, 44, 178].

Haşhaş bitkisinde alkaloid üretim sürecinin bütününde, BIA sentezi, organlar arası taşınım ve depolanma aşamalarının her birisi kritik rol oynamaktadır [35]. Dolayısıyla her aşama üzerinde epigenetik düzenlemelerin farklı etkisi olabilmektedir. Bitkilerde savunma mekanizmasında rol alan sekonder metabolitler, genellikle belirli doku veya hücre tiplerinde sıkı biçimde düzenlenmiş bir hücre içi lokalizasyonla birikir [223-225]. Bu metabolitler, kaynak hücrelerden komşu hücrelere, hatta daha uzak dokulara veya organlara taşınabilmektedir [226]. Karşılaştırmalı analizler, hem organ hem de çeşit bazında biyolojik süreç (BS) terimlerinden zarlar arası taşınımın yoludaki genlerin özellikle kontrol grubuna kıyasla yüksek alkaloid verimine sahip çeşitlerin gövde organlarında belirgin şekilde ifade

edildiğini ortaya koymuştur. Zarlar arası taşınım bitkilerde sadece temel besin taşınımını değil aynı zamanda hormonlar, sinyal molekülleri ve sekonder metabolitlerin yer değiştirmesinde de önemli rol oynamaktadır [226-228]**.** Ek olarak kontrol grubuna kıyasla morfin açısından zengin çeşitin gövde organında HB terimi plazma zarı ile ilişkili süreçlerin zenginleştiği gözlenmiştir. Plazma zarı, hem sinyal algılama hem de metabolit ve iyon taşınımını yöneten proteinleri taşır. Bu özellik, hücresel yanıtların hızını ve etkinliğini belirleyen temel bir düzenleyici konumda olduğunu göstermektedir [229]. Bu bilgiler, sinyal iletiminin ve metabolit taşınımının haşhaşta alkaloid seviyelerinin oluşumunda önemli rol oynadıklarını ve bu süreçlerin epigenetik olarak yoğun etki altında olduğunu göstermiştir.

Hücresel bileşen (HB) anotasyon verileri de diğer ontoloji terimlerini desteklemektedir. Kontrol örneğine kıyasla BIA açısından zengin çeşitlerin hem gövde hem de kapsül organlarında gen ifadesi daha aktif (hipometile) DMR'lerde en çok zenginleşen HB terimlerinin çekirdek ve plazma zarı olması, bu çeşitlerde gen aktivitesinin ve taşınımının haşhaş bitkisinde alkaloid sentezinde yoğun etkilerini göstermiştir.

BIA ile ilişkili metabolik süreçler, çok basamaklı ve enzim katalizli redoks reaksiyonlarından oluşur. Bu tür reaksiyonlar FAD, NADPH gibi enerji taşıyan moleküller gerektirdiğinden BIA biyosentezi yüksek enerji talep eden bir süreçtir [230-232]. Bu yüksek enerji gereksiniminin bir sonucu olarak enerji metabolizmasında görev alan kofaktörler, metabolik yolaklardaki reaksiyonların yürütülmesi ve enerji metabolizmasını düzenlemesinde önemli bir rol üstlenmektedir [233, 234]. Bu nedenle bitkinin enerji üretim mekanizmalarıyla, özellikle fotosentez yoluyla sağlanan ATP ve NADPH ile yakından bağlantılıdır [178, 235-237]. Fotosentez, sekonder metabolitlerin öncül karbon iskeletlerini ve enerji akışını sağlayan birincil metabolik süreç olup [238], elde edilen karbon başlıca sükroz ve nişasta formunda sekonder metabolizmanın sürdürülmesinde temel bir rol oynamaktadır. Literatür çalışmaları, fotosentezin alkaloid sentezi ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir [239-243]. Işık enerjisi fotosentez sürecinde kullanılmakta olup yapılan bir çalışmada, resveratrol içeren Erciş üzüm çeşidine ait kallus dokularında UV ışığı uygulaması sonucunda yüksek düzeyde resveratrol birikimi gözlemlenmiştir [239]. UV ışınlarının elisitör olarak kullanıldığında fenolikler, terpenoidler ve alkaloidler gibi sekonder metabolitlerin üretimini artırabildiğini bildiren çalışmaya [241] paralel olarak, Trivellin ve arkadaşları da ışığın sekonder metabolitler üzerindeki olumlu etkisini göstermiştir [242]. Yapılan başka bir çalışamda ise yüksek CO_2 seviyelerinin Rubisco enziminin aktivitesini

artırarak fotosentez sürecinde yükselişe neden olduğu ve bunun da ikincil metabolitlerin birikimini etkileyebildiği belirtilmiştir. Bu doğrultuda, yabani haşhaş (*Papaver setigerum*) bitkisinde CO_2 düzeylerinin artmasıyla morfin, kodein, papaverin ve noskapin gibi tüm alkaloidlerin bitkide anlamlı artışlar gösterdiği gözlenmiştir [243]. Ayrıca aynı haşhaş çeşitleri ile yapılan başka bir çalışmada fotosentezin haşhaşta özellikle morfin sentezi üzerindeki etkisi protein düzeyinde de gösterilmiştir [178].

Literatür bilgisi ile benzer şekilde çalışmamızda, fotosentezle ilişkili genler tüm çeşitlerin kapsül organlarına kıyasla gövde organlarında daha yüksek ifade seviyelerine sahip olduğu gözlenmiştir. Özellikle kontrol grubuna kıyasla morfin açısından zengin çeşidin kapsül organında, fotosistem II HB terimi ile ilişkili genlerin ifadesinin belirgin şekilde arttığı görülmüştür. Bu bulgu, Ofis_1 çeşidinin gövde organında fotosentetik aktiviteyle bağlantılı karbonhidrat metabolizması BS teriminde ve nişasta ve sükroz metabolizması KEGG yolak teriminde anlamlı biçimde zenginleşme ile desteklenmektedir. Bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular, enerji metabolizmasının Ofis_1'in gövde organında önemli bir rol oynadığını ve bu sürecin morfin biyosentezini destekleyecek şekilde fotosentetik aktiviteyle koordineli olarak düzenlendiğini göstermektedir. Bu koordineli enerji ve karbon akışı, sekonder metabolit yollarında kritik basamakları katalize eden ve birincil ile sekonder metabolizma arasındaki köprü işlevi gören enzimlerin, özellikle Sitokrom P450 (CYP) ailesinin, biyosentez süreçlerinde etkin bir şekilde rol alabileceğini düşündürmüştür.

Sitokrom P450 (CYP) enzimleri yalnızca fotosentezin fotoprotektif fonksiyonlarında değil aynı zamanda (S)-retikulin'in (R)-retikulin'e stereokimyasal dönüşümü gibi BIA biyosentezindeki kritik basamaklarda da görev almaktadır [19, 244]. Kontrol grubuna kıyasla yüksek alkaloid içerikli çeşitlerin gövde ve kapsül organlarında CYP enzim genlerinin artmış ifadesi bu enzimlerin çift yönlü fonksiyonel rollerini pekiştirmektedir. Bu artış, enerji ve karbon akışının sekonder metabolit yollarına yönlendirilmesinde CYP enzimlerinin kilit bir düzenleyici olduğunu, BIA biyosentezindeki dallanma noktalarını kontrol ederek alkaloid çeşitliliğini şekillendirdiğini göstermektedir. Ayrıca, CYP enzimlerindeki ifade artışının özellikle morfin açısından zengin çeşidin gövde organında belirgin olması, fotosentezle ilişkili genlerin morfin biyosentezini desteklemek üzere fotosentetik verimliliğin artırılmasına yönelik bir düzenleme mekanizmasına işaret etmiştir.

Fotosentez sürecinde birçok bileşen görev almaktadır, bu kapsamda enerji akışında rol alan kofaktörlerin önemi de iyi bilinmektedir [245, 246]. Çalışmamızda da kontrol grubuna kıyasla alkaloidce zengin çeşitlerde, KEGG analizlerinde en sık karşılaşılan terimlerden biri olan kofaktör biyosentezi yolunda belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu artış, enerji ve fotosentezin BIA sentez sürecini destekleyen temel mekanizmalardan biri olabileceğini göstermiştir.

Bu sonuçlar ve literatür bilgileri doğrultusunda, çalışmamızda fotosentez ile enerji üretimi ve karbon metabolizmasının haşhaş bitkisinde morfin ve noskapin alkaloidlerinin sentezinde başlıca ayırt edici faktörlerden biri olduğu ve bu süreçlerin morfin sentezinde daha da öne çıktığını göstermiştir.

Ek olarak karşılaştırmalı analizler, noskapin açısından farklı bir profil ortaya koymuş ve bu alkaloid ile ilgili süreçlerin hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde işlediğine dair bulgular sunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla noskapince zengin çeşidin gövde organında nükleik asit bağlanması (MF) teriminde artış görülmüştür. Nükleik asit bağlanması, RNA polimerazın DNA şablonuna bağlanarak transkripsiyonu başlatması için kritik bir mekanizmadır. Ayrıca, transkripsiyonu düzenleyen faktörler de bu bağlanma yetenekleri sayesinde RNA polimerazın aktivitesini kontrol edebilir [247]. Özellikle kontrol grubuna göre noskapin açısından zengin çeşidin gövde organında KEGG terimlerinden ubikitin aracılı proteoliz ve mRNA denetim yolağı yollarıyla ilişkili genlerin zenginleşmesi alkaloid metabolizmasını düzenleyen ek bir kontrol düzeyine işaret etmiştir. Ek olarak, seçici proteolizde görevli olan F-box proteinlerinin [248, 249] kontrol grubuna kıyasla yüksek alkaloid içerikli çeşitlerde ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Bu zenginleşmeler, yalnızca protein yıkımını değil, aynı zamanda protein sentezinin geçici olarak durdurulması veya yavaşlatılmasını içeren ek translasyonel kontrol mekanizmalarının da devreye girebileceğini düşündürmektedir. Noskapin açısından zengin çeşitte ribozom KEGG terimlerinin zenginleşmesi translasyonel hassasiyetin temel bir düzenleyici unsur olduğunu göstermiştir. Özellikle ribozomlarla ilişkili düzenlemeler, mRNA denetimi ve metabolit duyarlı translasyonel duraklama gibi mekanizmalar post-transkripsiyonel kontrolün karmaşıklığını ortaya koymuştur [250, 251]. Çalışmamızda kullanılan aynı haşhaş çeşitleri ile yapılan önceki çalışmada da noskapin özelinde translasyonel hassasiyetin temel bir düzenleyici unsur olduğu gösterilmiştir [178].

Çalışmamızda elde edilen verileri destekler nitelikte literatürde bazı alkaloid türlerinin translasyon ile kontrol edildiğine dair veriler elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, narsiklasin ve pretazettin gibi bazı Amaryllidaceae alkaloidlerinin, translasyonun peptit bağının oluştuğu basamağı inhibe ederek ökaryotik hücrelerde protein sentezini düzenlediği belirtilmiştir [252]. Bu doğrultuda değerlendirildiğinde noskapin biyosentezinin ribozomal kontrol, mRNA denetimini kapsayan oldukça yapılandırılmış ve çok katmanlı bir düzenleyici mekanizma tarafından kontrol edildiği görülmüştür. Literatürde morfin biyosentezinin *Papaver* cinsinde evrimsel olarak daha yakın bir dönemde ortaya çıktığı öne sürülürken [253] noskapin biyosentez yolunun evrimsel olarak daha korunaklı mekanizmalar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir [17]. Noskapin yoluna özgü evrimsel olarak korunmuş düzenleyici mekanizmalar, metabolik ağın kararlılığını ve noskapin üretiminin çevresel ya da gelişimsel değişimlere karşı daha hassas biçimde ayarlanabilmesini sağlamaktadır. Bu türden köklü düzenleyici unsurların varlığı noskapin üretiminin morfine kıyasla daha sıkı evrimsel kısıtlamalara tabi olduğunu göstermiştir.

Yukarıda da detaylı olarak verildiği üzere çalışmamız sonucunda morfin ve noskapin alkaloidlerinin ayrımında farklı düzenleyici mekanizmalar olduğu görülmüştür. Morfin açısından enerji metabolizması daha yoğun bir belirleyici olarak rol oynarken, noskapin için hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde işleyen ince ayarlı bir düzenleme mekanizmasının devrede olduğu anlaşılmaktadır. Bu düzenleyici mekanizmaların yanı sıra alkaloidlerin hücre içi taşınımının da çeşitler arasında farklılaştığı ve epigenetik düzenlemeler aracılığıyla yönlendirildiği görülmüştür.

Bu düzenleyici mekanizmaların çeşitler arası farklılıkları nasıl şekillendirdiği, sekonder metabolit biyosentezindeki değişimlerle ortaya konmaktadır. Nitekim çalışmamızda, alkaloid açısından zengin örneklerin karşılaştırma analizinde Ofis_1 kapsül ve gövde organlarında KEGG terimlerinden sekonder metabolitlerin biyosentez yolunun aktif olduğu görülmüştür. Bu bulgu önceki çalışmalarda da bahsedildiği gibi BIA'ların biyosentezinin yalnızca gövde organlarında değil, aynı zamanda kapsül organında da gerçekleştiğini göstermiştir [254-256]. Bu alan, önceki bir çalışmada da tam olarak aydınlatılamamış bir konu olarak vurgulanmıştır [178]. Özellikle morfin açısından zengin çeşitte sentez basamaklarının daha fazla olması ve kullanılan çeşitlerin melezleme yoluyla elde edilmesi, henüz tanımlanmamış bazı ara yolakların varlığına da işaret etmiştir.

Sekonder metabolit biyosentezindeki bu çeşitler arası farklılaşma, taşınım mekanizmalarının alkaloid birikimindeki rolüyle birlikte değerlendirildiğinde daha bütüncül bir tablo sunmaktadır. Yukarıda ayrıntılı olarak açıklandığı üzere, taşınım mekanizması alkaloid miktarının yüksek olmasında önemli bir etken süreç olmasının yanı sıra, morfin ve noskapin alkaloid düzeylerinin belirlenmesinde de kilit rol oynamaktadır. Noskapince zengin çeşide göre morfince zengin haşhaş çeşidinde hücre içi taşınım sistemleriyle ilgili süreçlerin baskılandığı belirlenmiştir. Endositoz dış uyaranların alınması ve hücresel homeostazın sağlanmasında önemli rol oynamakta olup dolaylı yoldan alkaloidlerin hücre içi bölgelere yönlendirilmesini etkilemektedir [257, 258]. Tez çalışmamızda, noskapin açısından zengin çeşide kıyasla morfin açısından zengin çeşidin gövde organında, KEGG terimlerinden endositoz ile ilişkili genlerde bir baskılanma olduğu görülmüştür. Ofis_NP çeşidine kıyasla Ofis_1 çeşidinin gövdelerinde membran ve hücreler arası bölgeler gibi HB terimleri yoğun olarak elde edilmiştir. Tüm bu sonuçlar sekonder metabolitlerin zar dinamiği ile yakın ilişkili olduğunu gösteren önceki bulgularla da uyumlu olup [259], taşıma yollarının epigenetik düzeyde metabolik profile göre şekillendirildiğini ortaya koymuştur. Özellikle, haşhaş bitkisinin lateksinde büyük membranöz veziküllerde biriktiği bildirilen morfin, toksisite potansiyeli yüksek bir metabolittir [227]. Bu nedenle, endositik geri dönüşümün sınırlandırılması, bu tür metabolitlerin aşırı birikiminin bitki büyümesini ve gelişimini engellemesini önlemek amacıyla bileşiğin depolama organlarında sınırlanmasına yönelik koruyucu bir strateji olarak işlev görebilir.

Çalışmamızda alkaloid tipine özgü taşınım ve enerji yönlendirmesi mekanizmalarının hücresel sinyal iletim yollarıyla etkileşimi görülmüş olup bu kapsamda, MAPK yolakları öne çıkmıştır. KEGG terimlerinden MAPK sinyal iletim yolağı-bitki yolundaki genlerin baskılanması, Ofis_NP çeşidine göre Ofis_1 çeşidinin gövde organında da belirgin olarak görülmüş olup, bu durum iki farklı olasılığa işaret etmektedir.

MAPK sinyal iletim yolakları, farklı hücresel mekanizmalar aracılığıyla çok sayıda biyolojik sürecin düzenlemesinde görevlidir. MAPK'nın sürekli aktif olması hücre ölümünü tetikleyebilir [260]. Hücre ölümü gibi karmaşık biyolojik süreçlerde MAPK'ların çift yönlü bir fonksiyon üstlendiği bilinmektedir. Hücre tipi ve uyarana bağlı olarak aktivasyonu destekleyebildikleri gibi baskılayıcı bir rol de üstlenebilmektedirler [261]. Bitkilerde MAPK yolakları, çeşitli abiyotik ve biyotik stres yanıtlarında kritik rol üstlenmektedir [262]. Morfin bitkilerde stres oluşturabilen bir bileşik olup aşırı birikiminin hücresel hasarı artırdığı

gösterilmiştir [263]. Bu doğrultuda çalışmamızdan edilen bulgular, morfin birikiminden kaynaklı stresin oluşturacağı hücre ölümüne ilerleyen süreçlerin sınırlandırılabilmesi için bitkinin MAPK aracılı sinyal iletimini bilinçli olarak baskılamaya yöneldiğine işaret etmiştir. Bu bağlamda, morfin birikiminin oluşturduğu potansiyel stres yanıtı, ROS düzeyleri ile oksidatif hasarın ölçülmesi ve MAPK ile ROS üretiminde görev alan genlerin ifade değişimlerinin PCR gibi analizlerle doğrulanmalıdır.

Öte yandan, MAPK sinyal yolakları sekonder metabolit sentezi ile olan yakın ilişkisidir [264, 265]. MAPK aktivitesindeki artışın sekonder metabolit birikimini desteklediği bilinmektedir [266]. Bitki, belirli bir noktadan sonra enerji kullanımını yeniden dengelemek üzere sinyal yolaklarında düzenleyici bir yanıt geliştirebilir. MAPK aracılı sinyal iletimi fosforilasyon–defosforilasyon döngüleri gibi ATP gerektiren basamaklarla ilerlerken [267], morfin sentezi de artan fotosentezle birlikte yüksek düzeyde enerji talebi oluşturmaktadır. Bu durum, bu çeşitte MAPK yolunun baskılanmasının enerji kullanımının yeniden dengelenmesine yönelik bir adaptasyon olabileceğini göstermiştir. Bu noktada, sekonder metabolit üretimi ve savunma yanıtlarının yalnızca MAPK yolaklarıyla sınırlı olmadığı aynı zamanda bitki hormonları aracılığıyla da kapsamlı biçimde düzenlendiği bilinmektedir. Nitekim bitki hormonları, savunma ile ilişkili sekonder metabolitlerin sentezini aktive edebilmekte [268] ve sinyal iletimi, büyüme, farklılaşma, gelişme, çevresel streslere adaptasyonda önemli bir rol oynamaktadır [269]. Bu kapsamda MAPK yolundaki baskılanmayı destekler şekilde, KEGG terimlerinde yer alan bitki hormonu sinyal iletimi yolaklarına ait genlerin Ofis_1'in gövde ve kapsül organlarında baskılanmış olması, bitkinin enerji ve sinyal iletimininin özellikle morfin açısından yeniden düzenlenme eğilimi gösterdiğine işaret etmiştir. Bu hipotezin MAPK genlerinin ifadesinin artırılması/baskılanması gibi fonksiyonel deneylerle doğrulanması gereklidir.

Sonuç olarak çalışmada, haşhaş bitkisinde BIA biyosentezi, taşınımı ve sinyal iletimine ilişkin genlerin epigenetik olarak koordineli bir şekilde düzenlendiği gösterilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut biyoteknolojik sistemlerin endüstriyel ölçekte BIA elde etmek için sınırlı kapasiteye sahiptir. BIA'ların yapısal karmaşıklıkları nedeniyle kimyasal sentezlerinin pratik olarak mümkün olmaması, üretim süreçlerini daha çok biyolojik yöntemlere bağımlı hale getirmektedir. Bu nedenle son yıllarda, bitkilerde alkaloid biyosentezini artırmayı hedefleyen biyoteknoloji temelli yaklaşımlar ön plana çıkmış ve genetik, metabolik ve epigenetik stratejiler üzerinde yoğunlaşılmıştır.

Çalışmamızda elde edilen bulgular, haşhaş bitkisinde epigenetik mekanizmaların en yaygını olan DNA metilasyonunun etkilediği ve alkaloid biyosentezini hem yöneten hem de yönlendiren gen bölgelerinin belirlenmesi açısından önemli bir temel sunmaktadır. Özellikle gen gövdesi ve promotör bölgelerindeki metilasyon farklılıklarının, belirli BIA üretim düzeyleriyle ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu durum, epigenetik düzenlemelerin BIA biyosentezinin kontrolünde kritik bir rol oynadığını göstermektedir.

DNA metilasyonu ve gen ifade paternlerinin anlaşılması, yüksek morfin veya noskapin üretimine sahip yeni haşhaş çeşitlerinin geliştirilmesine olanak tanır. Bu bilgiler, biyoteknolojik olarak alkaloid üretimini optimize etmek için farklı stratejilerin geliştirilmesine zemin hazırlar. Örneğin, hedef genlerin ifadesinin artırılması ya da metilasyon düzeylerinin düzenlenmesi yoluyla belirli enzimlerin üretiminin kontrol edilmesi, morfin ve noskapin gibi farmasötik değeri yüksek bileşiklerin verimli ve sürdürülebilir biçimde elde edilmesini sağlayabilir. Epigenetik bilgi, aynı zamanda metabolik mühendisliği stratejilerinin geliştirilmesi için güçlü bir altyapı sunmaktadır [270].

Bu çalışmada haşhaş bitkisinde alkaloid biyosentezi epigenetik perspektifte detaylı olarak ilk kez analiz edilmiş olup DNA metilasyonunun hangi süreçler üzerinden metabolit özelleşmesinde rol oynadığı belirlenmiştir. Haşhaşın epigenomik özellikleri detaylı biyoinformatik analizler ile ortaya konulmuştur. Yine ilk kez bu çalışmada morfin ve noskapin biyosentezine özgü epigenomik farklılıklar tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular genetik mühendisliği, metabolik mühendisliği gibi uygulama alanlarına yönelik yeni çalışma olanakları sunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Mungan Kılıç, F., Yıldız, K., Kılıç, M. (2018). Türkiye'de yayılış gösteren bazı *Glaucium* Mill. (Papaveraceae) taksonlarının habitat özellikleri. *Turkish Journal of Life Sciences*, 3(2), 255–262.

2. Gürkök, T. (2013). *Morfin İçeriği İndüklenmiş Haşhaş (Papaver somniferum* L.*) Bitkisinde Genom Düzeyinde Transkriptom Analizi*. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, 340.

3. Yazıcı, L., Yılmaz, G., Gökalp, S. (2017). Bazı haşhaş (*Papaver somniferum* L.) çeşit ve genotiplerinin alkaloid ve yağ oranlarının belirlenmesi. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 20, 313–317.

4. Yıldırım, M. U., Ayhan, A. E. (2021). Sonbahar ve ilkbahar ekimlerinin haşhaşın (Papaver somniferum L.) verim ve morfin içeriği üzerine etkisi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 26(2), 412–420.

5. Bulut, B., Aydinli, Z., Türktaş-Erken, M. (2020). MSAP analysis reveals diverse epigenetic statuses in opium poppy varieties with different benzylisoquinoline alkaloid content. *Turkish Journal of Biology*, 44(2), 103–109.

6. Portakal, P., Gürkök Tan, T. (2024). *Papaver somniferum* (haşhaş) bitkisinin alkaloidlerinin farmakolojik ve toksikolojik özellikleri. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 15(1), 1-10.

7. Vadhel, A., Bashir, S., Mir, A. H., Girdhar, M., Kumar, D., Kumar, A., et al. (2023). Opium alkaloids: Biosynthesis, pharmacology and association with cancer occurrence. *Open Biology*, 13(5), 1-14.

8. Demirci, Y. (2016). *Morfin ve Noskapin İçeriği Yüksek Haşhaş (Papaver somniferum* L.*) Genotiplerinde RNA Kütüphanelerinden Transkripsiyon Faktörlerinin Tespiti ve Ifade Analizi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 74.

9. Ziegler, J., Facchini, P. J., Geissler, R., Schmidt, J., Ammer, C., Kramell, R., et al. (2009). Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*, 70(15–16), 1696–1707.

10. Zulak, K. G., Cornish, A., Daskalchuk, T. E., Deyholos, M. K., Goodenowe, D. B., Gordon, P. M. K., et al. (2007). Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta*, 225(5), 1085–1106.

11. Yazici, L., Yılmaz, G. (2021). Investigation of alkaloids in opium poppy (*Papaver somniferum* L.) varieties and hybrids. *Journal of Agricultural Sciences*, 27(1), 62–68.

12. Aghaali, Z., Naghavi, M. R. (2024). Developing benzylisoquinoline alkaloid-enriched opium poppy via CRISPR-directed genome editing: A review. *BMC Plant Biology*, 24(1), 700.

13. Alagoz, Y., Gurkok, T., Zhang, B., Unver, T. (2016). Manipulating the biosynthesis of bioactive compound alkaloids for next-generation metabolic engineering in opium poppy using CRISPR-Cas9 genome editing technology. *Scientific Reports*, 6, 1-9.

14. Ziegler, J., Facchini, P. J. (2008). Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 735–769.

15. Singh, A., Menéndez-Perdomo, I., Facchini, P. (2019). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy: An update. *Phytochemistry Reviews*, 18, 1–26.

16. İnternet: Toprak Mahsulleri Ofisi. (2019). *Haşhaş raporu*. TMO Yayınları. Web: https://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/hashassektrraporu2019.pdf Son Erişim Tarihi: 12.06.2024.

17. Guo, L., Winzer, T., Yang, X., Li, Y., Ning, Z., He, Z., et al. (2018). The opium poppy genome and morphinan production. *Science*, 362(6412), 343–347.

18. Kara, N. (2017). The effects of autumn and spring sowing on yield, oil and morphine contents in the Turkish poppy (*Papaver somniferum* L.) cultivars. *Turkish Journal of Field Crops*, 22(1), 39–46.

19. Beaudoin, G. A., Facchini, P. J. (2014). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, 240(1), 19–32.

20. Yazici, L., Yılmaz, G. (2022). Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) çeşit ve F1 melezlerinin verim ve verim özelliklerinin belirlenmesi. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 9(4), 990–995.

21. İpek, G., Arslan, N. (2019). Gıda maddesi olarak haşhaş (*Papaver somniferum* L.) tohumunun değerlendirilmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(2), 99–101.

22. Pei, L., Wang, B., Ye, J., Hu, X., Fu, L., Li, K., et al. (2021). Genome and transcriptome of *Papaver somniferum* Chinese landrace CHM indicates that massive genome expansion contributes to high benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Horticultural Research*, 8(1), 5.

23. Cushnie, T. P. T., Cushnie, B., Lamb, A. J. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 377–386.

24. Bui, V. H., Rodríguez-López, C. E., Dang, T.-T. T. (2023). Integration of discovery and engineering in plant alkaloid research: Recent developments in elucidation, reconstruction, and repurposing biosynthetic pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 74, 1369-5266.

25. Liscombe, D. K., Facchini, P. J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 173–180.

26. Liscombe, D. K., MacLeod, B. P., Loukanina, N., Nandi, O. I., Facchini, P. J. (2005). Evidence for the monophyletic evolution of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry*, 66(20), 2501–2520.

27. Singla, D., Sharma, A., Kaur, J., Panwar, B., Raghava, G. P. (2010). BIAdb: A curated database of benzylisoquinoline alkaloids. *BMC Pharmacology*, 10, 4.

28. Swamy, M. K. (Editor). (2020). *Plant-derived bioactives*. (1. Baskı). Culiacán: Springer, 85–117.

29. Hu, Y., Wang, J., Liu, L., Yi, X., Wang, X., Wang, J., et al. (2025). Evolutionary history of magnoliid genomes and benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Nature Communications*, 16(1), 4039.

30. Hagel, J. M., Facchini, P. J. (2013). Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: A century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, 54(5), 647–672.

31. Li, Q., Ramasamy, S., Singh, P., Hagel, J. M., Dunemann, S. M., Chen, X., et al. (2020). Gene clustering and copy number variation in alkaloid metabolic pathways of opium poppy. *Nature Communications*, 11(1), 1190.

32. An, Z., Gao, R., Chen, S., Tian, Y., Li, Q., Tian, L., et al. (2024). Lineage-specific CYP80 expansion and benzylisoquinoline alkaloid diversity in early-diverging eudicots. *Advanced Science*, 11(19), 1-14.

33. Facchini, P. J., Bird, D. A., Bourgault, R., Hagel, J. M., Liscombe, D. K., MacLeod, B. P., Zulak, K. G. (2005). Opium poppy: A model system to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Canadian Journal of Botany*, 83(10), 1189–1206.

34. Onoyovwe, A., Hagel, J. M., Chen, X., Khan, M. F., Schriemer, D. C., Facchini, P. J. (2013). Morphine biosynthesis in opium poppy involves two cell types: Sieve elements and laticifers. *The Plant Cell*, 25(10), 4110–4122.

35. Ozber, N., Facchini, P. J. (2022). Phloem-specific localization of benzylisoquinoline alkaloid metabolism in opium poppy. *Journal of Plant Physiology*, 271, 153641.

36. Bird, D. A., Franceschi, V. R., Facchini, P. J. (2003). A tale of three cell types: Alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *The Plant Cell*, 15(11), 2626-2635.

37. Agarwal, P., Pathak, S., Kumar, R. S., Dhar, Y., Shukla, S., Asif, M., Trivedi, P. (2020). Short-chain dehydrogenase/reductase, PsDeHase, from opium poppy: Putative involvement in papaverine biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143, 1-10.

38. Hong, U. V. T., Tamiru-Oli, M., Hurgobin, B., Lewsey, M. G. (2024). Genomic and cell-specific regulation of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Journal of Experimental Botany*, 76(1), 35-51.

39. Gurkok, T., Turktas, M., Parmaksiz, I., Unver, T. (2015). Transcriptome profiling of alkaloid biosynthesis in elicitor-induced opium poppy. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(3), 673-688.

40. Farrow, S. C., Hagel, J. M., Beaudoin, G. A., Burns, D. C., Facchini, P. J. (2015). Stereochemical inversion of (S)-reticuline by a cytochrome P450 fusion in opium poppy. *Nature Chemical Biology*, 11(9), 728-732.

41. Ziegler, J., Voigtländer, S., Schmidt, J., Kramell, R., Miersch, O., Ammer, C., et al. (2006). Comparative transcript and alkaloid profiling in Papaver species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *The Plant Journal*, 48(2), 177-192.

42. Gesell, A., Rolf, M., Ziegler, J., Díaz Chávez, M. L., Huang, F. C., Kutchan, T. M. (2009). CYP719B1 is salutaridine synthase, the C–C phenol-coupling enzyme of morphine biosynthesis in opium poppy. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24432-24442.

43. Grothe, T., Lenz, R., Kutchan, T. M. (2001). Molecular characterization of the salutaridinol 7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *(Papaver somniferum). Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 30717-30723.

44. Onoyovwe, A., Hagel, J. M., Chen, X., Khan, M. F., Schriemer, D. C., Facchini, P. J. (2013). Morphine biosynthesis in opium poppy involves two cell types: Sieve elements and laticifers. *The Plant Cell*, 25(10), 4110-4122.

45. Gates, M., Tschudi, G. (1956). The synthesis of morphine. *Journal of the American Chemical Society*, 78(7), 1380-1393.

46. Gates, M., Tschudi, G. (1952). The synthesis of morphine. *Journal of the American Chemical Society*, 74(4), 1109-1110.

47. Murphy, P. B., Patel, P., Barrett, M. J. (2025). *Morphine*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing.

48. Thodey, K., Galanie, S., Smolke, C. D. (2014). A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opioids. *Nature Chemical Biology*, 10(10), 837-844.

49. Erthal-Williamson, J., Clare, P. J., Gisev, N., Santoso, C., Berterame, S. (2022). Trends in pharmaceutical opioid consumption in the WHO Eastern Mediterranean Region, 2010-2019. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 28(11), 788-797.

50. Tomar, V., Kukreti, S., Prakash, S., Madan, J., Chandra, R. (2017). Noscapine and its analogs as chemotherapeutic agents: Current updates. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(2), 174-188.

51. Ebrahimi, S. A. (2020). Noscapine, a possible drug candidate for attenuation of cytokine release associated with SARS-CoV-2. *Drug Development Research*, 81(7), 765-767.

52. Kumar, N., Awasthi, A., Kumari, A., Sood, D., Jain, P., Singh, T., et al. (2022). Antitussive noscapine and antiviral drug conjugates as arsenal against COVID-19: A comprehensive chemoinformatics analysis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(1), 101-116.

53. Zhao, W., Liu, J., Chen, Y. (2025). Advances in the biosynthesis of naturally occurring benzylisoquinoline alkaloids. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1-12.

54. Diamond, A., Desgagné-Penix, I. (2016). Metabolic engineering for the production of plant isoquinoline alkaloids. *Plant Biotechnology Journal*, 14(6), 1319-1328.

55. Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 29-66.

56. Desgagné-Penix, I., Khan, M. F., Schriemer, D. C., Cram, D., Nowak, J., Facchini, P. J. (2010). Integration of deep transcriptome and proteome analyses reveals the components of alkaloid metabolism in opium poppy cell cultures. *BMC Plant Biology*, 10, 252.

57. Desgagné-Penix, I., Farrow, S. C., Cram, D., Nowak, J., Facchini, P. J. (2012). Integration of deep transcript and targeted metabolite profiles for eight cultivars of opium poppy. *Plant Molecular Biology*, 79(3), 295-313.

58. Gurkok, T., Turktas, M., Parmaksiz, I., Unver, T. (2015). Transcriptome profiling of alkaloid biosynthesis in elicitor-induced opium poppy. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(3), 673-688.

59. Huang, F. C., Kutchan, T. M. (2000). Distribution of morphinan and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum. Phytochemistry*, 53(5), 555-564.

60. Larkin, P. J., Miller, J. A., Allen, R. S., Chitty, J. A., Gerlach, W. L., Frick, S., et al. (2007). Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. *Plant Biotechnology Journal*, 5(1), 26-37.

61. Kempe, K., Higashi, Y., Frick, S., Sabarna, K., Kutchan, T. M. (2009). RNAi suppression of the morphine biosynthetic gene salAT and evidence of association of pathway enzymes. *Phytochemistry*, 70(5), 579-589.

62. Allen, R. S., Miller, J. A. C., Chitty, J. A., Fist, A. J., Gerlach, W. L., Larkin, P. J. (2008). Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression and RNAi suppression of salutaridinol 7-O-acetyltransferase in opium poppy. *Plant Biotechnology Journal*, 6(1), 22-30.

63. Zhao, Y., Liu, G., Yang, F., Liang, Y., Gao, Q., Xiang, C., et al. (2023). Multilayered regulation of secondary metabolism in medicinal plants. *Molecular Horticulture*, 3(1), 11.

64. Mahfouz, M. M. (2010). RNA-directed DNA methylation: Mechanisms and functions. *Plant Signaling & Behavior*, 5(7), 806-816.

65. Gürel, Ç., Nursal, A., Yiğit, S. (2016). Epigenetik ve kanser. *Türkiye Klinikleri Journal of Radiation Oncology*, 1, 45-51.

66. Fedoroff, N. V. (2012). Presidential address: Transposable elements, epigenetics, and genome evolution. *Science*, 338(6108), 758-767.

67. Li, L., Chen, R., Zhang, H., Li, J., Huang, H., Weng, J., et al. (2024). The epigenetic modification of DNA methylation in neurological diseases. *Frontiers in Immunology*, 15, 1-19.

68. Law, J. A., Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 204-220.

69. Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J.-K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(8), 489-506.

70. Nasrullah, Hussain, A., Ahmed, S., Rasool, M., Shah, A. J. (2022). DNA methylation across the tree of life, from micro to macro-organism. *Bioengineered*, 13(1), 1666-1685.

71. Schöb, H., Grossniklaus, U. (2006). The first high-resolution DNA "methylome". *Cell*, 126(6), 1025-1028.

72. Yokuş, B. (2013). Epigenom ve epigenetik. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1, 5-13.

73. Lucibelli, F., Valoroso, M. C., Aceto, S. (2022). Plant DNA methylation: An epigenetic mark in development, environmental interactions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 1-18.

74. Yaari, R., Katz, A., Domb, K., Harris, K. D., Zemach, A., Ohad, N. (2019). RdDM-independent de novo and heterochromatin DNA methylation by plant CMT and DNMT3 orthologs. *Nature Communications*, 10(1), 1613.

75. Bartels, A., Han, Q., Nair, P., Stacey, L., Gaynier, H., Mosley, M., et al. (2018).Dynamic DNA methylation in plant growth and development. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1-17.

76. Niederhuth, C. E., Bewick, A. J., Ji, L., Alabady, M. S., Kim, K. D., Li, Q., et al. (2016). Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms. *Genome Biology*, 17(1), 194.

77. Finnegan, E. J., Peacock, W. J., Dennis, E. S. (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16), 8449-8454.

78. Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H., Kakutani, T. (2001). Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis. Nature*, 411(6834), 212-214.

79. Xiao, W., Custard, K. D., Brown, R. C., Lemmon, B. E., Harada, J. J., Goldberg, R. B., Fischer, R. L. (2006). DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *The Plant Cell*, 18(4), 805-814.

80. Kim, M., Ohr, H., Lee, J. W., Hyun, Y., Fischer, R. L., Choi, Y. (2008). Temporal and spatial downregulation of *Arabidopsis* MET1 activity results in global DNA hypomethylation and developmental defects. *Molecules and Cells*, 26(6), 611-615.

81. Zhou, W., Wang, M., Wang, L., Liu, Y., Tian, Z., Xie, L., Wang, Y. (2025). Epigenetics in plant response to climate change. *Biology*, 14(6), 631.

82. Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, 19(2), 81-92.

83. Ashapkin, V. V., Kutueva, L. I., Aleksandrushkina, N. I., Vanyushin, B. F. (2020). Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1-33.

84. Groot, M. P., Wagemaker, N., Ouborg, N. J., Verhoeven, K. J. F., Vergeer, P. (2018). Epigenetic population differentiation in field- and common garden-grown *Scabiosa columbaria plants. Ecology and Evolution*, 8(6), 3505-3517.

85. Springer, N. M. (2013). Epigenetics and crop improvement. *Trends in Genetics*, 29(4), 241-247.

86. Kooke, R., Morgado, L., Becker, F., van Eekelen, H., Hazarika, R., Zheng, Q., et al. (2019). Epigenetic mapping of the *Arabidopsis* metabolome reveals mediators of the epigenotype–phenotype map. *Genome Research*, 29(1), 96-106.

87. Kawanabe, T., Ishikura, S., Miyaji, N., Sasaki, T., Wu, L. M., Itabashi, E., et al. (2016). Role of DNA methylation in hybrid vigor in *Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(43), 1-8.

88. Uygur Göçer, E. (2024). Tuz stresi altındaki kişniş bitkisinin *(Coriandrum sativum)* DNA metilasyon modlarının RAPD markırları ile belirlenmesi. *Journal of Agriculture*, 7(1), 1-9.

89. Dubin, M. J., Zhang, P., Meng, D., Remigereau, M.-S., Osborne, E. J., Casale, F. P., et al. (2015). DNA methylation in *Arabidopsis* has a genetic basis and shows evidence of local adaptation. *eLife*, 4, 1-23.

90. Hao, M., Zhou, Y., Zhou, J., Zhang, M., Yan, K., Jiang, S., et al. (2020). Cold-induced ginsenoside accumulation is associated with the alteration in DNA methylation and gene expression in perennial American ginseng (*Panax quinquefolius* L.). *Journal of Ginseng Research*, 44(5), 747-755.

91. Chang, Y.-N., Zhu, C., Jiang, J., Zhang, H., Zhu, J.-K., Duan, C.-G. (2020). Epigenetic regulation in plant abiotic stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(5), 563-580.

92. Pilu, R., Panzeri, D., Cassani, E., Cerino Badone, F., Landoni, M., Nielsen, E. (2009). A paramutation phenomenon is involved in the genetics of maize low phytic acid1-241 (lpa1-241) trait. *Heredity*, 102(3), 236-245.

93. Mach, J. (2012). Identification of a novel maize protein important for paramutation at *the purple plant1* locus. *The Plant Cell*, 24(5), 1709.

94. Peng, Z., Tian, J., Luo, R., Kang, Y., Lu, Y., Hu, Y., et al. (2020). miR399d and epigenetic modification co-modulate anthocyanin accumulation in Malus leaves suffering from phosphorus deficiency. *Plant, Cell & Environment*, 43(5), 1148-1159.

95. Li, W. F., Ning, G. X., Mao, J., Guo, Z. G., Zhou, Q., Chen, B. H. (2019). Whole-genome DNA methylation patterns and complex associations with gene expression associated with anthocyanin biosynthesis in apple fruit skin. *Planta*, 250(6), 1833-1847.

96. Kim, J., Kang, S.-H., Park, S.-G., Yang, T.-J., Lee, Y., Kim, O. T., et al. (2020). Whole-genome, transcriptome, and methylome analyses provide insights into the evolution of platycoside biosynthesis in *Platycodon grandiflorus*, a medicinal plant. *Horticulture Research*, 7(112), 1-12.

97. Aydınlı, Z. (2020). *Epigenetik Düzenlemelerin Haşhaş (Papaver somniferum* L.*) Bitkisinde Tebaïn Yolağı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çankırı, 70.

98. Tahir, M., Norouzi, M., Khan, S. S., Davie, J. R., Yamanaka, S., Ashraf, A. (2024). Artificial intelligence and deep learning algorithms for epigenetic sequence analysis: A review for epigeneticists and AI experts. *Computers in Biology and Medicine*, 183, 1-20.

99. Agius, D. R., Kapazoglou, A., Avramidou, E., Baranek, M., Carneros, E., Caro, E., et al. (2023). Exploring the crop epigenome: A comparison of DNA methylation profiling techniques. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1-24.

100. Halabian, R., Valizadeh, A., Ahmadi, A., Saeedi, P., Azimzadeh Jamalkandi, S., Alivand, M. R. (2021). Laboratory methods to decipher epigenetic signatures: A comparative review. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 26(1), 46.

101. Shafi, A., Mitrea, C., Nguyen, T., Draghici, S. (2018). A survey of the approaches for identifying differential methylation using bisulfite sequencing data. *Briefings in Bioinformatics*, 19(5), 737-753.

102. Patterson, K., Molloy, L., Qu, W., Clark, S. (2011). DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. *Journal of Visualized Experiments*, 56, 1-9.

103. Kint, S., De Spiegelaere, W., De Kesel, J., Vandekerckhove, L., Van Criekinge, W. (2018). Evaluation of bisulfite kits for DNA methylation profiling in terms of DNA fragmentation and DNA recovery using digital PCR. *PLOS ONE*, 13(6), 1-17.

104. Nkongolo, K., Michael, P. (2024). Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) analysis reveals variation in distribution and levels of DNA methylation in white birch (*Betula papyrifera*) exposed to nickel. *Genome*, 67(10), 351-367.

105. Nakabayashi, K., Yamamura, M., Haseagawa, K., Hata, K. (2023). Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). *In Methods in Molecular Biology*, 2577, 39-51.

106. Schmidt, M., Van Bel, M., Woloszynska, M., Slabbinck, B., Martens, C., De Block, M., et al. (2017). Plant-RRBS, a bisulfite and next-generation sequencing-based methylome profiling method enriching for coverage of cytosine positions. *BMC Plant Biology*, 17(1), 115.

107. Waalwijk, C., Flavell, R. A. (1978). MspI, an isoschizomer of HpaII which cleaves both unmethylated and methylated HpaII sites. *Nucleic Acids Research*, 5(9), 3231-3236.

108. Beck, D., Ben Maamar, M., Skinner, M. K. (2022). Genome-wide CpG density and DNA methylation analysis method (MeDIP, RRBS, and WGBS) comparisons. *Epigenetics*, 17(5), 518-530.

109. Gu, H., Smith, Z. D., Bock, C., Boyle, P., Gnirke, A., Meissner, A. (2011). Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nature Protocols*, 6(4), 468-481.

110. Keklik, G., Özcan, B. D. (2022). Multidisipliner bir bilim dalı olarak biyoinformatiğe genel bir bakış. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(2), 1082-1091.

111. Kumaresan, V., Bhatt, P., Palanisamy, R., Gnanam, A. J., Pasupuleti, M., Arockiaraj, J. (2014). A murrel cysteine protease, cathepsin L: Bioinformatics characterization, gene expression and proteolytic activity. *Biologia*, 69(3), 395-406.

112. Polat, M., Karahan, A. (2009). Multidisipliner yeni bir bilim dalı: Biyoinformatik ve tıpta uygulamaları. *Medical Journal of Süleyman Demirel University*, 16(3), 41-50.

113. Edwards, D., Batley, J. (2004). Plant bioinformatics: From genome to phenome. *Trends in Biotechnology*, 22(5), 232–237.

114. Bhatt, D., Nath, M., Badoni, S., Joshi, R. (Editors) (2024). *Current omics advancement in plant abiotic stress biology*.(1. Baskı). Cambridge: Academic Press, 301–322.

115. Tan, Y. C., Kumar, A. U., Wong, Y. P., Ling, A. P. K. (2022). Bioinformatics approaches and applications in plant biotechnology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 106.

116. Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G. W., Ramsahoye, B., Lander, E. S., Jaenisch, R. (2005). Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Research*, 33(18), 5868-5877.

117. Liu, Y., Kriegel, A. J., Liang, M. (2019). Library preparation for multiplexed reduced representation bisulfite sequencing with a universal adapter. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 177–194.

118. Shafi, A., Mitrea, C., Nguyen, T., Draghici, S. (2017). A survey of the approaches for identifying differential methylation using bisulfite sequencing data. *Briefings in Bioinformatics*, 19(5), 737-753.

119. Aykanat, S. (2023). *Proteomik İle Haşhaşta Morfin Yolak Analizi.* Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 193.

120. Kim, D., Jung, M., Ha, I. J., Lee, M. Y., Lee, S.-G., Shin, Y., (2018). Transcriptional profiles of secondary metabolite biosynthesis genes and cytochromes in the leaves of four *Papaver species. Data*, 3, 55.

121. Owa, C., Poulin, M., Yan, L., Shioda, T. (2018). Technical adequacy of bisulfite sequencing and pyrosequencing for detection of mitochondrial DNA methylation: Sources and avoidance of false-positive detection. *PLOS ONE*, 13(2), 1-19.

122. Piferrer, D., A., F. (2023). Bioinformatic analysis for age prediction using epigenetic clocks: Application to fisheries management and conservation biology. *Frontiers in Marine Science*, 10, 1-13.

123. Baheti, S., Kanwar, R., Goelzenleuchter, M., Kocher, J. P., Beutler, A. S., Sun, Z. (2016). Targeted alignment and end repair elimination increase alignment and methylation measure accuracy for reduced representation bisulfite sequencing data. *BMC Genomics*, 17, 149.

124. Gong, T., Borgard, H., Zhang, Z., Chen, S., Gao, Z., Deng, Y. (2022). Analysis and performance assessment of the whole genome bisulfite sequencing data workflow: Currently available tools and a practical guide to advance DNA methylation studies. *Small Methods*, 6(3), 1-42.

125. Grehl, C., Wagner, M., Lemnian, I., Glaser, B., Grosse, I. (2020). Performance of mapping approaches for whole-genome bisulfite sequencing data in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 176.

126. Gong, W., Pan, X., Xu, D., Ji, G., Wang, Y., Tian, Y. (2022). Benchmarking DNA methylation analysis of 14 alignment algorithms for whole genome bisulfite sequencing in mammals. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 4704–4716.

127. Ahn, J., Heo, S., Lee, J., Bang, D. (2021). Introduction to single-cell DNA methylation profiling methods. *Biomolecules*, 11(7), 1-20.

128. Zheng, X., Wu, Q., Wu, H., Leung, K. S., Wong, M. H., Liu, X., Cheng, L. (2021). Evaluating the consistency of gene methylation in liver cancer using bisulfite sequencing data. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1-11.

129. Lee, J.-H., Park, S.-J., Kenta, N. (2015). An integrative approach for efficient analysis of whole genome bisulfite sequencing data. *BMC Genomics*, 16(12), 14.

130. Sun, X., Han, Y., Zhou, L., Chen, E., Lu, B., Liu, Y. (2018). A comprehensive evaluation of alignment software for reduced representation bisulfite sequencing data. *Bioinformatics*, 34(16), 2715–2723.

131. Gong, T., Borgard, H., Zhang, Z., Chen, S., Gao, Z., Deng, Y. (2022). Analysis and performance assessment of the whole genome bisulfite sequencing data workflow: Currently available tools and a practical guide to advance DNA methylation studies. *Small Methods*, 6(3), 1-42.

132. Liu, Y., Han, Y., Zhou, L., Pan, X., Sun, X., Liu, Y. (2020). A comprehensive evaluation of computational tools to identify differential methylation regions using RRBS data. *Genomics*, 112(6), 4567–4576.

133. Piao, Y., Xu, W., Park, K. H., Ryu, K. H., Xiang, R. (2021). Comprehensive evaluation of differential methylation analysis methods for bisulfite sequencing data. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(15), 1-15.

134. Suni, V., Seyednasrollah, F., Ghimire, B., Junttila, S., Laiho, A., Elo, L. L. (2020). Reproducibility-optimized detection of differential DNA methylation. *Epigenomics*, 12(9), 747–755.

135. Fernández, L., Pérez, M., Olanda, R., Orduña, J. M., Marquez-Molins, J. (2020). HPG-DHunter: An ultrafast, friendly tool for DMR detection and visualization. *BMC Bioinformatics*, 21(1), 287.

136. Akalin, A., Kormaksson, M., Li,S., Garrett-Bakelman, F. E., Figueroa, M. E., Melnick, A., Mason, C. E. (2012). methylKit: A comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biology*, 13(10), 87.

137. Bonora, G., Rubbi, L., Morselli, M., Ma, F., Chronis, C., Plath, K., Pellegrini, M. (2019). DNA methylation estimation using methylation-sensitive restriction enzyme bisulfite sequencing (MREBS). *PLOS ONE*, 14(4), 1-17.

138. Sun, Z., Behati, S., Wang, P., Bhagwate, A., McDonough, S., Wang, V., et al. (2023). Performance comparisons of methylation and structural variants from low-input whole-genome methylation sequencing. *Epigenomics*, 15(1), 11–19.

139. Mäkinen, H., van Oers, K., Eeva, T., Ruuskanen, S. (2022). The effect of experimental lead pollution on DNA methylation in a wild bird population. *Epigenetics*, 17(6), 625–641.

140. Peng, Q., Vijaya Satya, R., Lewis, M., Randad, P., Wang, Y. (2015). Reducing amplification artifacts in high multiplex amplicon sequencing by using molecular barcodes. *BMC Genomics*, 16(1), 589.

141. Kebschull, J.,Zador, A. (2015). Sources of PCR-induced distortions in high-throughput sequencing data sets. *Nucleic Acids Research*, 43(21), 1-15.

142. Laajala, E., Halla-Aho, V.,Grönroos, T., Kalim, U. U., Vähä-Mäkilä, M., Nurmio, M., et al. (2022). Permutation-based significance analysis reduces the type 1 error rate in bisulphite sequencing data analysis of human umbilical cord blood samples. *Epigenetics*, 17(12), 1608-1627.

143. Feró, O., Varga, D.,Nagy, É., Karányi, Z., Sipos, É., Engelhardt, J., et al. (2024). DNA methylome, R-loop and clinical exome profiling of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Data*, 11(1), 123.

144. Bock, S. L., Smaga, C. R., McCoy, J. A., Parrott, B. B. (2022). Genome-wide DNA methylation patterns harbour signatures of hatchling sex and past incubation temperature in a species with environmental sex determination. *Molecular Ecology*, 31(21), 5487-5505.

145. Saito, T., Whatmore, P., Taylor, J. F., Fernandes, J. M. O., Adam, A. C., Tocher, D. R., et al. (2022). Micronutrient supplementation affects DNA methylation in male gonads with potential intergenerational epigenetic inheritance involving the embryonic development through glutamate receptor-associated genes. *BMC Genomics*, 23(1), 115.

146. Yang, Y., Fear, J., Hu, J., Haecker, I., Zhou, L., Renne, R., et al. (2014). Leveraging biological replicates to improve analysis in ChIP-seq experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 9, 1-10.

147. Bouzeraa, L., Martin, H., Plessis, C., Dufour, P., Marques, J. C. S., Moore, S., et al. (2024). Decoding epigenetic markers: Implications of traits and genes through DNA methylation in resilience and susceptibility to mastitis in dairy cows. *Epigenetics*, 19(1), 1-15.

148. Storey, J. D., Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(16), 9440–9445.

149. Phillips, C. M., Stamatovic, S. M., Keep, R. F., Andjelkovic, A. V. (2023). Epigenetics and stroke: Role of DNA methylation and effect of aging on blood-brain barrier recovery. *Fluids and Barriers of the CNS*, 20(1), 14.

150. Rajkumar, M. S., Gupta, K., Khemka, N. K., Garg, R., Jain, M. (2020). DNA methylation reprogramming during seed development and its functional relevance in seed size/weight determination in chickpea. *Communications Biology*, 3(1), 340.

151. Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., Lempicki, R. A. (2003). DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biology*, 4(5), P3.

152. Kanehisa, M., Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30.

153. Rao, M., Zeng, Z., Tang, L., Cheng, G., Xia, W., Zhu, C. (2017). Next-generation sequencing-based microRNA profiling of mice testis subjected to transient heat stress. *Oncotarget*, 8(67), 111672–111682.

154. Ji, L., Sasaki, T., Sun, X., Ma, P., Lewis, Z. A., Schmitz, R. J. (2014). Methylated DNA is over-represented in whole-genome bisulfite sequencing data. *Frontiers in Genetics*, 5, 341.

155. İnternet: Andrews, S. (2010). FastQC:A quality control tool for high throughput sequence data. Web*:* https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/ Son Erişim Tarihi: 10.10.2024.

156. Crick, F. (1974). The double helix: A personal view. *Nature*, 248(5451), 766–769.

157. Zhao, T., Guan, X., Hu, Y., Zhang, Z., Yang, H., Shi, X., et al. (2024). Population-wide DNA methylation polymorphisms at single-nucleotide resolution in 207 cotton accessions reveal epigenomic contributions to complex traits. *Cell Research*, 34(12), 859-872.

158. Kawakatsu, T., Huang, S. C., Jupe, F., Sasaki, E., Schmitz, R. J., Urich, M. A., et al. (2016). Epigenomic diversity in a global collection of Arabidopsis thaliana accessions. *Cell*, 166(2), 492–505.

159. Gallo-Franco, J. J., Ghneim-Herrera, T.,Tobar-Tosse, F., Romero, M.,Chaura, J., Quimbaya, M. (2022). Whole-genome DNA methylation patterns of *Oryza sativa* (L.) and *Oryza glumaepatula* (Steud.) genotypes associated with aluminum response. *Plant Direct*, 6(8), 1-12.

160. Erdmann, R. M., Picard, C. L.(2020). RNA-directed DNA methylation. *PLoS Genetics*, 16(10), 1-31.

161. Lin, W., Xiao, X., Zhang, H., Li, Y., Liu, S., Sun, W., et al. (2019). Whole-genome bisulfite sequencing reveals a role for DNA methylation in variants from callus culture of pineapple (*Ananas comosus L.*). *Genes*, 10(11), 1-14.

162. Bajus, M., Macko-Podgórni, A., Grzebelus, D., Baránek, M.(2022). A review of strategies used to identify transposition events in plant genomes. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1-12.

163. Zhu, R., Xue, Y., Qian, W. (2025). Molecular mechanisms and biological functions of active DNA demethylation in plants. *Epigenetics & Chromatin*, 18(1), 41.

164. Ehrlich, M. (2019). DNA hypermethylation in disease: Mechanisms and clinical relevance. *Epigenetics*, 14(12), 1141-1163.

165. Pogribny, I. P., Rusyn, I. (2014). Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 342(2), 223-230.

166. Wei, B., Liu, H., Liu, X., Xiao, Q., Wang, Y., Zhang, J., et al. (2016). Genome-wide characterization of non-reference transposons in crops suggests non-random insertion. *BMC Genomics*, 17(1), 536.

167. Guan, Y., Zhou, M., Zhang, C., Han, Z., Zhang, Y., Wu, Z., Zhu, Y. (2024). Actively expressed intergenic genes generated by transposable element insertions in *Gossypium hirsutum cotton. Plants*, 13(15), 1-11.

168. Hirsch, C. D., Springer, N. M. (2017). Transposable element influences on gene expression in plants. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(1), 157–165.

169. Guo, W., Wang, D., Lisch, D. (2021). RNA-directed DNA methylation prevents rapid and heritable reversal of transposon silencing under heat stress in *Zea mays*. *PLoS Genetics*, 17(6), 1-28.

170. Martin, G. T., Seymour, D. K., Gaut, B. S.(2021). CHH methylation islands: A nonconserved feature of grass genomes that is positively associated with transposable elements but negatively associated with gene-body methylation. *Genome Biology and Evolution*, 13(8), 1-16.

171. Smale, S. T., Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 449–479.

172. Marchisio, M. A. (Editor). (2024). *Synthetic Promoters: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer,145–156.

173. Meng, X., Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 245–266.

174. Zhou, C., Zhang, L., Xu, D., Ding, H., Zheng, S., Liu, M. (2022). MeDIP-seq and RNA-seq analysis during porcine testis development reveals functional DMR at the promoter of LDHC. *Genomics*, 114(5), 1-12.

175. Kurtoğlu, K. Y. (2016). *Transcriptome Analysis of Morphine Biosynthesis in Opium Poppy (Papaver somniferum* L.*)*. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 199.

176. Zhao, Y., Zhang, Z., Li, M., Luo, J., Chen, F., Gong, Y., et al. (2019). Transcriptomic profiles of 33 opium poppy samples in different tissues, growth phases, and cultivars. *Scientific Data*, 6(1), 66.

177. Subramaniyam, S., Bae, S., Jung, M., Shin, Y., Oh, J.-H. (2020). The transcriptome data from the leaves of four Papaver species captured at the plant's three developmental life cycles. *Data in Brief*, 28, 1-6.

178. Aykanat, S., Türktaş, M. (2024). Divergent proteomic profiles of opium poppy cultivars. *Turkish Journal of Biology*, 48(1), 80–90.

179. Gupta, S., Sahu, S. K., Kaur, P., Singh, T. G., Singh, S. R. J. (2024). Unlocking plant chemical diversity: Exploring epigenetic influences on secondary metabolite production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 62, 103445.

180. Jia, Y., Xu, Y., Wang, B., Guo, L., Guo, M., Che, X., Ye, K. (2023). The tissue-specific chromatin accessibility landscape of *Papaver somniferum. Frontiers in Genetics*, 14, 1-7.

181. Boke, H., Ozhuner, E., Turktas, M., Parmaksiz, I., Ozcan, S., Unver, T. (2015). Regulation of the alkaloid biosynthesis by miRNA in opium poppy. *Plant Biotechnology Journal*, 13(3), 409–420.

182. Davoodi Mastakani, F., Pagheh, G., Rashidi Monfared, S., Shams-Bakhsh, M. (2018). Identification and expression analysis of a microRNA cluster derived from pre-ribosomal RNA in *Papaver somniferum* L. and *Papaver bracteatum* L. *PLoS One*, 13(8), 1-20.

183. Antequera, F., Bird, A. P. (1988). Unmethylated CpG islands associated with genes in higher plant DNA. *The EMBO Journal*, 7(8), 2295–2299.

184. Miranda, T. B., Jones, P. A.(2007). DNA methylation: The nuts and bolts of repression. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 384–390.

185. Arora, H., Singh, R. K., Sharma, S., Sharma, N., Panchal, A., Das, T., et al. (2022). DNA methylation dynamics in response to abiotic and pathogen stress in plants. *Plant Cell Reports*, 41(10), 1931–1944.

186. Rodrigues, J. A., Hsieh, P. H., Ruan, D., Nishimura, T., Sharma, M. K., Sharma, R., et al. (2021). Divergence among rice cultivars reveals roles for transposition and epimutation in ongoing evolution of genomic imprinting. *Proceedings of the National National Academy of Sciences*, 118(29), 1-9.

187. Shaikh, A., Chachar, S., Chachar, M., Ahmed, N., Guan, C., Zhang, P. (2022). Recent advances in DNA methylation and their potential breeding applications in plants. *Horticulturae*, 8, 562.

188. Lee, J., Lee, S., Park, K., Shin, S.-Y., Frost, J. M., Hsieh, P.-H., et al. (2023). Distinct regulatory pathways contribute to dynamic CHH methylation patterns in transposable elements throughout Arabidopsis embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1-14.

189. Argentin, J., Bolser, D., Kersey, P. J., Flicek, P. (2023). Comparative analysis of repeat content in plant genomes, large and small. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1-8.

190. Zakrzewski, F., Schmidt, M., Van Lijsebettens, M., Schmidt, T. (2017). DNA methylation of retrotransposons, DNA transposons and genes in sugar beet (*Beta vulgaris L.*). *Plant Journal*, 90(6), 1156–1175.

191. Ito, T., Nishio, H., Tarutani, Y., Emura, N., Honjo, M. N., Toyoda, A., et al. (2019). Seasonal stability and dynamics of DNA methylation in plants in a natural environment. *Genes*, 10(7), 1-13.

192. Shan, S., Gitzendanner, M. A., Boatwright, J. L., Spoelhof, J. P., Ethridge, C. L., Ji, L., et al. (2024). Genome-wide DNA methylation dynamics following recent polyploidy in the allotetraploid *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *New Phytologist*, 242(3), 1363–1376.

193. An, Y.-q. C., Goettel, W., Han, Q., Bartels, A., Liu, Z., Xiao, W. (2017). Dynamic changes of genome-wide DNA methylation during soybean seed development. *Scientific Reports*, 7(1), 1-14.

194. Yan, T., Kuang, L., Gao, F., Chen, J., Li, L., Wu, D. (2025). Differentiation of genome-wide DNA methylation between japonica and indica rice. *Plant Journal*, 121(2), 1-18.

195. Goeldel, C., Johannes, F. (2023). Stochasticity in gene body methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 75, 102436.

196. Shahzad, Z., Hollwey, E., Moore, J. D., Choi, J., Cassin-Ross, G., Rouached, H., et al. (2025). Gene body methylation regulates gene expression and mediates phenotypic diversity in natural *Arabidopsis* populations. *Nature Plants*, 11(10), 2084-2099.

197. Muyle, A. M., Seymour, D. K., Lv, Y., Huettel, B., Gaut, B. S. (2022). Gene body methylation in plants: Mechanisms, functions, and important implications for understanding evolutionary processes. *Genome Biology and Evolution*, 14(4), 1-18.

198. Bewick, A. J., Zhang, Y., Wendte, J. M., Zhang, X., Schmitz, R. J.(2019). Evolutionary and experimental loss of gene body methylation and its consequence to gene expression. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9(8), 2441–2445.

199. Omony, J., Nussbaumer, T., Gutzat, R. (2020). DNA methylation analysis in plants: Review of computational tools and future perspectives. *Briefings in Bioinformatics*, 21(3), 906–918.

200. Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J.-K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(8), 489–506.

201. Bewick, A. J., Schmitz, R. J. (2017). Gene body DNA methylation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 36, 103–110.

202. He, L., Huang, H., Bradai, M., Zhao, C., You, Y., Ma, J., et al. (2022). DNA methylation-free *Arabidopsis* reveals crucial roles of DNA methylation in regulating gene expression and development. *Nature Communications*, 13(1), 1-16.

203. Berdasco, M., Alcázar, R., García-Ortiz, M. V., allestar, E., Fernández, A. F.,Roldán-Arjona, T., et al. (2008). Promoter DNA hypermethylation and gene repression in undifferentiated *Arabidopsis* cells. *PLoS One*, 3(10), 1-10.

204. Sang, Y., Ma, Y., Wang, R., Wang, Z., Wang, T., Su, Y. (2024). Epigenetic regulation of organ-specific functions in *Mikania micrantha* and *Mikania cordata*: Insights from DNA methylation and siRNA integration. *BMC Plant Biology*, 24(1), 1-20.

205. Ibragić, S., Dahija, S., Karalija, E. (2025). The good, the bad, and the epigenetic: Stress-induced metabolite regulation and transgenerational effects. *Epigenomes*, 9(2), 1-27.

206. Zhang, Z., Wang, H., Wang, Y., Xi, F., Wang, H., Kohnen, M. V., et al. (2021). Whole-genome characterization of chronological age-associated changes in methylome and circular RNAs in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) from vegetative to floral growth. *Plant Journal*, 106(2), 435–453.

207. Lozano, R., Booth, G. T., Omar, B. Y., Li, B., Buckler, E. S., Lis, J. T., et al. (2021). RNA polymerase mapping in plants identifies intergenic regulatory elements enriched in causal variants. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 11(11), 1-10.

208. Xu, G., Lyu, J., Li, Q., Liu, H., Wang, D., Zhang, M., et al. (2020). Evolutionary and functional genomics of DNA methylation in maize domestication and improvement. *Nature Communications*, 11(1), 1-32.

209. Le, N. T., Harukawa, Y., Miura, S., Boer, D., Kawabe, A., Saze, H. (2020). Epigenetic regulation of spurious transcription initiation in Arabidopsis. *Nature Communications*, 11(1), 1-15.

210. Wu, X. N. (Editor). (2021). *Plant phosphoproteomics: methods and protocols*. (7. Baskı). New York, NY: Springer, 45–71.

211. Zhang, W. J., Zhou, Y., Zhang, Y., Su, Y. H., Xu, T. (2023). Protein phosphorylation: A molecular switch in plant signaling. *Cell Reports*, 42(7), 1-13.

212. Damaris, R. N., Yang, P. (2021). Protein phosphorylation response to abiotic stress in plants. *Methods in Molecular Biology*, 2358, 17–43.

213. Wu, X. N. (Editor). (2021). *Plant phosphoproteomics: methods and protocols*. (7. Baskı). New York, NY: Springer, 113–135.

214. Wu, X. N. (Editor). (2021). *Plant phosphoproteomics: methods and protocols*. (7. Baskı). New York, NY: Springer, 17–43.

215. Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. (2000). Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(8–9), 1172–1183.

216. Ji, C., Li, H., Zhang, Z., Peng, S., Liu, J., Zhou, Y., et al. (2025). The power of small signaling peptides in crop and horticultural plants. *The Crop Journal*, 13(3), 656–667.

217. Mayer, B. J. (1999). Protein-protein interactions in signaling cascades. *Molecular Biotechnology*, 13(3), 201–213.

218. Lyu, R., Singh, S. K., Liu, Y., Patra, B., Zhou, Y., Wang, B., et al. (2021). Reprogramming plant specialized metabolism by manipulating protein kinases. *aBIOTECH*, 2(3), 226–239.

219. Yaffe, M. B., Elia, A. E. (2001). Phosphoserine/threonine-binding domains. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(2), 131–138.

220. Xiao, J., Zhou, Y., Xie, Y., Li, T., Su, X., He, J., et al. (2024). ATP homeostasis and signaling in plants. *Plant Communications*, 5(4), 1-15.

221. Choi, J., Tanaka, K., Cao, Y., Qi, Y., Qiu, J., Liang, Y., et al. (2014). Identification of a plant receptor for extracellular ATP. *Science*, 343(6168), 290–294.

222. Tanaka, K., Gilroy, S., Stacey, G. (2010). Extracellular ATP signaling in plants. *Trends in Cell Biology*, 20, 601–608.

223. Nogia, P., Pati, P. K. (2021). Plant secondary metabolite transporters: Diversity, functionality, and their modulation. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1-20.

224. Heinig, U., Gutensohn, M., Dudareva, N., Aharoni, A. (2013). The challenges of cellular compartmentalization in plant metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 239–246.

225. Kistler, H. C., Broz, K. (2015). Cellular compartmentalization of secondary metabolism. *Frontiers in Microbiology*, 6, 68.

226. Yazaki, K. (2005). Transporters of secondary metabolites. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(3), 301–307.

227. Yazaki, K. (2006). ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters*, 580(4), 1183–1191.

228. Li, Z. P., Paterlini, A., Glavier, M., Bayer, E. M. (2021). Intercellular trafficking via plasmodesmata: Molecular layers of complexity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(3), 799–816.

229. Gill, R. A., Ahmar, S., Ali, B., Saleem, M. H., Khan, M. U., Zhou, W., Liu, S. (2021). The role of membrane transporters in plant growth and development, and abiotic stress tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 1-25.

230. Hagel, J. M., Facchini, P. J.(2013). Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: A century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, 54(5), 647–672.

231. Han, J., Wu, Y., Zhou, Y., Li, S. (2021). Engineering Saccharomyces cerevisiae to produce plant benzylisoquinoline alkaloids. *aBIOTECH*, 2(3), 264–275.

232. Beaudoin, G. A. W., Facchini, P. J. (2014). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, 240(1), 19–32.

233. Veech, R. L., Todd King, M., Pawlosky, R., Kashiwaya, Y., Bradshaw, P. C., Curtis, W. (2019). The “great” controlling nucleotide coenzymes. *IUBMB Life*, 71(5), 565–579.

234. Haitao Hu, Y. W., Yang, L. (2025). Research progress on the $NAD(P)^+$ biosynthesis and function in plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 60(1), 114–131.

235. Tripathi, D. K. et al. (Editors). (2020). *Plant life under changing environmen*t. (1. Baskı). Cambridge: Academic Press, 681–717.

236. King Hing, N., Aryal, U. K., Morgan, J. A. (2021). Probing light-dependent regulation of the Calvin cycle using a multi-omics approach. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1-14.

237. Kara, N., Baydar, H. (2021). The alkaloid content of poppy (*Papaver somniferum* L.) varieties in Turkey by their correlation and path coefficient relationships. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*, 5(4), 450–455.

238. Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G., Lattanzio, V. (2015). Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26378–26394.

239. Keskin, N., Kunter, B. (2007). Ercis üzüm çeşidinin kallus kültürlerinde UV ışını etkisiyle resveratrol üretiminin uyarılması. *Journal of Agricultural Sciences*, 13(4), 379–384.

240. Sun, H., Song, H., Deng, X., Liu, J., Yang, D., Zhang, M., et al. (2022). Transcriptome-wide characterization of alkaloids and chlorophyll biosynthesis in lotus plumule. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1-15.

241. Murthy, H. N., Joseph, K. S., Paek, K. Y., Park, S. Y. (2024). Light as an elicitor for enhanced production of secondary metabolites in plant cell, tissue, and organ cultures. *Plant Growth Regulation*, 104(1), 31–49.

242. Trivellini, A., Toscano, S., Romano, D., Ferrante, A. (2023). The role of blue and red light in the orchestration of secondary metabolites, nutrient transport and plant quality. *Plants*, 12, 1-17.

243. Sharafzadeh, S., Ordookhani, K. (2011). Influence of carbon dioxide enrichment on accumulation of secondary metabolites in plants. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(11), 1681-1686.

244. Winzer, T., Kern, M., King, A. J., Larson, T. R., Teodor, R. I., Donninger, S. L., et al. (2015). Morphinan biosynthesis in opium poppy requires a P450-oxidoreductase fusion protein. *Science*, 349(6245), 309–312.

245. Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K., Endo, T., Tasaka, M.,Shikanai, T. (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature*, 429(6991), 579–582.

246. Johnson, M. P. (2016). Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 255–273.

247. Cooper, G. M. (2000). *The cell: A molecular approach* (2nd ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates, 625.

248. Abd-Hamid, N. A., Ahmad-Fauzi, M. I., Zainal, Z., Ismail, I. (2020). Diverse and dynamic roles of F-box proteins in plant biology. *Planta*, 251(3), 68.

249. Yan, Y. S., Chen, X. Y, Yang, K., Sun, Z. X., Fu, Y. P., Zhang, Y. M., Fang, R. X. (2011). Overexpression of an F-box protein gene reduces abiotic stress tolerance and promotes root growth in rice. *Molecular Plant*, 4(1), 190–197.

250. Van der Horst, S., Filipovska, T., Hanson, J., Smeekens, S. (2020). Metabolite control of translation by conserved peptide uORFs: The ribosome as a metabolite multisensor. *Plant Physiology*, 182(1), 110–122.

251. Chyżyńska, K., Labun, K., Jones, C., Grellscheid, S. N., Valen, E. (2021). Deep conservation of ribosome stall sites across RNA processing genes. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 3(2), 38.

252. Jimenez, A., Santos, A., Alonso, G., Vazquez, D. (1976). Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells: Comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 425(3), 342–348.

253. Li, Y., Winzer, T., He, Z., Graham, I. A. (2020). Over 100 million years of enzyme evolution underpinning the production of morphine in the Papaveraceae family of flowering plants. *Plant Communications*, 1(2), 1-16.

254. Dang, T. T., Facchini, P. J. (2014). CYP82Y1 is N-methylcanadine 1-hydroxylase, a key noscapine biosynthetic enzyme in opium poppy. *Journal of Biological Chemistry*, 289(4), 2013–2026.

255. Kurtoğlu, K. Y. (2016). *Transcriptome Analysis of Morphine Biosynthesis in Opium Poppy (Papaver somniferum* L.*)*. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitütsü, İstanbul, 199.

256. İnal, B. (2015). *Haşhaş (Papaver somniferum* L.*)'da Tebain Üretim Mekanizmasının Yeni Nesil Dizileme Sistemi İle Transkriptom Düzeyinde Incelenmesi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 185.

257. Qi, W., Zhang, Y., Li, M., Zhang, P., Xing, J., Chen, Y., Zhang, L. (2024). Endocytic recycling in plants: Pathways and regulation. *Journal of Experimental Botany*, 75(16), 4712–4728.

258. He, D., Xia, B., Zhou, Q., Wang, L., Huang, X. (2019). Rare earth elements regulate the endocytosis and DNA methylation in root cells of *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, 227, 522–528.

259. Shekunov, E. V., Efimova, S. S., Yudintceva, N. M., Muryleva, A. A., Zarubaev, V. V., Slita, A. V., Ostroumova, O. S. (2021). Plant alkaloids inhibit membrane fusion mediated by calcium and fragments of MERS-CoV and SARS-CoV/SARS-CoV-2 fusion peptides. *Biomedicines*, 9(10), 1-19.

260. Genot, B., Lang, J., Berriri, S., Garmier, M., Gilard, F., Pateyron, S., *et al.* (2017). Constitutively active Arabidopsis MAP kinase 3 triggers defense responses involving salicylic acid and SUMM2 resistance protein. *Plant Physiology*, 174(2), 1238–1249.

261. Yue, J., López, J. M. (2020). Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 1-22.

262. Hashimoto, M., Komatsu, K., Maejima, K., Okano, Y., Shiraishi, T., Ishikawa, K., *et al.* (2012). Identification of three MAPKKKs forming a linear signaling pathway leading to programmed cell death in *Nicotiana benthamiana. BMC Plant Biology*, 12, 103.

263. Yadav, M. K., Kumar, A., Short, M. D., Nidumolu, B., Saint, C. P. (2019). Aquatic phytotoxicity to Lemna minor of three commonly used drugs of addiction in Australia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 103(5), 710–716.

264. Zhou, Y., Singh, S. K., Patra, B., Liu, Y., Pattanaik, S., Yuan, L. (2025). Mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of plant specialized metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 76(2), 262–276.

265. Liu, S., Zhang, Q., Kollie, L., Dong, J., Liang, Z. (2023). Molecular networks of secondary metabolism accumulation in plants: Current understanding and future challenges. *Industrial Crops and Products*, 201, 116901.

266. Liu, X., Singh, S. K., Patra, B., Liu, Y., Wang, B., Wang, J., et al. (2021). Protein phosphatase NtPP2C2b and MAP kinase NtMPK4 act in concert to modulate nicotine biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 72(5), 1661–1676.

267. Anders, A., Ghosh, B., Glatter, T., Sourjik, V. (2020). Design of a MAPK signalling cascade balances energetic cost versus accuracy of information transmission. *Nature Communications*, 11(1), 1-10.

268. Li, W., Lin, S., Wang, R., Chen, C., Ni, L., Wang, W., Liang, Z. (2025). Regulation of plant hormones on the secondary metabolism of medicinal plants. *Medicinal Plant Biology*, 4(1), 1-13.

269. Song, S., Chang, J., Ma, C., Tan, Y. W. (2017). Single-molecule fluorescence methods to study plant hormone signal transduction pathways. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1-15**.**

270. Frick, S., Kramell, R., Kutchan, T. M., Larkin, P. J. (Editors). (2005). *Studying morphine biosynthesis using transgenic opium poppy (Papaver somniferum* L.*).* Leuven: International Society for Horticultural Science, 37-43.



Gazili olmak ayrıcalıktır