

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KİMYASAL YENİDEN PROGRAMLAMA AJANININ *Arabidopsis thaliana*'NİN SOMATİK EMBRİYOGENEZİ ÜZERİNDEKİ MOLEKÜLER ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURCU GÜNDÜZ

1502060044

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Sinan MERİÇ

EKİM 2025

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KİMYASAL YENİDEN PROGRAMLAMA AJANININ *Arabidopsis thaliana*'NİN SOMATİK EMBRİYOGENEZİ ÜZERİNDEKİ MOLEKÜLER ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURCU GÜNDÜZ

1502060044

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Sinan MERİÇ

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Çimen ATAK

Prof. Dr. Şule ARI

EKİM 2025

ÖNSÖZ

T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi'nde tamamladığım lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini ve bana olan inancını her zaman hissettiğim, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum/duyacağım, bu günlere gelmemde üzerimde en büyük emeği olan, her zaman yol gösteren ve öğretme isteğiyle kendisini örnek almamı sağlayan saygıdeğer danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Sinan MERİÇ' e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca aldığım dersler ile bakış açımı genişleten ve danıştığım her konuda sorularımı büyük keyifle yanıtlayan sevgili Prof. Dr. Çimen ATAĞ' a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimime başlamam için beni motive eden ve lisans hayatımdan beri bana sayısız yardımı dokunan ihtiyacım olduğu zaman yardım etmekten hiç kaçınmayan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Tamer Gümüş'e ve ne zaman ihtiyacım olsa her anlamda yanımda olan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Buse ÖZDEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimime başladığımdan itibaren her zaman yanımda olan ve destekleyen, bu üç yılı kahkahalarla ve mutlulukla hatırlamamı sağlayacak en büyük parçalardan birisi olan sevgili arkadaşım MSc. Tuğçe AYDIN' a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımda her konuda beni destekleyen yanımda olan, desteklerini ve sevgilerini hep hissettiğim çok sevgili dostlarım Özlem Pullin, Yağmur Ekin BOYOĞLU, Sahra ARAS, Ceren Nazik'e ve Süleyman HAYKIR' a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca kararlarımı destekleyen ve yanımda olan onların verdiği sevgi ile her şeye bir adım daha önde başladığımı hissettiğim başta canım annem Sadegül GÜNDÜZ ve canım babam Ergüven GÜNDÜZ olmak üzere tüm aileme en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Ekim, 2025

Burcu GÜNDÜZ

Bu tez BAP-2309 numaralı proje ile T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi BAP Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ	iv
KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
2.2. Somatik Embriyogenez.....	5
2.3. Somatik Embriyogenezin Moleküler Mekanizması.....	8
2.3.1. Hormonal Kontrol	9
2.3.2. Transkripsiyonel Kontrol	11
2.3.3. Epigenetik Kontrol	13
2.3.4. Kromatin Yeniden Düzenlenmesi	16
2.4. Histon Modifikasyonları.....	17
2.5. Histon Lizin Metil Transferazlar.....	20
2.6. Lizin Metiltransferaz İnhibitörleri.....	20
2.6.1. BIX-01294	22
2.7. Omik Teknolojiler	26
2.7.1. Transkriptomik.....	27
3. MATERYAL- METOT	30

3.1.	Bitki Materyali	30
3.2.	Bitkilerin Yetiştirilmesi	30
3.3.	Kimyasal Yeniden Programlama Ajanı BIX-01294'ün Uygulaması ve Somatik Embriyogenez İndüksiyonu.....	31
3.3.1.	Sudan Red 7B Boyaması.....	32
3.4.	Total RNA İzolasyonu	33
3.5.	RNA Dizileme	36
3.5.1.	Biyoinformatik Analiz	36
3.6.	İstatistiksel Analiz	37
4.	SONUÇLAR.....	38
4.1.	Bitkilerin Gelişimi	38
4.2.	Somatik Embriyogenez: Doku Kültürünün Kurulması ve Somatik Embriyoların Gelişimi	39
4.3.	Somatik embriyogenez etkinliği ve somatik embriyogenez üretkenliğinin belirlenmesi	44
4.4.	Sudan Red 7B ile Embriyojenik Dokuların Boyanması	46
4.5.	RNA'ların Kalitatif ve Kantitatif Değerlendirilmesi	47
4.6.	RNA Sekanslama.....	49
4.6.1.	Diferansiyel Anlatım Analizi	55
4.6.2.	Gen Ontolojisi	64
4.6.3.	KEGG Analizi	68
5.	TARTIŞMA.....	101
6.	KAYNAKÇA.....	115

SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

°C: Santigrat derece

mL: Mililitre

L: Litre

M: Molar

µm: Mikrometre

nm: Nanometre

µM: Mikromolar

g: Gram

dk: Dakika

mM: Milimolar

N: Normal

%: Yüzde

µl: Mikrolitre

ng: Nanogram

sn: Saniye

V: Volt

KISALTMALAR

2,4-D: 2,4-Diklorofenoksiasetik asit

AP2/ERF: APETALA2/Etilen-Tepki Faktörü

ARR: *Arabidopsis* Yanıt Düzenleyicileri

Bç: Baz Çifti

Ch: Kaetosin (Chaetocin)

Col-0: Columbia-0 ekotip

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DNMT: DNA metiltransferaz

DSE: Direkt Somatik Embriyogenez

EtOH: Etil Alkol

GLP: G9 Benzeri Protein (G9 Like Protein)

GO: Gen ontolojisi

H3K27: Histon 3 Lizin 27

H3K9: Histon 3 Lizin 9

HAT: Histon asetiltransferaz

HKDM: Histon lizin demetilaz

HKMT: Histon lizin Metiltransferaz

IAA: İndol-3-Asetik Asit

IC₅₀: Yarı Maksimum İnhibitör Konsatrasyonu (Half maximal inhibitory concentration)

IZE: Olgunlaşmamış Zigotik Embriyo (Immature Zygotic Embryo)

iPSC: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre

İSE: İndirekt Somatik Embriyogenez

KEGG: Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi

KMT: Lizin Metiltransferaz

LSD: ise lizin-spesifik demetilaz

MBD: Metil-CpG bağlayıcı domain

MS: Murashige ve Skoog Besiyeri

NaOCl: Sodyum Hipoklorit

NaOH: Sodyum Hidroksit

pH: Hidrojen Potansiyeli

PRC2: Polikomb Baskılayıcı Kompleks 2 (Polycomb Repressive Complex 2)

RNA: Ribonükleik Asit

RNA-seq: RNA Dizileme

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SAM: S- adenosil-metiyonin

SCR: Somatik Hücre Yeniden Programlaması

SE: Somatik Embriyogenez

SHA: S – adenosil - homosistein

TBE: Tris Borat EDTA

TF: Transkripsiyon Faktörü

TSA: Trikostatin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. <i>Arabidopsis thaliana</i> 'nın yaşam döngüsü (Kramer, 2015).	4
Şekil 2. 2. Dikotil bitkilerde somatik embriyogenez (Yuan ve ark., 2024).	6
Şekil 2. 3. <i>Arabidopsis</i> embriyolarının gelişim evreleri. (A) <i>A. thaliana</i> embriyolarının gelişim evreleri. Dikey ölçek çubukları = 50 µm. (B) Bu çalışmada kullanılan tohumların içindeki embriyoların farklı kontrast görüntüleri. Soldan sağa: küresel, kalp, torpedo, bükülmüş kotiledon ve olgun yeşil evre. Ölçek çubukları = 100 µm. (Yoo ve ark., 2021).	7
Şekil 2. 4. Somatik embriyogenezin iki farklı yolu (Kumar ve ark., 2017 referans alınarak düzenlenmiştir).	7
Şekil 2. 5. Somatik embriyogenezin moleküler mekanizmaları (Long ve ark., 2022 referans alınarak düzenlenmiştir).	9
Şekil 2. 6. Epigenetik araçlar. DNMT'ler: DNA metiltransferazları, HKMT'ler: Histon lizin metiltransferazları, PRMT'ler: Protein arjinin metiltransferazları, HAT'lar: Histon asetiltransferazları, MBD'ler: Metil-CpG bağlayıcı alanlar, PHD: Bitki homeo alanı, HKDM'ler: Histon lizin demetilazları, HDAC'ler: Histon deasetilazları (Biswas ve ark., 2018 referans alınarak düzenlenmiştir).	15
Şekil 2. 7. Histon modifikasyon düzenlemesinin genel görünümü. A. Histon metilasyonu belirli genomik lokuslardaki "yazıcılar" (histon metiltransferazlar) ve "siliciler" (histon demetilazlar) arasındaki denge tarafından düzenlenen dinamik süreçlerdir. B. Histon H3 ve H4 üzerindeki ana metilasyon bölgeleri, ilgili metiltransferazlar (yukarıda) ve demetilazlar (aşağıda) gösterilmiştir (Tao ve ark., 2024).	19
Şekil 2. 8. Lizin metiltransferaz katalizinin genel mekanizması (DeCarlo ve ark., 2012).	20
Şekil 2. 9. Doğal ürün bazlı inhibitörler (DeCarlo ve ark.,2012).	21
Şekil 2. 10. BIX-01294 lizin metiltransferaz inhibitörünün moleküler yapısı (DeCarlo ve ark., 2012).	22
Şekil 2. 11. G9a yapısı (Casciello ve ark., 2015).	23
Şekil 2. 12. G9a'nın kromatin üzerindeki etki mekanizmasının şematik gösterimi (Hajar ve ark., 2025 referans alınarak düzenlenmiştir).	24
Şekil 2. 13. Çoklu omik yaklaşımlar (Roychowdhury ve ark., 2023).	27
Şekil 3. 1. Silikler oluştuktan sonra olgunlaşmamış zigotik embriyoların doku kültürüne aktarılması.	31
Şekil 3. 2. Kütüphane hazırlığı iş akışı	36
Şekil 4. 1. Yedi haftalık <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 bitkisi ve silik yapıları	38
Şekil 4. 2. 7 haftalık silik yapısının kapalı ve açık hali (Beyaz ok: olgunlaşmamış zigotik embriyolar).	39
Şekil 4. 3. 7 haftalık siliklerin içerisinde bulunan bükülmüş kotiledon ve torpedo evresindeki olgunlaşmamış zigotik embriyo görüntüleri (Soldan sağa: A) Bükülmüş kotiledon, B) Torpedo).	39
Şekil 4. 4. B5 besiyerinde <i>Arabidopsis thaliana</i> IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün).	40

Şekil 4. 5. 5 µM 2,4-D içeren besiyerinde <i>Arabidopsis thaliana</i> IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün) (Beyaz ok: Somatik embriyo yapısı) (Siyah ok: Protüberans yapısı).	40
Şekil 4. 6. 2,5 µM BIX-01294 içeren besiyerinde <i>Arabidopsis thaliana</i> IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün).....	41
Şekil 4. 7. 1 µM BIX-01294 içeren besiyerinde <i>Arabidopsis thaliana</i> IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün).....	42
Şekil 4. 8. 0,1 µM BIX-01294 içeren besiyerinde <i>Arabidopsis thaliana</i> IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün) (Beyaz ok: Somatik embriyo yapısı).....	42
Şekil 4. 9. 0,5 µM BIX-01294 içeren besiyerinde <i>Arabidopsis thaliana</i> IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün).....	43
Şekil 4. 10. 0,05 µM BIX-01294 içeren besiyerinde <i>Arabidopsis thaliana</i> IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün).....	44
Şekil 4. 11. Somatik embriyolar oluşturan eksplantların yüzdesi (Beyaz: B5, Turuncu: 5 µM 2,4-D, Yeşil: 2,5 µM BIX-01294, Mavi: 0,1 µM BIX-01294).....	45
Şekil 4. 12. 21 günlük kültür sonunda bir olgunlaşmamış zigotik embriyo üzerinde oluşan SE sayısı (Beyaz: B5, Turuncu: 5 µM 2,4-D, Yeşil: 2,5 µM BIX-01294, Mavi: 0,1 µM BIX-01294).	46
Şekil 4. 13. Farklı dönemlerdeki (kotiledon, bitkicik, kallus, somatik embriyo, kallustan kökenlenmiş somatik embriyolar) yapıların Sudan Red 7B ile boyanması (Üst satır: Boyama Öncesi, Alt satır: Boyama Sonrası).....	46
Şekil 4. 14. 5. ve 10. günde izolasyonu yapılan RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü. Markır (Thermo 100 bç 1) B5 Kontrol; 2) 0,05 µM BIX-01294; 3) 0,5 µM BIX-01294; 4) 0,1 µM BIX-01294; 5) 1 µM BIX-01294; 6) 2,5 µM BIX-01294; 7) 5 µM 2,4-D; 8) 2,5 µM BIX-01294 SE*; 9) 5 µM 2,4-D SE*).....	47
Şekil 4. 15. Örnekler arasında en fazla varyasyon gösteren ilk 50 genin anlatım profili	52
Şekil 4. 16. Gerçekleştirilen karşılaştırma grupları ve anlamlı derece farklılık gösteren genlerin sayıları (FDR < 0.05).	55
Şekil 4. 17. 5. ve 10. günlere ait belirtilen karşılaştırmalara ait venn şemaları A) 5.gün B5- 5.gün 2,5 µM BIX-01294 ve 5.gün B5- 5.gün 5 µM 2,4-D uygulamalarındaki DEG'ler için Venn diagramı B) 10.gün B5- 10.gün 2,5 µM BIX-01294 ve 10.gün B5- 10.gün 5 µM 2,4-D uygulamalarındaki DEG'ler için Venn diagramı C) 10.gün B5- 10.gün 2,5 µM BIX-01294, 10.gün B5- 10.gün 5 µM 2,4-D ve 10.gün 5 µM 2,4-D- 10.gün 2,5 µM BIX-01294 uygulamalarındaki DEG'ler için Venn diagramı	56
Şekil 4. 18. Belirtilen karşılaştırmalara ait venn şemaları	57
Şekil 4. 19. Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 µM 2,4-D için en anlamlı değişkenlik gösteren GO terimleri.....	64
Şekil 4. 20. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 5.gün 2,5 µM BIX için en anlamlı değişkenlik gösteren GO terimleri	65
Şekil 4. 21. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı değişkenlik gösteren GO terimleri	66
Şekil 4. 22. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5 µM 2,4-D için en anlamlı değişkenlik gösteren GO terimleri.....	67

Şekil 4. 23. Karşılaştırma 10. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 2,5 µM BIX için en anlamlı değişkenlik gösteren GO terimleri	68
Şekil 4. 24. Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 µM 2,4-D için en anlamlı artış gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	70
Şekil 4. 25. Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 µM 2,4-D için en anlamlı düşüş gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	72
Şekil 4. 26. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 5. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı artış gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	74
Şekil 4. 27. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 5. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı düşüş gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	76
Şekil 4. 28. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı artış gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	78
Şekil 4. 29. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı düşüş gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	80
Şekil 4. 30. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5µM 2,4-D için en anlamlı artış gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	82
Şekil 4. 31. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5µM 2,4-D için en anlamlı düşüş gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	84
Şekil 4. 32. Karşılaştırma 10. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı artış gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	86
Şekil 4. 33. Karşılaştırma 10. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı düşüş gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	88
Şekil 4. 34. Karşılaştırma 5. gün B5 – 10. gün B5 için en anlamlı artış gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	90
Şekil 4. 35. Karşılaştırma 5. gün B5 – 10. gün B5 için en anlamlı düşüş gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	92
Şekil 4. 36. Karşılaştırma 5. gün 2,5 µM BIX-01294 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı artış gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	94
Şekil 4. 37. Karşılaştırma 5. gün 2,5 µM BIX-01294 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı azalış gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	96
Şekil 4. 38. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 5 µM 2,4-D için en anlamlı artış gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	98
Şekil 4. 39. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 5 µM 2,4-D için en anlamlı azalış gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi	100
Şekil 5. 1. Somatik embriyogenez sırasında oksin ve BIX-01294 uygulamalarına bağlı olarak oksin taşınım genlerinin (AUX1, LAX1, LAX2, PIN1, PIN3, PIN4, PIN6, PIN7) anlatım değişimleri	108
Şekil 5. 2. Somatik embriyogenez sırasında vejetatif-embriyonik geçişi düzenleyen WRINKLED1 (WRI1) – aracılı yolk	110
Şekil 5. 3. 2,4-D ve BIX-01294 uygulamalarının 10. günde H3K9me2 seviyesi ve non-CpG DNA metilasyon genleri (CMT2, CMT3, DRM2) üzerindeki etkisi.	111

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. Bitki rejenerasyonunda rol oynayan bazı temel düzenleyici faktörler (transkripsiyon faktörleri, epigenetik düzenleyiciler ve oksin homeostazında rol oynayan diğerleri) (Ibanez ve ark., 2020).	12
Tablo 2.2. Bitki rejenerasyonunda rol oynayan bazı temel düzenleyici faktörler (transkripsiyon faktörleri, epigenetik düzenleyiciler ve oksin homeostazında rol oynayan diğerleri) (Ibanez ve ark., 2020) (devamı).....	13
Tablo 3. 1. Somatik embriyogenez indüksiyonu için kullanılan besiyerleri (Wojcikowska ve ark., 2017).	31
Tablo 3. 2. Gamborg B5 besiyeri içeriği (Gamborg ve ark., 1976).	32
Tablo 3. 3. RNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar.....	35
Tablo 4. 1. Somatik embriyolar oluşturan eksplantların 21 günlük kültürde SE oluşturma sayısı ve %SE.....	45
Tablo 4. 2. İzolasyonu yapılan 5.gün zigotik embriyo RNA örneklerinin saflaştırma öncesi ve sonrası konsantrasyon/saflık değerleri	47
Tablo 4. 3. İzolasyonu yapılan 5.gün zigotik embriyo RNA örneklerinin saflaştırma öncesi ve sonrası konsantrasyon/saflık değerleri (devamı).	48
Tablo 4. 4. İzolasyonu yapılan 10.gün zigotik embriyo RNA örneklerinin saflaştırma öncesi ve sonrası konsantrasyon/saflık değerleri	48
Tablo 4. 5. İzolasyonu yapılan 10.gün zigotik embriyo RNA örneklerinin saflaştırma	49
Tablo 4. 6. Dizileme için seçilen 5. gün RNA'ların Qubit 3 florometresi ölçümü sonrası saflık değerleri ve Agilent 2100 Bioanalyzer ölçümü sonrası elde edilen RNA bütünlüğü (RIN) değerleri.....	50
Tablo 4. 7. Dizileme için seçilen 10. gün RNA'ların Qubit 3 florometresi ölçümü sonrası saflık değerleri ve Agilent 2100 Bioanalyzer ölçümü sonrası elde edilen RNA bütünlüğü (RIN) değerleri.....	50
Tablo 4. 8. Çalışılan örneklerle ait grup bilgileri, okuma sayıları ve hizalama değerleri	51
Tablo 4. 9. Örnekler arasında en fazla varyasyon gösteren ilk 50 gen profili.....	53
Tablo 4. 10. Örnekler arasında en fazla varyasyon gösteren ilk 50 gen profili (devamı).	54
Tablo 4. 11. SE dokularında DNA metilasyonu ve Demetilasyonu ile ilişkili genler	60
Tablo 4. 12. DEG'lerde anlatımı artan ve embriyonik gelişimde önemli işlevi olan TF genleri	60
Tablo 4. 13. DEG'lerde anlatımı artan ve embriyonik gelişimde önemli işlevi olan TF genleri (devamı).....	61
Tablo 4. 14. 5. gün B5 – 5.gün 2,4-D ve 10. gün B5 – 10. gün 2,4-D kıyaslarında Aux/IAA genlerinin kat değişimleri.....	61
Tablo 4. 15. Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 µM 2,4-D kapsamında anlatım profili artan genler.....	69
Tablo 4. 16. Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 µM 2,4-D kapsamında anlatım profili azalan genler.....	71

Tablo 4. 17. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 5. gün 2,5 µM BIX-01294 kapsamında anlatım profili artan genler.....	73
Tablo 4. 18. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 5. gün 2,5 µM BIX-01294 kapsamında anlatım profili azalan genler.....	75
Tablo 4. 19. Karşılaştırma 10.gün B5 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 anlatımı artan genler.....	77
Tablo 4. 20. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 anlatımı azalan genler.....	79
Tablo 4. 21. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5 µM 2,4-D anlatımı artan genler	81
Tablo 4. 22. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5µM 2,4-D anlatımı azalan genler	83
Tablo 4. 23. 10. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 anlatımı artan genler	85
Tablo 4. 24. 10. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 anlatımı azalan genler	87
Tablo 4. 25. Karşılaştırma 5. gün B5 – 10. gün B5 anlatımı artan genler.....	89
Tablo 4. 26. Karşılaştırma 5. gün B5 – 10. gün B5 anlatımı azalan genler	91
Tablo 4. 27. Karşılaştırma 5. gün 2,5 µM BIX-01294 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 anlatımı artan genler.....	93
Tablo 4. 28. Karşılaştırma 5. gün 2,5 µM BIX-01294 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 anlatımı azalan genler	95
Tablo 4. 29. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 10.gün 5 µM 2,4-D anlatımı artan genler.....	97
Tablo 4. 30. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 5 µM 2,4-D anlatımı azalan genler.....	99

ÖZET

Çok hücreli organizmalarda hücre kaderinin belirlenmesi, gen anlatımının epigenetik düzeyde hassas bir biçimde düzenlenmesiyle sağlanır. Bu süreçlerin önemli örneklerinden biri olan somatik embriyogenez, farklılaşmış hücrelerin yeniden programlanarak embriyo benzeri yapılara dönüşmesini ifade eder. Bu olay, bitkilerin gelişimsel yeniden programlanabilirliğinin en çarpıcı örneklerinden biri olup, hayvansal sistemlerdeki hücresel yeniden programlama ve pluripotensi oluşum süreçleriyle yüksek düzeyde benzerlik göstermektedir. Her iki sistemde de epigenetik düzenlemeler (DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yeniden yapılanması) hücre kimliğinin yeniden tanımlanmasında kritik rol oynar.

Histon metilasyonunun düzenlenmesi, somatik embriyogenez sürecinde hücresel yeniden programlamanın epigenetik kontrolünde önemli bir mekanizma olarak öne çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, histon metiltransferaz inhibitörlerinin bu süreci yönlendirmede etkili olabileceğini ortaya koymuştur. Özellikle BIX-01294 inhibitörünün, farklı bitki türlerinde H3K9me2 düzeyini azaltarak embriyogenez sürecini teşvik ettiği gösterilmiştir. Bu etkinin, H3K9'un ikinci dereceden metillenmesini katalizleyen histon lizin metiltransferaz (SUVH) enzimlerinin inhibisyonu yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bitkilerde çeşitli histon lizin metiltransferaz (HKMT) aileleri tanımlanmış olup, bu enzimlerin büyük çoğunluğu, hayvanlar ve mayalarda bulunan SET domaini ile yapısal ve işlevsel homoloji göstermektedir. Bu durum, epigenetik mekanizmaların canlılar arasında büyük ölçüde korunmuş olduğunu ve hücresel yeniden programlamanın temelinde benzer moleküler yolların yer aldığını göstermektedir.

Kök ve kanser hücreleri gibi çok hücreli sistemlerde yeniden programlama ajanı olarak tanımlanan diazepin-kinazolin-amin türevi BIX-01294'ün, bitki hücrelerinde somatik embriyogenez sürecini tetikleyip embriyo gelişimini destekleyen epigenetik mekanizmalar üzerindeki potansiyel etkileri bu tez kapsamında incelenmiştir. Bu doğrultuda, farklı konsantrasyonlar (0,1; 0,05; 0,5; 1 ve 2,5 μ M) BIX-01294 ve somatik embriyogenezi teşvik eden 5 μ M 2,4-D (oksin) içeren kültür ortamlarında, olgunlaşmamış zigotik embriyolardan somatik embriyogenez elde edilmesi hedeflenmiştir. HKMT inhibitörünün farklı konsantrasyonlarda kültür ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen deneyler sonucunda, 0,1 μ M'lik konsantrasyonun embriyogenez indüksiyonu için yeterli olduğu saptanmıştır. 21. gün sonunda, 2,5 μ M BIX-01294 veya oksin varlığında olgunlaşmamış zigotik embriyolardan oluşan SE sayısı sırasıyla %35,41 ve %31,25 olarak belirlenmiştir. Bulgularımız, BIX-01294'ün 2,4-D'ye kıyasla bükülmüş kotiledon evresindeki olgunlaşmamış zigotik embriyolarda 1,13 kat SE oluşumunu artırdığını göstermiştir. Ayrıca bir eksplant üzerinde oluşan somatik embriyo sayısı 5 μ M 2,4-D'ye kıyasla 2,5 μ M BIX-01294'te 3,95 kat artmıştır. Yaptığımız transkriptomik çalışma sonucunda diferansiyel gen anlatım analizi (DEG) incelendiğinde, 10. gün kontrol grubuna kıyasla 10. gün, 5 μ M 2,4-D uygulamasında *SUVH3* (AT1G73100) (2,49 kat), *SUVH5* (AT2G35160) (2,36 kat), *SUVR2* (AT5G43990) (2,34 kat) ve *SUVR5* (AT2G23740) (2,21 kat) olmak üzere

histon lizin metiltransferaz transkriptlerinin anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır. Buna karşılık 10.gün kontrole kıyasla 2,5 µM BIX-01294 histon lizin metiltransferaz inhibitörünün uygulandığı grupta bu transkriptlerin anlamlı bir değişikliğe sahip olmadığı belirlenmiştir. Bu durum, BIX-01294'ün HKMT enzimlerinin aktivitesini inhibe ettiğinin ve epigenetik yeniden programlama sürecinde somatik embriyogenez üzerinde teşvik edici bir etki yarattığını düşündürmektedir. Bulgularımız, BIX-01294 ve 2,4-D'nin somatik embriyogenez sürecinde rol oynayan ana düzenleyici transkripsiyon faktörlerini (*LEC1*, *AGL15*, *FUS3*, *PHV*, *PHB*, *PLT*, *AIL7*) benzer şekilde tetiklediğini ortaya koymuştur. SE'nin 5 µM 2,4-D ile indüksiyonunda özellikle oksin sinyal genleri (*YUCCA*, *IAA*, *ARF*) aktif olarak rol oynarken, 2,5 µM BIX-01294'te ise WRI1-aracılı yolak, SE sürecinin indüksiyonunda en olası aday mekanizma olarak öne çıkmıştır. Bu sonuçlar, BIX-01294'ün hücrel yeniden programlamada önemli bir düzenleyici rol oynadığını göstermektedir.

Çok hücreli sistemlerde kimyasal yeniden programlama ajanı olan BIX-01294'ün ilk kez model bir bitki olan *Arabidopsis thaliana*'da kullanılmıştır. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, hücrelerin yeniden programlanması için gerekli moleküler ve hücrel mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlayabilir. Hücreyi embriyoya dönüştüren yeniden programlama yollarının daha derinlemesine anlaşılması, bitki mikroçoğaltımını ve yeşil biyoteknoloji uygulamalarını geliştirmemize yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, BIX-01294, Yeniden Programlama, Somatik Embriyogenez, RNA dizileme

ABSTRACT

Cell fate determination is accomplished through the precise epigenetic regulation of gene expression in multicellular organisms. A notable example of such tightly regulated processes is somatic embryogenesis (SE), which involves the reprogramming of differentiated cells into embryo-like structures. This phenomenon represents one of the most striking examples of developmental plasticity in plants and shows a high degree of similarity with cellular reprogramming and pluripotency induction in animal systems. In both systems, epigenetic regulations, including DNA methylation, histone modifications, and chromatin remodeling, play a critical role in redefining cell identity.

The regulation of histone methylation plays a key role as a mechanism underlying the epigenetic control of cellular reprogramming during somatic embryogenesis. Recent studies have indicated that histone methyltransferase (HMT) inhibitors can effectively guide this process. In particular, the BIX-01294 inhibitor has been shown to promote embryogenesis in various plant species by reducing H3K9me2 levels. This effect is thought to occur through the inhibition of histone lysine methyltransferase (SUVH) enzymes, which catalyze the secondary methylation of histone H3 at lysine 9 (H3K9). Several families of histone lysine methyltransferases (HKMTs) have been identified in plants, most of which exhibit structural and functional homology with the SET domain-containing enzymes found in animals and yeast, suggesting that epigenetic mechanisms are largely conserved across organisms and that similar molecular pathways underlie cellular reprogramming in plants.

In this thesis, the potential effects of the diazepine-quinazoline-amine derivative BIX-01294, identified as a reprogramming agent in multicellular systems (e.g., stem cells and cancer cells), on epigenetic mechanisms that may trigger somatic embryogenesis and support embryo development in plant cells, were investigated. Accordingly, the aim was to induce somatic embryogenesis from immature zygotic embryos in culture media containing different concentrations of BIX-01294 (0,01; 0,05; 0,5; 1 and 2,5 μ M) and 2,4-D (5 μ M). It was determined that the presence of the HKMT inhibitor at different concentrations in the medium was sufficient to induce embryogenesis at 0.1 μ M. By day 21, the number of SEs derived from immature zygotic embryos in the presence of 2.5 μ M BIX-01294 and 5 μ M 2,4-D was found to be 35.41% and 31.25%, respectively. Our findings showed that BIX-01294 increased SE formation by 1.13-fold in immature zygotic embryos at the bent-cotyledon stage compared to 2,4-D. Additionally, the number of somatic embryos per explant increased 3.95-fold under 2,5 μ M BIX-01294 compared to 5 μ M 2,4-D. Analysis of differentially expressed genes (DEGs) revealed that on day 10, compared to the control, the transcripts of histone lysine methyltransferases *SUVH3* (AT1G73100, 2.49-fold), *SUVH5* (AT2G35160, 2.36-fold), *SUVR2* (AT5G43990, 2.34-fold), and *SUVR5* (AT2G23740, 2.21-fold) were significantly upregulated in medium containing 5 μ M 2,4-D. In contrast, no significant changes in these transcripts were detected in the group treated with 2,5 μ M BIX-01294. Our results demonstrated that

BIX-01294 and 2,4-D similarly activated key regulatory transcription factors involved in SE, including *LEC1*, *AGL15*, *FUS3*, *PHV*, *PHB*, *PLT*, and *AIL7*. During SE induction with 5 μ M 2,4-D, auxin signaling genes (*YUCCA*, *IAA*, *ARF*) were actively involved, whereas in 2.5 μ M BIX-01294, the WRI1-mediated pathway emerged as the most likely candidate mechanism in the induction of SE. These findings indicate that BIX-01294 plays a significant regulatory role in cellular reprogramming.

The chemical reprogramming agent BIX-01294 has been used for the first time in the model plant *Arabidopsis thaliana* in multicellular systems. The findings from this thesis may serve as a tool to reveal the molecular and cellular mechanisms required for reprogramming. A deeper understanding of the reprogramming pathways that convert somatic cells into embryos will help us advance plant micropropagation and green biotechnology applications.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, BIX-01294, Reprogramming, Somatic Embryogenesis, RNA sequencing

1. GİRİŞ

Çok hücreli organizmalarda gelişim, tek bir döllenmiş yumurtadan başlayarak, senkronize hücre bölünmesi ve farklılaşma süreçleri aracılığıyla çeşitli ve fonksiyonel olarak özelleşmiş hücre tiplerinden oluşan doku ve organların oluşumunu sağlar. Bu farklılaşma süreci genellikle geri dönüşsüzdür; hücrel totipotensi, farklılaşmanın ilerlemesiyle kademeli olarak kaybolur. Bununla birlikte, bazı farklılaşmış bitki hücreleri, belirli uyarılara (örneğin doku yaralanması veya ekzojen fitohormon uygulamaları) yanıt olarak, daha az farklılaşmış bir duruma geri dönerek pluripotensi veya totipotensi sergileyebilir. Bu süreç epigenetik ve transkripsiyonel yeniden programlamayı içerir (Morinaka ve ark., 2022).

Memelilerde ve bitkilerde, kök hücreler kendini yenileme kapasitesine sahip farklılaşmamış hücrelerdir ve aynı zamanda spesifik işlevlere sahip birden fazla somatik hücre tipine farklılaşma potansiyeline sahiptir. Aksine, farklılaşmış somatik hücreler, somatik hücre yeniden programlaması (SCR) adı verilen bir süreçte, kendiliğinden veya spesifik indükleyici koşullar altında totipotent veya pluripotent durumlara yeniden programlanabilir (Ebrahimi ve ark., 2019).

Hayvan sistemlerinde hücre yeniden programlanması (örneğin indüklenmiş pluripotent kök hücreler, iPSC) ile bitkilerdeki somatik embriyogenez arasında işlevsel ve moleküler düzeyde dikkat çekici benzerlikler mevcuttur ve her iki süreç de epigenetik yeniden programlamayı temel alır ve hücre kimliğinin yeniden tanımlanmasında benzer mekanizmaları içerir.

Hayvanlarda, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin üretimi, birçok önemli transkripsiyon faktörünün ifadesine bağlıdır. Hayvan hücrelerine benzer şekilde, bitkilerde kök hücrelerin indüksiyonu B-ARR sınıfı, WUSCHEL (*WUS*) veya WUSCHEL ile ilişkili homeobox (*WOX5*) gibi birkaç önemli transkripsiyon faktörünün indüksiyonuna ve ifadesine bağlıdır. Bu nedenle, *WUS* veya *WOX5* gibi pluripotent genleri ifade eden bitkilerde indüklenen kök hücreler bitki iPSC'leri olarak ifade edilebilir (Sang ve ark., 2018). Bu benzerlikler, çok hücreli yaşamın epigenetik

kontrol mekanizmalarının evrimsel olarak korunmuş olabileceğini düşündürmektedir. Histon modifikasyonları da bu kontrol mekanizmalarında başlıca rol oynar (Xu ve ark., 2020; Liu ve ark., 2023). Bu süreçte görevli olan en önemli modifikasyon ise histon metilasyonudur. Histon metilasyonu SET domain olarak bilinen ve evrimsel açıdan oldukça korunmuş bir protein bölgesine sahip histon metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilir (Pontvianne ve ark., 2010). SET domainine sahip enzimler, genellikle H3 üzerindeki belirli lizinin metillenmesiyle sessizleştirilmiş kromatin bölgelerinin sürdürülmesine katkı sağlar. Bu nedenle, farklılaşmış hücrelerin kimliğini korumada önemli bir görev üstlenirler. SET domaini içeren histon lizin metiltransferazlar (HKMT) hem yapısal hem işlevsel olarak hayvanlardaki homolog enzimlerle ilişkilidir. Bu bağlamda literatürde, bitkilerdeki SUVH5 ve SUVH6 ile hayvanlardaki EHMT2 (G9a) enzimlerinin incelendiği çalışmalar yer almaktadır (Qin ve ark., 2010).

Bitkilerde somatik embriyogenez, somatik hücrelerin uygun kültür koşulları altında embriyo benzeri yapılara dönüşmesi sürecidir. Bu süreç, çevresel uyaranlar ve gelişimsel sinyallerle tetiklenir ve bitkilerin gelişimsel yeniden programlanabilirliğinin önemli bir örneğidir. Benzer şekilde, hayvanlarda da somatik hücreler, belirli transkripsiyon faktörlerinin anlatımı ile pluripotent bir duruma geri döndürülebilir; bu süreç indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin oluşumunu sağlar. Her iki durumda da hücre kimliği, gen anlatımının epigenetik düzeyde hassas bir biçimde düzenlenmesiyle yeniden şekillenir.

Somatik embriyogenez, somatik hücrenin daha sonra tüm bir bitkiye yol açabilen totipotent bir hücreye dönüştürülebildiği tipik bir SCR örneğidir (Peng ve ark., 2023). Bitki hücrelerinde totipotensi, kromatindeki değişikliklerle kontrol edilebilir. *In vitro* somatik embriyogenez, hücrelerin metabolik, genetik, epigenetik ve gelişimsel yeniden programlanmasını içeren karmaşık bir süreçtir (Feher ve ark., 2015). Epigenetik değişiklikler, hücrelerin gen anlatım profillerinde değişikliklere sebep olarak somatik embriyo gelişimine yol açan sinyal yolunun önemli bir parçası olarak görev almaktadırlar (Sivanesan ve ark., 2022). Histon metilasyonu, transkripsiyonun düzenlenmesinde ve heterokromatin oluşumunda yer alan önemli bir epigenetik modifikasyondur. Çok sayıda gelişim sürecinin düzenlenmesinde kilit rol oynar. Bu karmaşık epigenetik etiket, protein dizisinin farklı bölgelerinde, lizin veya arginin rezidülerinde meydana gelebilir ve farklı sayıda metil grubunun eklenmesi ile oluşur.

Histon metilasyon paternleri, histon lizin metiltransferaz (HKMT'ler) ve protein arginin metiltransferazlar gibi metil grupları ekleyen "yazıcılar" ve histon demetilazlar (HDM'ler) gibi metil grubunu çıkaran "siliciler" tarafından düzenlenir (Liu ve ark., 2023). Histon metiltransferazlar üç sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar SET domaini içeren lizin metiltransferazlar, SET domaini içermeyen lizin metiltransferazlar ve arginin metiltransferazlardır. Hepsi metilasyon için metil vericisi olarak S-adenosilmetiyonin (SAM) kullanır ve yan ürün olarak S-adenosilhomosistein (SAH) oluşur. Lizin metil transferazların SE üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için kimyasal yeniden programlama ajanları kullanılmaktadır. Bu kimyasal yeniden programlama ajanları lizin metiltransferaz inhibitörleri grubuna dahildir ve en sık kullanılanları kaetosin, BIX-01294, 3-deazaneplanocin A, BIX-011338'dir (Bissinger ve ark., 2010; Ebrahimi ve ark., 2021).

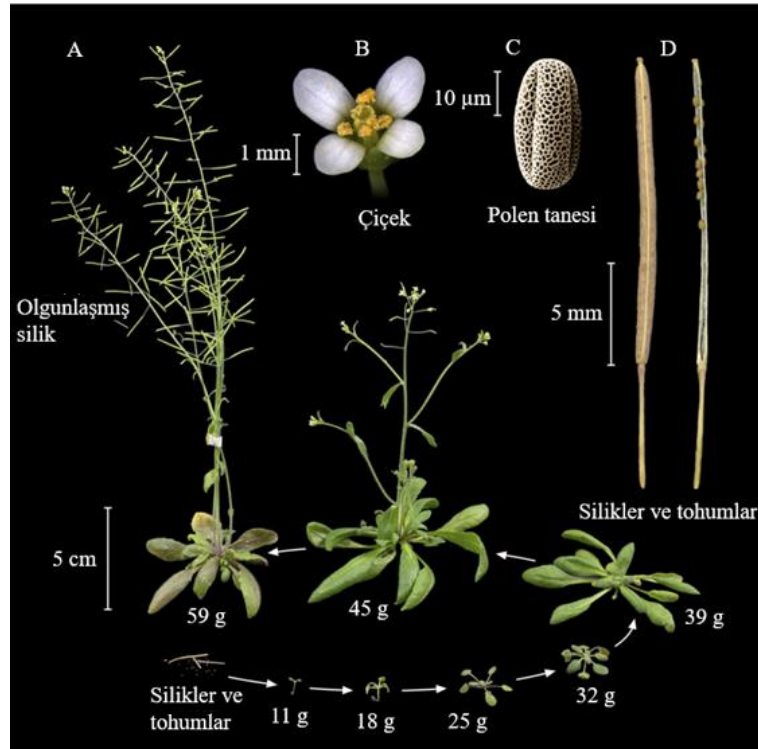
Bu tez çalışmasında, model bitki türü olarak yaygın şekilde kullanılan *Arabidopsis thaliana*'nın Col-0 ekotipinde, epigenetik yeniden programlama kapasitesine sahip bir histon lizin metiltransferaz inhibitörü olan BIX-01294'ün farklı konsantrasyonlarda uygulanması yoluyla somatik embriyogenez (SE) sürecinin indüklenmesi hedeflenmiştir. BIX-01294, özellikle H3K9 metilasyonunu inhibe ederek kromatin açılması ve buna bağlı olarak totipotens kazanımına yönelik genetik programların aktive edilmesini sağlayabilen bir epigenetik modülatör olarak öne çıkmaktadır. Bu kapsamda, farklı konsantrasyonlarda BIX-01294 uygulamasına maruz bırakılan olgunlaşmamış zigotik embriyolarda yüksek duyarlılıklı transkriptomik analizler gerçekleştirilerek somatik embriyogenez sürecini tetikleyen gen anlatım değişimleri kapsamlı biçimde ortaya konulmuştur. Elde edilecek bulguların hem temel epigenetik bilgi birikimine hem de uygulamalı bitki biyoteknolojisi alanına önemli katkılar sunması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Arabidopsis thaliana*

İlk olarak 1577'de Kuzey Almanya'nın Harz Dağları'nda hekim Johannes Thal tarafından tanımlanan *A. thaliana*, Linnaeus tarafından 1753'te yayınlanan Tür Plantarum II adlı eserde yer almıştır. 1842'de ise Gustav Heynhol tarafından bugünkü ismi *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh almıştır (Kramer, 2015) (Şekil 2.1).

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. moleküler ve gelişimsel biyolojiden ekoloji ve evrimsel araştırmalara kadar bitki biyolojisinde bir model tür olarak benimsenmiştir. Taksonomik olarak Brassicaceae ailesine ait olan *Arabidopsis*, kısa bir yaşam döngüsüne sahip tek yıllık bir bitkidir ve çoğunlukla kendi kendine döllenme yoluyla çoğalır. Angiospermiler arasında küçük bir genoma ($2n=10$ kromozom) sahiptir ve nispeten küçük bir genom boyutu (~135 Mb) vardır, bu da onu bir genetik model sistemi olarak elverişli hale getirir. Yaşam döngüsü çevresel faktörlere bağlı olarak 5-8 hafta gibi bitkiler için oldukça kısa sayılabilecek düzeydedir. Bunun yanında yüksek sayıda tohum üretmesi ve küçük alanlarda da kolayca yetiştirilebilmesi avantajları arasında sıralanabilir. Çok fazla sayıda doğal ekotipi mevcuttur ve ekotipler arasında melezleme yapılması kolaydır (Long ve ark., 2013; Leventhal ve ark., 2025).



Şekil 2. 1. *Arabidopsis thaliana*'nın yaşam döngüsü (Kramer, 2015).

2.2. Somatik Embriyogenez

In vitro bitki rejenerasyonu sıklıkla organogenez veya embriyogenez yoluyla elde edilir. Somatik embriyogenez (SE), somatik hücrelerin embriyo benzeri yapılar oluşturmak için bir dizi gelişimsel değişikliğe uğradığı bir süreçtir.

SE, çoğu bitkinin yaşam döngüsünde benzersiz bir süreçtir ve esas olarak ticari uygulama için kitlesel çoğaltım ve ürün iyileştirme için bitki biyoteknolojisinde temel bir araç haline gelmiştir. SE, geleneksel kitle çoğaltımına güçlü bir alternatiftir ve geleneksel tarımsal yöntemlerle ürün iyileştirme için yeni bir model sistemdir (Kumar ve ark., 2017).

Birçok çiçekli bitkide, vejetatif somatik hücreler uygun *in vitro* koşullar altında SE adı verilen bir süreçte embriyonik hücrelere dönüştürülebilir. Genetik transformasyon, somatik hibridizasyon, klonal çoğaltım ve sentetik tohum üretimi dahil olmak üzere bitki biyoteknolojisi ve bitki ıslahındaki uygulamalar için güçlü bir araç sağlamanın yanı sıra SE, bitki embriyosu başlangıcı ve sonraki morfogenez sırasında meydana gelen hücresel ve moleküler mekanizmaları anlama potansiyeli sunar (Karami ve ark., 2023).

Bitki totipotensisi araştırmaları, Schleiden (1838) ve Schwann'ın (1839) hücre teorisine dayanmaktadır. Bu teoriye göre organizmalar, bağımsız olarak büyüeyebilen ve bölünebilen bireysel hücrelerden oluşur. Bu teoriden yola çıkarak, Haberlandt (1902) kültürlenmiş hücrelerden yapay embriyoların oluşturulabileceğini öngörerek *in vitro* bitki totipotensi araştırmalarının temelini atmıştır. *In vitro* SE, deneysel olarak ilk kez 1957 yılında, Waris tarafından *Oenanthe aquatic* (deniz rezenesi) bitkisi üzerinde yapılan çalışmalarla tanımlanmıştır. Kısa bir süre sonra Steward ve ekibi ile Reinert de *Daucus carota* (havuç) üzerinde çalışarak bu alandaki bulgularını yayınlamışlardır (Horstman ve ark., 2017).

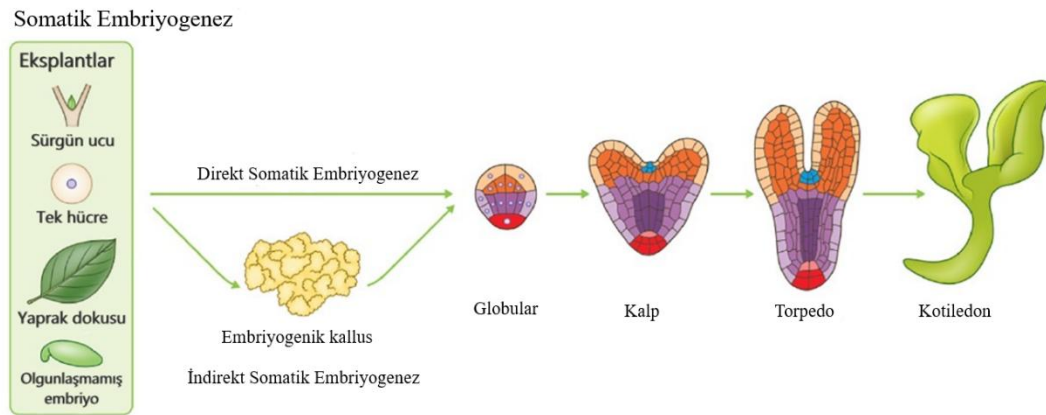
Embriyogenez, bir embriyonun ya bir zigottan (zigotik embriyogenez, ZE) ya da somatik hücrelerden (somatik embriyogenez, SE) oluşumunun başladığı süreçtir. ZE, gametlerin birleşmesinden sonra gerçekleşir (Medez-Hernandez ve ark., 2019).

Somatik embriyogenezi ve düzenlenmesini kontrol eden mekanizmaları anlamak, bitki biyolojisinde önemli bir konudur, SE yoluyla klonal çoğaltım, *Coffea* türleri, *Pinus* türleri, *Theobroma cacao* L. ve diğer türler gibi

tarımsal ilgi gören çeşitli bitkiler için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü oldukça hızlı ve etkili bir şekilde seçkin genotiplerin klonal çoğaltılmasını kolaylaştırır. Ayrıca, SE bu tarımsal türlerin ve çeltik, soya, mısır, buğday gibi diğer ürünlerin genetik transformasyon protokollerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Transformasyonun verimliliği embriyojenik ve rejenerasyon kapasitesiyle ilişkili olduğundan, SE süreçlerinin anlaşılması büyük önem taşımaktadır (Salaün ve ark., 2021).

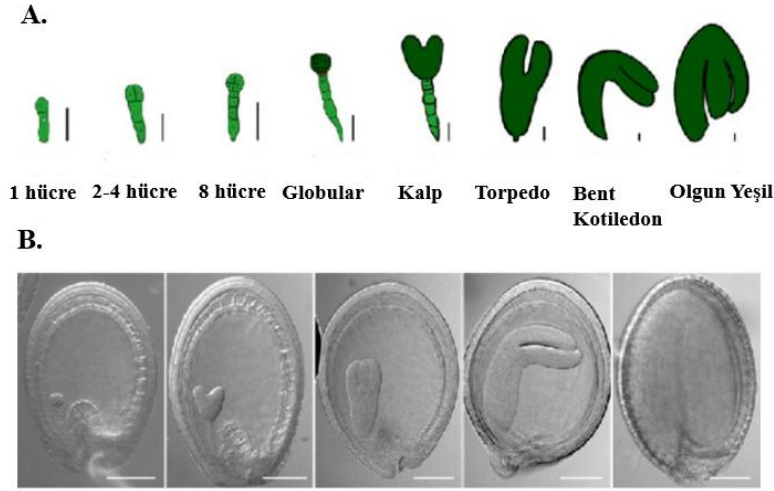
SE, çok çeşitli bitki türlerinde elde edilebilir ve indüksiyon sürecinin doğrudan veya dolaylı olarak iki yolu vardır. Kotiledonlar, yapraklar, yaprak sapları, kökler, sürgün uçları ve olgunlaşmamış zigotik embriyolar dahil olmak üzere çeşitli eksplant tipleri somatik embriyoları indüklemek için kullanılabilir (Şekil 2.2) (Yuan ve ark., 2024).

Arabidopsis thaliana'da somatik embriyogenez, *in vitro* protoplastlardan, kök eksplantlarından, sürgün apikal ucu ve çiçek tomurcuğu eksplantlarından, genç fidelerin sürgün apeks eksplantlarından veya olgun tohumlardan çimlenen embriyolardan indüklenebilir (Serna ve ark., 2023). Kadokura ve ark., 2018'de yaptıkları çalışmada *Arabidopsis thaliana*'da siliklerden toplanan ve eksplant kaynağı olarak yaygın şekilde kullanılan zigotik embriyoların dışında, genç fidelerin sürgün uçlarının somatik embriyolar için alternatif bir doku kaynağı olduğunu bildirilmişlerdir ve SE oluşumunun indüklenmesi için sürgün ucu eksplantlarını 6 saat boyunca 0,7 M mannitol ile muamele etmişlerdir (Kadokura ve ark., 2018).

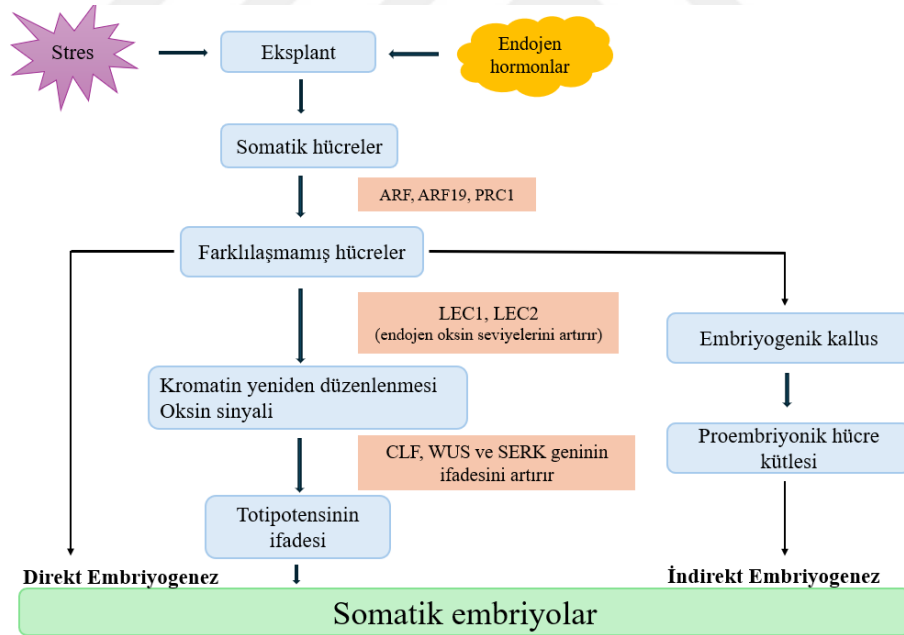


Şekil 2. 2. Dikotil bitkilerde somatik embriyogenez (Yuan ve ark., 2024).

Somatik embriyogenez sürecinde zigotik embriyo gelişimi, monokotiledon bitkilerde globular, genç ve koleoptil şekilli; dikotiledon bitkilerde globular, kalp, torpedo ve kotiledon şekilli; kozalaklı ağaçlarda globular, erken ve geç kotiledon şekilli gibi farklı gelişim aşamalarını temsil etmektedir (Şekil 2. 2, Şekil 2. 3) (Kumar ve ark., 2017).



Şekil 2.3. *Arabidopsis* embriyolarının gelişim evreleri. (A) *A. thaliana* embriyolarının gelişim evreleri. Dikey ölçek çubukları = 50 μm . (B) Bu çalışmada kullanılan tohumların içindeki embriyoların farklı kontrast görüntüleri. Soldan sağa: küresel, kalp, torpedo, bükülmüş kotiledon ve olgun yeşil evre. Ölçek çubukları = 100 μm . (Yoo ve ark., 2021).



Şekil 2.4. Somatik embriyogenezin iki farklı yolu (Kumar ve ark., 2017 referans alınarak düzenlenmiştir).

Somatik embriyogenez süreci, farklılaşmış hücrelerde doğrudan veya kallus/proembriyogenik hücre kütlesi aracılığıyla dolaylı olarak indüklenebilir. Endojen (içsel) veya ekzojen (dışsal) sinyaller (stres veya bitki büyüme düzenleyicileri ya da bunların kombinasyonları), yeterli hücrelerde dediferansiasyona yol açarak

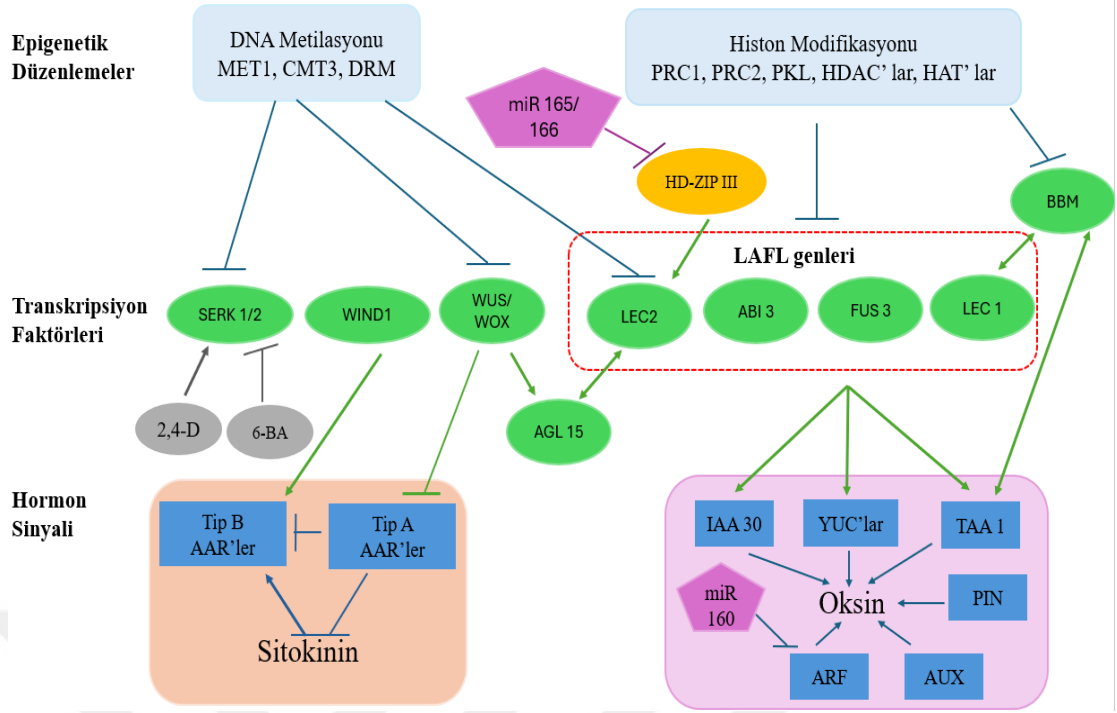
doğrudan somatik embriyogenezi ve kallus dokusu farklılaşmasını tetikleyebilir (Şekil 2. 4). Genetik düzeyde, somatik hücre dediferansiasyonu ve embriyojenik yolun aktivasyonu, transkripsiyonel aktivitede değişiklikler, bazı spesifik genlerin anlatımının kapatılması ve başlıca embriyo kimlik genleri olmak üzere diğer birkaç genin aktive edilmesi anlamına gelen karmaşık bir süreçtir (Serna ve ark., 2023).

SE indüksiyonu için gerekli olan stres bileşenleri farklı biçimler alabilir. Kültür ortamında yüksek seviyede bitki büyüme düzenleyicileri en yaygın kullanılanıdır, ancak aynı zamanda yaralama, aşırı pH, ozmotik veya ısı şoku veya farklı kimyasallarla uygulamalar da olabilir (Salaün ve ark., 2021).

Arabidopsis'te somatik embriyogeneizde elde edilen ilerleme, SE'yi kontrol eden karmaşık düzenleyici ağların altında yatan moleküler mekanizmalarda yer alan bazı genlerin karakterizasyonuna izin vermiştir. Tek başına veya diğer bitki büyüme düzenleyicileriyle veya stresle kombinasyon halinde ekzojen oksinler, SE'yi ve farklı genlerin anlatımını indüklemektedir (Şekil 2. 4).

2.3. Somatik Embriyogenezin Moleküler Mekanizması

Somatik embriyogenez süreci; epigenetik düzenleme, transkripsiyon faktörleri ve hormon sinyal yolları tarafından düzenlenir. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarını içeren epigenetik düzenleme, transkripsiyon faktörlerinin gen promotör bölgelerine erişimini baskılayarak somatik embriyogeneizde yer alan genlerin ifadesini engeller. Birçok transkripsiyon faktörü (*ABI3*, *LEC1*, *LEC2*, *BBM*) bu düzenleyici ağda yer alır ve aynı zamanda birbirlerini düzenler ve aşağı akış oksin ve sitokinin sinyal yollarını aktive eder. Ek olarak, miR-160 ve miR-165/-166 gibi çeşitli kodlama yapmayan RNA'lar da somatik embriyogenezin düzenlenmesinde rol oynar. (Şekil 2.5) (Long ve ark., 2022).



Şekil 2. 5. Somatik embriyogenezin moleküler mekanizmaları (Long ve ark., 2022 referans alınarak düzenlenmiştir).

2.3.1. Hormonal Kontrol

Bitki hormonları, özellikle oksinler ve sitokininler, somatik embriyogenez sürecinde kilit faktörlerdir. Bu nedenle, hormon sinyal yollarıyla ilişkili genlerin bu süreçte önemli bir rol oynaması muhtemeldir (Şekil 2. 5) (Long ve ark., 2022).

Embriyojenik gelişim sürecini başlatan çeşitli dış uyaranlar arasında, hücre döngüsünü düzenlemeleri ve hücre bölünmelerini tetiklemeleri nedeniyle *in vitro* ortamlarda kullanılan oksinler ve sitokininler gibi bitki büyüme düzenleyicileri en sık dikkate alınanlardır. Endojen fitohormonların düzeyi, eksplantların embriyonik potansiyelini etkileyen önemli faktörlerden biri olarak kabul edilir (Karami ve ark., 2009).

Arabidopsis'te TF kaynaklı somatik embriyo oluşumunu kontrol eden yolları belirlemek amacıyla son on yılda çok sayıda kromatin immünopresipitasyonu ve gen anlatımı çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, SE kaynaklı TF'lerin ortak yolları, özellikle oksin yolunu düzenlediğini ve bu farklı TF'ler arasında transkripsiyonel çapraz iletişim (cross-talk) olduğunu göstermiştir (Horstman ve ark., 2017).

Oksin, embriyo gelişimi sırasında apikal, bazal eksen ve asimetri oluşumunu düzenler. Aynı zamanda embriyogenez sırasında doku oluşumunun ve çoğalmasının sinyalini vermede de kritik bir rol oynar (Khan ve ark., 2023). Son SE protokollerinin %65'i, SE indüksiyonu için doğal oksin, indol-3-asetik asitin (IAA) sentetik bir analogu olan 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) herbisitini kullanmaktadır (Wójcikowska ve ark., 2020). SE, IAA, diğer sentetik oksinler veya stres tarafından indüklenebilse de birçok durumda 2,4-D en etkilidir ve bu nedenle birçok bitki türünde SE için yaygın olarak kullanılır (Karami ve ark., 2023).

Somatik embriyolar, düşük oksinli bir ortamda *in vitro* yetiştirilen bitki dokularından (örneğin olgunlaşmamış zigotik embriyolar) doğrudan indüklenebilir. Alternatif olarak, dolaylı somatik embriyogenez (SE) genellikle kallus oluşumu aracılığıyla gerçekleşir. Kallus oluşumu genellikle yüksek oksin içeren ortamlarda başlatılır ve bu kallustan köken alan dolaylı SE, daha sonra düşük oksin düzeyine sahip bir ortama geçilmesiyle indüklenebilir (Salaün ve ark., 2021).

Oksinler arasında, bazı oksinlerin SE indüksiyonuyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. 2,4-SE indüksiyonunda yaygın olarak kullanılır, hücre dediferansiasyonunda ve SE oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Genel olarak, 2,4-D'nin embriyonik hücreden somatik embriyoya dönüşümüne aracılık ettiğini düşünülmektedir (Asghar ve ark., 2023; Oliveira ve ark., 2023). Direkt SE sürecinde somatik embriyo oluşumu, bükülmüş kotiledon aşamasındaki olgunlaşmamış embriyoların sentetik oksin 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ile desteklenmiş bir ortamda kültüre alınmasıyla indüklenir. Eksplantların daha sonra oksinsiz bir ortamda alt kültüre alınması, embriyonun daha fazla gelişmesini teşvik eder (Chen ve ark., 2024).

Arabidopsis'te, Domains Rearranged Methyltransferase 1/2 (*DRM1-2*) genleri, RNA-yönelimli DNA metilasyonu (RdDM) yoluyla *de novo* metilasyon için gereklidir. Buna karşılık, Methyltransferase 1 (*MET1*) ve Chromomethylase1-3 (*CMT1-3*) genleri, DNA replikasyonu sırasında metilasyon deseninin korunmasını sağlar. Zigotik embriyo oluşumunun erken aşamalarında benzer şekilde, *Arabidopsis*'te *MET1* ve *CMT3*, *DRM1* ve *DRM2*'den önemli ölçüde daha yüksek bir ifade seviyesine sahiptir. Çeşitli çalışmalar, oksin (2,4-D) uygulmasının (de)metilazları kodlayan genleri farklı şekilde düzenleyebileceğini ve buna bağlı olarak, bir oksin ortamının *D. carota* ve *Arabidopsis*'in embriyojenik kültürlerinde *DRM*'ler ve *CMT3* metilazlarının

anlatımını artırıp, Repressor of silencing1 (*ROS1*), Demeter (*DME*) ve Demeter-like protein2 (*DML2*) demetilazlarının anlatımını azalttığını göstermiştir (Wojcikowska ve ark., 2020; Grzybkowska ve ark., 2018).

Sitokininlere yanıt, sitokinin yanıt elemanına bağlanan ve sitokinin yanıt genlerinin, sitokinin sinyalleşmesinin negatif geri besleme düzenleyicileri olan tip-A ARR'leri de dahil olmak üzere, anlatımını aktive eden tip-B *Arabidopsis* response regulators (ARR'ler) aracılığıyla sağlanır (Liu ve ark., 2020). Sitokinin sinyali zardan nükleusa iletilir ve burada tip B ARR'ler daha sonra tip A ARR'ler olarak bilinen ikinci bir ARR sınıfının transkripsiyonunu başlatır. Tip A ARR'ler, başlangıç sinyal iletim yolunun negatif düzenleyicileri olarak görev yapar ve ayrıca aşağı akış tepkilerini de düzenleyebilir (Argyros ve ark., 2008).

2020'de yapılan bir çalışmada, tip B ARR olan ARR1'in, *in vitro* kültür sırasında sürgün rejenerasyonunun temel bir inhibitörü olduğu, ARR12'ye bağımlı bir şekilde WUS ve CLV3 anlatımını düzenlediği ve doğrudan IAA17'yi aktive ederek sürgün rejenerasyonunu engellediği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2020).

2.3.2. Transkripsiyonel Kontrol

Birçok transkripsiyon faktörü, somatik embriyogenez sürecinin temel düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.5) (Long ve ark., 2022). Transkripsiyon faktörleri (TF'ler), gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol alan düzenleyici proteinlerdir. TF'ler, spesifik DNA düzenleyici dizilerine bağlanan DNA bağlayıcı domainlere sahiptir ve bağlanma bölgelerine bağlı olarak DNA promotör dizilerine bağlandıklarında transkripsiyon başlangıcını kolaylaştırabilirler veya güçlendirici (enhancer) dizilere bağlandıklarında gen transkripsiyonunu aktive edebilir veya baskılayabilirler (Yuan ve ark., 2024).

TF'ler bitki embriyogenezisi sırasında önemli roller oynarlar. Hücre kaderinin belirlenmesi, apikal-bazal desen oluşumu, embriyonik sürgün ve kök oluşumu gibi süreçlerde farklı TF ailelerinin çeşitli üyelerinin gerekli olduğu gösterilmiştir. APETALA2/Etilen-Tepki Faktörü (*AP2/ERF*) ailesinden BABY BOOM (*BBM*), homeobox ailesinden WUSCHEL ve WUSCHEL ile ilişkili homeobox (*WOX*), B3 ailesinden LEAFY COTYLEDON 2 (*LEC2*) gibi TF'ler bitki embriyogenezisi sırasında önemli roller üstlenen ana düzenleyicilerden bazılarıdır (Yuan ve ark., 2024).

Arabidopsis'te bazı embriyonik kimlik transkripsiyon faktörü genlerinin ektopik aşırı ifadesi, ekzojen büyüme düzenleyicileri olmadan SE'lerin oluşumunu indükleyebilir. Transkripsiyon faktörleri üç alt gruba aittir: (1) CCAAT bağlayıcı faktörlerin HAP3 ailesi Leafy cotyledon 1 (*LEC1*) ve *LEC1-LIKE* (*L1L*); (2) Absciscic acid intensitive 3 dahil olmak üzere bitkiye özgü B3 domain proteinlerinin bir alt grubu; ve (3) Leafy cotyledon 2 (*LEC2*). *LEC1/L1L*, *ABI3*, *FUS3* ve *LEC2*' nin hepsi “LAFL” olarak adlandırılır. LAFL genleri embriyogenez boyunca başlıca düzenleyiciler olarak ifade edilir ve embriyonik kimlik için gereklidir (Su ve ark., 2020). *WUS*, *LEC1*, *LEC2* veya *BBM* gibi bu genlerden bazılarının normal gelişim sırasında meristem/embriyo kimliğinden sorumlu olduğu bildirilmiştir ve bunların ektopik ifadesi doğrudan somatik hücreleri yeniden programlayabilir ve ekzojen uyarıların yokluğunda SE'yi indükleyebilir (Ibanez ve ark., 2020).

Lotan ve ark., 1998'de yaptıkları çalışmada *Arabidopsis* *LEC1* geninin kotiledon kimliğinin belirlenmesi ve embriyo olgunlaşmasının tamamlanması için gerekli olduğunu ve *LEC1*'in hem embriyo morfogenezini hem de hücrel farklılaşma için gerekli genlerin transkripsiyonunu aktive eden önemli bir embriyo gelişimi düzenleyicisi olduğunu bildirmişlerdir (Lotan ve ark., 1998).

Tablo 2. 1. Bitki rejenerasyonunda rol oynayan bazı temel düzenleyici faktörler (transkripsiyon faktörleri, epigenetik düzenleyiciler ve oksin homeostazında rol oynayan diğerleri) (Ibanez ve ark., 2020).

Gen	Kısaltması	Bitki Rejenerasyonundaki Fonksiyonu	Moleküler Fonksiyonu
<i>ABA</i> <i>INSENSITIVE 3</i>	<i>ABI3</i>	BBM aracılı somatik embriyogenezisi nicel olarak düzenler. Pozitif bir düzenleyici olarak işlev görür	Dof tipi transkripsiyon faktörü
<i>AGAMOUS LIKE 15</i>	<i>AGL15</i>	Oksin biyosentezini aktive eder, totipotens kazancına ve SE başlatılmasına yol açar	MADS domain transkripsiyon faktörü

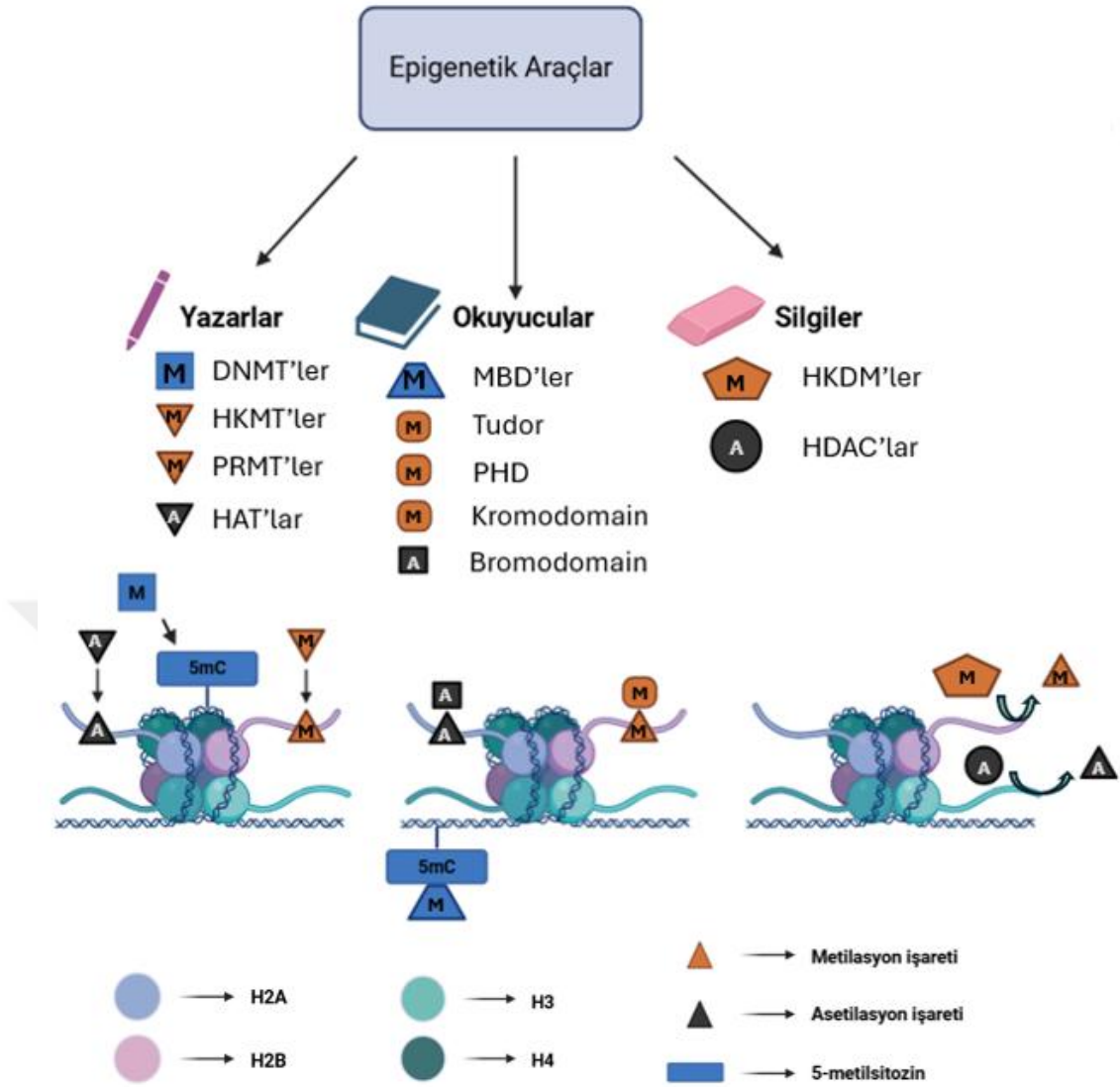
Tablo 2.2. Bitki rejenerasyonunda rol oynayan bazı temel düzenleyici faktörler (transkripsiyon faktörleri, epigenetik düzenleyiciler ve oksin homeostazında rol oynayan diğerleri) (Ibanez ve ark., 2020) (devamı).

<i>FUSCA 3</i>	<i>FUS3</i>	Embriyo gelişiminde rol oynar. Başarılı SE için önemlidir.	B3 domaini içeren transkripsiyon faktörü
<i>POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2</i>	<i>PRC 2</i>	Lys27'nin histon H3'te di- ve tri- metilasyonu. PRC2 aktivitesi hormon aracılı SE'yi engeller.	Histon lizin metiltransferaz
<i>BABY BOOM</i>	<i>BBM, PLT4, AIL5</i>	Ektopik anlatımı aynı zamanda somatik hücreleri doğrudan yeniden programlayabilir ve ekzojen uyaranların yokluğunda SE'yi indükleyebilir	AP2/ERF transkripsiyon faktörü
<i>LEAFY COTYLEDON 1, LEAFY COTYLEDON 2</i>	<i>LEC1, LEC2</i>	Ektopik ifadesi aynı zamanda somatik hücreleri doğrudan yeniden programlayabilir ve ekzojen uyaranların yokluğunda SE'yi indükleyebilir.	B3 domaini içeren transkripsiyon faktörü

2.3.3. Epigenetik Kontrol

"Epigenetik" terimi, DNA dizi varyasyonundan bağımsız olarak gen anlatımındaki genetik değişiklikleri ifade eder. Epigenetik mekanizmalar, gen anlatımını kontrol eden son derece dinamik eylemlerdir. Epigenetik düzenlemeler, anlatımının ve hücrel farklılaşmanın kontrolünde merkezi bir rol oynar ve bu mekanizmalar hem bitkilerde hem de hayvanlarda birçok temel süreçte korunmuştur. Gen anlatımını düzenleyen temel epigenetik mekanizmalar arasında histon modifikasyonları, DNA metilasyonu, küçük RNA'lar ve kromatin yeniden modellenmesi yer alır ve bu mekanizmalar hücrelerin farklılaşma potansiyelini belirler ve yeniden programlanma kapasitesini etkiler (Liu ve ark., 2023; Seffer ve ark., 2013). Epigenetik düzenlemeler, embriyo gelişimi ve somatik hücre yeniden programlamasının yönetiminde merkezi bir rol oynar (Chen ve ark., 2022). Bu mekanizmalar son yıllarda somatik embriyogenez sırasında kritik faktörler olarak önem kazanmıştır (Kumar ve ark., 2017). Epigenetik gen susturulması, hem bitkilerde hem de memelilerde baskılama gibi gelişimsel olgularda ve hücre farklılaşması ve yeniden programlamasında da önemlidir (Feng ve ark., 2011). Epigenetik regülasyon, embriyoya özgü genlerin ifadesini baskılayarak, somatik hücre kimliğinin korunmasında anahtar bir rol oynamaktadır (Long ve ark., 2022).

Gen anlatımı çeşitli hücresel süreçler için kritik öneme sahiptir ve yalnızca DNA dizisi ve transkripsiyon faktörleri tarafından değil aynı zamanda epigenetik düzenleme tarafından da kontrol edilir. Bu epigenetik düzenleme, DNA metilasyonu, kromatin yeniden şekillendirme, histon varyantları ve histonların translasyon sonrası modifikasyonları (PTM'ler) dahil olmak üzere çeşitli şekillerde değiştirilebilen kromatinin durumuna bağlıdır. Histonların PTM'lerinde doğrudan yer alan proteinler üç kategoriye ayrılır: Bunlar değişiklikleri oluşturan enzimler ("yazıcılar"), değişiklikleri tanıyan proteinler ("okuyucular") ve değişiklikleri kaldıran enzimler ("siliciler") dir (Şekil 2.6). Histonların PTM'leri metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, sumolasyon, ubiquitinasyon ve glikozilasyon içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir (Kaniskan ve ark., 2018). Bu histon modifikasyonları kromatin yapısını etkiler ve ayrıca kromatin yeniden modelleyicileri, histon şaperonları, DNA/histon değiştiren enzimler ve genel transkripsiyon faktörleri gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri için bağlanma platformları sağlar. Bu nedenle, histon modifikasyonları gen anlatımı, DNA replikasyonu ve onarımı, kromatin sıkışması ve hücre döngüsü kontrolü dahil olmak üzere birçok hücresel olayda önemli rollere sahiptir (Hyun ve ark., 2017).



Şekil 2. 6. Epigenetik araçlar. DNMT'ler: DNA metiltransferazları, HKMT'ler: Histon lizin metiltransferazları, PRMT'ler: Protein arjinin metiltransferazları, HAT'lar: Histon asetiltransferazları, MBD'ler: Metil-CpG bağlayıcı alanlar, PHD: Bitki homeo alanı, HKDM'ler: Histon lizin demetilazları, HDAC'lar: Histon deasetilazları (Biswas ve ark., 2018 referans alınarak düzenlenmiştir).

Gen anlatımının oksin aracılı düzenlenmesi ayrıca oksinin DNA ve histonların epigenetik modifikasyonları ile etkileşimini içerir, bu süreçler hayvanlarda ve bitkilerde gelişim süreçlerinin kontrolünde önemli bir rol oynar. DNA metilasyonu, gen anlatımını kontrol eden en yoğun şekilde incelenen epigenetik mekanizmadır (Wojcikowska ve ark., 2020).

Bitkilerdeki DNA metilasyonu, bazıları hayvanlarda benzerleri bulunmayan geniş bir spesifik DNA metiltransferaz enzimi seti tarafından gerçekleştirilir. Bitkilere özgü bir enzim olan *CMT3*, simetrik CHG bölgelerinin metilasyonunu korur ve muhtemelen

asimetrik CHH bölgelerinin metilasyonuna da katkıda bulunur. MET1'in aksine, CMT3'ün hemi-metillenmiş bölgeler için spesifik bir tercihi yoktur. *CMT3*, kromodomaini aracılığıyla, histon H3 moleküllerinin dokuzuncu lizin rezidüsünde metillenmiş olduğu nükleozomları tanır (H3K9me1, H3K9me2 ve H3K9me3). Buna karşılık, H3K9'a özgü metiltransferazlar olan KRYPTONITE (KYP)- diğer adıyla SU(VAR)3-9 HOMOLOG 4 (SUVH4), SUVH5 ve SUVH6- SRA domainleri aracılığıyla, CHG ve CHH bölgelerine spesifik bir tercih göstererek her türden metillenmiş DNA bölgelerini tanır (Ashapkin ve ark., 2019).

2.3.4. Kromatin Yeniden Düzenlenmesi

Kromatin yeniden şekillenmesi, kromatinin yeniden düzenlenmesidir ve transkripsiyon faktörlerinin veya diğer DNA bağlayıcı proteinlerin DNA'ya erişmesine ve gen anlatımını kontrol etmesine olanak tanır. (Kumar ve ark., 2017).

Hormonlarla birlikte epigenetik işaretler, SE indüksiyonu ve ilerlemesi sırasında önemli bir rol oynar. Kromatin değiştirici faktörler, kromatinin konformasyonel durumlarını ve transkripsiyonel mekanizmaya erişilebilirliğini düzenler. Epigenetik modifikasyonlar, özellikle DNA metilasyonu ve histon metilasyonu ve asetilasyonu, hem hayvanlarda hem de bitkilerde hücre çoğalması ve farklılaşması sırasında gen anlatımını düzenleyen kromatinin işlevsel durumuna katkıda bulunan temel faktörlerdir (Ibanez ve ark., 2020). Bir histon metiltransferaz enzimi olan Polycomb baskılayıcı kompleks 2 (PRC2) aracılı histon metilasyonu, histon deasetilasyonu ve PICKLE (PKL) ile ilişkili kromatin yeniden düzenlenmesi de bu epigenetik modifikasyonlara dahildir. Embriyonik kimlik genlerinin gerekli olduğu ve endojen oksinin SE'lerin indüksiyonu sırasında hücre yeniden programlamasında merkezi bir rol oynadığı açıktır (Thang ve ark., 2020).

SE çalışmalarında, hücrelerin totipotensinin açık bir kromatin konformasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Özellikle, bir dizi türde hücre yeniden programlamasının ve embriyogenez başlangıcının ilk aşamalarının genellikle yaygın DNA hipometilasyonunu, histon H3K9 demetilasyonunu ve histon H3 ve H4 asetilasyonunu içerdiği bulunmuştur.

Bu epigenetik işaretlerden sorumlu enzimatik aktiviteleri inhibe eden bileşikler, SE'yi teşvik etmek için yaygın epigenetik değişiklikleri manipüle etmek amacıyla çeşitli *in*

vitro embriyogenez sistemlerinde kullanılmıştır. SE indüksiyonunu teşvik ettiği gösterilen bazı epigenetik modölatörler; DNA metiltransferaz inhibitörlerinden azasitidin ve zeburalin; H3K9'a özgü histon metiltransferaz inhibitörü BIX-01294 ve histon deasetilaz inhibitörleri trikostatın A veya suberoilanolid hidroksamik asittir. (Ibanez ve ark., 2020).

Son zamanlarda, *Arabidopsis*'te, H3K27me3'ün yaklaşık 9006 genin anlatımını düzenlediği ve H3K9me2'nin dediferansiyasyon koşullarında gen anlatımında aktif olarak yer aldığı belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2017). Grafi ve ark., yaptıkları çalışmada (2007) kromatin yeniden düzenlenmesinin hücresel dedifferansiyasyon ve proliferasyon açısından önemini değerlendirmek için, kallus oluşturan ortam tarafından tetiklendiğinde kallus oluşturma kabiliyetleri açısından kromatin düzenleyen genlerdeki *Arabidopsis* mutantlarını taramıştır. İncelenen birkaç mutant arasında, yalnızca histon H3 lizin 9 metiltransferazı kodlayan KYP/SUVH4 geninde mutasyon taşıyan kyp-2'nin kallus oluşumunda bozukluk olduğu görülmüştür. Daha ileri analizler ile KYP/SUVH4'ün dedifferansiyasyon sırasında telomerazdan bağımsız telomer uzamasında ve hücre döngüsü ilerlemesinde rol oynayan belirli genlerin transkripsiyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Grafi ve ark., 2007).

Arabidopsis'te, SE indüksiyonunun DNA metilasyonu aracılığıyla H3K9me2 veya H3K27me3 gibi epigenetik baskılayıcı işaretlerin kaldırılmasına ve histon asetilasyonunun artmasına yol açarak, *LEC1*, *LEC2*, *BBM* veya *AGL15* gibi spesifik transkripsiyon faktörlerinin ifadesine izin verdiği ve bu faktörlerin oksin biyosentezini ve sinyallemesini aktive ederek totipotensi kazanımına ve SE başlatılmasına yol açtığı öne sürülmüştür (Ibanez ve ark., 2020).

Bu bulgular, epigenetik yeniden programlamanın SE indüksiyonundaki kritik rolünü ortaya koymaktadır. Dahası, bu çalışmalar, epigenetik modölatörlerin kullanımıyla *in vitro* embriyogenezin verimliliğini artırmak için yeni olanaklar sunmakta ve bu da SE'nin çoğalma, ıslah ve koruma programlarında uygulanmasını genişletebilmektedir (Ibanez ve ark., 2020).

2.4. Histon Modifikasyonları

Kromatin, ökaryotik hücrelerde DNA ve proteinlerin bir araya gelmesiyle oluşan, yüksek derecede düzenli bir yapıdır. DNA, düzenli aralıklarla dizilmiş nükleozomlara

paketlenir ve her bir nükleozom, bir çekirdek histon oktamersinin etrafına sarılmış yaklaşık 147 bp DNA tarafından oluşturulur (Vazquez ve ark., 2022). Ökaryotlarda nükleozom, DNA ve H2A, H2B, H3 ve H4'ün iki kopyasını içeren bir çekirdek histon oktamersinden oluşan kromatinin ana yapısal elemanıdır ve histon H1, nükleozom ile DNA arasında bir bağlantı görevi görür (Huang ve ark., 2021).

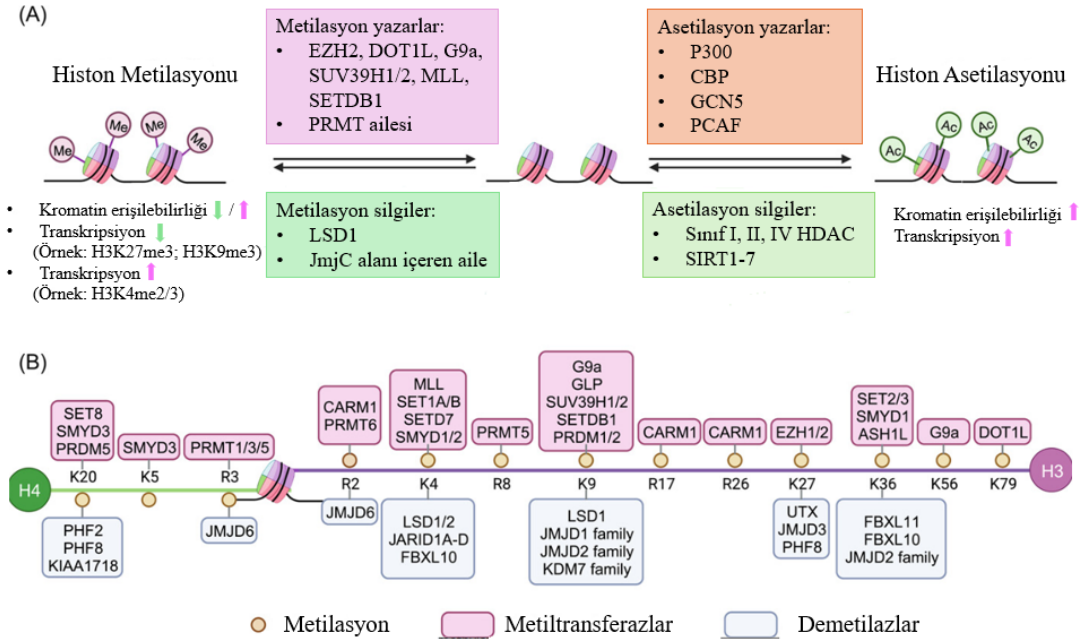
DNA'nın nükleus içindeki organizasyonu, kromatin erişilebilirliği ve transkripsiyonun düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu organizasyon büyük ölçüde, DNA ile etkileşime girerek kompakt nükleozom yapılarını oluşturan histon proteinleri aracılığıyla sağlanır. Bu nükleozomlar, yalnızca DNA'yı yapılandırmakla kalmaz, aynı zamanda histonlar üzerindeki çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlar aracılığıyla, ki bu modifikasyonlar topluca histon kodunu oluşturur, kromatin dinamiklerini de modüle eder (Le ve ark., 2025).

Histon PTM'leri metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon ve sumilasyon gibi reaksiyonları içerir. Bu reaksiyonlar, spesifik genomik bölgelere getirilen histon değiştirici enzimler tarafından katalize edilir. Aktif genlerin kromatin profili tercihen yüksek oranda asetillenmiş histonlarla ilişkilendirilirken, inaktif genler hipoasetillenmiş histonlarla ilişkilendirilir. Genel varsayım, lizin ve arginin rezidülerinin asetilasyonunun DNA-histon etkileşimlerini azalttığı ve kromatin yapısını gevşettiği ve bunun sonucunda transkripsiyonel mekanizmanın DNA'ya erişilebilirliğinin arttığı şeklindedir (Vazquez ve ark., 2022).

Histon asetiltransferaz, histon metiltransferaz ve histon fosfotransferaz, hepsi translasyon sonrası modifikasyonlar üretebilir; bunlardan histon lizin metilasyonu en çok karakterize edilen translasyon sonrası modifikasyonlardan biridir (Cao ve ark., 2022). Örneğin, asetilasyon genellikle gen aktivasyonunu kolaylaştıran ökromatin olarak bilinen daha açık bir kromatin konfigürasyonu ile sonuçlanır. Buna karşılık, belirli metilasyon kalıpları, transkripsiyonu engelleyen heterokromatin olarak adlandırılan daha kompakt bir yapı oluşturabilir (Treas ve ark., 2025).

Metilasyon, histonlardaki hem lizin hem de arginin amino asitlerinde meydana gelir ve hem aktif hem de inaktif kromatinleri işaretlemek için kullanılır. Histonlardaki Lys(K) kalıntılarının metilasyonunu katalize eden bir grup protein, ortak SET alanları aracılığıyla birbirleriyle ilişkilidir. Yaklaşık 130 amino asit uzunluğundaki SET alanı, ilk olarak *Drosophila*'daki kromatinle ilişkili Su (var)3–9, E(Z) ve Trithorax (TRX)

proteinlerinde tanımlanmıştır. Karakteristik bir psödodüğüm benzeri yapıya sahiptir ve histon lizin metiltransferazın katalitik kısmını oluşturur. Bu HKMT'ler, psödodüğümün bir tarafına bağlı olan metil vericisi S-adenosil metiyonin'den (SAM) bir metil grubunu lizin rezidülerinin E-amino grubuna aktarır. Metilasyon, histonlardaki farklı Lys(K) rezidülerinde meydana gelebilir: Histon H3'te K4, K9, K27, K36 ve K79; H413'te K20, K59 ve H1B'de K26 (Satish ve ark.,2017).



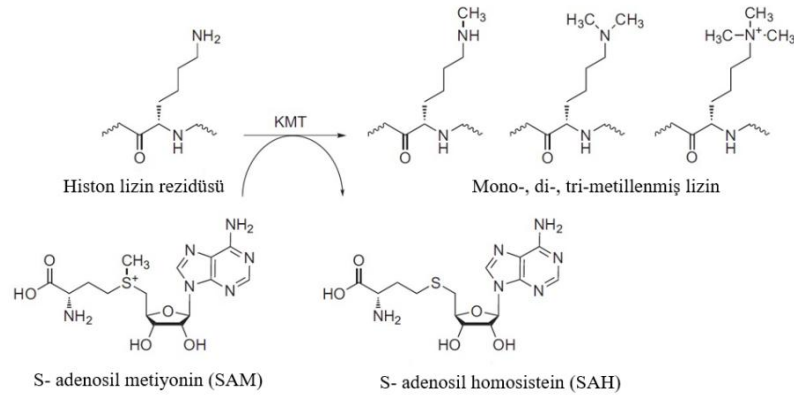
Şekil 2. 7. Histon modifikasyon düzenlemesinin genel görünümü. A. Histon metilasyonu belirli genomik lokuslardaki "yazıcılar" (histon metiltransferazlar) ve "siliciler" (histon demetilazlar) arasındaki denge tarafından düzenlenen dinamik süreçlerdir. B. Histon H3 ve H4 üzerindeki ana metilasyon bölgeleri, ilgili metiltransferazlar (yukarıda) ve demetilazlar (aşağıda) gösterilmiştir (Tao ve ark., 2024).

Arabidopsis'teki histon metilasyonu, sırasıyla metilasyon işaretleri ekleyen ve kaldıran çok sayıda histon metiltransferaz ve demetilaz tarafından dinamik olarak düzenlenir (Şekil 2. 7). Genel olarak, histon metiltransferazlar Su(var) 3e9, Enhancer-of-zeste ve Trithorax (SET) domain içeren protein ailelerine aittir, histon demetilazlar ise lizin-spesifik demetilazlar (LSD) veya JmjC histon demetilazlar olarak sınıflandırılabilir (Hu ve ark., 2022). Histon H3'ün N-terminal kuyruğundaki birkaç lizin rezidüsü metillenebilir ve her bir lizin rezidüsüne eklenen metil gruplarının konumuna ve sayısına bağlı olarak gen anlatımını pozitif veya negatif etkileyebilir. Histon H3'ün lizin 4'teki (H3K4me3) trimetilasyonu tipik olarak aktif gen anlatımı ile ilişkilidir,

buna karşılık lizin 27'deki (H3K27me3) trimetilasyon gen baskılaması ile bağlantılıdır. Histon H3'ün lizin 36'sında trimetilasyon (H3K36me3) transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkilidir ve histon H3'ün lizin 36'sında trimetilasyon (H3K36me3) transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkilidir (Ikeuchi ve ark., 2015; Liu ve ark., 2023).

2.5. Histon Lizin Metil Transferazlar

Histon lizin metiltransferazlar (KMT), histonlar üzerindeki lizin rezidülerine metil gruplarının (-CH₃) eklenmesini katalize eden enzim grubudur. KMT, metil grubunu bir metil vericisinden genellikle bir koenzim S-adenosil-metiyonin (SAM) histonlar üzerinde bulunan bir lizin rezidüsüne aktarır. SAM, fosfat ve pirofosfat üreten bir işlem olan metiyonin ve ATP ile birleştirilir. Metil grubunun transferinden sonra SAM, S-adenosil-homosisteine (SHA) dönüştürülür. (Şekil 2. 8).



Şekil 2. 8. Lizin metiltransferaz katalizinin genel mekanizması (DeCarlo ve ark., 2012).

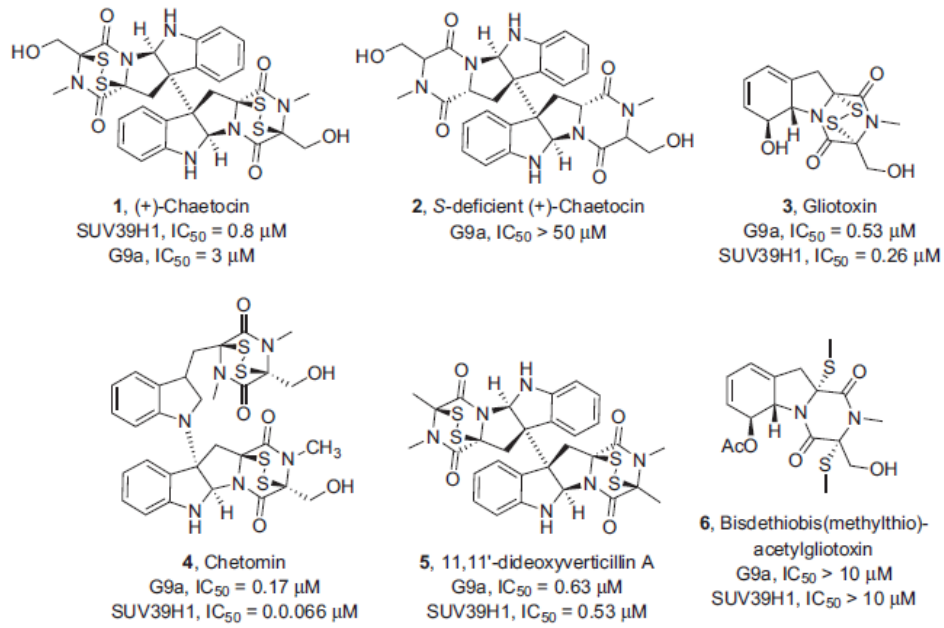
PKMT'ler tarafından katalize edilen lizin metilasyonu, gen anlatımı ve transkripsiyonunun düzenlenmesinde önemli bir mekanizma olarak kabul edilmiştir. Histon lizin metilasyonu, metilasyonun meydana geldiği yere ve metilasyon durumuna (örneğin, mono-, di- veya trimetilasyon) bağlı olarak transkripsiyon aktivasyonuna veya baskılanmasına yol açabilir (Kaniskan ve ark., 2014).

2.6. Lizin Metiltransferaz İnhibitörleri

KMT inhibitörleri, KMT enzimlerini hedef alan bir bileşik sınıfıdır. Bu inhibitörler, KMT'nin aktivitesini ve dolayısıyla histonlar üzerindeki epigenetik modifikasyonları

modüle etmek amacıyla geliştirilmiştir. Bunun, gen anlatımı, gelişim, hücre farklılaşması ve hastalık dahil olmak üzere ilgili hücresel süreçlerin düzenlenmesi üzerinde etkileri olabileceği düşünülmektedir. Bu inhibitörler doğal ürün bazlı inhibitörler ve kinazolin bazlı inhibitörler olarak iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.9).

Kaetosin (Ch), *Chaetomium* türü mantarların metabolitlerinden elde edilen yeni bir doğal üründür ve yapısı ilk kez 1970 yılında Hauser ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır.

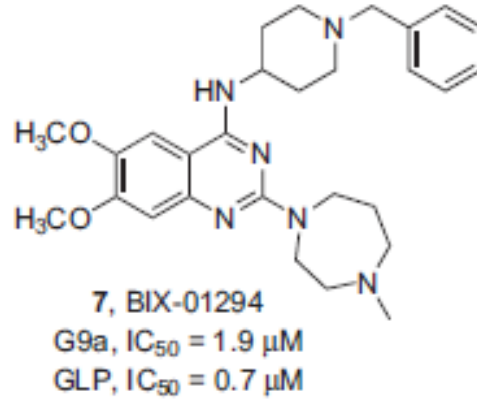


Şekil 2. 9. Doğal ürün bazlı inhibitörler (DeCarlo ve ark.,2012).

Ebrahimi ve ark., tarafından 2021’de gerçekleştirilen çalışmada *Nicotina tabacum* bitkisinde histon metiltransferaz inhibitörlerinden birisi olan Ch ajanının çimlenme sonrası büyüme ve kallus indüksiyonu üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, kaetosinin direkt çimlenme besiyerine eklendiğinde yaprak gelişimini geciktirdiği fakat büyüme aşamasında uygulandığında kallus oluşumunu 1,4 kat arttırdığı bildirilmiştir. 5 μ M Ch ile muamele edilmiş gruplarda yetiştirilen 30 günlük bitkiciklerin yaprak disklerinden elde edilen kallusların sayısı ve boyutu, kontrole kıyasla sırasıyla %12 ve %20 oranında artış göstermiş ve çimlenme sonrası büyüme aşamasında 5 μ M konsantrasyonda Ch uygulanması, kallus oluşumunu kontrole kıyasla önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir. Bu artışın kontrolden 1,4 kat daha fazla olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir (Ebrahimi ve ark., 2021).

2.6.1. BIX-01294

G9a histon lizin metiltransferaz inhibitörü olarak tanımlanan ve birkaç memeli hücre hattında toplu H3K9me2 seviyelerini azaltan bir diazepin-kinazolin-amin türevidir (Berenguer ve ark.,2017; Hajar ve ark., 2025)

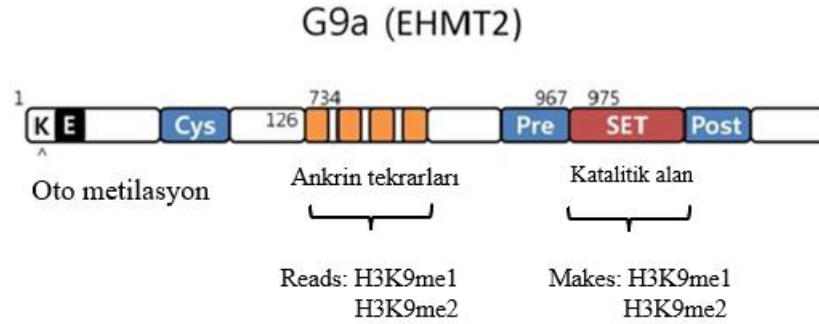


Şekil 2. 10. BIX-01294 lizin metiltransferaz inhibitörünün moleküler yapısı (DeCarlo ve ark., 2012).

Hücreler, işlevlerini belirleyen özgün moleküler ve fizyolojik özelliklere sahiptir. Ancak birçok hücre tipi, uygun uyaranlar veya kimyasal ajanlar sayesinde farklı hücre tiplerine dönüşme kapasitesine sahiptir. Bu süreç, hücrenin özgün moleküler özelliklerini kaybederek, değişmeyen genom dizisi üzerinde tamamen yeni ve kalıtsal bir moleküler profilin oluşturulmasını içerir. Epigenetik yeniden programlama olarak bilinen bu süreç, genellikle kromatin üzerindeki kovalent modifikasyonların değişmesi sonucu transkripsiyon ve kromatin yapısında değişiklikler içerir (Krishnakumar ve ark., 2015). Histon H3 lizin 9 dimetilasyonu (H3K9me2) gibi baskılayıcı bir histon modifikasyonu, hücrenin var olan kimliğini korumasına yardımcı olan önemli bir bariyer görevi görebilir. BIX-01294, bu bariyere doğrudan müdahale eden bir küçük molekül inhibitördür ve özellikle EHMT2 (G9a) gibi histon metiltransferazları (“yazıcılar”) hedef alarak H3K9me2 düzeylerini düşürür (Chang ve ark., 2009). Böylece kromatin daha erişilebilir bir hâle gelerek hücrelerin embriyonik/totipotent özelliklere yeniden programlama kapasitesini artırmaktadır. Dolayısıyla BIX-01294, yalnızca bir metiltransferaz inhibitörü değil, yeniden programlama süreçlerini kolaylaştıran önemli bir epigenetik modülatör olarak değerlendirilmektedir.

H3K9'un mono- ve dimetilasyonu G9a ve GLP tarafından katalize edilir. G9a'nın yapısı, yukarı akışta yer alan N-terminal ucunda bir otometilasyon bölgesi, ardından

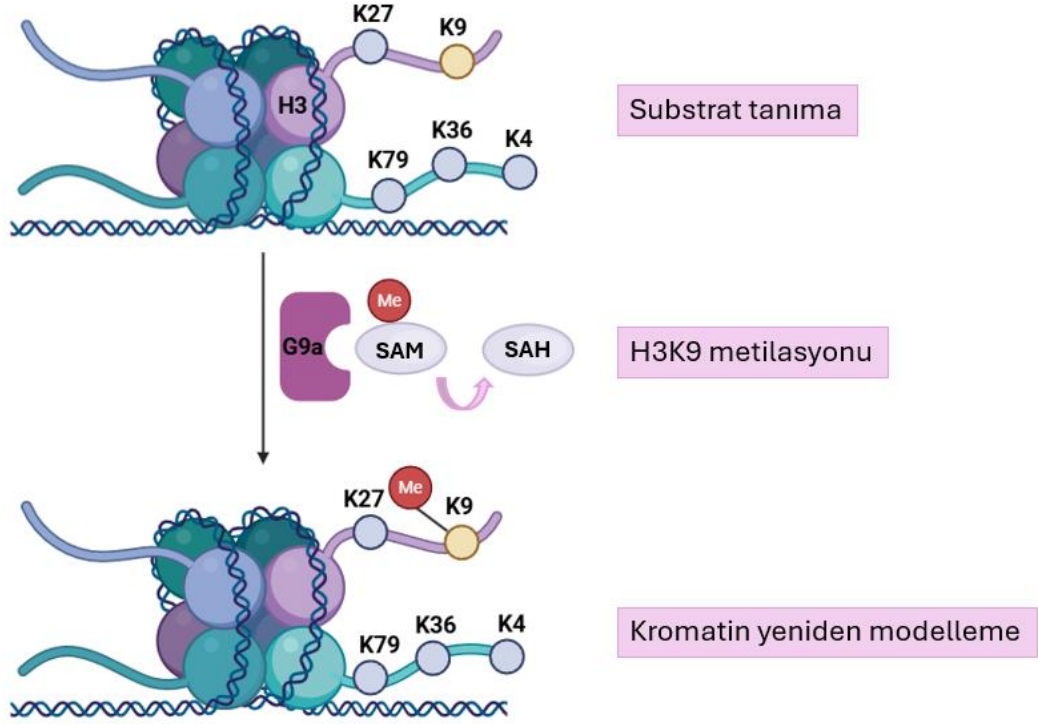
bir glutamat açısından zengin alan (E), bir sistein açısından zengin alan (Cys), mono ve dimetillenmiş histon H3K9'u tanıyan ankrin tekrarları ve enzimatik aktiviteden sorumlu katalitik bir SET domaini ile karakterize edilen G9a yapısal organizasyonu Şekil 2.11'de gösterildiği gibidir (Casciello ve ark., 2015; Hajar ve ark., 2025).



Şekil 2. 11. G9a yapısı (Casciello ve ark., 2015).

H3K9'un dimetillenmesinden sorumlu olan G9a metiltransferaz enzimi, genomun baskılanmış ökromatik bölgeleriyle ilişkilidir, bu da G9a ve GLP'nin, spesifik hedef genlerin H3K9 dimetilasyonu yoluyla ökromatik gen transkripsiyonunu baskıladığı anlamına gelir. Ek olarak hem G9a hem de GLP'nin çeşitli transkripsiyonel olarak baskılayıcı protein kompleksleriyle etkileşime girdiği bulunmuştur.

2002 yılında Tachibana ve ark. yaptıkları çalışmada G9a tarafından düzenlenen ökromatik H3K9 metilasyonunun erken embriyogenez için gerekli olduğunu ve gelişimsel genlerin transkripsiyonel baskılanmasında rol oynadığını göstermiştir (Tachibana ve ark., 2002).



Şekil 2. 12. G9a'nın kromatin üzerindeki etki mekanizmasının şematik gösterimi (Hajar ve ark., 2025 referans alınarak düzenlenmiştir).

Histon metilasyonu, epigenetik düzenlemenin önemli göstergelerinden biridir ve bu süreç, G9a gibi histon metiltransferazlar tarafından katalize edilir. G9a, histon 3 lizin 9 (H3K9) ve histon 3 lizin 27'nin (H3K27) metilasyonunu katalizler (Şekil 2.12). Ek olarak G9a, DNA metilasyonunu düzenleyerek DNA replikasyonu, hasar yanıtı, onarım süreçleri ve gen anlatımının kontrolünde önemli bir rol oynar. Çok sayıda çalışma, BIX-01294'ün embriyonik gelişim süresince, kanser oluşumu ve çoğalması sırasında G9a'yı inhibe ederek işlev gördüğünü göstermiştir (Cao ve ark., 2019).

Huang ve arkadaşları (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, G9a inhibitörü olan BIX-01294'ün akut T lenfoblastik lösemi hücrelerinde (MOLT-4 ve Jurkat) büyüme, hücre ölümü ve epigenetik düzenleme üzerindeki etkileri araştırılmıştır. MTT ve akım sitometrisi analizleri, BIX-01294'ün hücre proliferasyonunu belirgin şekilde baskıladığını ve apoptozu artırdığını göstermiştir. Moleküler düzeyde, anti-apoptotik Bcl-2 proteinini azaltırken pro-apoptotik Bax ve kaspaz-3 düzeylerini yükseltmiştir. Ayrıca P21 artışı ile hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurmuş; DNMT1'i baskılayıp tümör baskılayıcı P15'i yükselterek çoğalmanın önüne geçmiştir. Epigenetik incelemelerde ise H3K9 mono ve di-metilasyon seviyelerini düşürmüş, buna karşılık H3K9 tri-metilasyonu ve H3 asetilasyonu üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı

görülmüştür. Genel olarak bulgular, BIX-01294'ün histon metilasyonunu yeniden düzenleyerek hücre döngüsünü durdurduğunu ve apoptozu tetikleyerek T-ALL hücrelerinin hayatta kalmasını engellediğini göstermektedir (Huang ve ark., 2017).

2016'da yapılan bir çalışmada ise, BIX-01294'ün insan glioma hücrelerinde otofajiyi indükleyip indüklediğini ve bunun glioma kök hücrelerinin (GSC) farklılaşmasını nasıl etkilediğini araştırılmıştır. Toksik olmayan konsantrasyonlarda BIX-01294'ün ATG (autophagy related genes) genlerinin promotörlerindeki H3K9me2 ve H3K27me3 baskılayıcı işaretlerini azaltarak glioma hücrelerinde ve GSC kürelerinde otofajiyi indüklediği gösterilmiştir. Bulgulara dayanarak, BIX-01294'ün GSC'lerde G9a histon metiltransferazı inhibe ettiği ve bunun sonucunda baskılayıcı H3K9me2 işaretlerinin azaldığı, otofaji ve farklılaşmayla ilişkili genlerin promotörlerindeki H3K4me3 işaretlerinin aktivasyonunun arttığı bir model önerilmiştir. Bu değişiklikler, GSC'lerde otofaji bileşenlerinin yeniden programlanmasını ve bu sürecin aktivasyonunu tetikleyerek hücre farklılaşmasını tetiklediği belirtilmiştir (Ciechomska ve ark., 2016).

Brassica napus ve *Hordeum vulgare* bitkilerinde BIX-01294 ilk kez uygulandığında, majör bir baskılayıcı modifikasyon olan histon H3K9 metilasyonunun dinamikleri, olası diğer rolleri ve mikrospor embriyogenez başlangıcı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. HKMT inhibitörü BIX-01294'ün kısa süreli uygulamasının, H3K9 metilasyonunun azalmasıyla birlikte hücre yeniden programlama, totipotensi ve embriyogenez başlatma etkinliğini arttırdığını ortaya koymuştur. Kısa süreli BIX-01294 uygulaması embriyogenezi başlatan mikrosporların oranını arttırırken H3K9 metilasyonunu azaltmış, aksine uzun süreli uygulamada BIX-01294 uygulamasının embriyo farklılaşmasını bozarak, gelişmekte olan embriyolarda H3K9 metilasyon seviyelerini düşürmüştür. BIX-01294 uygulamasıyla, global DNA metilasyonunda meydana gelen azalmanın H3K9 metilasyonunda da azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Kültür ortamında bu kimyasal ajanın varlığı önce totipotensi ve embriyogenez indüksiyon etkinliğini arttırmıştır, ancak daha sonra proembriyo aşamasında süreci bloke etmiştir. Bu nedenle, BIX-01294'ün hücre farklılaşması başladıktan sonraki ileri aşamalarda ortadan kaldırılması, daha fazla gelişmeyi destekleyeceği ve embriyo üretimini arttıracığı düşünülmektedir (Berenguer ve ark., 2017).

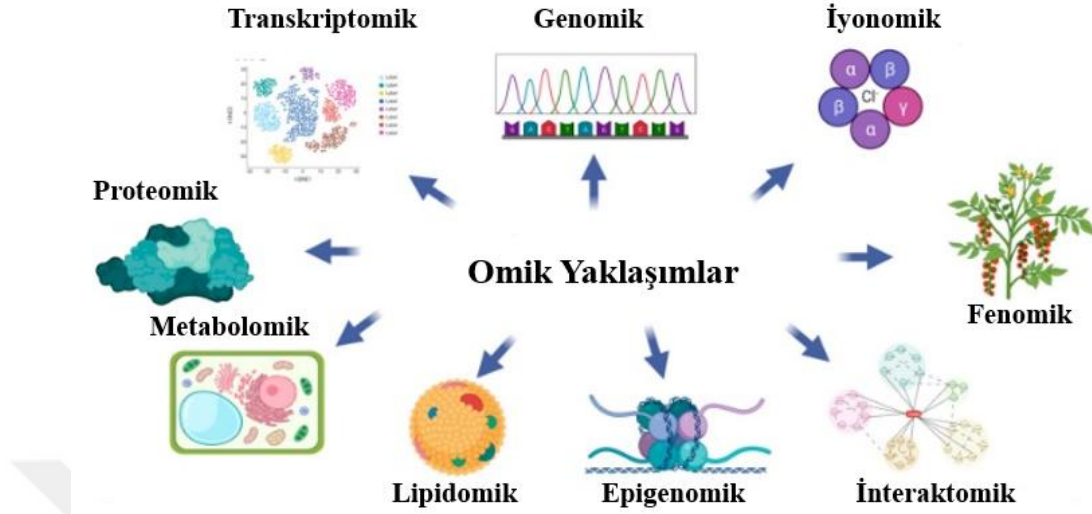
2019 yılında yapılan başka bir çalışmada ilkbahar ve kışlık buğday genotipleri için etkili ve geniş çapta uyarlanabilir mikrospor kültürü metodolojisi geliştirmek amacıyla scriptaid, BIX-01294, TSA ve sodyum bütirat inhibitörleri kullanılmıştır. Bu inhibitörler yapılarına göre gruplandırılabilir; TSA ve scriptaid hidroksamik asitlerdir, sodyum bütirat bir yağ asididir ve BIX-01294 bir histon metiltransferaz inhibitörüdür. Mevcut buğday mikrospor kültürü yöntemleri, özellikle kışlık genotipler için rutin uygulama için hala yetersizdir. Yapılan çalışma, mikrospor embriyogenezinin sıklığını artırmayı ve mikrospordan türetilen embriyoların verimli yeşil bitkilere dönüşümünü iyileştirmeyi içermektedir. 28 günlük bir uygulama için BIX-01294 ajanının bulunduğu kültürler, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli bir fark göstermemiştir. Bu sonucun, BIX-01294 inhibitörünün etkisiz olmasından veya test edilen dozun çok düşük konsantrasyonlarda uygulanmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2019).

2.7. Omik Teknolojiler

Omik teknolojileri, bir hücreyi, dokuyu veya organizmayı oluşturan moleküllere dair bütünsel bir bakış açısı benimsemektedir. (Horgan ve Kenny, 2011). Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin ortaya çıkışı, genomlar, epigenomlar, transkriptomlar, proteomlar, metabolomlar ve fenomenler için yüksek veri hacmi ve hızlı veri üretimine yol açmıştır. Omik teknolojilerinden elde edilen bilgilerin birleşimi, tarımsal ilgi çeken özelliklerin genetik temellerinin daha derinlemesine anlaşılması için bir çerçeve sunmaktadır (Tripodi, 2025).

Son teknolojiler, bitki genomu, transkriptom, proteom ve metabolomun tüm bilgilerinin derinlemesine analiz edilebildiği stratejilerin verimli bir şekilde geliştirilmesini sağlayarak, çoklu omik çağını başlatan bitki biyolojisinde devrim yaratmıştır. Günümüzde, çeşitli dizileme (örneğin genomik, transkriptomik, proteomik, epigenomik) veya fenotipleme tabanlı (metabolomik, fenomik ve iyonometrik) teknolojiler, bitkilerde genotip ve fenotipleri birbirine bağlayan moleküler ve fizyolojik mekanizmaları derinlemesine inceleyebilmektedir (Şekil 2. 13). Proteomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan iki temel laboratuvar yaklaşımı; protein elektroforezi ve kütle spektrometrisi temelli protein tanımlama yöntemleridir. Geleneksel jel bazlı protein elektroforezi yöntemleri arasında iki boyutlu elektroforez

(2-DE) ve diferansiyel jel elektroforez (DIGE) teknikleri öne çıkmaktadır (Roychowdhury ve ark., 2023).



Şekil 2. 13. Çoklu omik yaklaşımlar (Roychowdhury ve ark., 2023).

2.7.1. Transkriptomik

Transkriptomik teknikler, belirli bir zamanda belirli bir genomdan transkripsiyona uğrayan RNA moleküllerini tespit etmeye ve miktarını belirleyerek örnekler arasında gen anlatım modellerinin karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır (Dai ve ark., 2022). Transkriptomu anlamak, genomun yapısal ve fonksiyonel organizasyonunu aydınlatmada çok önemlidir. Mikroarray (mikrodizi), EST dizileme (expressed sequence tag) gen anlatımının seri analizi ve RNA dizileme (RNA-seq) dahil olmak üzere çeşitli hibridizasyon ve dizi tabanlı yaklaşımlar, transkriptom profillemesi için geliştirilmiştir (Wang ve ark., 2024).

Başlangıçta transkriptom dinamikleri, geleneksel profillemeye yöntemleri olan cDNA-AFLP, diferansiyel display-PCR (DD-PCR) ve SSH teknikleriyle incelenmiştir. Ancak bu yöntemler sınırlı bir çözünürlük sağlamıştır. Kısa süre sonra, mikrodizi, dijital gen ifade profillemesi, NGS, RNA-Seq ve SAGE gibi daha gelişmiş ve güvenilir teknolojilerin kullanılmaya başlanmasıyla, RNA ifade profillerinin yüksek doğrulukla oluşturulması mümkün hale gelmiştir (Yang ve ark., 2021).

Dizileme teknolojilerindeki sürekli ilerlemeler sayesinde, transkriptom analiz yaklaşımları son yıllarda temel DNA mikrodizi platformlarından RNA-Seq teknolojisine doğru önemli bir gelişim göstermiştir (Tyagi ve ark., 2022).

Bu yaklaşımlar arasında, yüksek verimli dizileme ile tüm transkriptleri yakalayan RNA-seq, doğru ve yüksek çözünürlüklü transkriptom analizi için devrim niteliğinde bir araçtır. RNA dizileme (RNA-seq) yüksek verimli dizileme teknolojileri kullanılarak transkriptlerin varlığını ve miktarını incelemeyi ifade eden ve neredeyse her türde gen anlatımının hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlamakla birlikte hücrelerin nasıl işlediğini ve metabolik olarak nasıl işlev gördüğünü anlamamıza yardımcı olan bir tekniktir (Wang ve ark., 2024). Örneğin, NGS tabanlı RNA-seq, 25 ila 300 bp uzunluğunda milyonlarca kısa okuma üretir. Gen anlatım seviyeleri genellikle RNA-seq okumaları temel alınarak değerlendirilir. RNA-seq okumalarını bir referans transkriptoma veya genomla eşleyerek, her bir genle eşleşen okuma sayısı ve gen ifade seviyeleri, kilobaz başına haritalanmış okuma parçacıkları, milyon başına transkriptler ve milyon başına sayımlar gibi algoritmalar kullanılarak okuma sayılarının normalleştirilmesiyle nicel olarak değerlendirilir (Wang ve ark., 2023).

2024 yılında yapılan bir çalışmada bir histon deasetilaz inhibitörü (HDAC) olan Trikositin A (TSA) uygulaması yapılan *Arabidopsis* bitkilerinde SE'de histon asetilasyonu ile düzenlenen genlerin anlatımını tanımlamak için transkriptomik analiz gerçekleştirilmiştir. TSA ve oksin (2,4-D) ile indüklenen transkriptomlar karşılaştırılmıştır. RNA-seq sonuçları, TSA'nın çoğunlukla genlerin büyük bir kısmının baskılandığını, TSA ve oksin kaynaklı transkriptomik yanıtların benzerliklerini ortaya koymuştur. Diferansiyel anlatım analizi sonuçlarında, somatik embriyogenezin temel düzenleyicileri olan transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra, oksin biyosentezi, sinyal iletimi ve polar taşınmasında görev alan genler ile indol-3-asetik asit biyosentezinde işlev gören nitrilaz kodlayan genler tanımlanmıştır. Transkriptomik verilerle uyumlu olarak, TSA kaynaklı eksplantlarda salisilik asit ve absisik asit birikmiş ve bu da SE indüksiyonu sırasında stres hormonu ile ilişkili yanıtların düzenlenmesinde histon asetilasyonunun rolünü düşündürmüştür. (Wojcikowska ve ark., 2024)

Wickramasuriya ve ark. (2015) tarafından yürütülen çalışmada ise, *Arabidopsis thaliana*'da erken somatik embriyogenez sürecinin aydınlatılması amaçlanmış ve üç farklı gelişim aşamasında (*in vitro* kültürden 5., 10. ve 15. günler) transkriptomik analiz gerçekleştirilmiştir. Beşinci ve onuncu günlerde elde edilen embriyonik kültürlerin analizi, 1.195 genin diferansiyel olarak ifade edildiğini göstermiştir; bu genlerin 778'i 10. güne kıyasla 5. günde daha yüksek düzeyde ifade edilmiştir. Ayrıca,

10. ve 15. günler arasında 1.718 genin ifade düzeyinde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Veriler, erken somatik embriyogenez sırasında en az sekiz farklı gen ifade paterninin varlığını ortaya koymuş; genlerin büyük çoğunluğunun 5. günde embriyonik dokularda transkripsiyonel olarak daha aktif olduğu belirlenmiştir. Somatik embriyolardan ve yaprak dokularından elde edilen transkriptomların karşılaştırılması sonucunda, embriyolarda yapraklara kıyasla 4.951 genin daha yüksek düzeyde ifade edildiğı saptanmıştır. Bu genlerin önemli bir kısmının DNA sitozin metilasyonu ve histon deasetilasyonu gibi epigenetik düzenleme süreçlerinde görev aldığı bildirilmiştir. Buna ek olarak, somatik embriyolarda diğer dokulara göre daha yüksek düzeyde ifade edilen 49 gen tanımlanmıştır. Bu genler arasında, işlevi henüz tanımlanmamış bazı genlerin yanı sıra oksidatif ve ozmotik stres tepkileri ile oksin sinyal yollarında görev alan genler de yer almaktadır (Wickramasuriya ve ark., 2015).

3. MATERYAL- METOT

3.1. Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında deneysel materyal olarak kullanılan Col-0 tohumları NASC (The European *Arabidopsis* Stock Centre), Nottingham Üniversitesi'nden temin edilmiştir.

3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Doku kültüründe kullanılacak olan tüm malzemeler (pens, bistüri, filtre kağıdı, beher) kuru sterilizatörde 120 dakika 180 °C'de steril edildi. *Arabidopsis thaliana* tohumları 1,5 ml'lik mikrofüj tüpü içerisinde 1 dakika boyunca %70'lik etil alkol (EtOH) ile alt-üst edildi. Ardından tohumlar alkolü uzaklaştırmak için 1 dakika distile su ile yıkandı daha sonrasında tohumlar %1'lik sodyum hipoklorit (NaOCI) ile 9 dk alt üst edildi. Sodyum hipokloritin uzaklaştırılması için 5 kez 1'er dakika distile su ile yıkama gerçekleştirildi ve tohumlar steril filtre kağıdında kurumaya bırakıldı. Tohumlar sonrasında Murashige ve Skoog (1/2 MS), %1 süktroz ve %0,8 agar içeren çimlendirme besiyerine alındı her magentaya 12 tohum olacak şekilde ekildi. Magentalar ekimden sonra 4 gün +4 °C'de karanlıkta bekletildi sonrasında soğuk beyaz floresan lambalar kullanılarak uzun gün (LD) fotoperiyodu (16 saat ışık/8 saat karanlık) ve 264 lux ışık yoğunluğu altında 22 °C' de 4 hafta bitki büyütme kabininde inkübe edildi. (Jeong ve ark., 2021). Dört haftayı dolduran bitkiler, üç hafta daha siliklerin oluşumu için toprak-perlit karışımı içeren saksılarda T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki iklimlendirme odasında, 16 saat gün/ 8 saat karanlık periyodu boyunca, 25 °C koşullar altında yetiştirildi. Aklimatizasyon sürecinde, *in vitro* koşullardan *in vivo* ortama transfer edilen bitkiler yüksek neme kademeli uyum sağlayabilmeleri için birkaç gün boyunca şeffaf kapaklar altında tutuldu, gün içinde belirli aralıklarla kapaklar kısa süreli açılarak havalandırma sağlandı ve yetiştirilme süresi boyunca bitkiler distile su ile sulandı.



Şekil 3. 1. Silikler oluştuktan sonra olgunlaşmamış zigotik embriyoların doku kültürüne aktarılması

3.3. Kimyasal Yeniden Programlama Ajanı BIX-01294'ün Uygulaması ve Somatik Embriyogenez İndüksiyonu

Somatik embriyogenez indüksiyonu için seçilen BIX-01294 (Sigma, B9311-5MG) histon lizin metiltransferaz inhibitörü 8,33 mM ana stok haline getirilmesi amacıyla 1 ml steril distile su ile çözündürüldü. Somatik embriyogenez için belirlenen besiyeri kombinasyonları aşağıdaki şekildedir (Tablo 3.1).

Tablo 3. 1. Somatik embriyogenez indüksiyonu için kullanılan besiyerleri (Wojcikowska ve ark., 2017).

Besiyeri İsmi	Besiyeri İçeriği
E0	3,2 g/L Gamborg B5 tuzu, 8g/L agar, 20 g/L süktroz
EA	3,2 g/L Gamborg B5 tuzu, 8g/L agar, 20 g/L süktroz, 5 µM 2,4-D
EB	3,2 g/L Gamborg B5 tuzu, 8g/L agar, 20 g/L süktroz, belirlenen konsantrasyonlarda (0,1µM; 0,5µM; 0,05 µM; 1 µM; 2,5µM) BIX-01294

Siliklerin yüzey sterilizasyonu 15 ml'lik falkon içerisinde 15 dk %1'lik sodyum hipoklorit ile alt üst edilerek gerçekleştirildi. Daha sonra sodyum hipokloriti uzaklaştırmak için 3 kez steril distile su ile yıkama gerçekleştirildi ve silikler steril filtre kağıdı üzerinde kurumaya bırakıldı (Lu ve ark., 2023). Silikler steril pens ve bistüri yardımı ile Olympus TH4-200 stereo mikroskop altında açılıp bükülmüş kotiledon evresindeki olgunlaşmamış zigotik embriyolar toplandı. Siliklerden

toplanan olgunlaşmamış zigotik embriyolar her konsantrasyon için bir petride 15 adet olgunlaşmamış zigotik embriyo olacak şekilde üç tekrarlı halde petrilere ekildi (Şekil 3.1).

Gamborg B5 besiyerinin hazırlanması;

1. Erlen içerisine 3,2 g Gamborg B5 tuzu (Duchefa, G0209.0025) eklenerek tuz karışımı çözünene kadar bir miktar su ile karıştırıldı.
2. Distile su ile hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra 1N NaOH/HCl yardımı ile ortam pH'ı 5.8'e ayarlandı. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Soğutulmuş besiyerine 1 mg/L son konsantrasyonunda Gamborg B5 vitamin eklendi. (Duchefa, G0415.0100)

Tablo 3. 2. Gamborg B5 besiyeri içeriği (Gamborg ve ark., 1976).

Mikro Elementler	mg/L	µM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.11
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.10
FeNaEDTA	36.70	100.00
H ₃ BO ₃	3.00	48.52
KI	0.75	4.52
MnSO ₄ . H ₂ O	10.00	59.16
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0.25	1.03
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	2.00	6.96
Makro Elementler		
CaCl ₂	113.23	1.02
KNO ₃	2500.00	24.73
MgSO ₄	121.56	1.01
NaH ₂ PO ₄	130.44	1.09
(NH ₄) ₂ SO ₂	134.00	1.01

3.3.1. Sudan Red 7B Boyaması

50 mg Sudan Red 7B (Santa Cruz Biotechnology) 25 ml PEG-300 içerisinde çözdürüldü. Solüsyon 1 saat 90 °C'de inkübe edildi ve içerisinde su bulunan bir beher

yardımı ile soğutma işlemi uygulandı. Solüsyon içerisine eşit miktarda %90 gliserol eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.

Eksplantlar, oksin ve kimyasal inhibitör uygulamasından 5-10 gün sonra embriyolara özgü olan triasilgliserol içeren dokuların varlığını belirlemek amacıyla Sudan Kırmızısı boyaması açısından değerlendirildi (Brundrett ve ark., 1991). Eksplantlar boyama solüsyonu içerisinde 24 saat bırakıldı ve 24 saat sonra birkaç kez distile su ile yıkama gerçekleştirildikten sonra Olympus TH4-200 stereo mikroskopunda eksplant görüntüleri alındı.

3.4. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu MagMAX Plant RNA Kit Isolation (Thermo Fisher Scientific, A33784) kullanılarak tüm gruplar için 5. gün olgunlaşmamış zigotik embriyolardan ve 10. Gün için de kontrol grubu ve oksin/ inhibitör içeren gruplardaki somatik embriyo içeren eksplantlardan RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyonda kullanılacak havan ve havan elleri nükleazların degradasyonu amacıyla kuru sterilizatörde 180 dakika 180 °C’de steril edildi. İzolasyon sırasında kullanılacak olan pipet uçları ve mikrofüj tüpleri 121 °C’de 1 atm basınçta 2 kere otoklavlanarak steril edildi.

MagMAX Plant RNA Kit Isolation (Thermo Fisher Scientific, A33784) kitinin izolasyon basamakları:

1. Her deney grubu için yaklaşık 15 mg’lık örnekler petrilere steril bistüri ucu yardımı ile toplanarak steril havana aktarıldı ve sıvı azot ile steril havan eli yardımıyla ezildi.
2. Homojenize edilen örneğin üzerine 612 µl Lysis Buffer-DTT solüsyonu eklendi ve elde edilen homojenat 1,5 ml’lik mikrofüj tüpüne aktarıldı. 10 sn vorteks uygulandı ve 56 °C’de 5 dk inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon sonrası örnekler maksimum hızda (20.817xg) 10 dk santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5430R) edildi.
4. Santrifüjden sonra üst faz 1,5 ml mikrofüj tüpüne alındı. Her 400 µl üst faz için 25 µl RNA Binding Beads eklendi. RNA Binding Beads her kullanım öncesi 10 sn yüksek ayarda vortekslendi.
5. RNA Binding Beads ve örneğin olduğu mikrofüj tüpü içerisine 400 µl %96 etanol eklendi ve 10 sn yüksek ayarda vortekslendi. Örnekler daha sonra

- DynaMag™-2 Magnet standına yerleştirildi. Tüp içerisindeki sıvı berraklaşana kadar yaklaşık 2 dk bekletildi. Sonrasında süpernatant atıldı ve tüp stanttan alındı.
6. İçerisinde sadece manyetik boncuklar bulunan tüp içerisine 700 µl Wash Buffer 1 eklendi.
 7. Örnekler 10 sn yüksek ayarda vortekslendi sonrasında spin atıldı ve manyetik stanta yerleştirildi. Tüp içerisindeki sıvı berraklaşana kadar yaklaşık 2 dk bekletildi. Sonrasında süpernatant atıldı ve tüp stanttan alındı. Mikrofüj tüpü ağzı açık bir şekilde etanol uçana kadar yaklaşık 5 dk bekletildi.
 8. Daha sonra tüp içerisindeki manyetik boncukların üzerine 200 µl DNase eklendi. Örnekler 37 °C 250 rpm’de 15 dk boyunca çalkalamalı etüvde (New Brunswick Excella E25) inkübe edildi. Örnekler inkübasyon sonrası 10 sn yüksek ayarda vortekslendi sonrasında spin atıldı ve manyetik stanta yerleştirildi. Tüp içerisindeki sıvı berraklaşana kadar yaklaşık 2 dk bekletildi. Sonrasında süpernatant atıldı ve tüp stanttan alındı.
 9. İçerisinde sadece manyetik boncuklar bulunan tüp içerisine 700 µl Wash Buffer 1 eklendi. Örnekler 10 sn yüksek ayarda vortekslendi sonrasında spin atıldı ve manyetik stanta yerleştirildi. Tüp içerisindeki sıvı berraklaşana kadar yaklaşık 2 dk bekletildi. Sonrasında süpernatant atıldı ve tüp stanttan alındı.
 10. İçerisinde sadece manyetik boncuklar bulunan tüp içerisine 700 µl Wash Buffer 2 eklendi. Örnekler 10 sn yüksek ayarda vortekslendi sonrasında spin atıldı ve manyetik stanta yerleştirildi. Tüp içerisindeki sıvı berraklaşana kadar yaklaşık 2 dk bekletildi. Sonrasında süpernatant atıldı ve tüp stanttan alındı. Bu adım iki kere tekrar edildi.
 11. İçerisinde sadece manyetik boncuklar bulunan tüp içerisine 50 µl Nükleaz içermeyen su eklendi ve örnekler 10 sn yüksek ayarda vortekslendi sonrasında spin atıldı ve manyetik stanta yerleştirildi. Tüp içerisindeki sıvı berraklaşana kadar yaklaşık 2 dk bekletildi. Sonrasında süpernatant steril mikrofüj tüpüne alındı. Örnekler kullanılana kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

Tablo 3. 3. RNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar

Solüsyon	İçerik
Lizis -DTT Solüsyonu	600 µl Lizis Buffer +12 µl 2M DTT
Dnaz Solüsyonu	100 µl 2X Dnaz Buffer + 4 µl DNaz I Solüsyonu+ 20 µl Manganez Klorür Solüsyonu + 76 µl Nükleaz içermeyen su

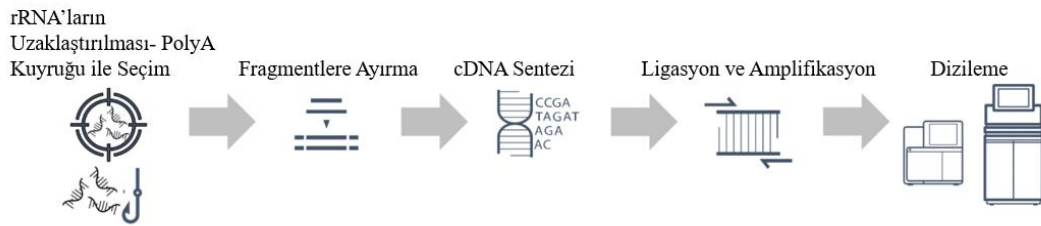
5. ve 10. günlerde izole edilen örneklerin RNA kalitesini belirlemek amacıyla örnekler 6X yükleme tamponu (Beyotime, D0071) ile karıştırılarak %1,3'lük agaroz jelde 1X TBE tamponu içerisinde 60V 50 dk yürütüldü. Yürütme bittikten sonra jel GEN-BOX imagER Fx sisteminde görüntülendi (Şekil 4.14). Örneklerin konsantrasyonları ve saflıklarını belirlemek için NanoDrop spektrofotometre (Implen NP80) cihazı kullanılmış ve RNA sekanslama için A260/230 ve A260/280 değeri yaklaşık 2 olacak şekilde uygun örnekler seçildi. Saflıkları RNA sekanslama için uygunluk göstermeyen örnekler için saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Saflaştırma öncesi/sonrası örneklerin konsantrasyon ve saflık bilgileri Tablo 4.2, 4.3'te verilmiştir.

A260/230 değeri düşük çıkan örnekler için saflaştırma işlemi aşağıdaki basamaklar doğrultusunda gerçekleştirildi.

1. RNA örneğinin hacmi mikropipet yardımı ile ölçüldü. Örnek hacmi nükleaz içermeyen su ile 200 µl total hacime tamamlandı ve hafif pipetaj yapıldı.
2. Örnek hacmi kadar 3M Sodyum Asetat (AppliChem, 8A002341) eklendi ve hafifçe pipetaj yapıldı. Toplam hacim kadar %100 izopropanol (Emsure, I1184834 201) eklendi ve hafifçe alt üst edildi.
3. 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirildi.
4. Daha sonra 12.000 x g'de 15 dk +4 °C'de santrifüj işlemi (Eppendorf Centrifuge 5430R) gerçekleştirildi.
5. Santrifüj işleminden sonra süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü ve pellet üzerine 500 µl %70 soğuk etanol eklendi. Örnekler 7.500 x g'de 2 dk +4 °C'de santrifüj edildi, bu basamak iki kere tekrarlandı.
6. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant döküldü ve pellet üzerindeki alkol uçana kadar örnekler ağzı açık şekilde bekletildi.
7. Pellet 30 µl nükleaz içermeyen su ile çözdürüldü ve örnekler kullanılabilecek kadar -80 °C'de muhafaza edildi (Green ve Sambrook., 2025).

3.5. RNA Dizileme

mRNA dizileme işlemi Gen Era Diagnostik şirketi tarafından gerçekleştirilmiştir. İzole edilmiş RNA materyaline ait kalite kontrol işlemlerinde florometrik ve kapiler elektroforez yöntemleri kullanılarak, miktar, saflık ve yapısal bütünlük tayini yapılmıştır. Ölçümlerde Qubit 3 florometresi (Thermo Fisher, ABD, #Q33216) ve 2100 Bioanalyzer (Agilent, ABD, #G2939BA) veya alternatif olarak 4200 TapeStation (Agilent, ABD, #G2991BA) kullanılmıştır. İzole edilmiş RNA materyalinin kütüphane hazırlığında, Illumina Stranded mRNA Prep kiti (Illumina, ABD, #20040534) kullanılmıştır. Kit, tüm RNA içindeki hedeflenen mRNA'ların poly-A kuyruklarından yakalanması, rastgele parçalanması ve ardından birincil ve ikincil cDNA zincirlerinin oluşturulması esasına dayanır. Kütüphane hazırlık sürecinde sırasıyla, yakalama, parçalama, mRNA pürifikasyonu, cDNA sentezi, index-barkod dizilerinin eklenmesi ve pürifikasyon işlemleri üretici firmanın kit yönergeleri takip edilerek gerçekleştirilmektedir.



Şekil 3. 2. Kütüphane hazırlığı iş akışı

Dizileme çalışmasında Illumina NovaSeq 6000 yeni nesil dizileme platformu kullanılmıştır. Bu basamakta örnek başı ortalama 30 milyon adet 150 bp uzunlukta çift yönlü (paired-end) okuma elde edilmesi planlanmıştır. Kütüphane ölçümü, seyreltme ve yükleme işlemleri, üretici firmanın ilgili yönergeleri takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Biyoinformatik Analiz

Dizileme işlemi sonrasında, elde edilen okuma verilerinin kalite kontrolü amacıyla FASTQC aracı kullanılmıştır. Kalite kontrol sonuçlarına göre her bir örneğin, veri miktarları, okuma kaliteleri, GC dağılımları, kmer dağılımları, olası adaptör kontaminasyonları incelenmiştir. Dizileme sürecinde, ham okuma verilerindeki düşük kalitedeki baz okumaları ve olası adaptör-indeks

kontaminasyonlarının sonraki analiz basamaklarında sapmalara neden olmaması için, okumalardan kırılmıştır. Kalite değerlerine göre kırma işlemleri için Trimmomatic (v0.39) aracı kullanılmıştır (Bolger ve ark., 2014).

Kırma sonrasında eldeki diziler, Illumina DRAGEN Bio-IT platformu ve RNA Pipeline iş akışı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu analiz sürecinde, okumalar, seçilen genom kırılma bölgeleri dikkate alınarak (splice-aware) hizalama gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamada referans genom olarak ilgili organizmanın güncel referans genomu (*Arabidopsis thaliana TAIR*) kullanılmıştır. Hizalama sonrası anotasyonunda gen, ekzon ve transkript bilgileri için ilgili veriseti kullanılmıştır. Bu işlem sonrasında her bir transkript üzerindeki okuma sayıları hesaplanmış ve ardından ilgili transkriptin uzunluğuna göre normalize edilerek RPK (Reads per Kilobase) değerleri elde edilmiştir. Bu değerler ardından toplam okuma sayısına göre tekrar normalize edilerek TPM (Transcripts Per Million) değerleri çıkarılmıştır. Normalizasyon sonrasında, gruplar arası anlatımı değişen genleri (Differentially Expressed Genes) belirlemek için edgeR R paketi Quasi-Likelihood modeli kullanılmıştır. Gen ontoloji analizinde TopGO paketi ve Kolmogorov-Smirnov (KS) istatistiksel testi kullanılmıştır. Yolak analizlerinde clusterProfiler paketi kullanılmıştır (Yu ve ark., 2012). Grup içi ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırma çalışmalarının düzenlenmesi, veri görselleştirme uygulamaları ve rapor oluşturulmasında R betikleri kullanılmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

Arabidopsis thaliana bitkilerine ait B5, 5 μ M 2,4-D, 2,5 μ M BIX-01294 ve 0,1 μ M BIX-01294 gruplarının somatik embriyolar oluşturan eksplantların yüzdesi ve bir eksplant üzerinde oluşan somatik embriyoların sayısı Graphpad PRISM 8 programında tek yönlü ANOVA testi kullanılarak değerlendirildi.

4. SONUÇLAR

4.1. Bitkilerin Gelişimi

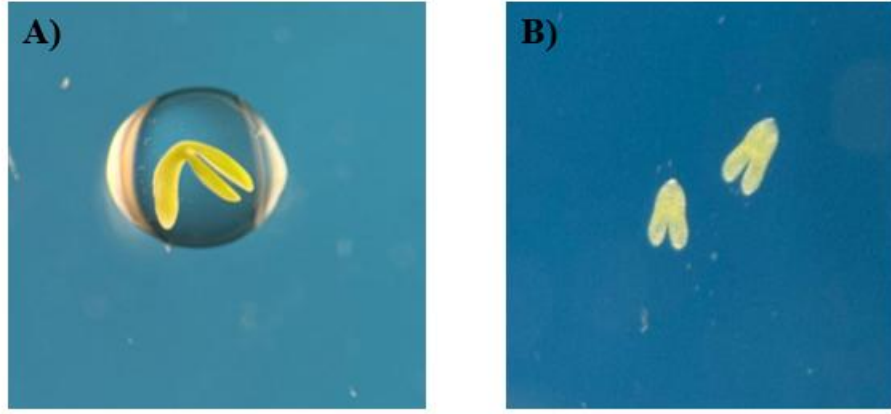
Yaklaşık yedi haftalık büyüme sonrasında *Arabidopsis thaliana* bitkisinin gelişimi büyüme aşaması 8. evrededir (Boyces ve ark., 2001) (Şekil 4.1). Ekimi yapılan 250 bitkide çimlenme oranı %100 olarak hesaplanmıştır. Bir silikte ortalama 20 olgunlaşmamış zigotik embriyo bulunmaktadır (Şekil 4. 2). 7 haftalık bir bitkide silik içerisindeki olgunlaşmamış zigotik embriyolar genelde bükülmüş kotiledon evresindedir. Tam olgunlaşmamış siliklerde ise torpedo evresine ait olgunlaşmamış zigotik embriyolar ile karşılaşılırsa da bu dokular çalışmada kullanılmamıştır (Şekil 4. 3).



Şekil 4. 1. Yedi haftalık *Arabidopsis thaliana* Col-0 bitkisi ve silik yapıları



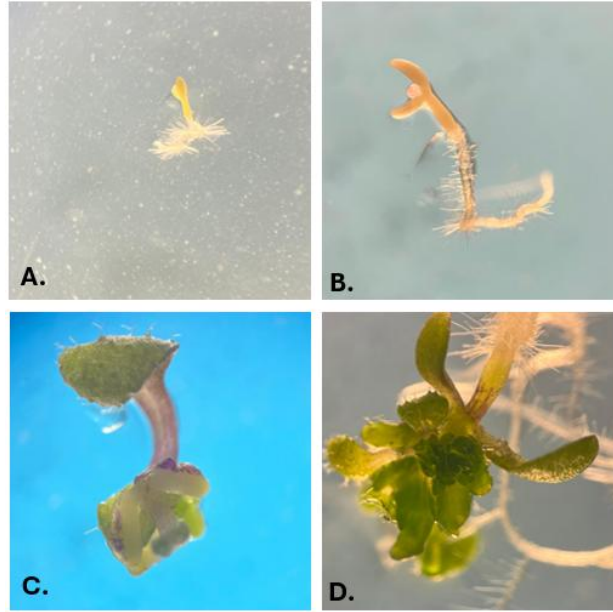
Şekil 4. 2. 7 haftalık silik yapısının kapalı ve açık hali (Beyaz ok: olgunlaşmamış zigotik embriyolar)



Şekil 4. 3. 7 haftalık siliklerin içerisinde bulunan bükülmüş kotiledon ve torpedo evresindeki olgunlaşmamış zigotik embriyo görüntüleri (Soldan sağa: A) Bükülmüş kotiledon, B) Torpedo)

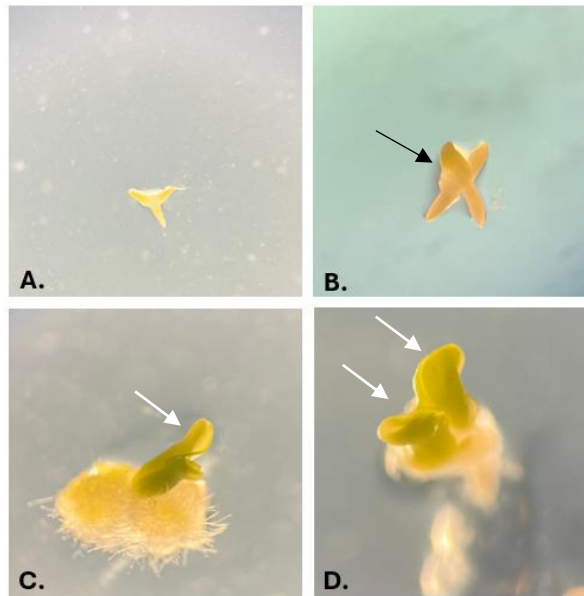
4.2. Somatik Embriyogenez: Doku Kültürünün Kurulması ve Somatik Embriyoların Gelişimi

Bükülmüş kotiledon evresindeki olgunlaşmamış zigotik embriyoları içeren yedi haftalık silikler toplandıktan sonra yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilip içerisinde Gamborg B5 tuzu bulunan besiyerlerine bükülmüş kotiledon evresindeki olgunlaşmamış zigotik embriyoların ekimi gerçekleştirilmiştir. IZE'lerin gelişimi 21 gün boyunca takip edilmiş ve belirli aralıklarda (5, 10, 15 ve 21. günler) stereo mikroskopunda gelişimler fotoğraflandırılmıştır.



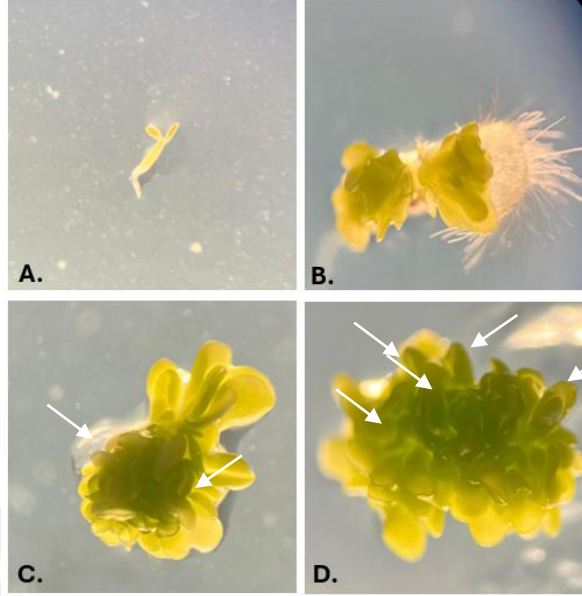
Şekil 4. 4. B5 besiyerinde *Arabidopsis thaliana* IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün)

Şekil 4.4'te görüldüğü üzere içerisinde herhangi bir inhibitör ve oksin bulundurmeyen B5 besiyerinde gelişimlerini tamamlayan eksplantlarda hiçbir somatik embriyoya dönüşümün gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. Tüm IZE'lerde 21 gün boyunca bitkicik gelişimi gözlemlenmiştir.



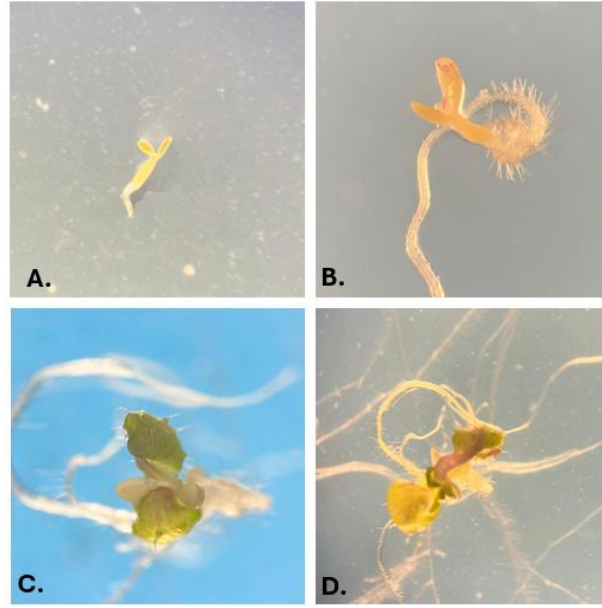
Şekil 4. 5. 5 µM 2,4-D içeren besiyerinde *Arabidopsis thaliana* IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün) (Beyaz ok: Somatik embriyo yapısı) (Siyah ok: Protüberans yapısı).

Şekil 4. 5'te görüldüğü üzere içerisinde 5 μ M 2,4-D oksin içeren besiyerinde gelişen IZE'lerin 21 gün sonunda 48 embriyo eksplantının yalnızca 15'inin somatik embriyoya dönüştüğü gözlemlenmiştir.

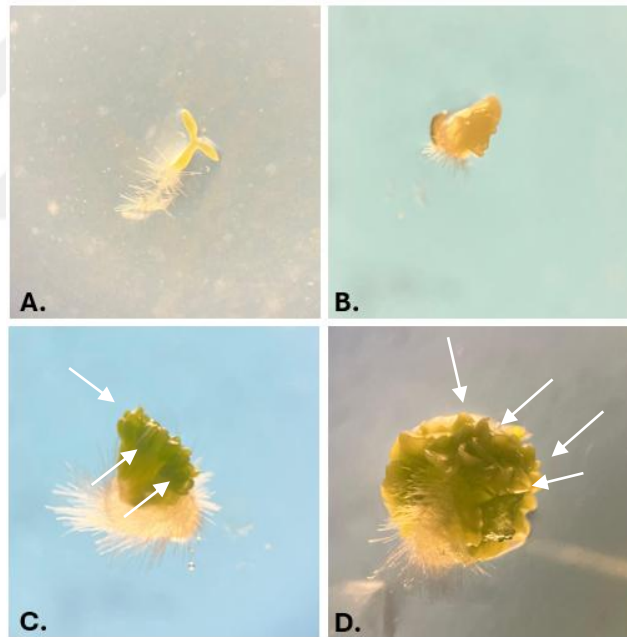


Şekil 4. 6. 2,5 μ M BIX-01294 içeren besiyerinde *Arabidopsis thaliana* IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün)

Şekil 4. 6'da görüldüğü üzere içerisinde 2,5 μ M BIX-01294 içeren besiyerinde gelişen IZE'lerin 21 gün sonunda 48 embriyo eksplantının yalnızca 17'sinin somatik embriyoya dönüştüğü gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 7. 1 μ M BIX-01294 içeren besiyerinde *Arabidopsis thaliana* IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün).

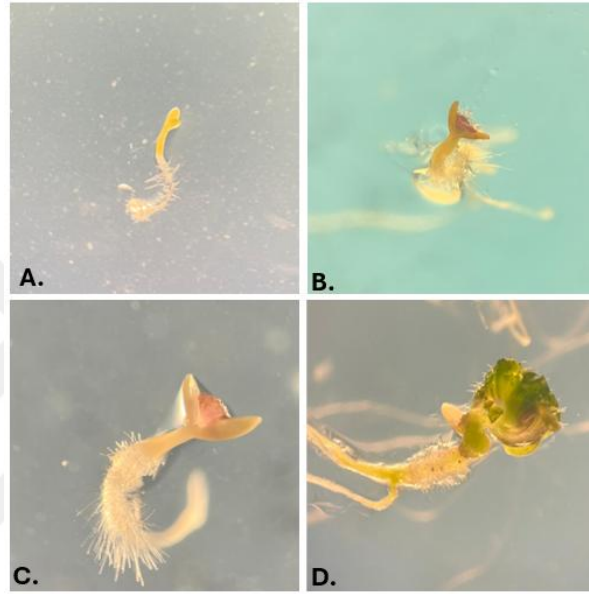


Şekil 4. 8. 0,1 μ M BIX-01294 içeren besiyerinde *Arabidopsis thaliana* IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün) (Beyaz ok: Somatik embriyo yapısı).

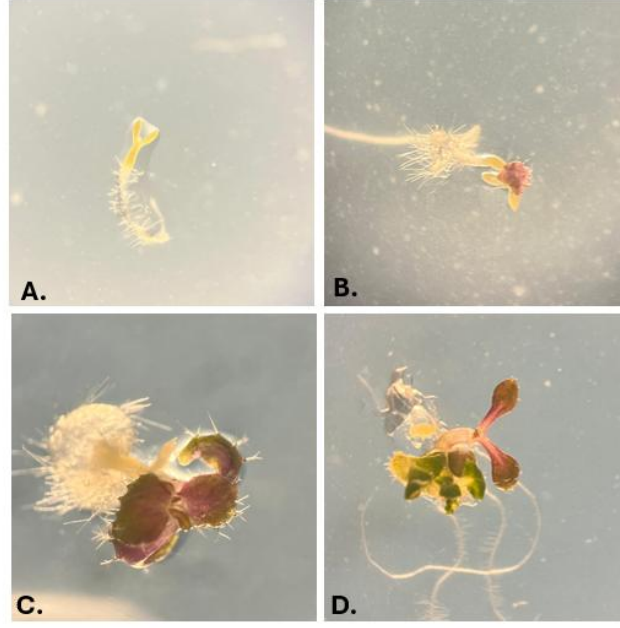
Oksin içermeyen E0 ortamında kültüre edilen IZE'ler direkt bitkicik olarak gelişim gösterirken, ortama BIX-01294 (2,5–0,1 μ M) inhibitörü eklenmesi embriyo benzeri yapıların oluşumuyla sonuçlanmıştır. 2,5-0,1 μ M BIX-01294 içeren besiyerinde gelişen IZE'lerin sırasıyla %35,41- 20,83'ünün SE indüksiyonuna uğradığı

belirlenmiştir. EA ve EB ortamında ilk protüberans (SE çıkışı) 10. Gün itibari ile gözlemlenmiştir.

0,1 μ M BIX-01294 içeren besiyerindeki IZE'ler 10. günden itibaren ilk çıkıntılarını verdiği belirlenmiştir. 2,5 μ M BIX-01294 ve 0,1 μ M BIX-01294 içeren besiyerlerindeki bir eksplantın sahip olduğu SE kapasitesinin oksin içeren besiyerindeki bir eksplantın sahip olduğu SE kapasitesine kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4. 8).



Şekil 4. 9. 0,5 μ M BIX-01294 içeren besiyerinde *Arabidopsis thaliana* IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün).



Şekil 4. 10. 0,05 µM BIX-01294 içeren besiyerinde *Arabidopsis thaliana* IZE'lerinin 21 günlük gelişimi (A: 5.gün, B: 10.gün, C:15.gün, D: 21.gün).

Şekil 4. 9, 4. 10 ve 4. 7'de e görüldüğü üzere 0,05-0,5 ve 1 µM BIX-01294 içeren besiyerlerinde gelişen IZE'lerin B5 ortamında gelişen bitkiciklerle benzer yapıya sahip olduğu gözlemlenmiş ve bu üç besiyerinde de herhangi bir SE gelişimi gerçekleşmediği gözlemlenmiştir.

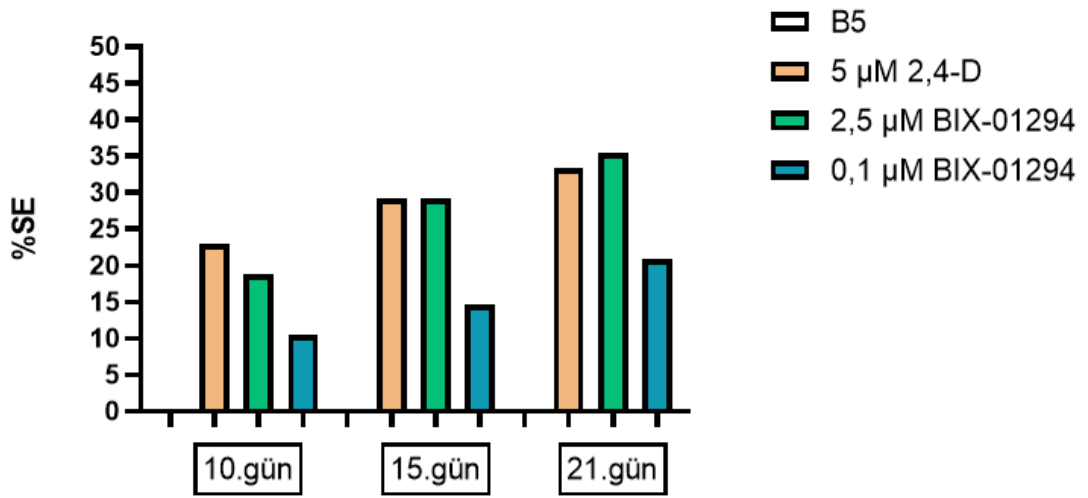
4.3. Somatik embriyogenez etkinliği ve somatik embriyogenez üretkenliğinin belirlenmesi

SE için eksplant kapasitesi 21 günlük bir kültürde değerlendirilmiştir ve SE etkinliği, somatik embriyolar oluşturan eksplantların yüzdesi ve SE üretkenliği, embriyogenik eksplant tarafından üretilen somatik embriyoların ortalama sayısı olmak üzere iki parametrede değerlendirilmiştir (Nowak ve ark., 2024).

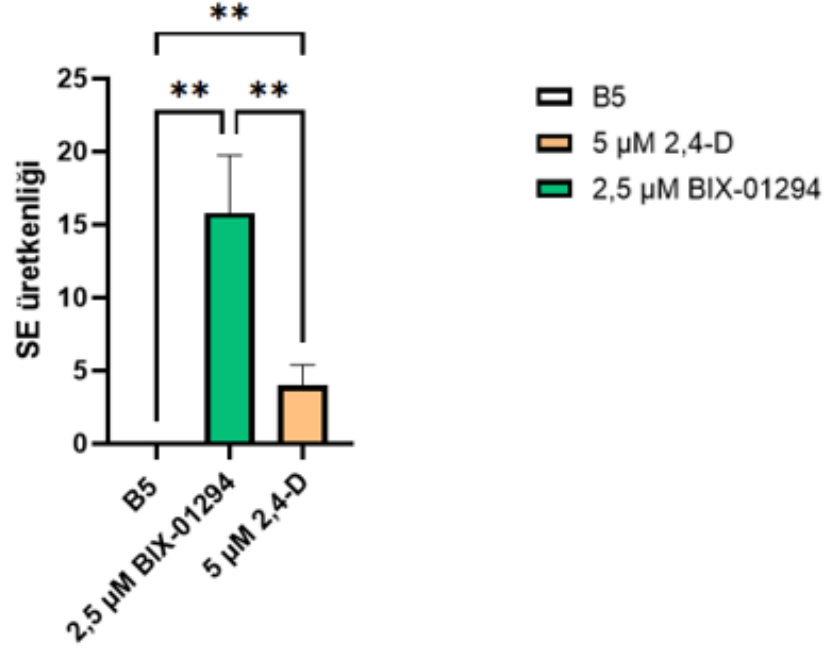
21 günlük kültür tamamlandıktan sonra B5 besiyerinde herhangi bir SE oluşumu gözlemlenmemiştir (Tablo 4. 1). 5 µM 2,4-D ve 2,5 µM BIX-01294 içeren besiyerindeki SE yüzdeleri 15.günde eşitlenmiştir (Şekil 4. 11). 0,1 µM içeren besiyerinde ise bu oran yarıya düşmüştür. 21 gün sonunda ise en çok SE dönüşümüne sahip IZE yüzdesi %35,41 ile 2,5 µM BIX-01294 içeren besiyerinde saptanmıştır. Bir eksplant üzerinde oluşan somatik embriyo oranı ise 5 µM 2,4-D'ye kıyasla 2,5 µM BIX-01294'te 3,95 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 4. 12).

Tablo 4. 1. Somatik embriyolar oluşturan eksplantların 21 günlük kültürde SE oluşturma sayısı ve %SE

rnek Adı	10.gün	15.gün	21.gün	% SE
B5	0	0	0	0
5 μ M 2,4-D	11	14	15	%31,25
2,5 μ M BIX-01294	9	14	17	%35,41
0,1 μ M BIX-01294	5	7	10	%20,83



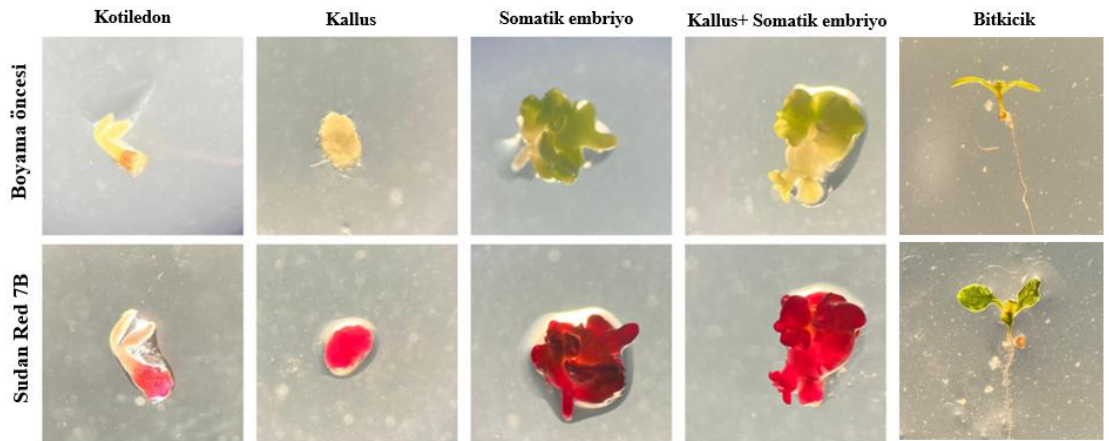
şekil 4. 11. Somatik embriyolar oluşturan eksplantların yüzdesi (Beyaz: B5, Turuncu: 5 μ M 2,4-D, Yeşil: 2,5 μ M BIX-01294, Mavi: 0,1 μ M BIX-01294).



Şekil 4. 12. 21 günlük kültür sonunda bir olgunlaşmamış zigotik embriyo üzerinde oluşan SE sayısı (Beyaz: B5, Turuncu: 5 µM 2,4-D, Yeşil: 2,5 µM BIX-01294, Mavi: 0,1 µM BIX-01294).

4.4. Sudan Red 7B ile Embriyojenik Dokuların Boyanması

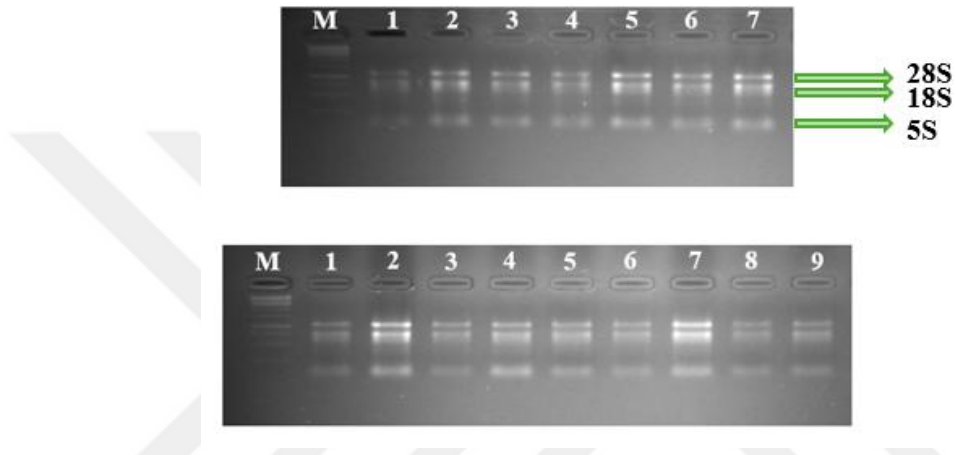
Farklı dönemlerdeki (kotiledon, bitkicik, kallus, somatik embriyo, kallustan kökenlenmiş somatik embriyolar) eksplantlarda, embriyolara özgü olan triasilgliserol içeren dokuların varlığı Sudan Red 7B ile boyayarak doğrulanmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4. 13. Farklı dönemlerdeki (kotiledon, bitkicik, kallus, somatik embriyo, kallustan kökenlenmiş somatik embriyolar) yapıların Sudan Red 7B ile boyanması (Üst satır: Boyama Öncesi, Alt satır: Boyama Sonrası).

4.5. RNA'ların Kalitatif ve Kantitatif Değerlendirilmesi

Sekanslama için seçilen gruplar; B5 (Kontrol grubu), 5 μ M 2,4-D içeren grup, BIX-01294 inhibitörü içeren gruplar (2,5-1-0,1 μ M) ve 5 μ M 2,4-D içeren besiyerinde SE dönüşmüş eksplantların RNA örnekleri ve aynı şekilde 2,5 μ M BIX-01294 içeren besiyerinde SE dönüşmüş eksplantların RNA örneklerini içermektedir. 0,05-0,5 ve 1 μ M BIX-01294 bitki grupları, RNA saflıklarının belirtilen düzeyde elde edilememesi nedeniyle transkriptom deney dizaynından çıkarılmıştır.



Şekil 4. 14. 5. ve 10. günde izolasyonu yapılan RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü. Markır (Thermo 100 bç 1) B5 Kontrol; 2) 0,05 μ M BIX-01294; 3) 0,5 μ M BIX-01294; 4) 0,1 μ M BIX-01294; 5) 1 μ M BIX-01294; 6) 2,5 μ M BIX-01294; 7) 5 μ M 2,4-D; 8) 2,5 μ M BIX-01294 SE*; 9) 5 μ M 2,4-D SE*)

5. ve 10. gün örneklerinde 28S ve 18S bantlarının belirgin şekilde gözlenmesi, RNA bütünlüğünün iyi olduğunu göstermektedir (Şekil 4. 14).

Tablo 4. 2. İzolasyonu yapılan 5.gün zigotik embriyo RNA örneklerinin saflaştırma öncesi ve sonrası konsantrasyon/saflık değerleri

Örnek Adı		Konsantrasyon (ng/ μ l)	A260/280	A260/230
B5 (5A1)	Öncesi	67.120	2.1	0,49
	Sonrası	37.760	2.1	2.4
B5 (5A2)	Öncesi	34.280	2.1	0.35
	Sonrası	26.680	2.0	2.0
B5 (5A3)	Öncesi	27.560	2.1	0.24
	Sonrası	19.920	2.2	2.1

Tablo 4. 3. İzolasyonu yapılan 5.gün zigotik embriyo RNA örneklerinin saflaştırma öncesi ve sonrası konsantrasyon/saflık değerleri (devamı).

2,5 µM BIX (5C1)	Öncesi	60.440	2.1	0.48
	Sonrası	47.160	2.2	2.2
2,5 µM BIX (5C2)	Öncesi	52.440	2.1	0.57
	Sonrası	37.440	2.1	2.2
2,5 µM BIX (5C3)	Öncesi	35.360	2.1	0.6
	Sonrası	39.200	2.1	2.3
5 µM 2,4-D (5E1)	Öncesi	33.080	2.1	0.15
	Sonrası	23.560	2.2	1.8
5 µM 2,4-D (5E2)	Öncesi	48.280	2.2	0.47
	Sonrası	20.240	2.0	2.2
5 µM 2,4-D (5E3)	Öncesi	23.560	2.2	1.82
	Sonrası	26.880	2.1	2.0

Tablo 4. 4. İzolasyonu yapılan 10.gün zigotik embriyo RNA örneklerinin saflaştırma öncesi ve sonrası konsantrasyon/saflık değerleri

Örnek Adı		Konsantrasyon (ng/µl)	A260/280	A260/230
B5 (10A1)	Öncesi	109.48	2.2	1.4
	Sonrası	104.40	2.2	2.2
B5 (10A2)	Öncesi	45.560	2.3	0.88
	Sonrası	39.880	2.1	2.1
B5 (10A3)	Öncesi	62.450	2.2	0.63
	Sonrası	49.080	2.2	2.2
2,5 µM BIX SE*(10F1)	Öncesi	57.560	2.1	0.8
	Sonrası	17.000	2.0	1.7

Tablo 4. 5. İzolasyonu yapılan 10.gün zigotik embriyo RNA örneklerinin saflaştırma

2,5 µM BIX SE* (10F2)	Öncesi	48.400	2.2	0.6
	Sonrası	20.600	2.0	1.65
2,5 µM BIX SE* (10F3)	Öncesi	81.960	2.2	0.6
	Sonrası	82..280	2.2	2.3
5 µM 2,4-D SE* (10G1)	Öncesi	145.96	2.1	0.4
	Sonrası	89.040	2.1	2.1
5 µM 2,4-D SE* (10G2)	Öncesi	97.360	2.1	0.4
	Sonrası	52.400	2.2	2.0
5 µM 2,4-D SE* (10G3)	Öncesi	238.88	2.2	1.12
	Sonrası	244.88	2.2	2.4

4.6. RNA Sekanslama

Çalışma kapsamında 5. ve 10. Günlere ait 6 deney grubu RNA örnekleri 3 tekrarlı olacak şekilde toplamda 18 adet örnek için analiz gerçekleştirilmiştir ve aşağıda belirtilen deney grupları kullanılmıştır:

1. 5.gün B5 grubu (Kontrol grubu) (A)
2. 5.gün 2,5 µM BIX-01294 inhibitörü içeren grup (C)
3. 5.gün 5 µM 2,4-D içeren grup (E)
4. 10.gün B5 grubu (Kontrol grubu) (A)
5. 10.gün 2,5 µM BIX-01294 inhibitörü içeren grup (F)
6. 10.gün 5 µM 2,4-D içeren grup (G)

Seçilen gruplardaki RNA örneklerinin Qubit 3 florometresi (Thermo Fisher, ABD, #Q33216) sonrası A260/230, A260/280 değerleri ve 2100 Bioanalyzer (Agilent, ABD, #G2939BA) ölçümü sonrası RNA bütünlüğü hakkında bilgi veren RIN (RNA Integrity Number) değerleri Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4. 6. Dizileme için seçilen 5. gün RNA'ların Qubit 3 florometresi ölçümü sonrası saflık değerleri ve Agilent 2100 Bioanalyzer ölçümü sonrası elde edilen RNA bütünlüğü (RIN) değerleri

Örnek Adı	A260/280	A260/230	RIN
5.gün B5			
5A1	2,08	2,03	8,9
5A2	1,97	1,99	7,6
5A3	2,07	1,75	8,7
5.gün 2,5 µM BIX-01294			
5C1	2,14	2,43	7,8
5C3	2,07	2,05	8,9
5C5	2,05	1,82	7,2
5.gün 5 µM 2,4-D			
5E2	2,12	1,96	8,8
5E3	1,97	1,8	8,7
5E4	2,39	2,31	7,3

Tablo 4. 7. Dizileme için seçilen 10. gün RNA'ların Qubit 3 florometresi ölçümü sonrası saflık değerleri ve Agilent 2100 Bioanalyzer ölçümü sonrası elde edilen RNA bütünlüğü (RIN) değerleri

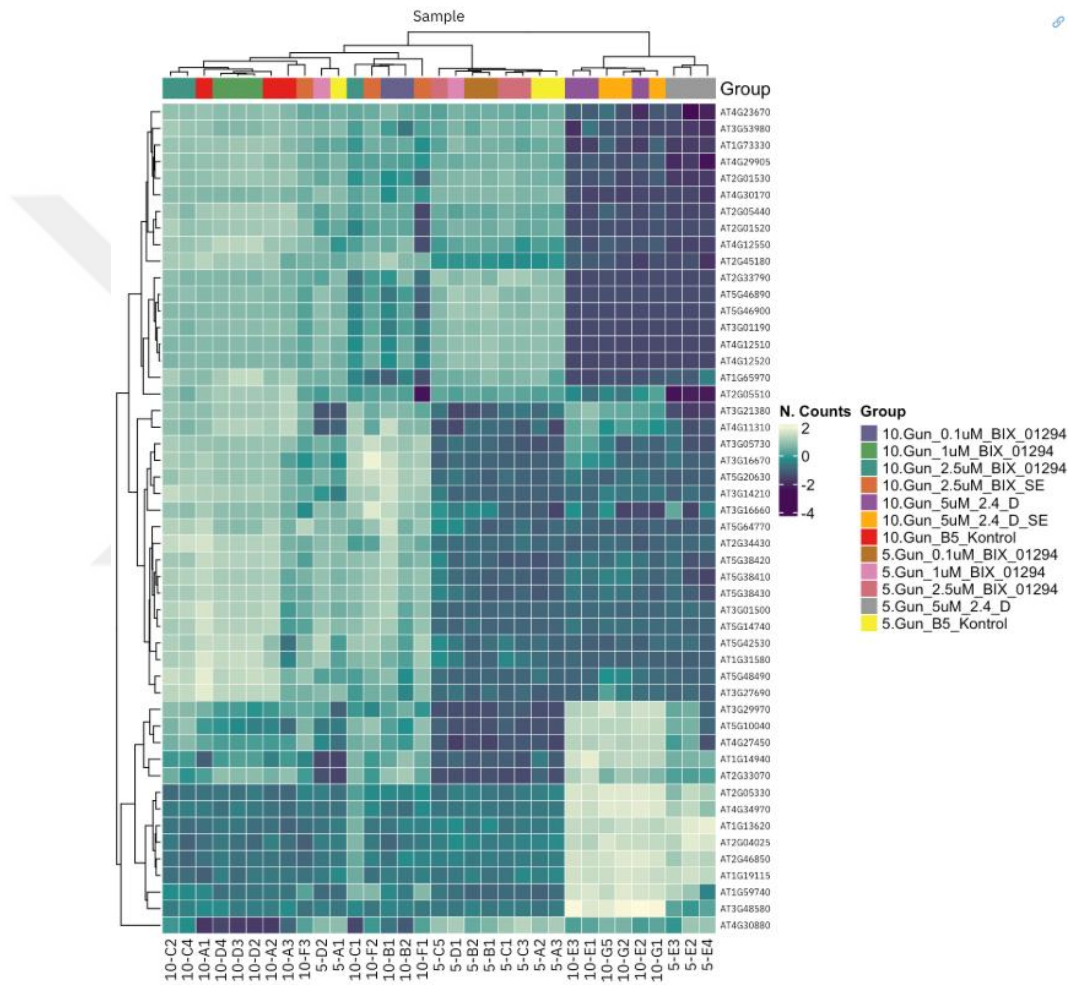
Örnek Adı	A260/280	A260/230	RIN
10.gün B5 grubu			
10A1	2,14	1,96	8,8
10A2	1,98	2,19	9
10A3	2,11	2,08	8,9
10.gün 2,5 µM BIX-01294			
10F1	2,09	1,59	9,3
10F2	2,05	1,54	8,9
10F3	2,06	2,16	8,6
10.gün 5 µM 2,4-D			
10G1	2	2,02	10
10G2	2,09	1,88	9,6
10G5	2,01	2,46	8,6

Çalışma kapsamında 12 farklı grup içinde 33 farklı numunenin RNA dizilemesi gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki Tablo 4.6 içinde ilgili örneklerin adları, deney grupları, dizileme sonucunda elde edilen okuma sayıları ve bu okumaların ne kadarının genomu hizalandığı yer almaktadır. “Toplam” sütunu numuneden elde edilen toplam okuma sayısını; “Hizalanan” sütunu genomu hizalanan okumaların sayısını; “Hizalama Oranı” sütunu genomu hizalanan okumaların oranını; “Hizalanmayan” genomu hizalanamayan okumaların sayısını; “Q30 Kalite Oranı” ise Q30 ve daha üstünde Phred kalite skoru alan okumaların oranını belirtmektedir. Okuma sayıları hizalama oranları %97.97 ile 99.81 arasında değişmektedir. Q30 kalite oranı ise %91.54 ve 95.66 oranlar arasındadır. Hizalanmayan dizi sayıları oldukça azdır.

Tablo 4. 8. Çalışılan örneklere ait grup bilgileri, okuma sayıları ve hizalama değerleri

Örnek Adı	Toplam	Hizalanan	Hizalanmayan	Q30 Kalite Oranı	Hizalama Oranı
5.gün B5					
5A1	73.138.964	72.652.854	486.110	94.54%	99.34%
5A2	65.911.998	65.353.104	558.894	94.64%	99.15%
5A3	81.934.720	80.465.552	1.469.168	94.25%	98.21%
5.gün 2,5 µM BIX-01294					
5C1	155.074.290	154.698.065	376.225	94.34%	99.76%
5C3	164.182.968	163.629.990	552.978	93.78%	99.66%
5C5	69.480.762	69.093.084	387.678	94.64%	99.44%
5.gün 5 µM 2,4-D					
5E2	62.601.584	55.982.503	6.619.081	91.54%	89.43%
5E3	88.841.264	88.058.410	782.854	93.33%	99.12%
5E4	65.063.296	64.809.454	253.842	94.44%	99.61%
10.gün B5					
10A1	79.910.594	79.187.041	723.553	94.36%	99.09%
10A2	101.652.560	101.372.449	280.111	94.64%	99.72%
10A3	120.376.462	120.148.152	228.310	94.28%	99.81%
10.gün 2,5 µM BIX-01294					
10F1	61.163.430	59.923.071	1.240.359	94.15%	97.97%
10F2	86.106.288	85.092.846	1.013.442	94.24%	98.82%
10F3	204.085.948	201.409.476	2.676.472	93.69%	98.69%
10.gün 5 µM 2,4-D					
10G1	205.735.728	204.753.676	982.052	94.42%	99.52%
10G2	269.028.702	268.457.886	570.816	93.33%	99.79%
10G5	98.255.370	97.908.937	346.433	95.66%	99.65%

Aşağıda yer alan Şekil 4.15'teki ısı grafiği (heatmap), örnekler arasında en fazla varyasyon gösteren ilk 50 genin anlatım profillerini göstermektedir. Isı grafiğinde yer alan örnek ve genler, profil benzerliklerine göre de her iki ekseninde kümelenebilir ve benzerlikler dendrogramlar ile görselleştirilmiştir. Isı grafiğinde, sadece protein kodlayan genler dahil edilmiştir. Isı grafiği analizinde örnekler arasında varyasyon gösteren ilk 50 gen Tablo 4.7'de verildiği gibidir.



Şekil 4. 15. Örnekler arasında en fazla varyasyon gösteren ilk 50 genin anlatım profili

Tablo 4. 9. Örnekler arasında en fazla varyasyon gösteren ilk 50 gen profili

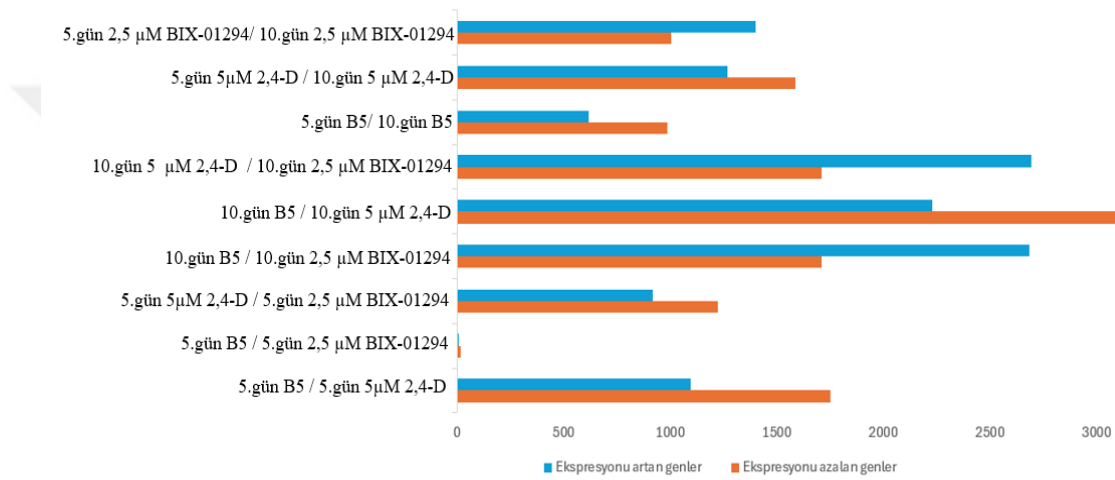
GEN ID	Gen ismi
AT3G48580	<i>Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 11, XTH11</i>
AT1G59740	<i>Major facilitator superfamily protein</i>
AT1G13620	<i>root meristem growth factor-like protein, RGF2</i>
AT2G04025	<i>root meristem growth factor, RGF3</i>
AT2G46850	<i>Protein kinase superfamily protein</i>
AT1G19115	<i>uncharacterized protein</i>
AT2G05330	<i>BTB/POZ domain-containing protein</i>
AT4G34970	<i>actin depolymerizing factor 9, ADF9</i>
AT1G14940	<i>Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein</i>
AT2G33070	<i>nitrile specifier protein 2, NSP2</i>
AT3G29970	<i>B12D protein</i>
AT4G27450	<i>aluminum induced protein with YGL and LRDR motifs</i>
AT5G10040	<i>uncharacterized protein)</i>
AT4G30880	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT5G64770	<i>root meristem growth factor, RGF9</i>
AT2G34430	<i>light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1, LHB1B1</i>
AT5G38420	<i>Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein, RBCS2B</i>
AT5G38410	<i>Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein, RBCS3B</i>
AT5G38430	<i>(Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein, RBCS1B)</i>
AT3G01500	<i>carbonic anhydrase 1, CA1</i>
AT5G14740	<i>carbonic anhydrase 2, CA2</i>
AT1G31580	<i>ECS1</i>
AT5G42530	<i>uncharacterized protein</i>
AT5G48490	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT3G27690	<i>photosystem II light harvesting complex protein 2.3, LHCB2.3</i>

Tablo 4. 10. Örnekler arasında en fazla varyasyon gösteren ilk 50 gen profili (devamı).

AT3G16670	<i>Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein</i>
AT3G05730	<i>defensin-like protein</i>
AT3G14210	<i>GDSL-like lipase/acylhydrolase superfamily protein, ESM1</i>
AT5G20630	<i>germin 3, GER</i>
AT3G16660	<i>Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein</i>
AT3G21380	<i>Mannose-binding lectin superfamily protein</i>
AT4G11310	<i>Papain family cysteine protease</i>
AT2G05510	<i>Glycine-rich protein family</i>
AT5G46890	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT5G46900	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT4G12510	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT4G12520	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT3G01190	<i>Peroxidase superfamily protein</i>
AT2G33790	<i>arabinogalactan protein 30</i>
AT1G65970	<i>thioredoxin-dependent peroxidase 2, TPX2</i>
AT4G23670	<i>Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein</i>
AT4G30170	<i>Peroxidase family protein</i>
AT1G73330	<i>drought-repressed 4, DR4</i>
AT4G29905	<i>uncharacterized protein</i>
AT2G01530	<i>MLP-like protein 329</i>
AT3G53980	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT4G12550	<i>Auxin-Induced in Root cultures 1, AIR1</i>
AT2G01520	<i>MLP-like protein 328, MLP328</i>
AT2G05540	<i>Glycine-rich protein family</i>
AT2G45180	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>

4.6.1. Diferansiyel Anlatım Analizi

Diferansiyel anlatım analizi (DEG), normalize edilmiş okuma sayıları üzerinden, deney grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı anlatım değişikliklerini tespit etmek için kullanılır. Diğer bir deyişle, belirli bir gen için okuma sayılarında gözlenen bir farkın sadece rastgele varyasyon ile meydana gelme beklentisinden daha büyük olup olmadığına karar vermek için Diferansiyel Anlatım Analizi kullanılır. Şekil 4.16'da DEG analizi sonrasında her bir karşılaştırma grubunun detayları ve anlamlı derecede (FDR < 0,05) farklılık gösteren genlerin sayıları yer almaktadır.



Şekil 4. 16. Gerçekleştirilen karşılaştırma grupları ve anlamlı derece farklılık gösteren genlerin sayıları (FDR < 0.05).

5 µM 2,4-D ve 2,5 µM BIX-01294 inhibitörü uygulanan *Arabidopsis thaliana* IZE'lerinde 5.gün ve 10.günlerde farklı şekilde ifade edilen genlerin analizleri artan/azalan olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4. 16).

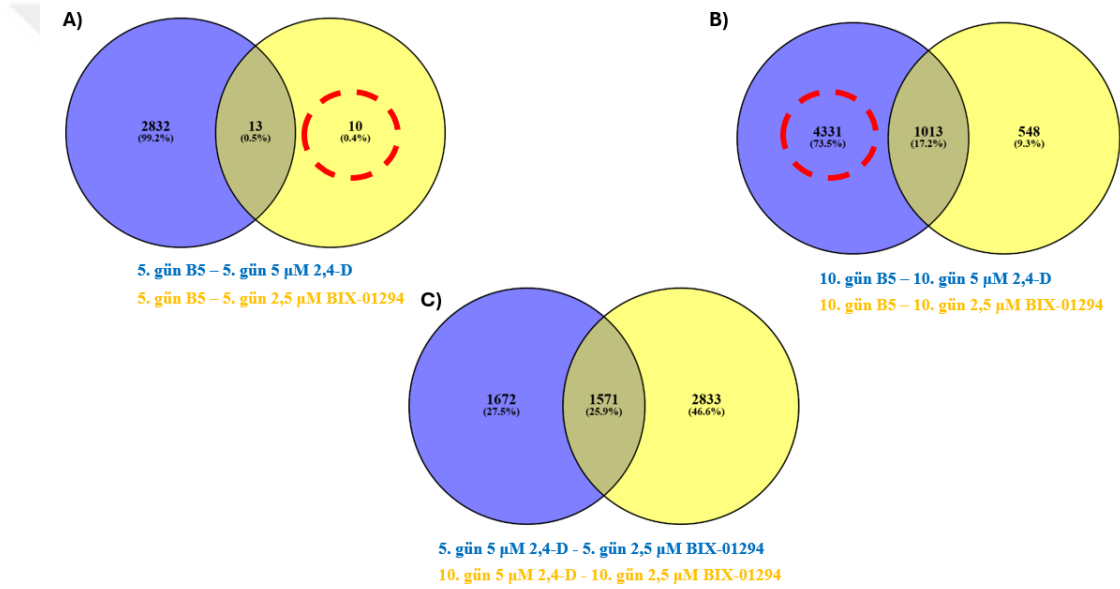
5. gün B5 kontrol grubuna kıyasla oksin içeren ortamda 1093 gende anlamlı artış, 1751 gende anlamlı azalış saptanmıştır. 5. gün B5 kontrol grubuna kıyasla BIX-01294 inhibitörü içeren ortamda 7 gende artış, 115 gende azalış saptanmıştır. 5.gün oksin içeren ortama kıyasla BIX-01294 içeren ortamda 2022 gende anlamlı artış ve 1220 gende anlamlı azalış saptanmıştır.

10. günde ise B5 kontrol grubuna kıyasla oksin içeren ortamda 2229 gende anlamlı artış, 3114 gende anlamlı azalış bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla (B5) 5. ve 10. günlerde oksin içeren ortamlarda 2106 ortak gen saptanmıştır.

10.günde ise B5 kontrol grubuna kıyasla BIX-01294 inhibitörü içeren ortamda 914 gende anlamlı artış, 646 gende anlamlı azalış bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla (B5) 5. ve 10.günlerde BIX-01294 inhibitörü içeren ortamlarda 7 ortak gen saptanmıştır.

10. gün oksin içeren ortama kıyasla BIX-01294 içeren ortamda 2693 gende anlamlı artış ve 1710 gende anlamlı azalış tespit edilmiştir.

Oksin içeren ortama kıyasla BIX-01294 içeren ortamda 5.gün ve 10.gün karşılaştırmasında 465 ortak gen tespit edilmiştir.



Şekil 4. 17. 5. ve 10. günlere ait belirtilen karşılaştırmalara ait venn şemaları A) 5.gün B5- 5.gün 2,5 µM BIX-01294 ve 5.gün B5- 5.gün 5 µM 2,4-D uygulamalarındaki DEG'ler için Venn diagramı B) 10.gün B5- 10.gün 2,5 µM BIX-01294 ve 10.gün B5- 10.gün 5 µM 2,4-D uygulamalarındaki DEG'ler için Venn diagramı C) 10.gün B5- 10.gün 2,5 µM BIX-01294, 10.gün B5- 10.gün 5 µM 2,4-D ve 10.gün 5 µM 2,4-D- 10.gün 2,5 µM BIX-01294 uygulamalarındaki DEG'ler için Venn diagramı

(MLP-like protein 329) 1000 kat, AT2G45220 (*Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily*) 166,66 kat, AT3G09220 (*laccase 7*) 270,27 kat, AT5G66390 (*Peroxidase superfamily protein*) 119,04 kat, AT1G73330 (*drought-repressed 4*) 909,09 kat, AT1G45145 (*thioredoxin H-type 5*) 27,77 kat, AT1G18980 (*RmlC-like cupins superfamily protein*) 149,25 kat, AT3G29250 (*NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein*) 144,92 kat, AT4G37410 (*cytochrome P450, family 81, subfamily F, polypeptide 4*) 384,61 kat azalış saptanmıştır.

Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 5. gün 2,5 µM BIX-01294 için yapılan analize göre istatistiksel olarak en anlamlı değişiklik gösteren 15 gen ve kat değişimleri şu şekildedir; AT2G05510 (*Glycine-rich protein family*) 1265 kat, AT2G33790 (*arabinogalactan protein 30*) 856,93 kat, AT3G25930 (*Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein*) 420,45 kat, AT1G05260 (*Peroxidase superfamily protein*) 552,33 kat, AT4G21830 (*methionine sulfoxide reductase B7*) 178,68 kat, AT5G62340 (*Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein*) 94,65 kat, AT4G30170 (*Peroxidase family protein*) 268,25 kat, AT2G37750 (*uncharacterized protein*) 32,58 kat, AT4G21850 (*methionine sulfoxide reductase B9*) 18,80 kat, AT2G44790 (*uclacyanin 2*) 52,86 kat, AT5G19230 (*Glycoprotein membrane precursor GPI-anchored*) 18,99 kat, AT1G74458 (*uncharacterized protein*) 96,97 kat artış, AT5G07310 (*Integrase-type DNA-binding superfamily protein*) 65,35 kat, AT4G27260 (*Auxin-responsive GH3 family protein*) 13,15 kat azalış saptanmıştır.

Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 için yapılan analize göre istatistiksel olarak en anlamlı değişiklik gösteren 15 gen ve kat değişimleri şu şekildedir; AT1G75640 (*Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein*) 6,69 kat, AT3G07540 (*Actin-binding FH2 (formin homology 2) family protein*) 3,88 kat, AT4G32490 (*early nodulin-like protein 4*) 19,96 kat, AT2G20750 (*expansin B1*) 4,13 kat, AT1G66250 (*O-Glycosyl hydrolases family 17 protein*) 3,98 kat, AT1G25510 (*Eukaryotic aspartyl protease family protein*) 4,91 kat, AT5G48360 (*Actin-binding FH2 (formin homology 2) family protein*) 7,01 kat, AT5G10310 (*EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-like protein*) 4,09 kat, AT1G32583 (*tapetum determinant protein*) 13,50 kat, AT1G80280 (*alpha/beta-Hydrolases superfamily protein*) 3,95 kat, AT1G32860 (*Glycosyl hydrolase superfamily protein*) 3,61 kat,

AT1G54160 (*nuclear factor Y, subunit A5*) 3,84 kat artış, AT3G61890 (*homeobox 12*) 3,57 kat, AT4G22880 (*leucoanthocyanidin dioxygenase*) 19,23 kat, AT5G17220 (*glutathione S-transferase phi 12*) 14,70 kat azalış saptanmıştır.

Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5 μ M 2,4-D için yapılan analize göre istatistiksel olarak en anlamlı değişiklik gösteren 15 gen ve kat değişimleri şu şekildedir; AT1G04610 (*YUCCA 3*) 65,74 kat, AT2G05330 (*BTB/POZ domain-containing protein*) 230,08 kat artış, AT2G21045 (*Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein*) 37,03 kat, AT3G01190 (*Peroxidase superfamily protein*) 714,28 kat, AT5G46890 (*Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein*) 526,31 kat, AT4G12545 (*Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein*) 50,50 kat, AT4G12510 (*Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein*) 833,3 kat, AT4G35060 (*Heavy metal transport/detoxification superfamily protein*) 27,7 kat, AT4G07820 (*CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein*) 303 kat, AT4G12550 (*Auxin-Induced in Root cultures 1*) 119,04 kat, AT3G24020 (*Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein*) 13,69 kat, AT5G66390 (*Peroxidase superfamily protein*) 71,42 kat, AT2G37870 (*Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein*) 21,27 kat, AT4G30170 (*Peroxidase family protein*) 303 kat, AT4G26320 (*arabinogalactan protein 13*) 40 kat azalış saptanmıştır. 10. gün kontrole kıyasla 10. gün 5 μ M 2,4-D ve 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 en anlamlı değişiklik gösteren transkriptler dışında bu karşılaştırmalara ait DEG'lerde anlatımı artan ve embriyonik gelişimde önemli işlevi olan TF genleri ve SE dokularında DNA metilasyonu ve demetilasyonu ile ilişkili genler tanımlanmıştır. Tablo 4.8 ve 4.9'da bu kıyaslara ait kat değişimleri verilmiştir.

Tablo 4. 11. SE dokularında DNA metilasyonu ve Demetilasyonu ile ilişkili genler

Gen ID	İsim	10.gün B5	10.gün B5-
		10.gün 5 µM 2,4-D	10.gün 2,5 µM BIX
AT5G49160	<i>MET1</i>	+2,50	
AT1G69770	<i>CMT3</i>	+2,24	
AT5G14620	<i>DRM2</i>	+1,92	+2,05
AT5G66750	<i>DDM1</i>	+2,56	
AT2G16390	<i>DRD1</i>	+2,51	+2,59
AT1G57820	<i>VIM1</i>	+3,53	+2,4
AT5G39550	<i>VIM3</i>	+1,97	
AT5G04560	<i>DME1</i>	+2,22	
AT3G10010	<i>DML2</i>		+3,13
AT2G36490	<i>ROS1</i>	+2,28	
AT5G13960	<i>CMT2</i>		+3,04
AT2G36490	<i>DRM3</i>	+1,86	+1,85
AT2G36490	<i>DML1</i>		+1,80

Tablo 4. 12. DEG'lerde anlatımı artan ve embriyonik gelişimde önemli işlevi olan TF genleri

Gen ID	İsim	10.gün B5	10.gün B5
		10.gün. 5 µM 2,4-D	10.gün 2,5 µM BIX-01294
AT1G21970)	<i>LEC1</i>	+9,99	+14,91
AT1G30490	<i>PHV</i>	+2,79	+2,04
AT2G34710	<i>PHB</i>	+6,04	+2,05
AT3G24650	<i>ABI3</i>		+2,26
AT3G26790	<i>FUS3</i>	+2,46	+3,99
AT5G13790	<i>AGL15</i>	+2,65	+3,46
AT1G51190	<i>PLT 2/AIL4</i>	+22,25	
AT3G20840	<i>PLT 1/AIL3</i>	+49,04	
AT4G37750	<i>ANT</i>		+3,0
AT5G10510	<i>PLT 3/AIL 6</i>	+7,97	
AT5G10510	<i>PLT 4/BBM/AIL2</i>	+5,79	

Tablo 4. 13. DEG'lerde anlatımı artan ve embriyonik gelişimde önemli işlevi olan TF genleri (devamı).

AT5G57390	<i>PLT5/AIL5</i>		+2,33
AT5G65510	<i>PLT 7/AIL7</i>	+2,41	+3,43
AT3G11260	<i>WOX 5</i>	+4,16	
AT5G05770	<i>WOX 7</i>	+5,43	
AT3G03660	<i>WOX 11</i>	+28,56	

Tablo 4. 14. 5. gün B5 – 5.gün 2,4-D ve 10. gün B5 – 10. gün 2,4-D kıyaslarında Aux/IAA genlerinin kat değişimleri

İsim/ Gen ID	5.gün B5- 5.gün 5 µM 2,4-D	10.gün B5-10.gün 5 µM 2,4-D
<i>IAA 1 (AT4G14560)</i>	+10,88	+6,97
<i>IAA 2 (AT3G23030)</i>	+3,54	+6,24
<i>IAA 3 (AT1G04240)</i>	- 0,25	
<i>IAA 4 (AT5G43700)</i>	+4,0	+3,43
<i>IAA 7 (AT3G23050)</i>	+2,82	
<i>IAA 8 (AT2G22670)</i>		+1,61
<i>IAA 9 (AT5G65670)</i>	+1,81	+1,66
<i>IAA11 (AT4G28640)</i>	+1,72	
<i>IAA12 (AT1G04550)</i>		+1,57
<i>IAA13 (AT2G33310)</i>	+2,95	+2,13
<i>IAA17 (AT1G04250)</i>		+2,81
<i>IAA19 (AT3G15540)</i>	+3,76	+6,72
<i>IAA20 (AT2G46990)</i>	+ 43,18	+33,60
<i>IAA26 (AT3G16500)</i>	+2,34	+1,65
<i>IAA27 (AT4G29080)</i>	+2,76	+1,93
<i>IAA28 (AT5G25890)</i>	-0,24	-0,53
<i>IAA30 (AT3G62100)</i>	+32,65	+22,87
<i>IAA33 (AT5G57420)</i>	+53,41	+31,92

Karşılaştırma 10. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 için yapılan analize göre istatistiksel olarak en anlamlı değişiklik gösteren 15 gen ve kat değişimleri şu şekildedir; AT1G24020 (*MLP-like protein 423*) 4,59 kat, AT5G04950 (*nicotianamine synthase 1*) 6,48 kat, AT3G15840 (*post-illumination chlorophyll fluorescence*

increase) 3,32 kat, AT1G78490 (*post-illumination chlorophyll fluorescence increase*) 4,71 kat, AT3G15360 (*thioredoxin M-type 4*) 2,81 kat, AT4G21210 (*PPDK regulatory protein*) 2,45 kat, AT2G05330 (*BTB/POZ domain-containing protein*) 7,85 kat artış, AT4G34970 (*actin depolymerizing factor 9*) 6,29 kat, AT4G09940 (*P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein*) 5,53 kat, AT2G03830 (*root meristem growth factor*) 5,91 kat, AT1G04610 (*YUCCA 3*) 5,58 kat, AT1G48000 5,35 kat (*myb domain protein 112*), AT1G15385 (*cotton fiber protein*) 5,49 kat, AT3G14362 4,75 kat (*ROTUNDIFOLIA like 10*), AT3G02245 (*uncharacterized protein*) 4,85 kat azalış belirlenmiştir.

Karşılaştırma 5. gün B5 – 10. gün B5 için yapılan analize göre istatistiksel olarak en anlamlı değişiklik gösteren 15 gen ve kat değişimleri şu şekildedir; AT5G39720 (*avirulence induced protein 2 like protein*) 32,23 kat, AT2G30766 (*uncharacterized protein*) 13,81 kat, AT1G13609 (*Defensin-like (DEFL) family protein*) 24,27 kat, AT5G53450 (*OBP3-responsive protein 1*) 5,63 kat, AT3G05260 (*NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein*) 27,61 kat artış, AT4G22235 (*defensin-like protein*) 11,62 kat, AT1G76470 (*NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein*) 12,98 kat, AT4G28850 (*xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 26*) 6,25 kat, AT1G18180 (*3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase (DUF1295)*) 4,16 kat, AT3G29030 (*expansin A5*) 6,25 kat, AT5G57530 (*xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 12*) 4,76 kat, AT2G21260 (*NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein*) 4,34 kat, AT1G06080 (*delta 9 desaturase 1*) 7,14 kat, AT1G65880 (*benzoyloxyglucosinolate 1*) 10 kat, AT4G25820 (*xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 14*) 4,54 kat azalış saptanmıştır.

Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 5 µM 2,4-D için yapılan analize göre istatistiksel olarak en anlamlı değişiklik gösteren 15 gen ve kat değişimleri şu şekildedir; AT2G17850 (*Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein*) 25,84 kat, AT1G21500 (*uncharacterized protein*) 12,92 kat, AT4G21650 (*Subtilase family protein*) 37,72 kat, AT2G16060 (*hemoglobin 1*) 7,72 kat, AT5G42200 (*RING/U-box superfamily protein*) 5,29 kat, AT4G27450 (*aluminum induced protein with YGL and LRDR motifs*) 30,47 kat, AT2G42220 (*Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein*) 7,26 kat, AT2G01990 (*XR11-like protein*) 5,15 kat, AT2G20570 (*GBF's pro-rich region-interacting factor 1*) 4,38 kat,

AT1G52230 (*photosystem I subunit H2*) 7,77 kat, AT5G63180 (*Pectin lyase-like superfamily protein*) 11,15 kat, AT4G37750 (*Integrase-type DNA-binding superfamily protein*) 4,6 kat, AT2G29310 (*NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein*) 17,94 kat, AT5G54510 (*Auxin-responsive GH3 family protein*) 3,99 kat, AT1G52050 (*Mannose-binding lectin superfamily protein*) 6,25 kat azalış belirlenmiştir.

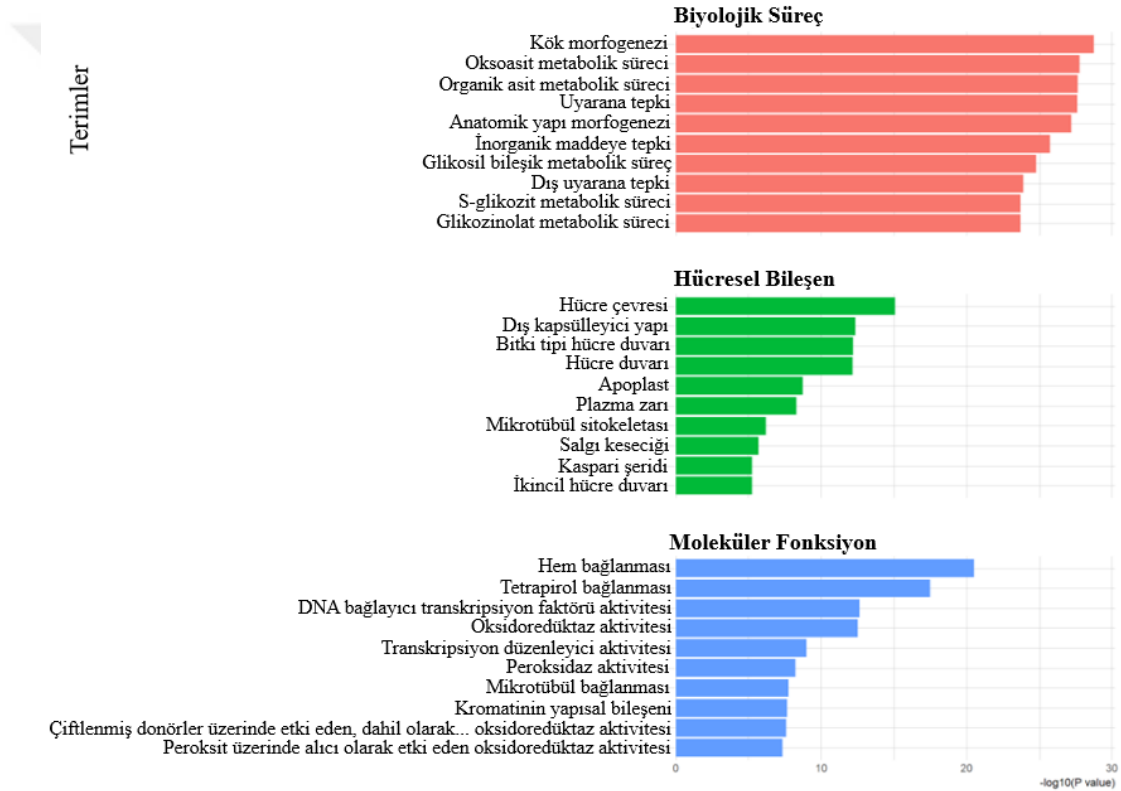
Karşılaştırma 5. gün 2,5 μ M BIX-01294 – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 için yapılan analize göre istatistiksel olarak en anlamlı değişiklik gösteren 15 gen ve kat değişimleri şu şekildedir; AT5G26290 (*TRAF-like family protein*) 11,03 kat, AT4G37410 (*cytochrome P450, family 81, subfamily F, polypeptide 4*) 272,97 kat, AT5G60950 (*COBRA-like protein 5 precursor*) 11,6 kat, AT1G29270 (*transcription factor bHLH35-like protein*) 8,33 kat, AT3G15450 (*aluminum induced protein with YGL and LRDR motifs*) 12,92 kat, AT3G48580 (*xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 11*) 22,63 kat, AT1G66270 (*Glycosyl hydrolase superfamily protein*) 31,59 kat, AT5G62920 (*response regulator 6*) 3,68 kat, AT3G63210 (*mediator of aba-regulated dormancy protein (DUF581)*) 3,8 kat, AT1G17430 (*alpha/beta-Hydrolases superfamily protein*) 4,16 kat, AT1G65610 (*Six-hairpin glycosidases superfamily protein*) 5 kat, AT4G25980 (*peroxidase superfamily protein*) 5,26 kat, AT5G40960 (*transmembrane protein, putative (DUF 3339)*) 3,33 kat, AT1G22710 (*sucrose-proton symporter 2*) 3,84 kat azalış belirlenmiştir.

Karşılaştırma 5. gün 5 μ M 2,4-D – 10. gün 5 μ M 2,4-D için yapılan analize göre istatistiksel olarak en anlamlı değişiklik gösteren 15 gen ve kat değişimleri şu şekildedir; AT5G26290 (*TRAF-like family protein*) 3,46 kat, AT4G37410 (*cytochrome P450, family 81, subfamily F, polypeptide 4*) 8,09 kat, AT5G60950 (*COBRA-like protein 5 precursor*) 3,54 kat, AT3G15450 (*aluminum induced protein with YGL and LRDR motifs*) 3,69 kat, AT3G48580 (*xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 11*) 4,50 kat, AT1G66270 (*Glycosyl hydrolase superfamily protein*) 4,98 kat, AT5G62920 (*response regulator 6*) 1,88 kat, AT3G63210 (*mediator of aba-regulated dormancy protein (DUF581)*) 1,93 kat artış, AT1G17430 (*alpha/beta-Hydrolases superfamily protein*) 2 kat, AT1G65610 (*Six-hairpin glycosidases superfamily protein*) 2,28 kat, AT4G25980 (*peroxidase superfamily protein*) 2,37 kat, AT5G40960 (*transmembrane protein, putative (DUF*

3339) 1,74 kat, AT1G22710 (*sucrose-proton symporter 2*) 1,92 kat, AT4G22730 (*Leucine-rich repeat protein kinase family protein*) 1,98 kat azalış belirlenmiştir.

4.6.2. Gen Ontolojisi

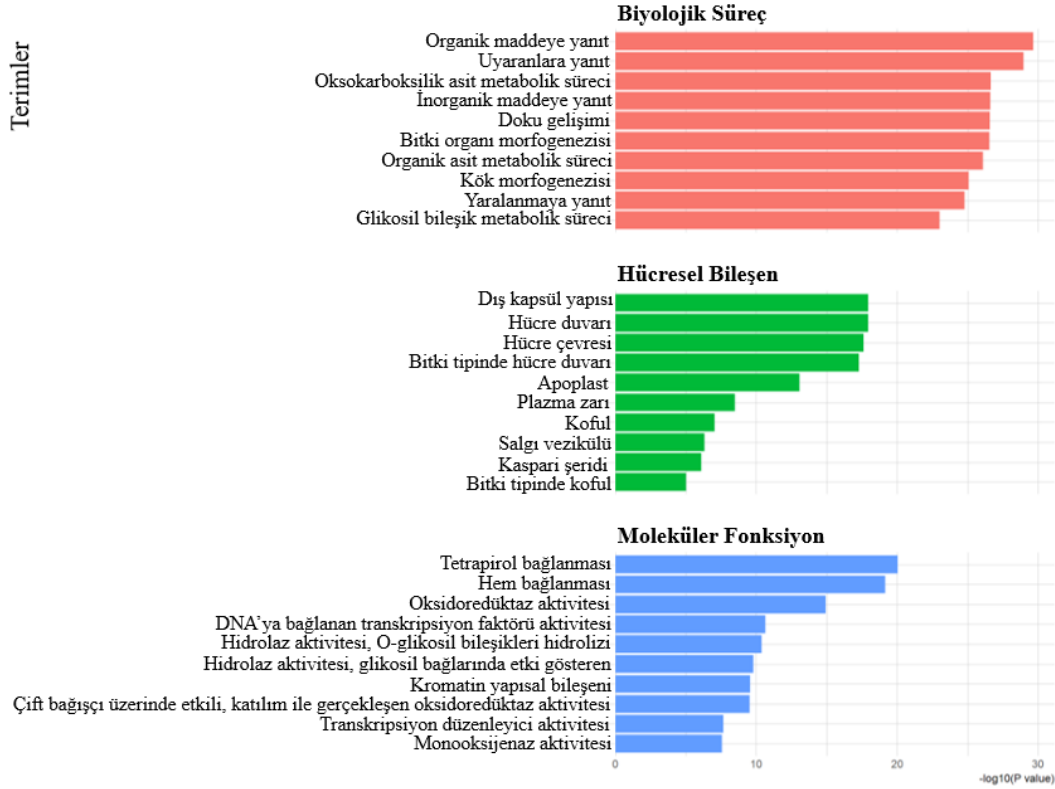
Gen Ontoloji (GO) analizi, genlerin fonksiyonel özelliklerine bağlı olarak önceden tanımlanmış terim veya gruplara atandığı ve Gen Ontolojisi sınıflandırma sistemini kullanan bir yorumlama yöntemidir. Bir deneyde, altta yatan biyolojik süreçleri daha iyi anlamak için genellikle bu gen gruplarının işlevsel bir profilini almak için kullanılır. Gen ontolojileri “moleküler fonksiyon (mf), hücresel bileşen (cc) ve biyolojik süreç (bp)” olmak üzere 3 ana başlık altında gruplanır.



Şekil 4. 19. Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 µM 2,4-D için en anlamlı değişkenlik gösteren GO terimleri

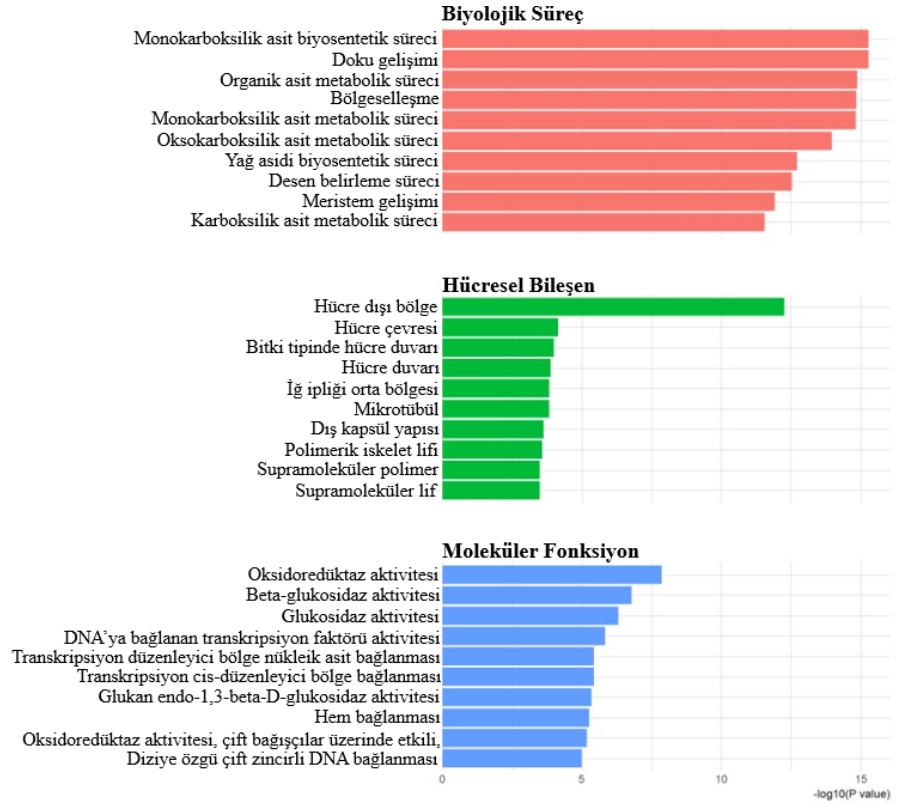
Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 µM 2,4-D için yapılan analize göre anlatım analizinde tespit edilen genlerin hangi GO terimlerinde gruplandığı detaylı şekilde analiz edilmiştir (Şekil 4. 19). GO: BP analizinde 5.günde kontrole kıyasla en çok etkilenen süreçler kök morfogenezi, oksoasit metabolik süreci ve organik asit metabolik süreç olmuştur.

GO:MF analizinde ise en çok etkilenen fonksiyonlar Hem bağlanması, tetrapirel bağlanması ve DNA bağlayıcı TF aktivitesi olmuştur



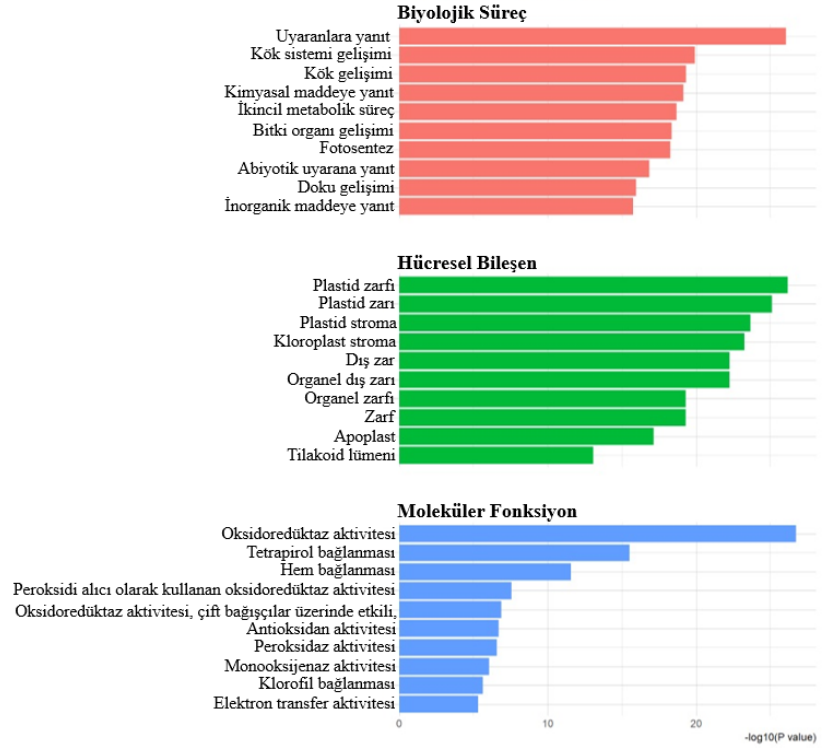
Şekil 4. 20. Karşılaştırma 5. gün 5 μ M 2,4-D – 5.gün 2,5 μ M BIX için en anlamlı değişkenlik gösteren GO terimleri

Karşılaştırma 5. gün 5 μ M 2,4-D – 5. gün 2,5 μ M BIX için yapılan analize göre anlatım analizinde tespit edilen genlerin hangi GO terimlerinde gruplandığı detaylı şekilde analiz edilmiştir (Şekil 4. 20). GO: BP analizinde 5.gün 5 μ M 2,4-D'ye kıyasla 2,5 μ M BIX-01294 içeren ortamda yetişen bitkilerde organik maddeye yanıt, uyaranlara yanıt ve oksokarboksilik asit metabolik süreci etkilenmiştir. GO:MF analizinde ise en çok etkilenen fonksiyonlar tetrapirel bağlanması, Hem bağlanması ve oksoredüktaz aktivitesi olmuştur.



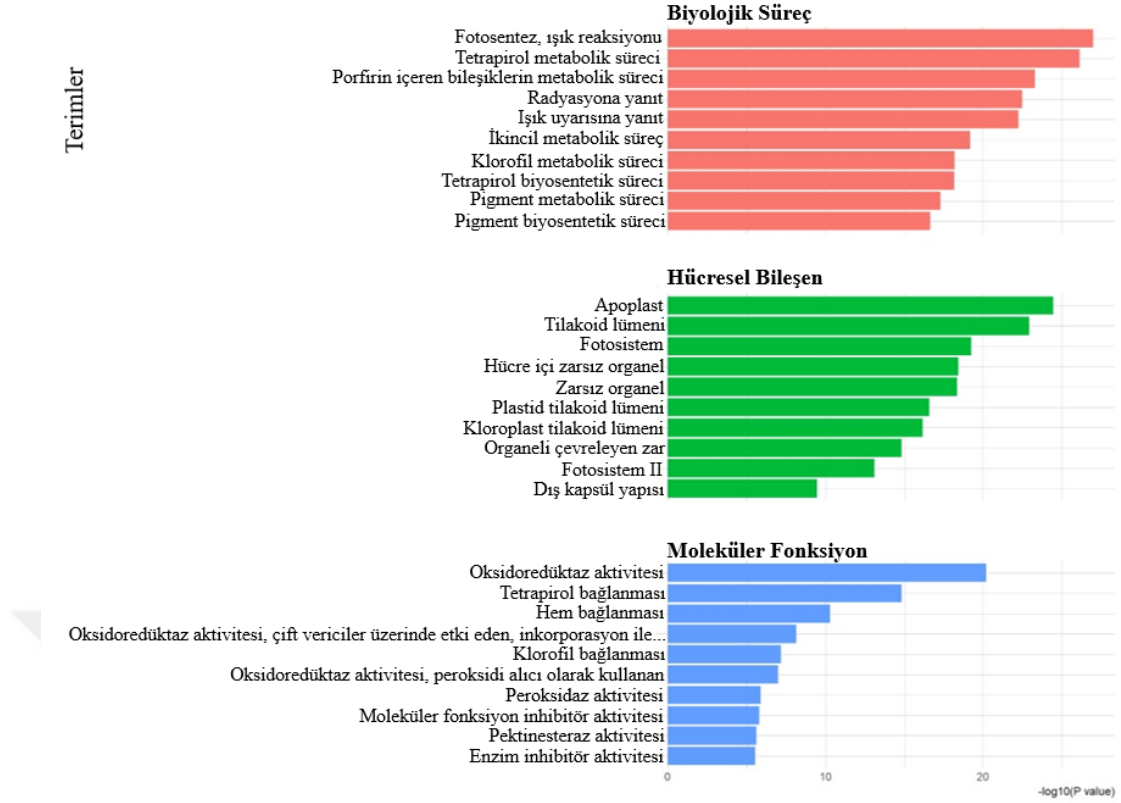
Şekil 4. 21. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı değişkenlik gösteren GO terimleri

Karşılaştırma 10. gün B5 – 10.gün 2,5 μ M BIX-01294 için yapılan analize göre anlatım analizinde tespit edilen genlerin hangi GO terimlerinde gruplandığı detaylı şekilde analiz edilmiştir (Şekil 4. 21). GO: BP analizinde 10. gün B5'e kıyasla 2,5 μ M BIX-01294 içeren ortamda yetişen bitkilerde en çok monokarboksilik asit biyosentez süreci etkilenmiştir. GO:MF analizinde ise en çok etkilenen fonksiyonlar oksidoredüktaz aktivitesi, beta-glukosidaz aktivitesi ve glukosidaz aktivitesi olmuştur.



Şekil 4. 22. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5 µM 2,4-D için en anlamlı değişkenlik gösteren GO terimleri

Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5 µM 2,4-D için yapılan analize göre anlatım analizinde tespit edilen genlerin hangi GO terimlerinde gruplandığı detaylı şekilde analiz edilmiştir (Şekil 4. 22). GO: BP analizinde 10. gün B5'e kıyasla 5 µM 2,4-D içeren ortamda yetişen bitkilerde en çok uyarılara yanıt süreci etkilenmiştir. GO:MF analizinde ise en çok etkilenen fonksiyonlar oksidoredüktaz aktivitesi, tetrapiröl bağlanması ve Hem bağlanması aktivitesi olmuştur.



Şekil 4. 23. Karşılaştırma 10. gün 5 μ M 2,4-D – 10. gün 2,5 μ M BIX için en anlamlı değişkenlik gösteren GO terimleri

Karşılaştırma 10. gün 5 μ M 2,4-D – 10. gün 2,5 μ M BIX için yapılan analize göre anlatım analizinde tespit edilen genlerin hangi GO terimlerinde gruplandığı detaylı şekilde analiz edilmiştir (Şekil 4. 23). GO: BP analizinde 10. gün 5 μ M 2,4-D'ye kıyasla 2,5 μ M BIX-01294 içeren ortamda yetişen bitkilerde en çok fotosentez, ışık reaksiyonu, tetrapirel metabolik süreci etkilenmiştir. GO:MF analizinde ise en çok etkilenen fonksiyonlar oksidoredüktaz aktivitesi, tetrapirel bağlanması ve Hem bağlanması olmuştur.

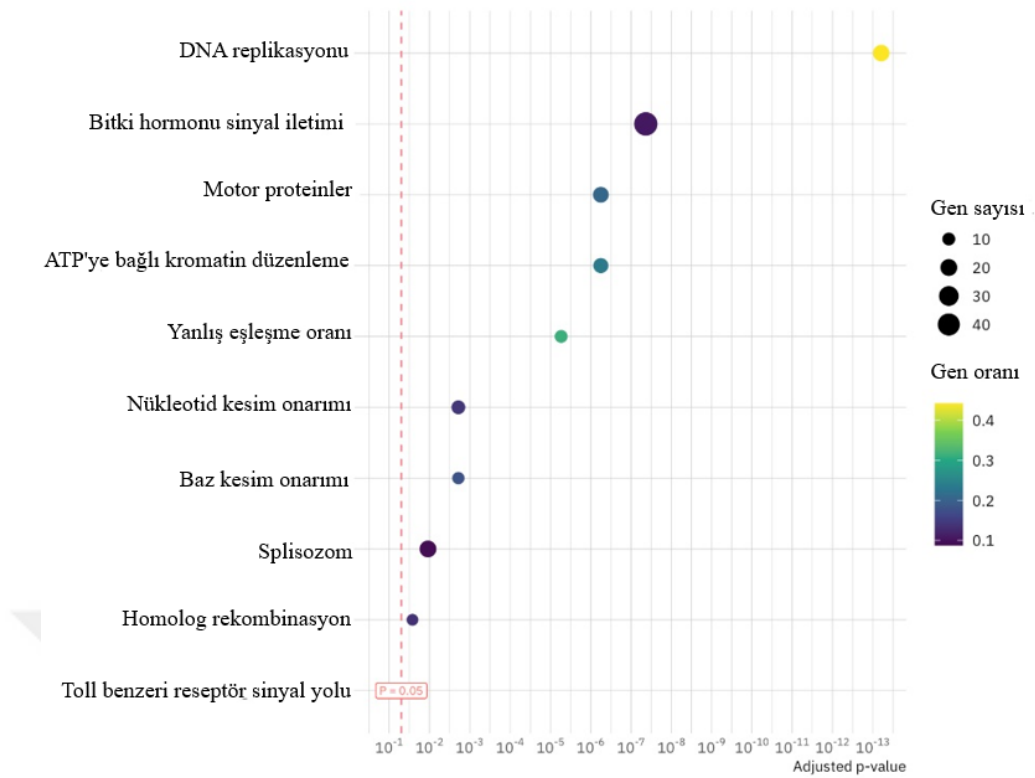
4.6.3. KEGG Analizi

Yolak analizi, bir moleküler yolak içinde yer alan proteinleri kodlayan genlerin anlatımının, deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterip göstermediğinin testini sağlar. Buna bağlı olarak, bir yolaktaki gen anlatımındaki değişiklikleri inceleyerek biyolojik gruplar arasındaki fenotip farklılıklarının nedenleri araştırılabilir. Gerçekleştirilen analizde, bu amaçla KEGG Pathway yolak veritabanı kullanılmıştır. Yolaklar, barındırdıkları gen sayısına göre istatistiksel olarak test edilmiştir.

Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 µM 2,4-D kapsamında, anlatım analizinde anlamlı değişkenlik gösteren genlerin (FDR < 0.05) hangi yolak gruplarında kümелendiği Tablo 4. 11 ve 4. 12’de belirtilmiştir. Bu tablolarda, tespit edilen tüm yolaklar FDR değerine göre düşükten yükseğe olarak sıralanmıştır. Buna göre 1093 adet anlamlı artış gösteren genin 9 adet yolak içinde anlamlı olarak kümелendiği ve 1751 adet anlamlı düşüş gösteren genin 49 adet yolak içinde anlamlı olarak kümелendiği tespit edilmiştir (Şekil 4. 24 ve Şekil 4. 25). Tüm anlamlı değişkenlik gösteren genler dikkate alındığında, 40 adet yolakta anlamlı farklılık görülmüştür.

Tablo 4. 15. Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 µM 2,4-D kapsamında anlatım profili artan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath03030	DNA replikasyonu	19/43	7.47×10^{-16}	6.20×10^{-14}
ath04075	Bitki hormonu sinyal iletimi	46/433	1.04×10^{-9}	4.30×10^{-8}
ath04814	Motor proteinler	17/82	2.27×10^{-8}	5.62×10^{-7}
ath03082	ATP-bağımlı kromatin yeniden düzenlenmesi	15/64	2.71×10^{-8}	5.62×10^{-7}
ath03430	Yanlış eşleşme onarımı	10/32	3.26×10^{-7}	5.42×10^{-6}
ath03420	Nükleotid eksizyon onarımı	12/85	1.58×10^{-4}	1.93×10^{-3}
ath03410	Baz eksizyon onarımı	9/50	1.63×10^{-4}	1.93×10^{-3}
ath03040	Splisom	20/229	1.05×10^{-3}	1.09×10^{-2}
ath03440	Homolog rekombinasyon	8/60	2.88×10^{-3}	2.65×10^{-2}
ath04620	Toll-benzeri reseptör sinyal iletimi	3/15	2.15×10^{-2}	1.78×10^{-1}
ath03013	Nükleositoplazmik taşıma	9/105	2.77×10^{-2}	2.09×10^{-1}
ath04016	MAPK sinyal iletim yolu	11/144	3.37×10^{-2}	2.33×10^{-1}
ath00908	Zeatin biyosentezi	4/32	4.03×10^{-2}	2.57×10^{-1}
ath00040	Pentoz ve glukuronat enterkonversiyonları	8/108	7.47×10^{-2}	4.43×10^{-1}

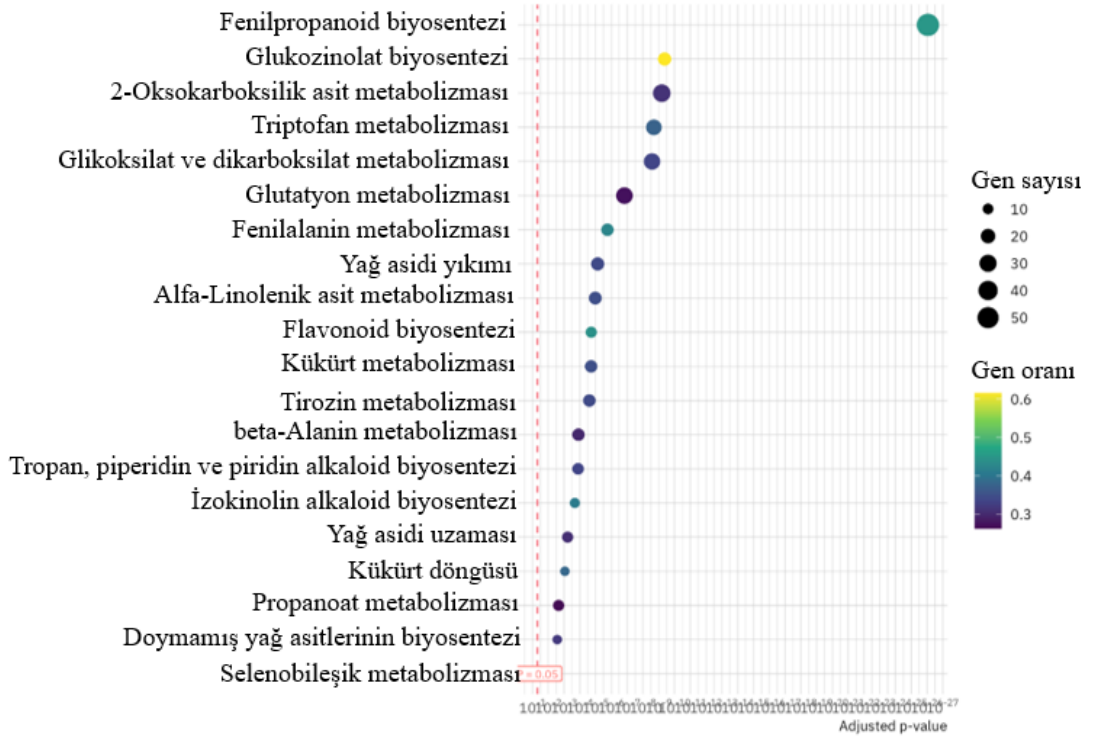


Şekil 4. 24. Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 µM 2,4-D için en anlamlı artış gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 µM 2,4-D için en anlamlı artış gösteren üç yola göre rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: DNA replikasyonu yolağı için AT1G07370 (*proliferating cellular nuclear antigen 1*), AT1G09815 (*polymerase delta 4*), AT1G44900 (*minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein*), AT1G67320 (*DNA primase, large subunit family*), AT1G77470 (*replication factor C subunit 3*); bitki hormonu sinyal iletimi yolağı için AT1G04310 (*ethylene response sensor 2*), AT1G04550 (*AUX/IAA transcriptional regulator family protein*), AT1G04610 (*YUCCA 3*), AT1G19840 (*SAUR-like auxin-responsive protein family*), AT1G19850 (*Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-like protein*); motor proteinler yolağı içinse AT1G18370 (*ATP binding microtubule motor family protein*), AT1G59540 (*P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein*), AT2G21300 (*ATP binding microtubule motor family protein*), AT2G28620 (*P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein*) ve AT2G29550 (*tubulin beta-7 chain*)'dir.

Tablo 4. 16. Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 µM 2,4-D kapsamında anlatım profili azalan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath00940	Fenilpropanoid biyosentezi	57/127	8.32×10^{-29}	8.66×10^{-27}
ath01200	Karbon metabolizması	60/275	1.78×10^{-12}	9.27×10^{-11}
ath00966	Glukozinolat biyosentezi	16/26	1.24×10^{-11}	4.30×10^{-10}
ath01210	2-Oksokarboksilik asit metabolizması	32/103	2.50×10^{-11}	6.49×10^{-10}
ath00380	Triptofan metabolizması	24/64	9.95×10^{-11}	2.07×10^{-9}
ath00630	Glikoksilat ve dikarboksilat metabolizması	27/81	1.55×10^{-10}	2.68×10^{-9}
ath00480	Glutasyon metabolizması	28/102	1.03×10^{-8}	1.52×10^{-7}
ath00360	Fenilalanin metabolizması	14/33	1.39×10^{-7}	1.81×10^{-6}
ath00071	Yağ asidi yıkımı	16/47	6.56×10^{-7}	7.58×10^{-6}
ath00592	Alfa-Linolenik asit metabolizması	15/43	1.03×10^{-6}	1.07×10^{-5}



Şekil 4. 25. Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 μ M 2,4-D için en anlamlı düşüş gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

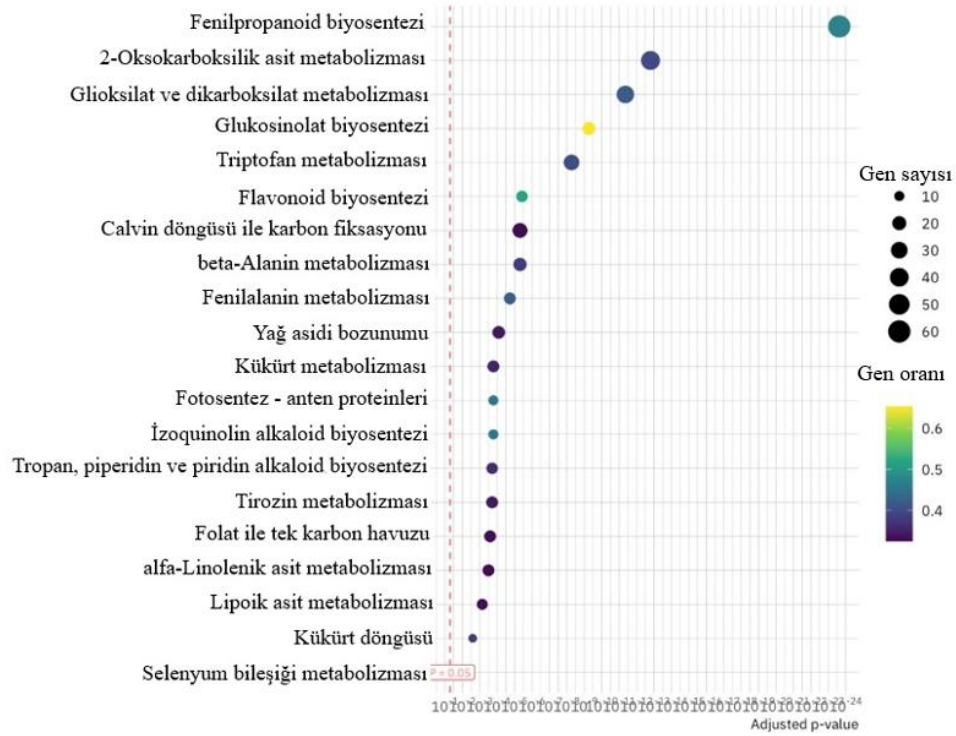
Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 μ M 2,4-D için en anlamlı düşüş gösteren yolda rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: fenil propanoid biyosentezi yolağı için AT1G05240 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G05250 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G05260 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G14540 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G30760 (*FAD-binding Berberine family protein*); karbon metabolizması yolağı için AT1G06290 (*acyl-CoA oxidase 3*), AT1G09780 (*Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent*), AT1G12230 (*Aldolase superfamily protein*), AT1G17745 (*D-3-phosphoglycerate dehydrogenase*), AT1G22430 (*GroES-like zinc-binding dehydrogenase family protein*); glukozinat biyosentezi yolağı içinse AT1G16400 (*cytochrome P450, family 79, subfamily F, polypeptide 2*), AT1G18590 (*sulfotransferase 17*), AT1G24100 (*UDP-glucosyl transferase 74B1*), AT1G74090 (*desulfo-glucosinolate sulfotransferase 18*), AT1G74100 (*sulfotransferase 16*)'dür.

Karşılaştırma 5. gün 5 μ M 2,4-D – 5. gün 2,5 μ M BIX-01294 kapsamında, anlatım analizinde anlamlı değişkenlik gösteren genlerin (FDR < 0.05) hangi yolak gruplarında kümelendiği Tablo 4. 13 ve Tablo 4. 14'te belirtilmiştir. Bu tablolarda, tespit edilen

tüm yolaklar FDR değerine göre düşükten yükseğe olarak sıralanmıştır. Buna göre 2022 adet anlamlı artış gösteren genin 51 adet yolak içinde anlamlı olarak kümelendiği ve 1220 adet anlamlı düşüş gösteren genin 10 adet yolak içinde anlamlı olarak kümelendiği tespit edilmiştir (Şekil 4. 26 ve Şekil 4. 27). Tüm anlamlı değişkenlik gösteren genler dikkate alındığında, 35 adet yolakta anlamlı farklılık görülmüştür.

Tablo 4. 17. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 5. gün 2,5 µM BIX-01294 kapsamında anlatım profili artan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath00940	Fenilpropanoid biyosentezi	60/127	2.08×10^{-26}	2.33×10^{-24}
ath01200	Karbon metabolizması	85/275	1.45×10^{-21}	8.10×10^{-20}
ath01210	2-Oksokarboksilik asit metabolizması	41/103	4.25×10^{-15}	1.59×10^{-13}
ath00630	Glikoksilat ve dikarboksilat metabolizması	34/81	1.57×10^{-13}	4.40×10^{-12}
ath00966	Glukozinolat biyosentezi	17/26	2.46×10^{-11}	5.51×10^{-10}
ath00380	Triptofan metabolizması	26/64	2.90×10^{-10}	5.41×10^{-9}
ath01230	Amino asit biyosentezi	54/242	3.99×10^{-8}	6.39×10^{-7}
ath00941	Flavonoid biyosentezi	13/25	2.71×10^{-7}	3.79×10^{-6}
ath00480	Glutasyon metabolizması	29/102	3.33×10^{-7}	4.15×10^{-6}
ath00710	Calvin döngüsü ile karbon fiksasyonu	23/71	4.37×10^{-7}	4.89×10^{-6}
ath00410	Beta-alanin metabolizması	18/47	4.80×10^{-7}	4.89×10^{-6}
ath00270	Sistein ve metiyonin metabolizması	32/125	1.11×10^{-6}	1.04×10^{-5}
ath00360	Fenilalanin metabolizması	14/33	2.17×10^{-6}	1.87×10^{-5}
ath00010	Glikoliz / Glukoneogenez	30/119	3.40×10^{-6}	2.72×10^{-5}
ath00620	Pirüvat metabolizması	26/97	4.57×10^{-6}	3.41×10^{-5}

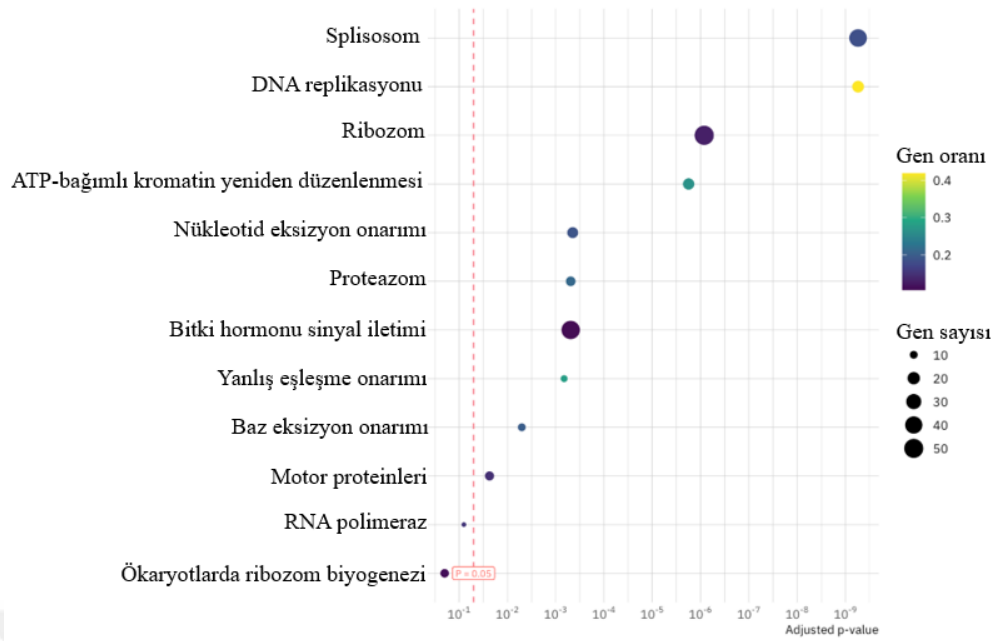


Şekil 4. 26. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 5. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı artış gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 5. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı artış gösteren üç yolda rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: fenilpropanoid biyosentezi yolağı için AT1G05240 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G05250 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G05260 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G14540 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G15950 (*cinnamoyl coa reductase 1*); karbon metabolizması yolağı için AT1G06290 (*acyl-CoA oxidase 3*), AT1G09780 (*Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent*), AT1G12230 (*Aldolase superfamily protein*), AT1G13440 (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2*), AT1G17745 (*D-3-phosphoglycerate dehydrogenase*); 2-Oksokarboksilik asit metabolizması yolağı içinse AT1G16400 (*cytochrome P450, family 79, subfamily F, polypeptide 2*), AT1G18500 (*methylthioalkylmalate synthase-like 4*), AT1G21400 (*thiamine diphosphate-binding fold (THDP-binding) superfamily protein*), AT1G24100 (*UDP-glucosyl transferase 74B1*) ve AT1G24180 (*thiamine diphosphate-binding fold (THDP-binding) superfamily protein*)'dir.

Tablo 4. 18. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 5. gün 2,5 µM BIX-01294 kapsamında anlatım profili azalan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath03030	DNA replikasyonu	18/43	6.29×10^{-12}	5.44×10^{-10}
ath03040	Splisom	42/229	1.21×10^{-11}	5.44×10^{-10}
ath03010	Ribozom	51/393	2.79×10^{-8}	8.37×10^{-7}
ath03082	ATP-bağımlı kromatin yeniden düzenlenmesi	17/64	7.82×10^{-8}	1.76×10^{-6}
ath03420	Nükleotid eksizyon onarımı	16/85	2.46×10^{-5}	4.43×10^{-4}
ath03050	Proteazom	13/61	3.66×10^{-5}	4.88×10^{-4}
ath04075	Bitki hormonu sinyal iletimi	46/433	3.79×10^{-5}	4.88×10^{-4}
ath03430	Yanlış eşleşme onarımı	9/32	5.93×10^{-5}	6.67×10^{-4}
ath03410	Baz eksizyon onarımı	10/50	5.02×10^{-4}	5.02×10^{-3}
ath04814	Motor proteinler	12/82	2.60×10^{-3}	2.34×10^{-2}
ath03020	RNA polimeraz	8/52	9.70×10^{-3}	7.94×10^{-2}
ath03008	Ökaryotlarda ribozom biyogenezi	11/98	2.65×10^{-2}	1.99×10^{-1}
ath04620	Toll-benzeri reseptör sinyal iletimi	3/15	5.29×10^{-2}	3.50×10^{-1}
ath01232	Nükleotid metabolizması	9/84	5.45×10^{-2}	3.50×10^{-1}
ath03013	Nükleositoplazmik taşıma	10/105	8.42×10^{-2}	5.05×10^{-1}



Şekil 4. 27. Karşılaştırma 5. gün 5 μ M 2,4-D – 5. gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı düşüş gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

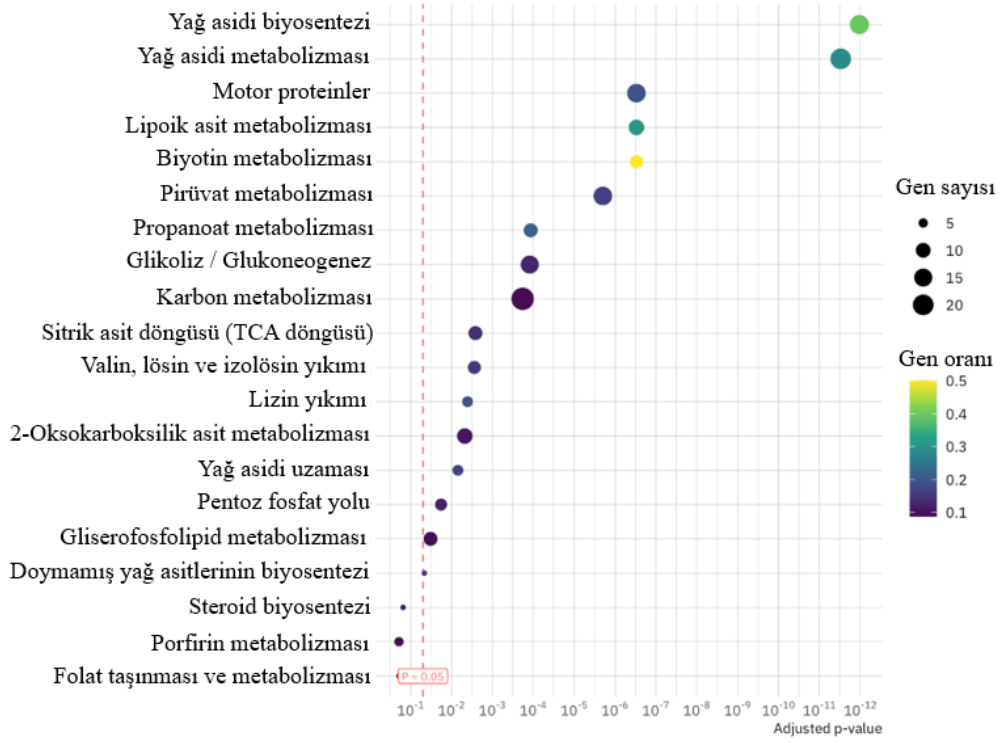
Karşılaştırma 5. gün B5 – 5. gün 5 μ M 2,4-D için en anlamlı düşüş gösteren yolda rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: DNA replikasyonu yolağı için AT1G07370 (*proliferating cellular nuclear antigen 1*), AT1G09815 (*polymerase delta 4*), AT1G21690 (*ATPase family associated with various cellular activities (AAA)*), AT1G67320 (*DNA primase, large subunit family*), AT1G77470 (*replication factor C subunit 3*); splisom yolağı için AT1G03330 (*Small nuclear ribonucleoprotein family protein*), AT1G09760 (*U2 small nuclear ribonucleoprotein A*), AT1G20580 (*Small nuclear ribonucleoprotein family protein*), AT1G23860 (*RS-containing zinc finger protein 21*), AT1G65700 (*Small nuclear ribonucleoprotein family protein*); ribozom yolağı içinse AT1G07830 (*ribosomal protein L29 family protein*), AT1G14620 (*decoy*), AT1G15930 (*Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein*), AT1G17560 (*Ribosomal protein L14p/L23e family protein*) ve AT1G18540 (*Ribosomal protein L6 family protein*)'dır.

Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 SE kapsamında, anlatım analizinde anlamlı değişkenlik gösteren genlerin (FDR < 0.05) hangi yolak gruplarında kümelendiği Tablo 4. 15 ve Tablo 4. 16'da belirtilmiştir. Bu tablolarda, tespit edilen tüm yollar FDR değerine göre düşükten yükseğe olarak sıralanmıştır. Buna

göre 914 adet anlamlı artış gösteren genin 19 adet yolak içinde anlamlı olarak kümелendiği ve 646 adet anlamlı düşüş gösteren genin 3 adet yolak içinde anlamlı olarak kümелendiği tespit edilmiştir (Şekil 4. 28 ve Şekil 4. 29). Tüm anlamlı değişkenlik gösteren genler dikkate alındığında, 16 adet yolakta anlamlı farklılık görülmüştür.

Tablo 4. 19. Karşılaştırma 10.gün B5 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 anlatımı artan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath00061	Yağ asidi biyosentezi	17/43	1.13×10^{-14}	1.05×10^{-12}
ath01212	Yağ asidi metabolizması	20/70	6.48×10^{-14}	3.01×10^{-12}
ath04814	Motor proteinler	16/82	1.06×10^{-8}	3.00×10^{-7}
ath00785	Lipoik asit metabolizması	11/36	1.57×10^{-8}	3.00×10^{-7}
ath00780	Biyotin metabolizması	8/16	1.61×10^{-8}	3.00×10^{-7}
ath00620	Pirüvat metabolizması	16/97	1.28×10^{-7}	1.98×10^{-6}
ath00640	Propanoat metabolizması	9/42	8.71×10^{-6}	1.16×10^{-4}
ath00010	Glikoliz / Glukoneogenez	15/119	1.05×10^{-5}	1.22×10^{-4}
ath01200	Karbon metabolizması	24/275	1.76×10^{-5}	1.82×10^{-4}
ath00020	Sitrik asit döngüsü (TCA döngüsü)	9/64	2.81×10^{-4}	2.61×10^{-3}
ath00280	Valin, lösin ve izölösün yıkımı	8/52	3.28×10^{-4}	2.77×10^{-3}
ath00310	Lizin yıkımı	6/31	5.24×10^{-4}	4.06×10^{-3}
ath01210	2-Oksokarboksilik asit metabolizması	11/103	7.01×10^{-4}	4.74×10^{-3}

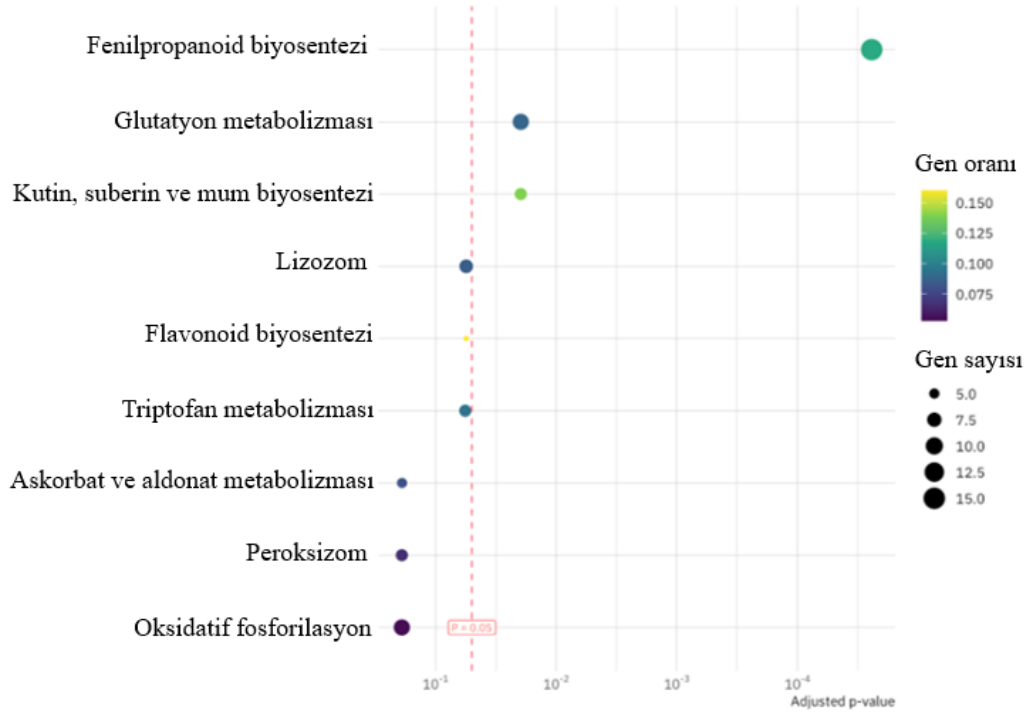


Şekil 4. 28. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı artış gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı artış gösteren üç yolda rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: yağ asidi biyosentezi yolağı için AT1G24360 (*NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein*), AT1G36160 (*acetyl-CoA carboxylase 1*), AT1G49430 (*long-chain acyl-CoA synthetase 2*), AT1G62640 (*3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III*), AT1G74960 (*fatty acid biosynthesis 1*); yağ asidi metabolizması yolağı için AT1G24360 (*NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein*), AT1G36160 (*acetyl-CoA carboxylase 1*), AT1G49430 (*long-chain acyl-CoA synthetase 2*), AT1G62640 (*3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III*), AT1G67730 (*beta-ketoacyl reductase 1*); motor proteinler yolağı içinse AT1G04820 (*tubulin alpha-4 chain*), AT1G18370 (*ATP binding microtubule motor family protein*), AT1G50010 (*tubulin alpha-2 chain*), AT2G28620 (*P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein*) ve AT2G29550 (*tubulin beta-7 chain*)'dir.

Tablo 4. 20. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 anlatımı azalan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath00940	Fenilpropanoid biyosentezi	15/127	2.96×10^{-7}	2.43×10^{-5}
ath00073	Kütün, süberin ve mum biyosentezi	6/43	5.11×10^{-4}	1.97×10^{-2}
ath00480	Glutasyon metabolizması	9/102	7.20×10^{-4}	1.97×10^{-2}
ath00941	Flavonoid biyosentezi	4/25	2.74×10^{-3}	5.58×10^{-2}
ath04142	Lizozom	7/82	3.40×10^{-3}	5.58×10^{-2}
ath00380	Triptofan metabolizması	6/64	4.16×10^{-3}	5.68×10^{-2}
ath00053	Askorbat ve aldarat metabolizması	5/62	1.62×10^{-2}	1.90×10^{-1}
ath04146	Peroksizom	6/90	2.08×10^{-2}	1.91×10^{-1}
ath00190	Oksidatif fosforilasyon	9/170	2.09×10^{-2}	1.91×10^{-1}
ath00071	Yağ asidi yıkımı	4/47	2.57×10^{-2}	2.05×10^{-1}
ath00460	Siyanamino asit metabolizması	5/71	2.75×10^{-2}	2.05×10^{-1}
ath00908	Zeatin biyosentezi	3/32	4.06×10^{-2}	2.78×10^{-1}
ath00052	Galaktoz metabolizması	4/57	4.75×10^{-2}	3.25×10^{-1}
ath04075	Bitki hormonu sinyal iletimi	16/433	5.54×10^{-2}	3.25×10^{-1}
ath00010	Glikoliz / Glukoneogenez	6/119	6.64×10^{-2}	3.25×10^{-1}



Şekil 4. 29. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı düşüş gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

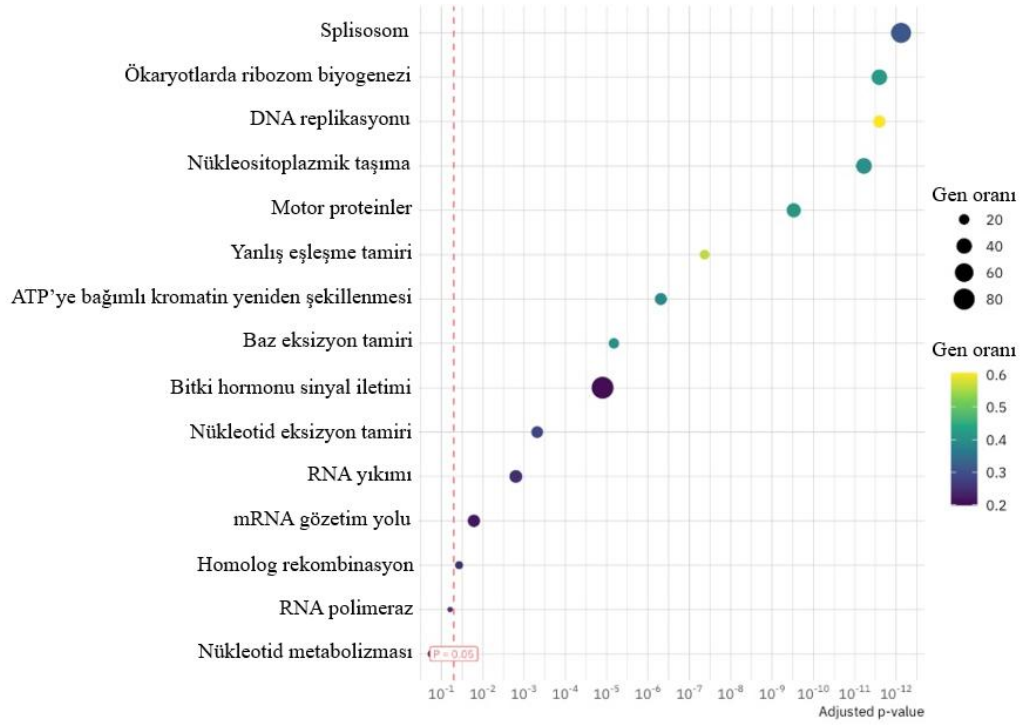
Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı düşüş gösteren yolda rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: fenilpropanoid biyosentezi yolağı için AT1G30870 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G68850 (*Peroxidase superfamily protein*), AT2G18980 (*Peroxidase superfamily protein*), AT2G35380 (*Peroxidase superfamily protein*), AT2G38390 (*Peroxidase superfamily protein*); kütin, süberin ve mum biyosentezi yolağı için AT1G11600 (*cytochrome P450, family 77, subfamily B, polypeptide 1*), AT3G10570 (*cytochrome P450, family 77, subfamily A, polypeptide 6*), AT3G44550 (*fatty acid reductase 5*), AT5G22500 (*fatty acid reductase 1*), AT5G58860 (*cytochrome P450, family 86, subfamily A, polypeptide 1*); glutatyon metabolizması yolağı içinse AT1G17190 (*glutathione S-transferase tau 26*), AT1G27130 (*glutathione S-transferase tau 13*), AT2G29490 (*glutathione S-transferase TAU 1*), AT2G30870 (*glutathione S-transferase PHI 10*) ve AT2G31570 (*glutathione peroxidase 2*)'dir.

Karşılaştırma 10. gün B5 –10. gün 5 μ M 2,4-D kapsamında, anlatım analizinde anlamlı değişkenlik gösteren genlerin (FDR < 0.05) hangi yolak gruplarında kümelendiği Tablo 4. 17 ve Tablo 4. 18'de belirtilmiştir. Bu tablolarda, tespit edilen tüm yollar

FDR değerine göre düşükten yükseğe olarak sıralanmıştır. Buna göre 2229 adet anlamlı artış gösteren genin 13 adet yolak içinde anlamlı olarak kümelendiği ve 3114 adet anlamlı düşüş gösteren genin 51 adet yolak içinde anlamlı olarak kümelendiği tespit edilmiştir (Şekil 4. 30 ve Şekil 4. 31). Tüm anlamlı değişkenlik gösteren genler dikkate alındığında, 44 adet yolakta anlamlı farklılık görülmüştür.

Tablo 4. 21. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5 µM 2,4-D anlatımı artan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath03040	Splisom	71/229	6.53×10^{-15}	7.58×10^{-13}
ath03030	DNA replikasyonu	26/43	5.02×10^{-14}	2.54×10^{-12}
ath03008	Ökaryotlarda ribozom biyogenezi	41/98	6.57×10^{-14}	2.54×10^{-12}
ath03013	Nükleositoplazmik taşıma	42/105	2.07×10^{-13}	5.99×10^{-12}
ath04814	Motor proteinler	34/82	1.29×10^{-11}	2.99×10^{-10}
ath03430	Yanlış eşleşme onarımı	18/32	2.22×10^{-9}	4.29×10^{-8}
ath03082	ATP-bağımlı kromatin yeniden düzenlenmesi	25/64	2.96×10^{-8}	4.90×10^{-7}
ath03410	Baz eksizyon onarımı	20/50	4.61×10^{-7}	6.68×10^{-6}
ath04075	Bitki hormonu sinyal iletimi	86/433	9.77×10^{-7}	1.26×10^{-5}
ath03420	Nükleotid eksizyon onarımı	24/85	4.14×10^{-5}	4.80×10^{-4}
ath03018	RNA yıkımı	28/114	1.49×10^{-4}	1.57×10^{-3}
ath03015	mRNA gözetim yolu	26/119	1.69×10^{-3}	1.63×10^{-2}
ath03440	Homolog rekombinasyon	15/60	4.17×10^{-3}	3.72×10^{-2}
ath03020	RNA polimeraz	13/52	7.41×10^{-3}	6.14×10^{-2}



Şekil 4. 30. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5µM 2,4-D için en anlamlı artış gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5µM 2,4-D için en anlamlı artış gösteren üç yolda rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: splisom yolağı için AT1G02840 (*RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein*), AT1G03330 (*Small nuclear ribonucleoprotein family protein*), AT1G06220 (*Ribosomal protein S5/Elongation factor G/III/V family protein*), AT1G07360 (*CCCH-type zinc finger family protein with RNA-binding domain-containing protein*), AT1G09760 (*U2 small nuclear ribonucleoprotein A*); DNA replikasyonu yolağı için AT1G07370 (*proliferating cellular nuclear antigen 1*), AT1G08130 (*DNA ligase 1*), AT1G21690 (*ATPase family associated with various cellular activities (AAA)*), AT1G44900 (*minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein*), AT1G63160 (*replication factor C 2*); ökaryotlarda ribozom biyogenezi yolağı içinse AT1G06720 (*P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein*), AT1G08410 (*P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein*), AT1G10300 (*Nucleolar GTP-binding protein*), AT1G10490 (*GNAT acetyltransferase (DUF699)*) ve AT1G15420 (*WD repeat protein*)'dir.

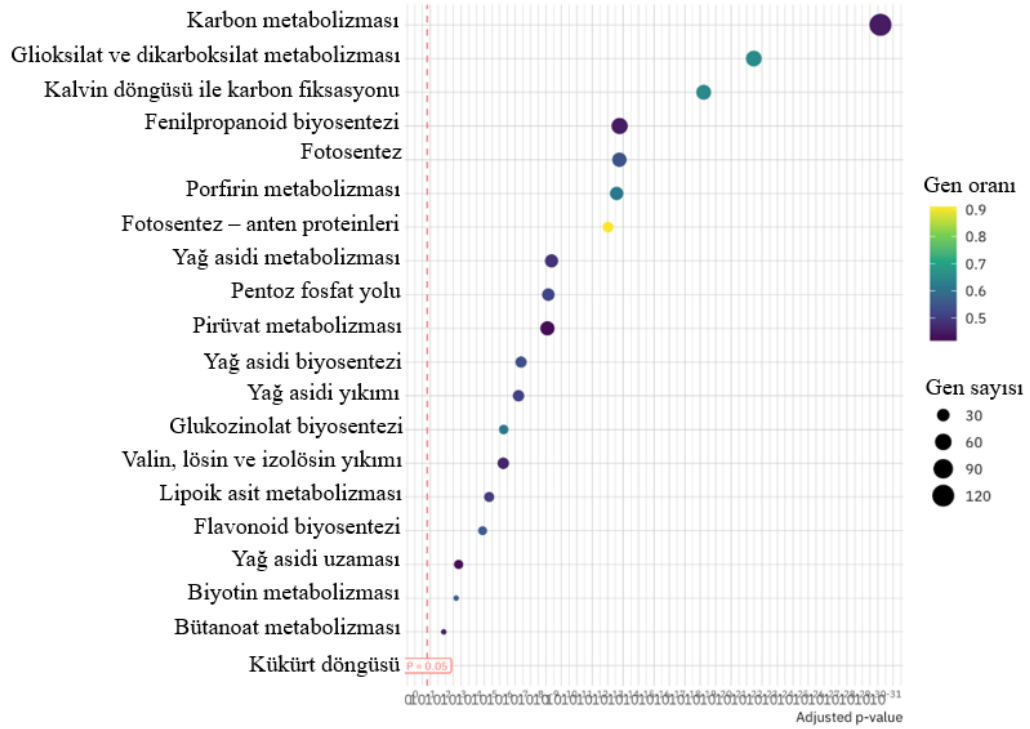
Tablo 4. 22. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5µM 2,4-D anlatımı azalan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath00630	Glikoksilat ve dikarboksilat metabolizması	54/81	7.69×10^{-13}	9.53×10^{-21}
ath01200	Karbon metabolizması	115/275	2.74×10^{-12}	1.09×10^{-19}
ath00940	Fenilpropanoid biyosentezi	66/127	3.93×10^{-12}	1.62×10^{-19}
ath00480	Glutasyon metabolizması	52/102	7.24×10^{-10}	2.44×10^{-13}
ath00190	Oksidatif fosforilasyon	72/170	1.27×10^{-14}	3.10×10^{-13}
ath00195	Fotosentez	43/77	2.41×10^{-10}	4.98×10^{-13}
ath00710	Calvin döngüsü ile karbon fiksasyonu	39/71	8.14×10^{-13}	2.59×10^{-12}
ath00196	Fotosentez- anten proteinleri	19/22	3.26×10^{-12}	5.05×10^{-11}
ath00071	Yağ asidi yıkımı	26/47	4.60×10^{-9}	6.34×10^{-10}
ath01210	2-Oksokarboksilik asit metabolizması	43/103	5.27×10^{-9}	6.34×10^{-10}
ath00860	Porfirin metabolizması	28/57	3.81×10^{-8}	5.01×10^{-9}
ath00380	Triptofan metabolizması	30/64	4.85×10^{-8}	5.01×10^{-9}
ath00966	Glukozinolat biyosentezi	17/26	7.67×10^{-8}	7.32×10^{-7}
ath00330	Arjinin ve prolin metabolizması	26/54	1.96×10^{-7}	1.73×10^{-6}
ath01240	Kofaktör biyosentezi	72/237	5.03×10^{-7}	4.46×10^{-6}

kümelendiği ve 1710 adet anlamlı düşüş gösteren genin 7 adet yolak içinde anlamlı olarak kümelendiği tespit edilmiştir (Şekil 4. 32 ve Şekil 4. 33). Tüm anlamlı değişkenlik gösteren genler dikkate alındığında, 40 adet yolakta anlamlı farklılık görülmüştür.

Tablo 4. 23. 10. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 anlatımı artan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath01200	Karbon metabolizması	123/275	1.78×10^{-33}	2.12×10^{-31}
ath00630	Glikoksilat ve dikarboksilat metabolizması	53/81	5.76×10^{-25}	3.42×10^{-23}
ath00710	Calvin döngüsü ile karbon fiksasyonu	46/71	1.53×10^{-21}	6.07×10^{-20}
ath00940	Fenilpropanoid biyosentezi	57/127	5.69×10^{-16}	1.69×10^{-14}
ath00195	Fotosentez	42/77	7.38×10^{-16}	1.76×10^{-14}
ath00860	Porfirin metabolizması	35/57	1.33×10^{-15}	2.64×10^{-14}
ath00196	Fotosentez- anten proteinleri	20/22	5.60×10^{-15}	9.52×10^{-14}
ath00010	Glikoliz / Glukoneogenez	48/119	1.47×10^{-11}	2.19×10^{-10}
ath01212	Yağ asidi metabolizması	34/70	3.31×10^{-11}	4.38×10^{-10}
ath01240	Kofaktör biyosentezi	75/237	4.94×10^{-11}	5.87×10^{-10}
ath00030	Pentoz fosfat yolu	30/58	6.49×10^{-11}	7.03×10^{-10}
ath00620	Pirüvat metabolizması	41/97	8.14×10^{-11}	8.07×10^{-10}
ath01230	Amino asit biyosentezi	73/242	1.04×10^{-9}	9.54×10^{-9}
ath00061	Yağ asidi biyosentezi	23/43	4.86×10^{-9}	4.13×10^{-8}
ath00071	Yağ asidi yıkımı	24/47	7.61×10^{-9}	6.04×10^{-8}

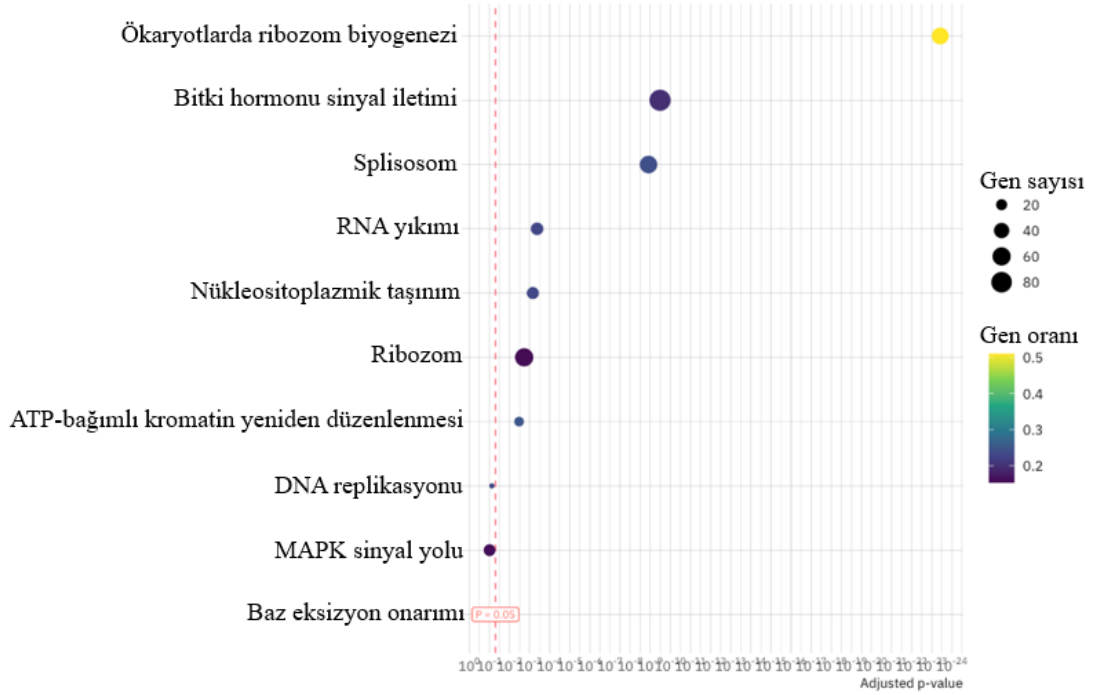


Şekil 4. 32. Karşılaştırma 10. gün 5 μ M 2,4-D – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı artış gösteren yolakların dot plot görselleştirmesi

Karşılaştırma 10. gün 5 μ M 2,4-D – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı artış gösteren üç yolakta rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: karbon metabolizması yolağı için AT1G01090 (*pyruvate dehydrogenase E1 alpha*), AT1G04410 (*Lactate/malate dehydrogenase family protein*), AT1G09420 (*glucose-6-phosphate dehydrogenase 4*), AT1G11860 (*Glycine cleavage T-protein family*), AT1G12230 (*Aldolase superfamily protein*); glikoksilat ve dikarboksilat metabolizması yolağı için AT1G04410 (*Lactate/malate dehydrogenase family protein*), AT1G11860 (*Glycine cleavage T-protein family*), AT1G12550 (*D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family protein*), AT1G17650 (*glyoxylate reductase 2*), AT1G20620 (*catalase 3*); Calvin döngüsü ile karbon fiksasyonu yolağı içinse AT1G04410 (*Lactate/malate dehydrogenase family protein*), AT1G12230 (*Aldolase superfamily protein*), AT1G12900 (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2*), AT1G23310 (*glutamate:glyoxylate aminotransferase*) ve AT1G32060 (*phosphoribulokinase*)'dır.

Tablo 4. 24. 10. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 anlatımı azalan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath03008	Ökaryotlarda ribozom biyogenezi	50/98	3.75×10^{-26}	3.79×10^{-24}
ath04075	Bitki hormonu sinyal iletimi	86/433	6.45×10^{-12}	3.26×10^{-10}
ath03040	Splisom	55/229	3.62×10^{-11}	1.22×10^{-9}
ath03018	RNA yıkımı	26/114	1.68×10^{-5}	4.25×10^{-4}
ath03013	Nükleositoplazmik taşıma	24/105	3.41×10^{-5}	6.88×10^{-4}
ath03010	Ribozom	60/393	1.11×10^{-4}	1.86×10^{-3}
ath03082	ATP-bağımlı kromatin yeniden düzenlenmesi	16/64	2.31×10^{-4}	3.34×10^{-3}
ath03030	DNA replikasyonu	10/43	5.94×10^{-3}	7.50×10^{-2}
ath04016	MAPK sinyal iletim yolu	23/144	8.70×10^{-3}	9.76×10^{-2}
ath03410	Baz eksizyon onarımı	16/50	1.74×10^{-2}	1.61×10^{-1}
ath03020	RNA polimeraz	10/52	2.26×10^{-2}	2.08×10^{-1}
ath01250	Nükleotid biyosentezi	16/41	2.79×10^{-2}	2.25×10^{-1}
ath00500	Nişasta ve sakkaroz metabolizması	24/172	3.48×10^{-2}	2.70×10^{-1}
ath00040	Pentoz ve glukuronat enterkonversiyonları	16/108	4.80×10^{-2}	3.46×10^{-1}
ath03430	Yanlış eşleşme onarımı	6/32	7.74×10^{-2}	3.89×10^{-1}



Şekil 4. 33. Karşılaştırma 10. gün 5 μ M 2,4-D – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı düşüş gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

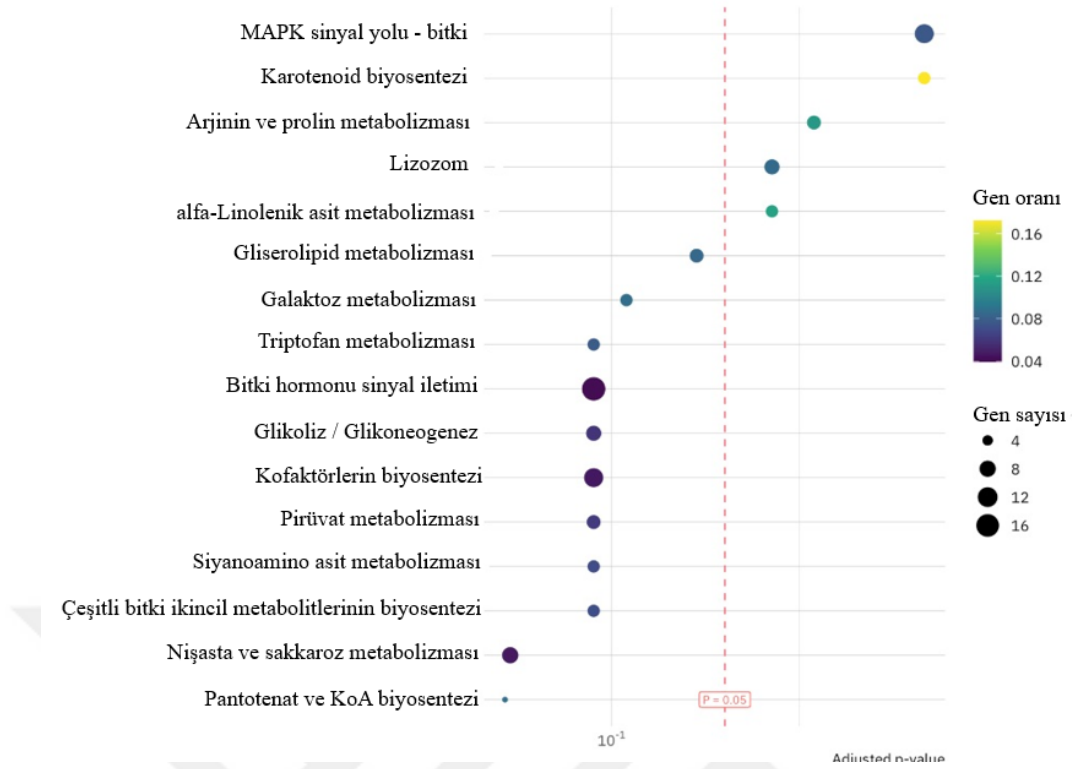
Karşılaştırma 10. gün 5 μ M 2,4-D – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı düşüş gösteren yolda rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: ökaryotlarda ribozom biyogenezi yolağı için AT1G06720 (*P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein*), AT1G08410 (*P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein*), AT1G10300 (*Nucleolar GTP-binding protein*), AT1G10490 (*GNAT acetyltransferase (DUF699)*), AT1G15420 (*WD repeat protein*); bitki hormonu sinyal iletimi yolağı için AT1G01360 (*regulatory component of ABA receptor 1*), AT1G04180 (*YUCCA 9*), AT1G04250 (*AUX/IAA transcriptional regulator family protein*), AT1G04310 (*ethylene response sensor 2*), AT1G04610 (*YUCCA 3*); splisozom yolağı içinse AT1G02840 (*RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein*), AT1G06220 (*Ribosomal protein S5/Elongation factor G/III/V family protein*), AT1G07170 (*PHF5-like protein*), AT1G09140 (*SERINE-ARGININE PROTEIN 30*) ve AT1G09760 (*U2 small nuclear ribonucleoprotein A*)'dir.

Karşılaştırma 5. gün B5 –10. gün B5 kapsamında, anlatım analizinde anlamlı değişkenlik gösteren genlerin (FDR < 0.05) hangi yolak gruplarında kümelendiği Tablo 4. 21 ve Tablo 4. 22'de belirtilmiştir. Bu tablolarda, tespit edilen tüm yollar FDR değerine göre düşükten yükseğe olarak sıralanmıştır. Buna göre 614 adet anlamlı

artış gösteren genin 5 adet yolak içinde anlamlı olarak kümелendiği ve 982 adet anlamlı düşüş gösteren genin 24 adet yolak içinde anlamlı olarak kümелendiği tespit edilmiştir (Şekil 4. 34 ve Şekil 4.35). Tüm anlamlı değişkenlik gösteren genler dikkate alındığında, 26 adet yolakta anlamlı farklılık görülmüştür.

Tablo 4. 25. Karşılaştırma 5. gün B5 – 10. gün B5 anlatımı artan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath04016	MAPK sinyal iletim yolu- bitki	11/144	2.77×10^{-4}	1.48×10^{-2}
ath00906	Karotenoid biyosentezi	5/29	3.55×10^{-4}	1.48×10^{-2}
ath00330	Arjinin ve prolin metabolizması	6/54	1.05×10^{-3}	2.90×10^{-2}
ath04142	Lizozom	7/82	1.95×10^{-3}	3.75×10^{-2}
ath00592	Alfa-linolenik asit metabolizması	5/43	2.26×10^{-3}	3.75×10^{-2}
ath00561	Gliserolipid metabolizması	6/71	4.30×10^{-3}	5.94×10^{-2}
ath00052	Galaktoz metabolizması	5/57	7.70×10^{-3}	9.13×10^{-2}
ath04075	Bitki hormonu sinyal iletimi	17/433	1.24×10^{-2}	1.12×10^{-1}
ath00380	Triptofan metabolizması	5/64	1.24×10^{-2}	1.12×10^{-1}
ath01240	Kofaktör biyosentezi	11/237	1.39×10^{-2}	1.12×10^{-1}
ath00010	Glikoliz / Glukoneogenez	7/119	1.48×10^{-2}	1.12×10^{-1}
ath00999	Çeşitli bitki ikincil metabolitlerinin biyosentezi	5/70	1.78×10^{-2}	1.12×10^{-1}
ath00620	Pirüvat metabolizması	6/97	1.88×10^{-2}	1.12×10^{-1}
ath00460	Siyanamino asit metabolizması	5/71	1.88×10^{-2}	1.12×10^{-1}
ath00500	Nişasta ve sakkaroz metabolizması	8/172	3.36×10^{-2}	1.86×10^{-1}

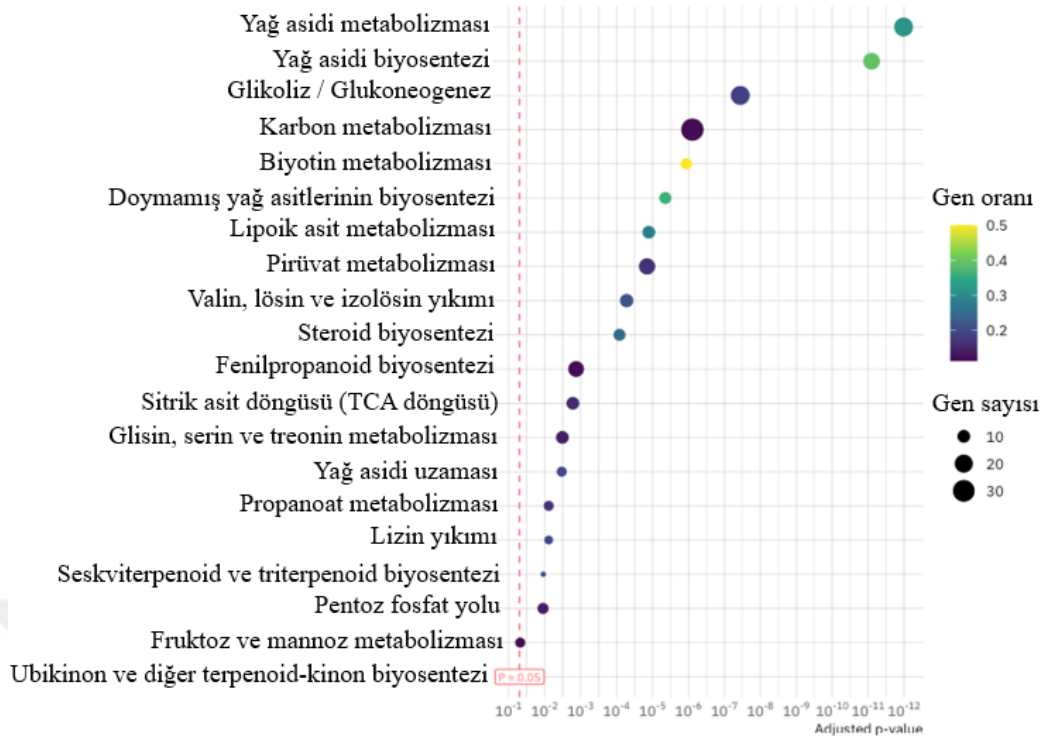


Şekil 4. 34. Karşılaştırma 5. gün B5 – 10. gün B5 için en anlamlı artış gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

Karşılaştırma 5. gün B5 – 10. gün B5 için en anlamlı artış gösteren üç yolda rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: MAPK sinyal iletim yolağı için AT1G60940 (*SNF1-related protein kinase 2.10*), AT1G78290 (*Protein kinase superfamily protein*), AT2G27050 (*ETHYLENE-INSENSITIVE3-like 1*), AT2G29380 (*highly ABA-induced PP2C protein 3*), AT3G20770 (*Ethylene insensitive 3 family protein*); karotenoid biyosentezi yolağı için AT1G31800 (*cytochrome P450, family 97, subfamily A, polypeptide 3*), AT4G25700 (*beta-hydroxylase 1*), AT5G52570 (*beta-carotene hydroxylase 2*), AT5G57030 (*Lycopene beta/epsilon cyclase protein*), AT5G67030 (*zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1)*); arjinin ve prolin metabolizması yolağı içinse AT1G08980 (*amidase 1*), AT1G23800 (*aldehyde dehydrogenase 2B7*), AT2G39800 (*delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase 1*), AT3G47450 (*P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein*) ve AT3G55610 (*delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthase 2*)'dir.

Tablo 4. 26. Karşılaştırma 5. gün B5 – 10. gün B5 anlatımı azalan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath01212	Yağ asidi metabolizması	22/70	1.01×10^{-14}	1.04×10^{-12}
ath00061	Yağ asidi biyosentezi	17/43	1.57×10^{-13}	8.07×10^{-12}
ath00010	Glikoliz / Glukoneogenez	22/119	1.05×10^{-9}	3.62×10^{-8}
ath01200	Karbon metabolizması	32/275	3.02×10^{-8}	7.78×10^{-7}
ath00780	Biyotin metabolizması	8/16	5.56×10^{-8}	1.15×10^{-6}
ath01040	Doymamış yağ asitlerinin biyosentezi	9/25	2.57×10^{-7}	4.41×10^{-6}
ath00785	Lipoik asit metabolizması	10/36	8.60×10^{-7}	1.27×10^{-5}
ath00620	Pirüvat metabolizması	16/97	1.10×10^{-6}	1.42×10^{-5}
ath00280	Valin, lösin ve izölösün yıkımı	11/52	4.58×10^{-6}	5.24×10^{-5}
ath00100	Steroid biyosentezi	9/36	8.05×10^{-6}	8.29×10^{-5}
ath00940	Fenilpropanoid biyosentezi	15/127	1.43×10^{-4}	1.64×10^{-3}
ath00020	Sitrik asit döngüsü (TCA döngüsü)	10/64	1.91×10^{-4}	1.64×10^{-3}
ath00260	Glisin, serin ve treonin metabolizması	10/70	4.06×10^{-4}	3.22×10^{-3}
ath00062	Yağ asidi uzaması	7/36	4.55×10^{-4}	3.35×10^{-3}
ath00640	Propanoat metabolizması	7/42	1.20×10^{-3}	7.13×10^{-3}



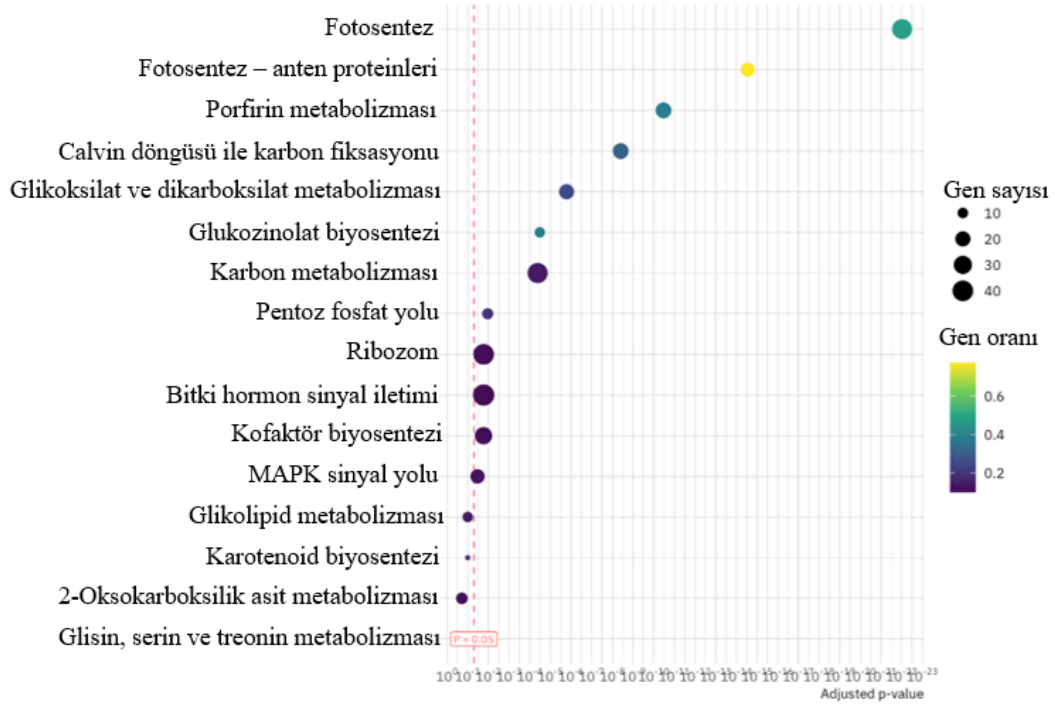
Şekil 4. 35. Karşılaştırma 5. gün B5 – 10. gün B5 için en anlamlı düşüş gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

Karşılaştırma 5. gün B5 – 10. gün B5 için en anlamlı düşüş gösteren yolda rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: yağ asidi metabolizması yolağı için AT1G04710 (*peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 4*), AT1G24360 (*NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein*), AT1G24470 (*beta-ketoacyl reductase 2*), AT1G62640 (*3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III*), AT1G67730 (*beta-ketoacyl reductase 1*); yağ asidi biyosentezi yolağı için AT1G24360 (*NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein*), AT1G62640 (*3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III*), AT1G74960 (*fatty acid biosynthesis 1*), AT1G77590 (*long chain acyl-CoA synthetase 9*), AT2G05990 (*long chain acyl-CoA synthetase 9*); glikoliz / glukoneogenez yolağı içinse AT1G01090 (*pyruvate dehydrogenase E1 alpha*), AT1G12000 (*Phosphofructokinase family protein*), AT1G22170 (*Phosphoglycerate mutase family protein*), AT1G30120 (*pyruvate dehydrogenase E1 beta*) ve AT1G34430 (*2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein*)'dur.

Karşılaştırma 5. gün 2.5 µM BIX-01294 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 kapsamında, anlatım analizinde anlamlı değişkenlik gösteren genlerin (FDR < 0.05) hangi yolak gruplarında kümelendiği Tablo 4. 23 ve Tablo 4. 24’te belirtilmiştir. Bu tablolarda, tespit edilen tüm yolaklar FDR değerine göre düşükten yükseğe olarak sıralanmıştır. Buna göre 1398 adet anlamlı artış gösteren genin 12 adet yolak içinde anlamlı olarak kümelendiği ve 1004 adet anlamlı düşüş gösteren genin 16 adet yolak içinde anlamlı olarak kümelendiği tespit edilmiştir (Şekil 4. 36 ve Şekil 4. 37). Tüm anlamlı değişkenlik gösteren genler dikkate alındığında, 20 adet yolakta anlamlı farklılık görülmüştür.

Tablo 4. 27. Karşılaştırma 5. gün 2,5 µM BIX-01294 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 anlatımı artan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath00195	Fotosentez	37/77	9.22×10^{-25}	9.68×10^{-23}
ath00196	Fotosentez – anten proteinleri	17/22	5.45×10^{-17}	2.86×10^{-15}
ath00860	Porfirin metabolizması	22/57	9.70×10^{-13}	3.40×10^{-11}
ath00710	Calvin döngüsü ile karbon fiksasyonu	22/71	1.52×10^{-10}	3.99×10^{-9}
ath00630	Glikoksilat ve dikarboksilat metabolizması	20/81	7.89×10^{-8}	1.66×10^{-6}
ath00966	Glukozinolat biyosentezi	10/26	1.87×10^{-6}	3.27×10^{-5}
ath01200	Karbon metabolizması	38/275	2.78×10^{-6}	4.17×10^{-5}
ath00030	Pentoz fosfat yolu	11/58	8.30×10^{-4}	1.09×10^{-2}
ath03010	Ribozom	40/394	1.57×10^{-3}	1.71×10^{-2}
ath04075	Bitki hormon sinyal iletimi	43/433	1.63×10^{-3}	1.71×10^{-2}
ath01240	Kofaktör biyosentezi	27/237	1.82×10^{-3}	1.73×10^{-2}
ath04016	MAPK sinyal yolu – bitki	18/144	3.85×10^{-3}	3.37×10^{-2}
ath00561	Glikolipid metabolizması	10/71	1.28×10^{-2}	1.01×10^{-1}
ath00906	Karotenoid biyosentezi	6/32	1.34×10^{-2}	1.01×10^{-1}
ath01210	2-Oksokarboksilik asit metabolizması	12/103	2.77×10^{-2}	1.94×10^{-1}

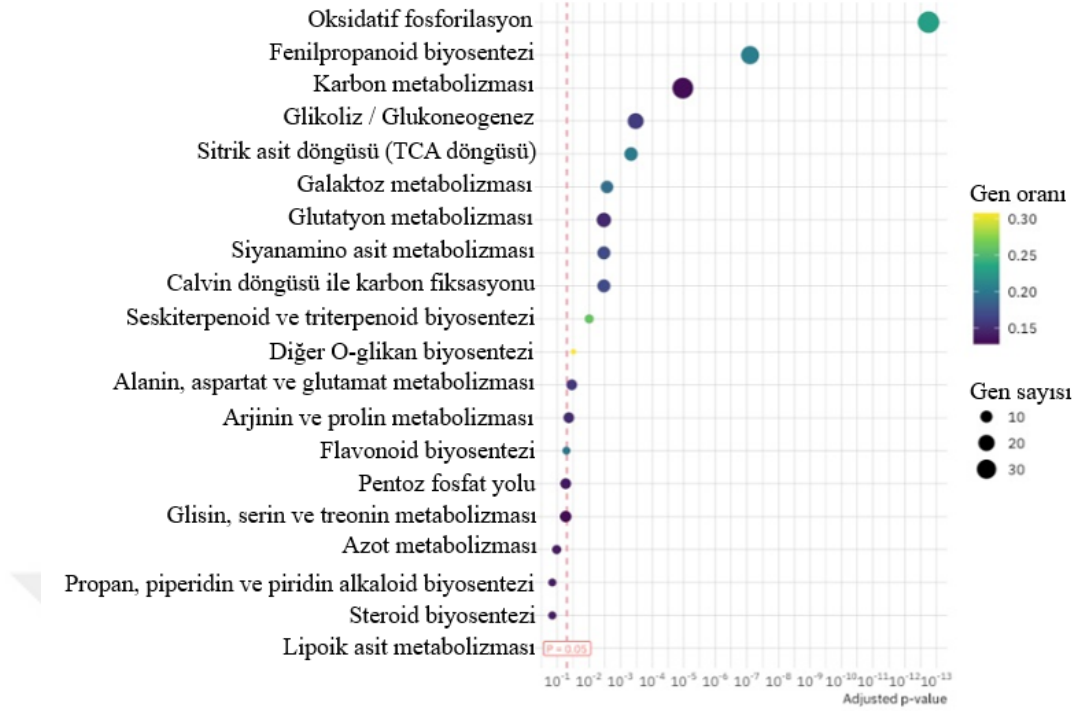


Şekil 4. 36. Karşılaştırma 5. gün 2,5 µM BIX-01294 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı artış gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

Karşılaştırma 5. gün 2,5 µM BIX-01294 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 için en anlamlı artış gösteren üç yolda rol oynayan genlerin ID’leri şu şekildedir: fotosentez yolağı için AT1G03130 (*photosystem I subunit D-2*), AT1G03600 (*photosystem II family protein*), AT1G06680 (*photosystem II subunit P-1*), AT1G08380 (*photosystem I subunit O*), AT1G10960 (*ferredoxin 1*); fotosentez-anten proteinleri için AT1G15820 (*light harvesting complex photosystem II subunit 6*), AT1G19150 (*PSI type II chlorophyll a/b-binding protein (Lhca2*1)*), AT1G29920 (*chlorophyll A/B-binding protein 2*), AT1G29930 (*chlorophyll A/B binding protein 1*), AT1G45474 (*photosystem I light harvesting complex protein 5*); porfirin metabolizması yolağı içinse AT1G03475 (*Coproporphyrinogen III oxidase*), AT1G03630 (*protochlorophyllide oxidoreductase C*), AT1G08520 (*ALBINA 1*), AT1G44446 (*Pheophorbide a oxygenase family protein with Rieske 2Fe-2S domain-containing protein*), AT1G58290 (*Glutamyl-tRNA reductase family protein*)’dir.

Tablo 4. 28. Karşılaştırma 5. gün 2,5 µM BIX-01294 – 10. gün 2,5 µM BIX-01294 anlatımı azalan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath00190	Oksidatif fosforilasyon	39/170	1.80×10^{-15}	1.77×10^{-13}
ath00940	Fenilpropanoid biyosentezi	26/127	1.62×10^{-9}	7.96×10^{-8}
ath01200	Karbon metabolizması	36/275	3.27×10^{-7}	1.07×10^{-5}
ath00010	Glikoliz / Glukoneogenez	19/119	1.36×10^{-5}	3.34×10^{-4}
ath00020	Sitrik asit döngüsü (TCA döngüsü)	13/64	2.39×10^{-5}	4.68×10^{-4}
ath00052	Galaktoz metabolizması	11/57	1.65×10^{-4}	2.70×10^{-3}
ath00480	Glutasyon metabolizması	15/102	2.84×10^{-4}	3.40×10^{-3}
ath00460	Siyanamino asit metabolizması	12/71	3.12×10^{-4}	3.40×10^{-3}
ath00710	Calvin döngüsü ile karbon fiksasyonu	12/71	3.12×10^{-4}	3.40×10^{-3}
ath00909	Seskitrpenoid ve triterpenoid biyosentezi	6/23	1.01×10^{-3}	9.87×10^{-3}
ath00500	Nişasta ve sakkaroz metabolizması	19/172	1.83×10^{-3}	1.63×10^{-2}
ath00514	Diğer O-glikan biyosentezi	4/13	3.82×10^{-3}	3.12×10^{-2}
ath00040	Pentoz ve glukuronat	13/108	4.52×10^{-3}	3.41×10^{-2}
ath00250	Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	8/51	5.02×10^{-3}	3.52×10^{-2}
ath04145	Fagozom	11/86	5.52×10^{-3}	3.61×10^{-2}



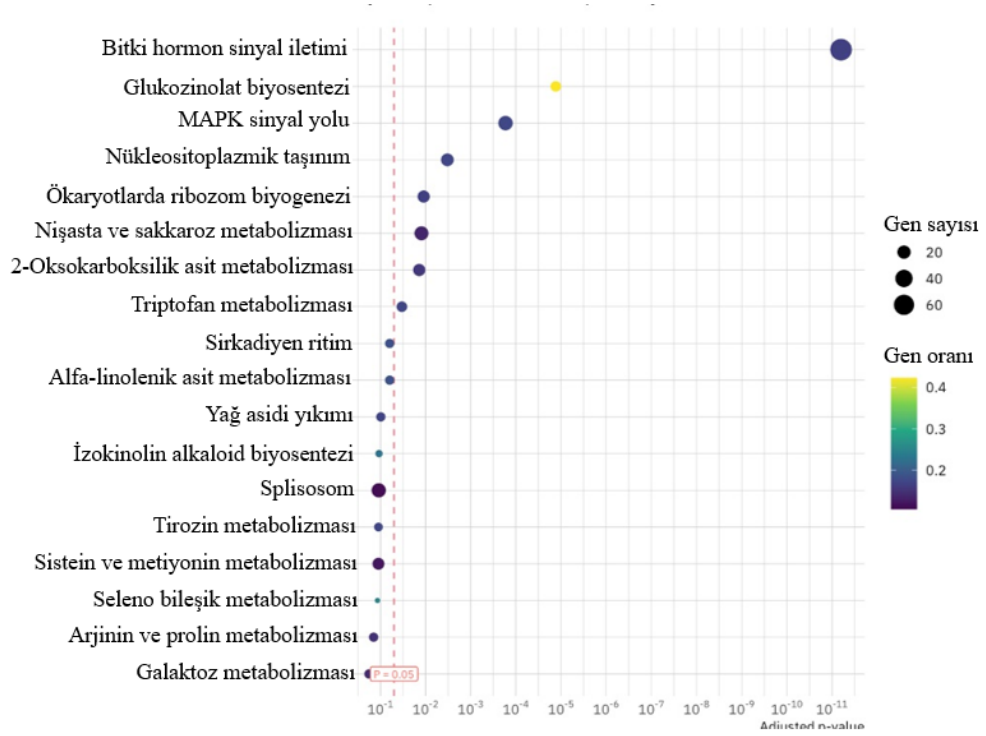
Şekil 4. 37. Karşılaştırma 5. gün 2,5 μ M BIX-01294 – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı azalış gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

Karşılaştırma 5.gün 2,5 μ M BIX-01294 – 10.gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı azalış gösteren üç yolda rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: oksidatif fosforilasyon yolağı için AT1G15120 (*Ubiquinol-cytochrome C reductase hinge protein*), AT1G19910 (*ATPase, F0/V0 complex, subunit C protein*), AT1G20260 (*ATPase, VI complex, subunit B protein*), AT1G22840 (*CYTOCHROME C-1*), AT1G49140 (*NADH dehydrogenase ubiquinone 1 beta subcomplex subunit 10-B-like protein (Complex I subunit NDUF56)*); fenilpropanoid biyosentezi için AT1G05240 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G05250 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G14540 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G30870 (*Peroxidase superfamily protein*), AT1G34510 (*Peroxidase superfamily protein*); karbon metabolizması yolağı içinse AT1G22440 (*Zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein*), AT1G24180 (*thiamine diphosphate-binding fold (THDP-binding) superfamily protein*), AT1G36370 (*serine hydroxymethyltransferase 7*), AT1G70580 (*alanine-2-oxoglutarate aminotransferase 2*), AT1G78050 (*phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase*), AT1G58290 (*Glutamyl-tRNA reductase family protein*)'dır.

Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 5 µM 2,4-D kapsamında, anlatım analizinde anlamlı değişkenlik gösteren genlerin (FDR < 0.05) hangi yolak gruplarında kümelendiği Tablo 4. 25 ve Tablo 4. 26’da belirtilmiştir. Bu tablolarda, tespit edilen tüm yollar FDR değerine göre düşükten yükseğe olarak sıralanmıştır. Buna göre 1266 adet anlamlı artış gösteren genin 8 adet yolak içinde anlamlı olarak kümelendiği ve 1584 adet anlamlı düşüş gösteren genin 16 adet yolak içinde anlamlı olarak kümelendiği tespit edilmiştir (Şekil 4. 38 ve 4. 39). Tüm anlamlı değişkenlik gösteren genler dikkate alındığında, 23 adet yolda anlamlı farklılık görülmüştür.

Tablo 4. 29. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 10.gün 5 µM 2,4-D anlatımı artan genler

ID	Yolak	Gen Oramı	P Değeri	FDR
ath04075	Bitki hormon sinyal iletimi	71/433	5.77×10^{-14}	6.29×10^{-12}
ath00966	Glukozinolat biyosentezi	11/26	2.40×10^{-7}	1.31×10^{-5}
ath04016	MAPK sinyal yolu – bitki	25/144	4.66×10^{-6}	1.69×10^{-4}
ath03013	Nükleositol plazmik taşınım	18/105	1.20×10^{-4}	3.28×10^{-3}
ath03008	Ökaryotlarda ribozom biyogenezi	16/98	5.05×10^{-4}	1.10×10^{-2}
ath00500	Nişasta ve sakkaroz metabolizması	23/172	6.77×10^{-4}	1.23×10^{-2}
ath01210	2-Oksokarboksilik asit metabolizması	16/103	8.86×10^{-4}	1.38×10^{-2}
ath00380	Triptofan metabolizması	11/64	2.45×10^{-3}	3.34×10^{-2}
ath00592	Alfa-linolenik asit metabolizması	8/43	5.71×10^{-3}	6.22×10^{-2}
ath04712	Sirkadiyen ritim – bitki	8/43	5.71×10^{-3}	6.22×10^{-2}
ath00071	Yağ asidi yıkımı	8/47	9.87×10^{-3}	9.78×10^{-2}
ath00950	İzokinolin alkaloid biyosentezi	5/22	1.18×10^{-2}	1.07×10^{-1}
ath03040	Splisom	24/229	1.30×10^{-2}	1.09×10^{-1}
ath00270	Sistein ve metiyonin metabolizması	15/125	1.49×10^{-2}	1.10×10^{-1}
ath00350	Tirozin metabolizması	7/41	1.52×10^{-2}	1.10×10^{-1}

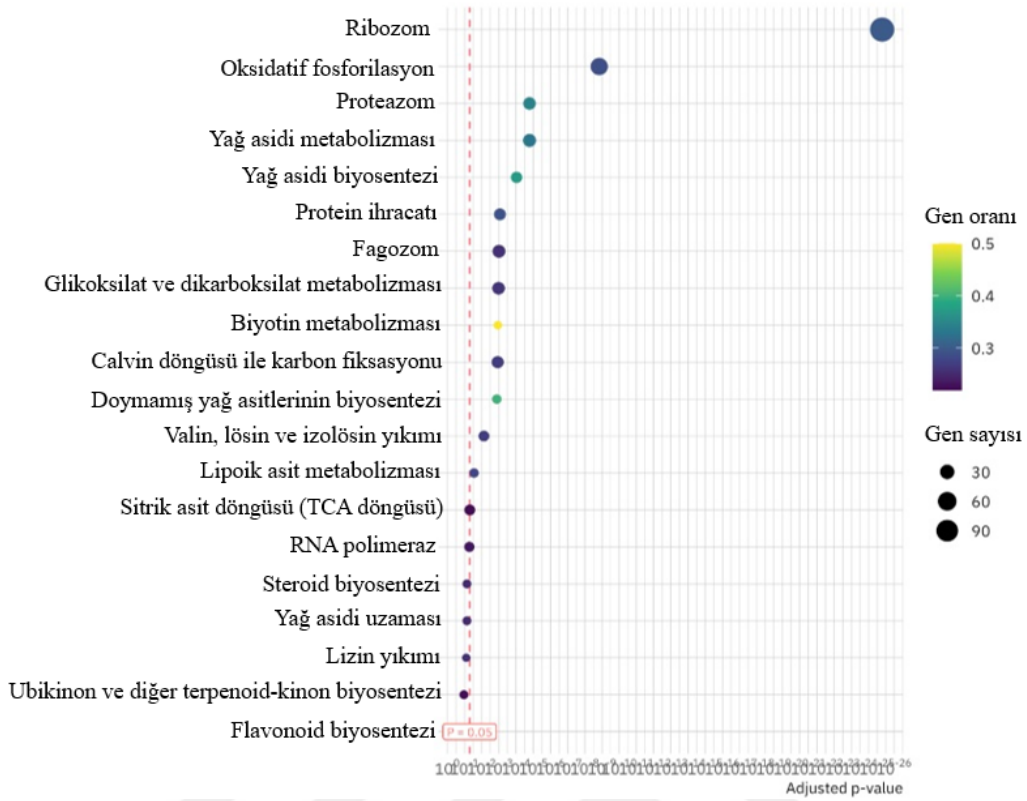


Şekil 4. 38. Karşılaştırma 5. gün 5 μ M 2,4-D – 10. gün 5 μ M 2,4-D için en anlamlı artış gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

Karşılaştırma 5. gün 5 μ M 2,4-D – 10. gün 5 μ M 2,4-D için en anlamlı artış gösteren üç yolda rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: bitki hormon sinyal iletimi yolağı için AT1G04240 (*AUX/IAA transcriptional regulator family protein*), AT1G10470 (*response regulator 4*), AT1G19220 (*auxin response factor 19*), AT1G19850 (*Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-like protein*), AT1G27320 (*Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-like protein*); glukozinolat biyosentezi için AT1G16400 (*cytochrome P450, family 79, subfamily F, polypeptide 2*), AT1G18590 (*sulfotransferase 17*), AT1G24100 (*UDP-glucosyl transferase 74B1*), AT1G74090 (*desulfo-glucosinolate sulfotransferase 18*), AT1G74100 (*sulfotransferase 16*); MAPK sinyal yolu yolağı içinse AT1G10210 (*mitogen-activated protein kinase 1*), AT1G20620 (*catalase 3*), AT1G72770 (*HYPERSENSITIVE TO ABA1*), AT1G78290 (*Protein kinase superfamily protein*), AT2G23030 (*SNF1-related protein kinase 2.9*)'dır.

Tablo 4. 30. Karşılaştırma 5. gün 5 µM 2,4-D – 10. gün 5 µM 2,4-D anlatımı azalan genler

ID	Yolak	Gen Oranı	P Değeri	FDR
ath03010	Ribozom	118/394	4.12×10^{-28}	5.07×10^{-26}
ath00190	Oksidatif fosforilasyon	49/170	2.36×10^{-18}	4.13×10^{-16}
ath01212	Yağ asidi metabolizması	23/70	5.38×10^{-7}	1.65×10^{-5}
ath03050	Proteazom	21/63	5.38×10^{-7}	1.65×10^{-5}
ath00061	Yağ asidi biyosentezi	16/43	3.83×10^{-6}	9.42×10^{-5}
ath01200	Karbon metabolizması	51/275	4.20×10^{-5}	8.60×10^{-4}
ath03060	Protein ihracatı	18/62	4.97×10^{-5}	8.73×10^{-4}
ath04145	Fagozom	22/86	6.46×10^{-5}	1.04×10^{-3}
ath00630	Glikoksilat ve dikarboksilat metabolizması	21/81	7.65×10^{-5}	1.03×10^{-3}
ath00780	Biyotin metabolizması	8/16	9.36×10^{-5}	1.15×10^{-3}
ath00710	Calvin döngüsü ile karbon fiksasyonu	19/71	1.05×10^{-4}	1.18×10^{-3}
ath01040	Doymamış yağ asitleri biyosentezi	10/25	1.29×10^{-4}	1.32×10^{-3}
ath00280	Valin, lösin ve izölösin yıkımı	14/52	7.87×10^{-4}	7.45×10^{-3}
ath00010	Glikoliz / Glukoneogenez	24/119	1.42×10^{-3}	1.20×10^{-2}
ath00785	Lipoik asit metabolizması	10/36	3.39×10^{-3}	2.78×10^{-2}



Şekil 4. 39. Karşılaştırma 5. gün 5 μ M 2,4-D – 10. gün 5 μ M 2,4-D için en anlamlı azalış gösteren yolların dot plot görselleştirmesi

Karşılaştırma 5. gün 2,5 μ M BIX-01294 – 10. gün 2,5 μ M BIX-01294 için en anlamlı azalış gösteren üç yolda rol oynayan genlerin ID'leri şu şekildedir: ribozom yolağı için AT1G01100 (*60S acidic ribosomal protein family*), AT1G09590 (*Translation protein SH3-like family protein*), AT1G09690 (*Translation protein SH3-like family protein*), AT1G15250 (*Zinc-binding ribosomal protein family protein*), AT1G16740 (*Ribosomal protein L20*); oksidatif fosforilasyon için AT1G04630 (*GRIM-19 protein*), AT1G12840 (*vacuolar ATP synthase subunit C (VATC) / V-ATPase C subunit / vacuolar proton pump C subunit (DET3)*), AT1G15120 (*Ubiquinol-cytochrome C reductase hinge protein*), AT1G16700 (*Alpha-helical ferredoxin*), AT1G22450 (*cytochrome C oxidase 6B*); yağ asidi metabolizması yolağı içinse AT1G04710 (*peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 4*), AT1G24360 (*NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein*), AT1G24470 (*beta-ketoacyl reductase 2*), AT1G62640 (*3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III*), AT1G67730 (*beta-ketoacyl reductase I*)'dir.

5. TARTIŞMA

Epigenetik düzenlemeler, gen anlatımının ve hücrel farklılaşmanın kontrolünde merkezi bir rol oynar ve bu mekanizmalar hem hayvanlarda hem de bitkilerde birçok temel süreçte korunmuştur. Ayrıca, bitkiler ve memeliler gen düzenlemesi için DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarını (PTM'ler) benzer şekilde kullanırlar. Genel olarak, genom organizasyonu ve epigenetik düzenlemenin farklı model sistemlerde karşılaştırılması, bitkiler ve memeliler arasında beklenenden daha fazla benzerliğin bulunduğunu göstermektedir. Memelilerde veya bitkilerde keşfedilen epigenetik mekanizmalar genellikle her iki sistemle de ilgilidir (Pikaard ve ark., 2014). Epigenetik gen susturulması memelilerde ve bitkilerde gelişimsel süreçlerde, hücre farklılaşması ve yeniden programlamasında önemli rol oynamaktadır (Feng ve ark., 2011).

Somatik hücrelerin somatik embriyogenez aracılığıyla yeniden programlanma ve farklılaşma mekanizmalarının anlaşılması, gelişim biyolojisi araştırmalarının temel odak noktalarından biri olmaya devam etmektedir. *Arabidopsis*'te SE indüksiyonu üzerine yapılan çalışmalar, embriyonik geçişi düzenleyen karmaşık gen ağını ortaya koymuş ve SE ile ilişkili genlerin aktivasyonunda rol oynayan epigenetik mekanizmaların aydınlatılması gerektiğini göstermiştir (Wojcikowska ve ark., 2024). Bu tez çalışmasında, *in vitro* koşullar altında yetiştirilmiş *Arabidopsis thaliana* Col-0 bitkilerinde, BIX-01294 histon metiltransferaz inhibitörünün somatik embriyogenez (SE) üzerine etkileri transkriptomik olarak incelenmiştir. *Arabidopsis*'te SE indüksiyonu genellikle olgunlaşmamış zigotik embriyolardan elde edilen eksplantlara, sentetik bir oksin olan 2,4-D'nin uygulanmasına dayanmaktadır.

Bu tez çalışmasında, yeniden programlama ajanı histon metiltransferaz inhibitörü BIX-01294 ile benzer bir strateji ile embriyo kültüründe gerçekleştirilen uygulamanın da SE indüksiyonuyla sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu sonuç, literatürde yer alan farklı bitki türlerinde (Berenguer ve ark., 2017) rapor edilen çalışmalarla uyumludur ve histon metilasyonunun bitki somatik hücrelerinin embriyonik yeniden programlanmasında kritik bir düzenleyici rol oynadığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu sonuç *Arabidopsis thaliana* gibi bir model organizmada BIX-01294'ün somatik embriyogenez üzerindeki etkisinin ilk kez gösterilmesi bakımından özgünlük taşımaktadır.

Somatik embriyogenez sürecinin değerlendirilmesinde kontrol gruplarının morfolojik gelişimleri önemli bir karşılaştırma ölçütü sunmaktadır. *A. thaliana* bitkilerinin kontrol gruplarında (2,4-D ve BIX-01294 inhibitörü uygulanmayan) olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında 5. günden sonra kotiledon yapısı gözlemlenmiştir. 15. güne gelindiğinde ise gerçek yaprakların sayısının artışı ile bitkiciklerin oluştuğu saptanmıştır. Ancak oksin ve BIX-01294 inhibitörü içeren ortamlarda kültüre alınan olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında, somatik embriyo indüksiyonunun 10. gününde protuberans yapılarının belirginleştiği ve kültürün ilerleyen günlerinde bu yapıların tipik SE morfolojisine dönüştüğü gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, literatürde SE indüksiyonunun 10. gününde protuberans oluşumunun belirginleştiğini bildiren çalışmalar ile uyum göstermektedir (Wójcikowska ve ark., 2018). Protuberans oluşumunun, erken embriyogenez sürecinde *YUC* ve *WOX* genlerinin anlatımının artışıyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Karami ve ark., 2023; Wójcikowska ve ark., 2018). Histon asetilasyonunun SE süreci üzerindeki etkisi bilinmekle birlikte, bu tez kapsamında elde edilen bulgular ve literatürdeki güçlü kanıtlar, histon metilasyonunun da embriyogenez mekanizmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Özellikle histon 3'teki 9. lizinin metilasyonunun bir inhibitör ajan aracılığıyla engellenmesinin somatik embriyo oluşumuyla ilişkili olabileceği öngörülmektedir. Literatürde, BIX-01294'ün bitkilerde somatik embriyogenez indüksiyonu üzerindeki etkisine ilişkin tek bir çalışma bulunmaktadır. Mikrospor embriyogenezinin BIX-01294 inhibitörü ile indüklendiği bu çalışmada, uygulamanın 0,5-1 μ M dozlarının *Brassica napus* ve *Hordeum vulgare* mikrospor kültürlerinde H3K9 metilasyonunu azalttığı ve hücrenin yeniden programlaması ile birlikte hücre farklılaşmasına yol açtığı bildirilmiştir (Berenguer ve ark., 2017). Benzer şekilde insan/memeli hücrelerinde BIX-01294'ün etkilerinin histon metilasyonu ile ilişkilendirildiği pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. İnsan glioma kök hücrelerinde 1-2 μ M BIX-01294'ün H3K9me2 ve H3K27me3 düzeylerini düşürdüğü ve otofaji/diferansiasyon süreçlerini başlattığı bildirilmiştir (Ciechomska ve ark., 2016). Memeli SCNT (Somatic cell nuclear transfer) embriyolarında ise 1 μ M BIX-01294'ün gelişimi artırdığı, H3K9me2 düzeylerini düşürdüğü rapor edilmiştir (Cao ve ark., 2017).

Bu tez çalışmasında, olgunlaşmamış zigotik embriyolardan somatik embriyogenez indüksiyonu, oksin varlığında %31,25, 2,5 μ M BIX-01294 uygulamasında ise %35,41 oranında gerçekleşmiştir. Berenguer ve ark., (2017)'nin yaptıkları çalışmada 2,5 μ M

BIX-01294'ün *Brassica napus* mikrospor embriyogeneziyi yaklaşık %50 oranında indüklemesi bulgularımız ile paralellik göstermektedir. Buna ek olarak, 0.5 µM BIX-01294 uygulamasında *Hordeum vulgare* bitkilerinde bu oran yaklaşık %70 olarak rapor edilmiştir (Berenguer ve ark., 2017). Benzer şekilde, klasik oksin temelli SE indüksiyon protokollerinde bildirilen oranlar genellikle %40-60 aralığındadır (Mozgova ve ark., 2017; Sivilay ve ark., 2023). Bu bulgular ve literatürdeki güçlü kanıtlar, BIX-01294'ün somatik embriyogenezi indüklediğini göstermekle birlikte, epigenetik inhibitörlerin bitki hücrelerinde doza ve türe bağlı olarak gelişimsel yeniden programlamayı düzenleyebileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu tez çalışmasında, tek bir eksplant üzerinde oluşan somatik embriyo sayısının 5 µM 2,4-D uygulanan gruba kıyasla 3,95 kat artması dikkat çekici bir bulgudur. Bu bulgu, Wojcikowska ve arkadaşlarının (2024) *Arabidopsis* bitkisinde IZE'lerden SE indükledikleri çalışmalarında, HDAC inhibitörü olan 0,5 µM TSA'nın 5 µM 2,4-D uygulanan gruba kıyasla tek bir eksplant üzerinde oluşan embriyo sayısını 1,8 kat arttırdığı yönündeki raporlarıyla paralellik göstermektedir (Wojcikowska ve ark., 2018).

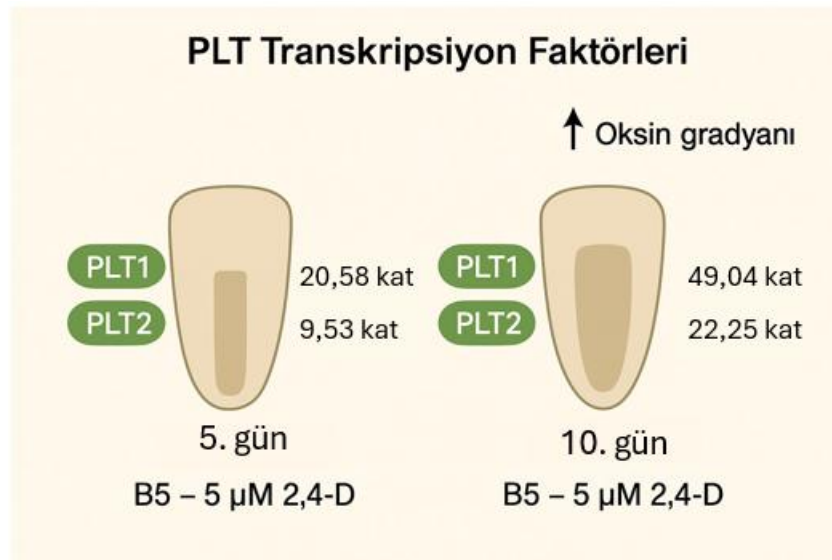
Somatik embriyogenez sürecinde hücrel farklılaşma ve yeniden programlanmanın incelenmesinde, lipid birikiminin boyama teknikleri ve mikroskopik yöntemler ile saptanması dokuların embriyonik olup olmadığının anlaşılmasında önemli bir göstergedir. Sudan Red 7B boyası, nötr lipidler (triasilgliserol ve bazı esterler) ile hidrofilik etkileşimler kurarak bağlanır. Bu sebeple hücrelerdeki lipid birikimi ile doğru orantılı olarak boyanan dokularda kırmızı lekeler görünür hale gelir. Somatik embriyogenezde hücrel yeniden programlanma, enerji depolanmasını sağlayan nötr lipidlerin belirgin şekilde artışıyla ilişkilidir ve bu birikim zigotik embriyolara benzer bir metabolik profilin oluşmasına yol açar (Blanckaert ve ark., 2000). 2,4-D oksin ve BIX-01294 inhibitör uygulama gruplarında, oluşan yapıların embriyonik dokuya ait olduğu, nötr lipid triasilgliserol birikimlerinin Sudan Red 7B boyası kullanılarak gösterilmesiyle doğrulanmıştır (Şekil 4.13). Sudan Red 7B, yalnızca *Arabidopsis* gibi model organizmada değil, narenciye ve çeltik gibi farklı türlerde de somatik embriyogenez sürecindeki lipid birikimini göstermek için kullanılmıştır (Wu ve ark., 2024; Purwestri ve ark., 2023; Wojcikowska ve ark., 2024; Kadokura ve ark., 2018; Mozgova ve ark., 2017).

Arabidopsis thaliana'da somatik embriyogenez ile ilişkili TF'ler ve potansiyel gen yolları GO ve KEGG analizleri ile belirlenmiştir. Moleküler düzeyde, farklılaşmış bir dokudan embriyonik bir dokuya başarılı bir geçiş, hücre kimliğini yeniden programlamak için gerekli olan anahtar gen anlatım profillerinin harekete geçirilmesini de gerektirir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, SE sürecinde hücre yeniden programlanması ve totipotensinin, epigenetik işaretler, transkripsiyon faktörleri ve oksin arasındaki karşılıklı etkileşimlerden oluşan karmaşık bir düzenleyici ağ tarafından kontrol edildiğini ortaya koymuştur. Bu ağ, normal koşullarda somatik hücrelerde baskılanmış durumda bulunurken, stres koşulları veya eksojen 2,4-D uygulaması gibi dışsal uyarılarla yeniden aktive edilebilmektedir. Ibanez ve arkadaşları (2020), *Arabidopsis*'te gerçekleştirdikleri çalışmada, SE indüksiyonunun, DNA metilasyonu, H3K9me2 veya H3K27me3 gibi epigenetik baskılayıcı işaretlerin kaldırılması ve histon asetilasyonu artmasına yol açarak, *LEC1*, *LEC2*, *BBM* veya *AGL15* gibi spesifik transkripsiyon faktörlerinin anlatımına izin verdiği ve bu faktörlerin oksin biyosentezini ve sinyallemesini aktive ederek nihayetinde totipotens kazanımına ve SE başlatılmasına yol açtığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, DEG analizleri sonucunda 10. gün kontrole kıyasla 10. gün 5 µM 2,4-D ve 2,5 µM BIX-01294 uygulamalarında, IZE'lerden somatik embriyogenez indüklenmesi sürecinde ana düzenleyici olan TF'ler belirlenmiştir. 10. Gün kontrol grubuna kıyasla hem 10. Gün 2,5 µM BIX-01294 hem de 10.gün 5 µM 2,4-D uygulanan grupta *LEC1*, *PHV*, *PHB*, *FUS3*, *AGL15*, *SERK1* ve *PLT17* gibi somatik embriyogenez sürecinde ana düzenleyici (master regülatör) olan TF genlerinin anlatımında artış olması, epigenetik yeniden programlamada ortak bir genetik yanıtın tetiklendiğini düşündürmektedir. Ek olarak, SE sürecinde anlatımı farklılık gösteren *WOX5*, *WOX7*, *WOX11*, *PLT1*, *PLT2*, *PLT3*, *PLT4*, *PLT7* gibi diğer ana düzenleyici TF'leri de 10.gün kontrole kıyasla 10.gün 5 µM 2,4-D uygulamasında saptanmıştır. Bu genlerin anlatımının artışı embriyogenez sürecinin yalnızca morfolojik olarak değil moleküler düzeyde de başladığının göstergesidir (Karami ve ark., 2023).

Bu tez çalışmasında anlatımı değişiklik gösteren ana düzenleyici TF genlerinden birisi olan *WOX5*, bitkilerde hücrel yeniden programlama süreçlerinde önemli bir transkripsiyon faktörüdür ve farklılaşmış hücrelerin pluripotent duruma geri dönmesini teşvik eden genetik düzenleyicilerden biri olarak bilinmektedir (Wojcik ve ark., 2025). *WOX5* geninin yalnızca 5. (3,42 kat) ve 10. gün (4,16 kat) 5 µM 2,4-D uygulamasında anlamlı şekilde artması, bu genin aktivasyonunun özellikle oksin

sinyal yoluna bağımlı olduğunu göstermektedir. 2,4-D, hücre polaritesi ve embriyonik eksen oluşumunu düzenleyen güçlü bir oksin analogu olup, embriyonik hücre kaderinin yeniden belirlenmesinde etkili olmaktadır.

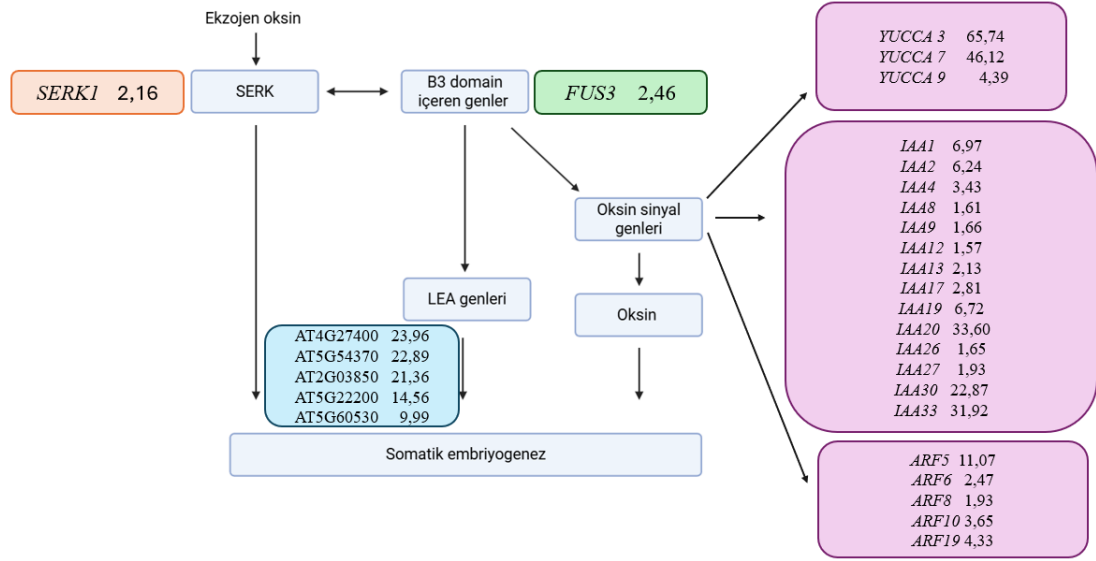
Bir diğer ana düzenleyici TF genlerinden birisi olan *PLT* (Plethora/Aintegumenta-like) gen ailesine ait genlerin bir kısmının hem 2,4-D hem de BIX-01294 uygulamalarında ortak şekilde aktive olduğu, ancak büyük çoğunluğunun yalnızca 2,4-D uygulamasında artış gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.12 ve Tablo 4.13). Bu durum, oksin sinyalinin *PLT* genlerinin transkripsiyonel kontrolünde belirleyici olduğunu, inhibitörün ise bu gen grubunda ikincil veya dolaylı bir etki yarattığını düşündürmektedir. *PLT* genlerinin, 5. gün ve 10. gün B5- 5 μ M 2,4-D karşılaştırmaları incelendiğinde *PLT1*'in 5. günde 20,58 kat 10. günde 49,04 kat, *PLT2*'nin 5. günde 9,53 kat 10.günde 22,25 kat, *PLT4*'ün ise sadece 10. günde 5,79 kat artış gösterdiği saptanmıştır. *PLT* transkripsiyon faktör ailesinin, oksin gradyanını ayarlayarak kök meristeminde hücre bölünmesi ve farklılaşmasını düzenlediği bilinmektedir (Kerstens ve ark., 2024) (Şekil 5. 2). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, *PLT* genlerinin fonksiyonlarının yalnızca kök gelişimiyle sınırlı olmadığını, aynı zamanda SE sırasında yeniden programlanan hücrelerde embriyonik kimliğin kazanılmasında da önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (Horstamn ve ark., 2017). Son yıllarda, filogenetik olarak farklı olan *AIL1* ve *ANT* dışındaki tüm *PLT* proteinlerinin yüksek anlatımının somatik embriyogenezi indüklediği ortaya konmuştur (Horstman ve ark., 2017).



Şekil 5. 1. *PLT1* ve *PLT2* genlerinin 5. ve 10. günlerdeki kat değişimi

Literatürdeki kanıtlar, oksinlerin somatik hücrelerin embriyoya yeniden programlanmasında kritik bir rol oynadığı fikrini desteklemektedir. Kültür ortamına 2,4-D eklenmesinin, indol-3-asetik asitin endojen seviyelerinin artışıyla ilişkili embriyogenik bir tepkiyi indüklediği öne sürülmüştür. Çeşitli türlerde, endojen IAA seviyelerinin SE başlangıcı ve embriyo gelişimi sırasında arttığı gösterilmiştir. Dahası, SE'ye endojen oksin biyosentezi, polar taşıma ve sinyal yollarının aktivasyonu eşlik eder. Bu durum, oksin biyosentez genleri *YUC*, *TAA1* ve *TAR2*, polar taşıma geni *PIN1* ve sinyal genleri *Aux/IAA* ve *ARF*'nin anlatım düzeylerindeki artış ile gösterilir (Ibanez ve ark., 2020; Karami ve ark. 2022).

ARF (Auxin Response Factor) genleri, oksin sinyali hücre içinde algılandıktan sonra, oksinle ilişkili hedef genlerin ifadesini başlatan transkripsiyon faktörleridir. Oksin, birçok yanıtı kontrol eden Oksin Tepki Faktörleri (*ARF*'ler) ile sinyal iletim yollarını aktive eder. Toplamda, *Arabidopsis*'te 23 *ARF* tanımlanmıştır ve bunlardan bazıları embriyonik süreçlere de katılır (Elhiti ve ark., 2022). Bulgularımıza göre 10. günde kontrole kıyasla oksin ve BIX-01294 uygulamasında 7 (*ARF1 ARF3, ARF5, ARF6, ARF8, ARF10 VE ARF19*) geninin artışı saptanmıştır. Bunlardan *ARF* 1, 5, 6, 8, 10 ve 19, 5 µM 2,4-D uygulamasında artış göstermiştir (Şekil 5. 2). 2,5 µM BIX-01294 uygulamasında ise sadece *ARF* 1, 3 ve 6 transkriptlerinin artışı saptanmıştır. SE indüksiyon protokolünün %80'inden fazlası bitki büyüme düzenleyicileri kullanır ve bunların çoğu oksinlerdir (Nic-Can ve ark., 2016). Ekzojen oksinler, *Yucca* (*YUC*), Oksin/İndol-3-Asetik Asit (*AUX/IAA*), Oksin Tepki Faktörü (*ARF*) gibi oksinle ilişkili genleri tetikler ve endojen oksin düzeyinde değişikliklerine neden olur. Bu nedenle, hormona duyarlı genler ve hormon biyosentezini ve sinyallemesini düzenleyen sinyal iletim yoluyla ilişkili genler veya transkripsiyon faktörleri, somatik embriyogenezele ilişkili anahtar düzenleyici genler olarak kabul edilir (Luo ve ark., 2018). Hücrel sinyal iletimiyle ilişkili proteinler, örneğin Lössin-zengin tekrar içeren reseptör benzeri kinazlar (LRR-RLK'ler) ve LEA, somatik embriyogeneze sırasında önemli roller oynar (Hu ve ark., 2021). Transkriptomik veriler, 10. günde kontrole kıyasla 5 µM 2,4-D uygulanan grupta *LEA*, *SERK*, *ARF* ve *FUS* genlerinin anlatımlarının arttığını ve bu artışın ekzojen oksin uygulamasına bağlı olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Elde ettiğimiz bulgular, Kang ve ark. (2021) tarafından bildirilen sonuçlarla uyumlu olarak, *SERK* ve *LEA* genleri de dahil olmak üzere hücrel sinyal iletimiyle ilişkili genlerin *Arabidopsis thaliana*'da somatik embriyogenezin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir (Şekil 5. 2).

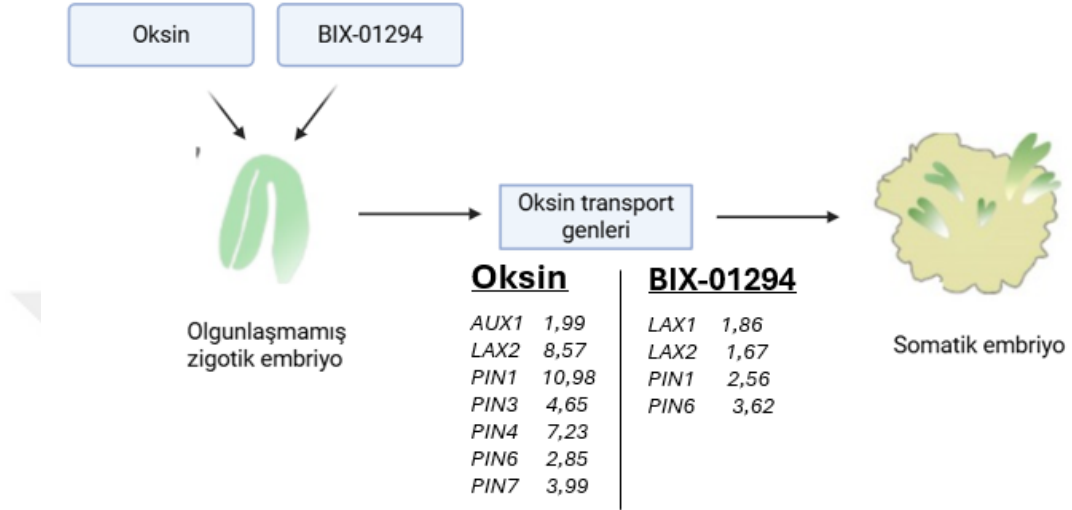


Şekil 5. 2. Karşılaştırma 10. gün B5 – 10. gün 5 µM 2,4- D SE sürecinde rol oynayan genler

Oksin transport genlerinde (*AUX*, *PIN*, *LAX*) anlatım artışı, somatik embriyogenezin ilerlemesi ve yeniden programlanması açısından önemli bir bilgi vermektedir. Bu tez çalışmasında, hem 2,4-D hem de 2,5 µM BIX uygulaması ile özellikle 10. günde *AUX*, *PIN* ve *LAX* gen ailelerine ait oksin taşıyıcı genlerde anlamlı bir artış saptanmıştır. Bu artış, oksin sinyal iletiminin yeniden şekillendiğini ve somatik embriyogenezin ilerlemesi için gerekli olan hücresel yeniden programlamanın başladığını düşündürmektedir.

Kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında, hem 2,4-D hem de BIX-01294 uygulamalarının pek çok genin anlatım düzeyinde benzer yönde değişimlere yol açtığı belirlenmiştir. Karami ve arkadaşları (2023), 2,4-D ile indüklenen somatik embriyogenezde *AUX1/LAX* ve *PIN1* genlerinin anlatımlarında artış meydana geldiğini rapor etmiştir. Bu bulgu, bizim çalışmamızda gözlenen *AUX1*, *LAX1*, *LAX2*, *PIN1–PIN7* gibi genlerin artışı ile paralellik göstermektedir. Transkriptomik veriler, 10. gün kontrol grubuna kıyasla hem 5 µM 2,4-D uygulanan grupta hem de 2,5 µM BIX-01294 uygulanan grupta bazı oksin transport genlerinde artış meydana geldiğini ortaya koymuştur. Bu genler *AUX1*, *LAX1*, *LAX2*, *PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN4*, *PIN6* ve *PIN7* 'dir. Transkriptomik verilere göre BIX-01294 uygulamasıyla bazı *AUX/LAX* ve *PIN* genlerinde artış gözlenmesi, literatürde TSA (histon deasetilaz inhibitörü) uygulamalarında rapor edilen oksin transport genlerinin indüksiyonu ile paralellik göstermektedir. TSA'nın histon deasetilaz enzimini baskılayarak artan histon

asetilasyonu aracılığıyla transkripsiyonel etkinliği artırdığı, BIX-01294'ün ise baskılayıcı H3K9me2 düzeylerini düşürerek benzer biçimde kromatin erişilebilirliğini artırdığı bilinmektedir. Bu bakımdan, farklı epigenetik müdahaleler farklı moleküler başlangıç yolları kullanarak oksin taşınım ağlarının aktive olmasına yol açabilir (Wojcikowska ve ark., 2024) (Şekil 5.3).



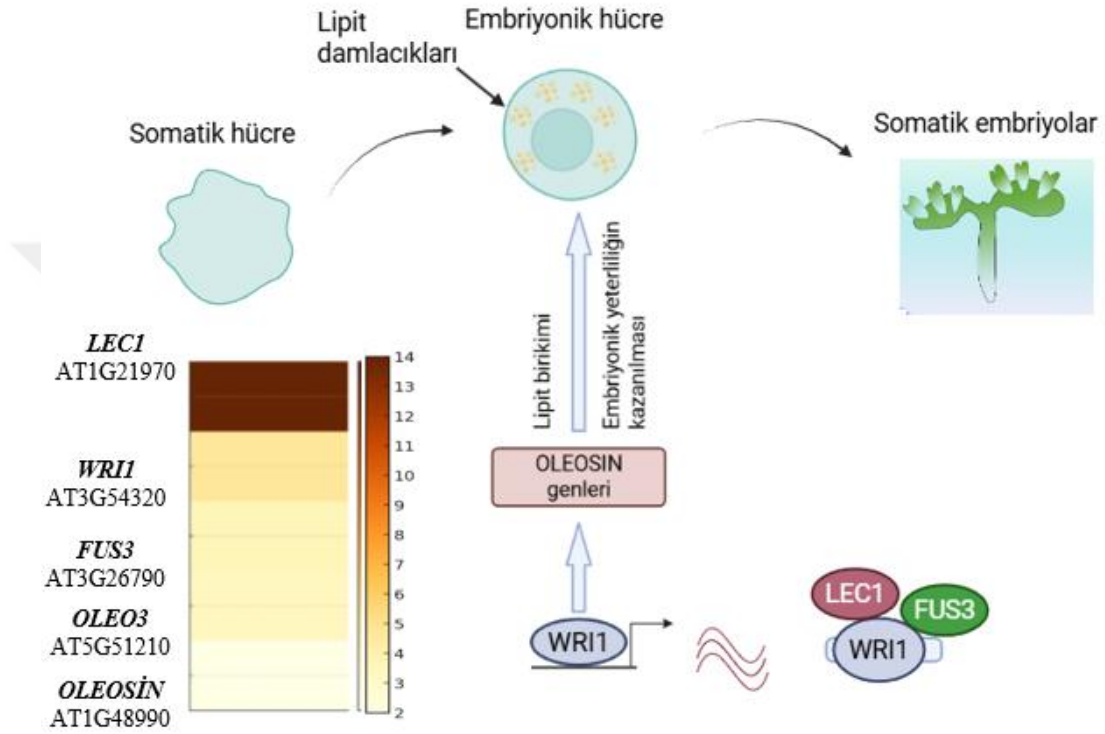
Şekil 5. 1. Somatik embriyogenez sırasında oksin ve BIX-01294 uygulamalarına bağlı olarak oksin taşınım genlerinin (*AUX1*, *LAX1*, *LAX2*, *PIN1*, *PIN3*, *PIN4*, *PIN6*, *PIN7*) anlatım değişimleri.

Lipid damlacıkları (lipid droplets), bitki lipid metabolizması, stres adaptasyonu ve enerji homeostazında merkezi öneme sahip dinamik organellerdir (Zhao ve ark., 2025). Bitki lipid damlacıkları, çimlenmeden sonra fide büyümesi için enerji sağlamak üzere tohumlarda biriken depolama organelleri olarak tanımlanmaktadır. Somatik embriyogenez, yüksek bitkilerin erken gelişimi sırasında morfolojik ve moleküler olayları araştırmak için iyi bir modeldir. Lipitler, *Arachis hypogaea*, *Daucus carota*, *Papaver orientalis* ve *Vitis vinifera* gibi türlerde somatik embriyogenezle ilişkili olarak incelenmiştir. Bu çalışmalar esas olarak somatik embriyoların gelişimi sırasında trigliseritlerin birikimi ve kullanımı üzerine yürütülmüştür ancak somatik embriyogenez sürecinin erken aşamalarındaki lipit bileşimi ve değişiklikleri hakkında çok az bilgi mevcuttur (Bouchknak ve ark., 2023). Diasilgliserol asiltransferaz (DGAT), yağ üretiminin son basamağı olan triacylglycerol (TAG) sentezini katalize eden temel bir enzimdir. DGAT, asil-CoA'dan diasilgliserole (DAG) bir asil grubunun aktarımını gerçekleştirerek TAG sentezini tamamlar (Roesler ve ark., 2016).

Embriyonik dokularda TAG birikimi ve yağ cisimciği yüzey proteinlerinden OLEOSIN'in anlatımındaki artış, embriyogenez programının aktivasyonu ile eşzamanlı olarak gerçekleşir. Bu süreçte, LEC2 ve WRI1 gibi temel düzenleyici transkripsiyon faktörleri lipid biyosentezini ve TAG depolanmasını uyararak embriyogenik hücrelerin farklılaşmasının biyokimyasal bir göstergesi olarak görev yapar (Siloto ve ark., 2006).

Embriyo oluşumu, olgunlaşma ve depolama bileşenlerinin sentezi gibi tohum gelişimi ile ilişkili pek çok süreç, embriyonik gelişimin kontrolünde yer alan ana düzenleyici genler olan AFL transkripsiyon faktör genleri (*ABI3*, *FUS3*, *LEC2*) ve *LEC1* geni tarafından düzenlenmektedir. Bu genlerden *LEC1* veya *LEC2*'nin normalde aktif olmadıkları dokularda ektopik olarak ifade edilmesi, somatik embriyoların oluşumunu indükleyebilmektedir. Bu sayede bu genler embriyo gelişimini başlatma kapasitesine sahiptir. Bununla birlikte, *LEC1*, *LEC2* ve *AFL* ailesine ait genlerin işlevi yalnızca embriyo oluşumu ile sınırlı değildir. Bu genler aynı zamanda tohumda yağ birikimini doğrudan düzenlemektedir. Bu nedenle, lipid biyosentezine ilişkin genlerin aktivasyonu, embriyonik gelişim sürecinin rastlantısal bir sonucu değil, bu “master regulator” genlerin yönlendirdiği kontrollü bir süreçtir. Başka bir ifadeyle, embriyoların olgunlaşma sürecinde gerçekleşen yağ birikimi, gelişim programının tesadüfi bir yan ürünü değil; aksine, *LEC1* ve *LEC2* gibi embriyogenik ana düzenleyiciler tarafından doğrudan yönlendirilen, gelişimsel olarak planlanmış bir süreçtir (Fobert, 2019). Blancaet ve arkadaşları (2000), yaptıkları çalışmada somatik embriyogenezin erken evrelerinin, esas olarak 18:2 oranında zenginleştirilmiş fosfotidilkolin (PC) ve triasilgliserol (TAG) artışıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Lipid biyosentezinin temel düzenleyicisi olan WRINKLED1'in (WRI1) somatik embriyo oluşumu için gerekli olduğunu, bu da *WRI1* aracılı lipid biyosentezinin vejetatif gelişimden embriyonik gelişime geçişte önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu tez çalışmasında transkriptomik veriler, 10.gün kontrole kıyasla 2,5 µM BIX-01294 uygulamasında *WRI1* geni için 5,06 kat artış meydana geldiğini göstermiştir. 10. gün kontrole kıyasla 5 µM 2,4-D uygulamasında ise bu gene ait anlatım saptanmamıştır. Zhang ve arkadaşları (2024), *WRI1* ve *LEC2* arasında doğrudan bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmada sonuçlar WRI1'in, *YUCCA4* (*YUC4*) ve *OLEOSIN3* (*OLE3*) genlerinin aktivasyonunu güçlendirerek somatik embriyo indüksiyonu için oksin ve lipit birikimini kolaylaştırmak amacıyla

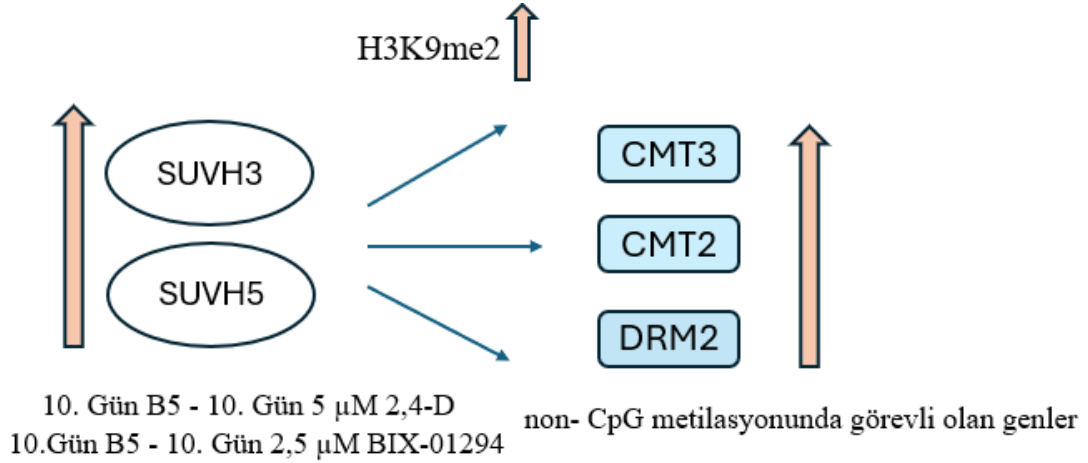
LEC1, *LEC2* ve *FUSCA3* (*FUS3*) ile bir kompleks oluşturduğunu göstermektedir (Zhang ve ark., 2024). Bu tez çalışmasında, 10. gün kontrole kıyasla 2,5 μ M BIX-01294 uygulamasında *OLEOSIN3* (AT5G51210) geninin 3,76 kat arttığı, *LEC1* (AT1G21970) geninin 14,91 kat arttığı ve *FUS3* (AT1G21970) geninin ise 3,99 kat arttığı saptanmıştır (Şekil 5. 4).



Şekil 5. 2. Somatik embriyogenez sırasında vejetatif-embriyonik geçişi düzenleyen WRINKLED1 (*WRI1*) – aracılı yolak

In vitro embriyoların indüksiyon süreci esas olarak bitki büyüme düzenleyicileri ve stres tepkileri tarafından düzenlenir. Buna ek olarak, bu faktörler SE sürecinde epigenetik modifikasyonların indüklenmesine katkıda bulunabilir. Bu nedenle, bu epigenetik düzenlenme hakkında bilgi edinmek için, DNA ve histon metilasyonu/demetilasyonu ile ilişkili genlerin transkript düzeyleri incelenmiştir. Transkriptomik veriler, 10. gün kontrol grubuna kıyasla 10. gün, 5 μ M 2,4-D uygulamasında, histon lizin metiltransferaz genleri olan *SUVH3* (AT1G73100) geninin 2,49 kat, *SUVH5* (AT2G35160) geninin 2,36 kat, *SUVR2* (AT5G43990) geninin 2,34 kat ve *SUVR5* (AT2G23740) geninin 2,21 kat arttığını göstermiştir. Buna karşılık 10.gün kontrole kıyasla 2,5 μ M BIX-01294 histon lizin metiltransferaz inhibitörünün uygulandığı grupta bu *SUVH5* (AT2G35160) transkriptinin 2,37 kat

arttığı saptanmıştır. Bu histon modifikasyonu, DNA metiltransferazlarının bağlanmasını ve DNA metilasyonunu teşvik eden bir sinyal görevi görür. *SUVH3* ve *SUVH5* genleri, H3K9 dimetilasyonunu gerçekleştirerek heterokromatin oluşumuna katkıda bulunur (Caro ve ark., 2012). (Şekil 5. 5).



Şekil 5. 3. 2,4-D ve BIX-01294 uygulamalarının 10. günde H3K9me2 seviyesi ve non-CpG DNA metilasyon genleri (CMT2, CMT3, DRM2) üzerindeki etkisi.

Bu tez çalışmasında, *Arabidopsis*'te somatik embriyogenez süreci sırasında sitozin DNA metilasyonunun sürdürülmesinde önemli rol oynayan METİLTRANSFERAZ 1 (*MET1*) ve KROMOMETİLİZ 3 (*CMT3*) genlerinin anlatımı, 10. gün kontrol grubuna kıyasla 5 µM 2,4-D içeren embriyonik dokularda sırasıyla 2,50 ve 2,24 kat artmıştır. Bu bulgular, Grzybkowska ve arkadaşları (2018), tarafından yapılan çalışmada E5 (oksin içeren) ortamına kıyasla E0 (oksin içermeyen) ortamındaki DNA metilaz genlerinin anlatım profilleriyle paralellik göstermektedir ve oksin uygulamasının *MET1* ve *CMT3* transkripsiyonunu aktive ettiğini desteklemektedir. *CMT3*'ün oksin kontrollü anlatımını destekleyen mekanizma, bu genin promotöründe oksine duyarlı AuxRE motifinin bulunmasıyla açıklanmaktadır.

Kültüre alınan eksplantların DNA metilasyon durumunun 5-AzaC uygulamasıyla değiştirilmesi ve DNA metilazlarını (dd/ddc) kodlayan genlerdeki mutasyonlar, hem embriyonik yanıtı hem de somatik embriyogenez sürecinde ana düzenleyicileri olan *LEC2*, *LEC1* ve *BBM* transkripsiyon faktörlerinin anlatım profillerini belirgin şekilde değiştirmektedir. Dolayısıyla, DNA metilasyonunun, somatik embriyogenez indüksiyonunu ve embriyonik geçiş için gerekli olan TF genlerinin anlatımını kontrol

ettiği düşünülmektedir. Bu genlerdeki SE'ye özgü DNA metilasyon motifinin belirlenmesi, SE ile ilişkili DNA metilomunun çözülmesine katkıda bulunacaktır.

Xiao ve arkadaşları (2006), yaptıkları çalışmada *MET1* ve *CMT3*'te fonksiyon kaybı mutasyonlarına sahip *Arabidopsis thaliana* embriyolarının normal gelişmediğini, hücre bölünme düzlemlerinde ve sayılarında değişiklikler görüldüğünü ve canlılıklarının azaldığını bildirmiştir. Bu mutasyonlar, embriyo hücre kimliğini belirleyen genlerin yanlış ifade edilmesine ve anormal *met1* embriyolarında oksin hormon gradyanlarının düzgün oluşmamasına yol açmaktadır. Dolayısıyla, DNA metilasyonu, bitki embriyogenezinin doğru düzenlenmesi ve tohum canlılığı için kritik bir role sahiptir (Xiao ve ark., 2006).

Özellikle, hücrenin yeniden programlanmasını etkileyen çok az sayıda demetilazın bitkilerde bugüne kadar rapor edildiği görülmektedir. Genel olarak, somatik hücrelerde, pluripotensi genleri hipermetilasyon (aşırı metilasyon) nedeniyle transkripsiyonel olarak susturulmuştur. Bu genler, somatik hücre yeniden programlama sırasında aktif DNA demetilasyonu yoluyla yeniden aktive edilmektedir. Bu süreçte, somatik genlerin ise hücre yeniden programlamasını kolaylaştırmak için *de novo* metilasyon ile susturulması gerekir. Bu bilgilere göre *DRM1*, *DRM2*, *DRM3*, *VIM1*, *VIM2*, *VIM3*, *DRD1* DNA metilasyonu ile ilişkili genlerin ve DNA demetilasyonunda rol oynayan *DML1*, *DME1*, *DML3*, *ROS1* genlerinin anlatımının artmış olması, hücrelerin epigenetik yeniden programlama sürecine girdiğini göstermektedir. SCR sırasında, DNA metilasyonu ve demetilasyon arasında karmaşık bir denge olabilir ve bu denge, hücre yeniden programlamasını desteklemek için somatik hücreye özgü genlerin veya pluripotensi genleri anlatımını değiştirmek üzere eş zamanlı olarak gerçekleşebilir (Peng ve ark., 2023). Wickramasuriya ve arkadaşları (2015), yaptıkları çalışmada *VIM1* geninin embriyonik dokularda en yüksek anlatım düzeyine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu durum, *VIM*'lerin *in vitro* embriyogenez sırasında metilasyon motiflerinin korunmasında bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Wickramasuriya ve ark., 2015). Transkriptomik veriler AT1G57820 (*VIM1*)'in kontrole kıyasla hem 10.gün 2,5 µM BIX-01294 (2,4 kat) hem de 10.gün 5 µM 2,4-D (3,53 kat) arttığını göstermiştir.

Bu tez kapsamında,

- Somatik embriyogenez indüksiyonu açısından, 5 μ M 2,4-D'ye kıyasla en yüksek etkinliğin 2,5 μ M BIX-01294 uygulamasında elde edildiği belirlenmiştir.
- Bulgularımız, 5 μ M 2,4-D ve 2,5 μ M BIX-01294'in somatik embriyogenez sürecinde rol oynayan ana düzenleyici transkripsiyon faktörlerini (*LEC1*, *AGL15*, *FUS3*, *PHV*, *PHB*, *PLT*, *AIL7*) benzer biçimde tetiklediğini ortaya koymuştur.
- SE'nin 5 μ M 2,4-D ile indüksiyonunda özellikle oksin sinyal genleri (*YUCCA*, *IAA*, *ARF*) aktif olarak rol oynarken, 2,5 μ M BIX-01294'te ise WR11-aracılı olarak, SE sürecinin indüksiyonunda en güçlü aday mekanizma olarak öne çıkmıştır.
- 21. gün sonunda, 5 μ M 2,4-D ve 2,5 μ M BIX-01294 varlığında olgunlaşmamış zigotik embriyolardan oluşan SE yüzdesi sırasıyla %31,25 ve %35,41 olarak belirlenmiştir.
- 21. gün sonunda bir eksplant üzerinde oluşan somatik embriyo sayısı 5 μ M 2,4-D'ye kıyasla 2,5 μ M BIX-01294'te 3,95 kat artmıştır.
- Transkriptomik veriler, 10. gün kontrol grubuna kıyasla 10. gün, 5 μ M 2,4-D uygulamasında, histon lizin metiltransferaz genleri olan *SUVH3* (AT1G73100) geninin 2,49 kat, *SUVH5* (AT2G35160) geninin 2,36 kat, *SUVR2* (AT5G43990) geninin 2,34 kat ve *SUVR5* (AT2G23740) geninin 2,21 kat arttığını göstermiştir. Aksine 10.gün kontrole kıyasla 2,5 μ M BIX-01294 histon lizin metiltransferaz inhibitörünün uygulandığı grupta *SUVH5* (AT2G35160) geni haricindeki genlerin anlatımları saptanmamıştır.
- *Arabidopsis thaliana*'da somatik embriyogenez indüksiyonunda BIX-01294 inhibitör etkisi, histon modifikasyonlarının bu süreçteki olası rolüne işaret etmekte ve BIX-01294'ün oksine alternatif veya tamamlayıcı bir düzenleyici faktör olabileceğini düşündürmektedir.
- Elde edilen bulgular, hücrelerin yeniden programlanması için gerekli moleküler ve hücresel mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

Hücreyi embriyoya dönüştüren yeniden programlama yollarının daha derinlemesine anlaşılması, bitki mikroçoğaltımını ve yeşil biyoteknoloji uygulamalarını geliştirmemize yardımcı olacaktır.



6. KAYNAKÇA

- 1.Argyros, R. D., Mathews, D. E., Chiang, Y. H., Palmer, C. M., Thibault, D. M., Etheridge, N., ... & Schaller, G. E. (2008). Type B response regulators of Arabidopsis play key roles in cytokinin signaling and plant development. *The Plant Cell*, 20(8), 2102-2116.
- 2.Asghar, S., Ghori, N., Hyat, F., Li, Y., & Chen, C. (2023). Use of auxin and cytokinin for somatic embryogenesis in plant: a story from competence towards completion. *Plant Growth Regulation*, 99(3), 413-428.
- 3.Ashapkin, V. V., Kutueva, L. I., Aleksandrushkina, N. I., & Vanyushin, B. F. (2019). Epigenetic regulation of plant gametophyte development. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 3051.
- 4.Benamins, R., & Scheres, B. (2008). Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59(1), 443-465.
- 5.Berenguer, E., Bárány, I., Solís, M. T., Pérez-Pérez, Y., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2017). Inhibition of Histone H3K9 Methylation by BIX-01294 Promotes Stress-Induced Microspore Totipotency and Enhances Embryogenesis Initiation. *Frontiers in plant science*, 8, 1161. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01161>
- 6.Bissinger, E. M., Heinke, R., Sippl, W., & Jung, M. (2010). Targeting epigenetic modifiers: Inhibitors of histone methyltransferases. *MedChemComm*, 1(2), 114-124.
- 7.Biswas, S., & Rao, C. M. (2018). Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *European journal of pharmacology*, 837, 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.021>
- 8.Blanckaert, A., Belingheri, L., Vasseur, J., & Hilbert, J. L. (2000). Changes in lipid composition during somatic embryogenesis in leaves of Cichorium. *Plant science*, 157(2), 165-172.
- 9.Bolger, A.M., Marc L, & Bjoern U. (2014). “Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.” *Bioinformatics* 30 (15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.

10. Bouchnak, I., Coulon, D., Salis, V., D'andrea, S., & Bréhélin, C. (2023). Lipid droplets are versatile organelles involved in plant development and plant response to environmental changes. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1193905.
11. Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Gorlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants, *The Plant Cell*, *13*(7), 1499-1510
12. Brundrett, M. C., Kendrick, B., & Peterson, C. A. (1991). Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry*, *66*(3), 111-116.
13. Calabuig-Serna, A., Mir, R., & Seguí-Simarro, J. M. (2023). Calcium dynamics, WUSCHEL expression and callose deposition during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* immature zygotic embryos. *Plants*, *12*(5), 1021.
14. Cao, H., Li, L., Yang, D., Zeng, L., Yewei, X., Yu, B., ... & Chen, J. (2019). Recent progress in histone methyltransferase (G9a) inhibitors as anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *179*, 537-546.
15. Cao, Y. C., Shan, S. K., Guo, B., Li, C. C., Li, F. X. Z., Zheng, M. H., ... & Yuan, L. Q. (2022). Histone lysine methylation modification and its role in vascular calcification. *Frontiers in endocrinology*, *13*, 863708.
16. Cao, Y. C., Shan, S. K., Guo, B., Li, C. C., Li, F. X. Z., Zheng, M. H., ... & Yuan, L. Q. (2022). Histone lysine methylation modification and its role in vascular calcification. *Frontiers in endocrinology*, *13*, 863708.
17. Caro, E., Stroud, H., Greenberg, M. V., Bernatavichute, Y. V., Feng, S., Groth, M., ... & Jacobsen, S. E. (2012). The SET-domain protein SUVR5 mediates H3K9me2 deposition and silencing at stimulus response genes in a DNA methylation-independent manner.
18. Casciello, F., Windloch, K., Gannon, F., & Lee, J. S. (2015). Functional Role of G9a Histone Methyltransferase in Cancer. *Frontiers in immunology*, *6*, 487. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00487>
19. Chang, Y., Zhang, X., Horton, J. R., Upadhyay, A. K., Spannhoff, A., Liu, J., Snyder, J. P., Bedford, M. T., & Cheng, X. (2009). Structural basis for G9a-like protein lysine methyltransferase inhibition by BIX-01294. *Nature*

structural & molecular biology, 16(3), 312–317.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1560>

20. Chen, C., Gao, Y., Liu, W., & Gao, S. (2022). Epigenetic regulation of cell fate transition: learning from early embryo development and somatic cell reprogramming. *Biology of Reproduction*, 107(1), 183-195.
21. Christenhusz, M. J., Twyford, A. D., Hudson, A., Royal Botanic Gardens Kew Genome Acquisition Lab, Royal Botanic Garden Edinburgh Genome Acquisition Lab, Darwin Tree of Life Barcoding collective, ... & Darwin Tree of Life Consortium. (2023). The genome sequence of thale cress, *Arabidopsis thaliana* (Heynh., 1842). *Wellcome Open Research*, 8, 40.
22. Ciechomska, I. A., Przanowski, P., Jackl, J., Wojtas, B., & Kaminska, B. (2016). BIX01294, an inhibitor of histone methyltransferase, induces autophagy-dependent differentiation of glioma stem-like cells. *Scientific reports*, 6(1), 38723.
23. Ciechomska, I. A., Przanowski, P., Jackl, J., Wojtas, B., & Kaminska, B. (2016). BIX01294, an inhibitor of histone methyltransferase, induces autophagy-dependent differentiation of glioma stem-like cells. *Scientific reports*, 6(1), 38723.
24. Dai, X., & Shen, L. (2022). Advances and trends in omics technology development. *Frontiers in Medicine*, 9, 911861
25. Dai, X., & Shen, L. (2022). Advances and trends in omics technology development. *Frontiers in Medicine*, 9, 911861.
26. de Moraes Oliveira, J. P., Silva, A. J. D., Catrinck, M. N., & Clarindo, W. R. (2023). Embryonic abnormalities and genotoxicity induced by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid during indirect somatic embryogenesis in *Coffea*. *Scientific Reports*, 13(1), 9689.
27. DeCarlo, D., & Hadden, M. K. (2012). Oncoepigenomics: Making histone lysine methylation count. *European journal of medicinal chemistry*, 56, 179-194.
28. Ebrahimi, A., Özsoy, N., GÜRLE, S. D., Yaman, B., & Ari, Ş. (2021). Chaetocin enhances callus induction by decreasing the expression of major leaf polarity genes in *Nicotiana tabacum*. *Turkish Journal of Botany*, 45(5), 412-420.

- 29.Fambrini, M., Usai, G., & Pugliesi, C. (2022). Induction of somatic embryogenesis in plants: Different players and focus on WUSCHEL and WUS-RELATED HOMEODOMAIN (WOX) transcription factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15950.
- 30.Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 385-402.
- 31.Feng, S., Jacobsen, S. E., & Reik, W. (2010). Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 330(6004), 622-627.
- 32.Feng, S., Jacobsen, S. E., & Reik, W. (2010). Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 330(6004), 622-627.
- 33.Fobert, P. R. (2012). Role of Transcription Factors in Storage Lipid Accumulation in Plants. *AOCS: Urbana, IL, USA*.
- 34.Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., & Vasil, I. K. (1976). Plant tissue culture media. *In vitro*, 12(7), 473-478.
- 35.Grafi, G., Ben-Meir, H., Avivi, Y., Moshe, M., Dahan, Y., & Zemach, A. (2007). Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation. *Developmental biology*, 306(2), 838-846.
- 36.Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Precipitation of RNA with Ethanol. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020(3), 101717.
- 37.Grzybkowska, D., Morończyk, J., Wójcikowska, B., & Gaj, M. D. (2018). Azacitidine (5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in Arabidopsis. *Plant Growth Regulation*, 85(2), 243-256.
- 38.Hajar, M., Werner, T., Gajic, M., Stark, H., & Sadek, B. (2025). Targeting Histone H3K9 Methyltransferase G9a as a Potential Therapeutic Strategy for Neuropsychiatric Disorders. *Medicinal Research Reviews*.
- 39.Hajar, M., Werner, T., Gajic, M., Stark, H., & Sadek, B. (2025). Targeting Histone H3K9 Methyltransferase G9a as a Potential Therapeutic Strategy for Neuropsychiatric Disorders. *Medicinal Research Reviews*.
- 40.Horstman, A., Bemmer, M., & Boutilier, K. (2017). A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*, 4(4), 201-216.

- 41.Hu, H., & Du, J. (2022). Structure and mechanism of histone methylation dynamics in Arabidopsis. *Current opinion in plant biology*, 67, 102211.
- 42.Hu, H., & Du, J. (2022). Structure and mechanism of histone methylation dynamics in Arabidopsis. *Current opinion in plant biology*, 67, 102211.
- 43.Huang, J., Zhang, H., Yao, J., Qin, G., Wang, F., Wang, X., ... & Zhao, J. (2016). BIX-01294 increases pig cloning efficiency by improving epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Reproduction*, 151(1), 39-49.
- 44.Huang, Y., Zou, Y., Lin, L., Ma, X., & Huang, X. (2017). Effect of BIX-01294 on proliferation, apoptosis and histone methylation of acute T lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia Research*, 62, 34-39.
- 45.Huang, Y., Zou, Y., Lin, L., Ma, X., & Huang, X. (2017). Effect of BIX-01294 on proliferation, apoptosis and histone methylation of acute T lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia Research*, 62, 34-39.
- 46.Hyun, K., Jeon, J., Park, K., & Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Experimental & molecular medicine*, 49(4), e324-e324.
- 47.Ibáñez, S., Carneros, E., Testillano, P. S., & Pérez-Pérez, J. M. (2020). Advances in plant regeneration: shake, rattle and roll. *Plants*, 9(7), 897.
- 48.Ibáñez, S., Carneros, E., Testillano, P. S., & Pérez-Pérez, J. M. (2020). Advances in plant regeneration: shake, rattle and roll. *Plants*, 9(7), 897.
- 49.Ibáñez, S., Carneros, E., Testillano, P. S., & Pérez-Pérez, J. M. (2020). Advances in plant regeneration: shake, rattle and roll. *Plants*, 9(7), 897.
- 50.Ikeuchi, M., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2015). Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation. *Current opinion in plant biology*, 28, 60-67.
- 51.Jain, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. *Briefings in functional genomics*, 11(1), 63-70.
- 52.Jeong, Y. Y., Lee, H. Y., Kim, S. W., Noh, Y. S., & Seo, P. J. (2021). Optimization of protoplast regeneration in the model plant Arabidopsis thaliana. *Plant Methods*, 17(1), 21.
- 53.Kadokura, S., Sugimoto, K., Tarr, P., Suzuki, T., & Matsunaga, S. (2018). Characterization of somatic embryogenesis initiated from the Arabidopsis shoot apex. *Developmental Biology*, 442(1), 13-27.

- 54.Kang, H. I., Lee, C. B., Kwon, S. H., Park, J. M., Kang, K. S., & Shim, D. (2021). Comparative transcriptome analysis during developmental stages of direct somatic embryogenesis in *Tilia amurensis* Rupr. *Scientific reports*, 11(1), 6359.
- 55.Kaniskan, H. U., Martini, M. L., & Jin, J. (2018). Inhibitors of protein methyltransferases and demethylases. *Chemical reviews*, 118(3), 989-1068.
- 56.Karami, O., Aghavaisi, B., & Mahmoudi Pour, A. (2009). Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of chemical biology*, 2(4), 177-190.
- 57.Karami, O., Philipsen, C., Rahimi, A., Nurillah, A. R., Boutilier, K., & Offringa, R. (2023). Endogenous auxin maintains embryonic cell identity and promotes somatic embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 113(1), 7-22.
- 58.Kawakatsu, T., & Ecker, J. R. (2019). Diversity and dynamics of DNA methylation: Epigenomic resources and tools for crop breeding. *Breeding science*, 69(2), 191-204.
- 59.Kerstens, M., Galinha, C., Hofhuis, H., Nodine, M., Pardal, R., Scheres, B., & Willemsen, V. (2024). PLETHORA transcription factors promote early embryo development through induction of meristematic potential. *Development*, 151(12), dev202527.
- 60.Khan, F. S., Li, Z., Shi, P., Zhang, D., Htwe, Y. M., Yu, Q., & Wang, Y. (2023). Transcriptional regulations and hormonal signaling during somatic embryogenesis in the coconut tree: an insight. *Forests*, 14(9), 1800.
- 61.Krämer U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, 4, e06100. <https://doi.org/10.7554/eLife.06100>
- 62.Krishnakumar, R., & Blelloch, R. H. (2013). Epigenetics of cellular reprogramming. *Current opinion in genetics & development*, 23(5), 548–555. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.06.005>
- 63.Kumar, V., & Van Staden, J. (2017). New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(9), 194.
- 64.Kumar, V., & Van Staden, J. (2017). New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(9), 194.
- 65.Leventhal, L., Ruffley, M., & Exposito-Alonso, M. (2025). Planting genomes in the wild: *Arabidopsis* from genetics history to the ecology and evolutionary genomics era. *Annual Review of Plant Biology*, 76.

- 66.Liu, L., Qiu, L., Zhu, Y., Luo, L., Han, X., Man, M., ... & Xing, Y. (2023). Comparisons between plant and animal stem cells regarding regeneration potential and application. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4392.
- 67.Liu, L., Qiu, L., Zhu, Y., Luo, L., Han, X., Man, M., Li, F., Ren, M., & Xing, Y. (2023). Comparisons between Plant and Animal Stem Cells Regarding Regeneration Potential and Application. *International journal of molecular sciences*, 24(5), 4392. <https://doi.org/10.3390/ijms24054392>
- 68.Liu, X., Zhu, K., & Xiao, J. (2023). Recent advances in understanding of the epigenetic regulation of plant regeneration. *Abiotech*, 4(1), 31-46
- 69.Liu, Z., Dai, X., Li, J., Liu, N., Liu, X., Li, S., & Xiang, F. (2020). The type-B cytokinin response regulator ARR1 inhibits shoot regeneration in an ARR12-dependent manner in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 32(7), 2271-2291.
- 70.Long, Q., Rabanal, F. A., Meng, D., Huber, C. D., Farlow, A., Platzer, A., ... & Nordborg, M. (2013). Massive genomic variation and strong selection in Arabidopsis thaliana lines from Sweden. *Nature genetics*, 45(8), 884-890.
- 71.Long, Y., Yang, Y., Pan, G., & Shen, Y. (2022). New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. *Frontiers in plant science*, 13, 926752.
- 72.Lotan, T., Ohto, M. A., Yee, K. M., West, M. A., Lo, R., Kwong, R. W., ... & Harada, J. J. (1998). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93(7), 1195-1205.
- 73.Luo, J., Zhou, J. J., & Zhang, J. Z. (2018). Aux/IAA gene family in plants: molecular structure, regulation, and function. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 259.
- 74.Luo, J., Zhou, J. J., & Zhang, J. Z. (2018). Aux/IAA gene family in plants: molecular structure, regulation, and function. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 259.
- 75.Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), 662-682
- 76.Mozgova, I., Munoz-Viana, R., & Hennig, L. (2017). PRC2 represses hormone-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, 13(1), e1006562.

77. Mozgová, I., Muñoz-Viana, R., & Hennig, L. (2017). PRC2 represses hormone-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, *13*(1), e1006562.
78. Nunez-Vazquez, R., Desvoyes, B., & Gutierrez, C. (2022). Histone variants and modifications during abiotic stress response. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 984702.
79. Peng, J., Zhang, Q., Tang, L. P., Xu, B. J., Laux, T., Zhang, X. S., & Su, Y. H. (2025). LEC2 induces somatic cell reprogramming through epigenetic activation of plant cell totipotency regulators. *Nature Communications*, *16*(1), 4185.
80. Peng, J., Zhang, W. J., Zhang, Q., Su, Y. H., & Tang, L. P. (2023). The dynamics of chromatin states mediated by epigenetic modifications during somatic cell reprogramming. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *11*, 1097780.
81. Pikaard, C. S., & Scheid, O. M. (2014). Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *6*(12), a019315.
82. Purwestri, Y. A., Lee, Y. S., Meehan, C., Mose, W., Susanto, F. A., Wijayanti, P., ... & Gutierrez-Marcos, J. (2023). RWP-RK Domain 3 (OsRKD3) induces somatic embryogenesis in black rice. *BMC Plant Biology*, *23*(1), 202.
83. Roesler, K., Shen, B., Bermudez, E., Li, C., Hunt, J., Damude, H. G., ... & Meyer, K. (2016). An improved variant of soybean type 1 diacylglycerol acyltransferase increases the oil content and decreases the soluble carbohydrate content of soybeans. *Plant Physiology*, *171*(2), 878-893.
84. Roychowdhury, R., Das, S. P., Gupta, A., Parihar, P., Chandrasekhar, K., Sarker, U., ... & Sudhakar, C. (2023). Multi-omics pipeline and omics-integration approach to decipher plant's abiotic stress tolerance responses. *Genes*, *14*(6), 1281.
85. Salaün, C., Lepiniec, L., & Dubreucq, B. (2021). Genetic and molecular control of somatic embryogenesis. *Plants*, *10*(7), 1467.
86. Sang, Y. L., Cheng, Z. J., & Zhang, X. S. (2018). iPSCs: a comparison between animals and plants. *Trends in Plant Science*, *23*(8), 660-666.
87. Satish, M., Nivya, M. A., Abhishek, S., Nakarakanti, N. K., Shivani, D., Vani, M. V., & Rajakumara, E. (2018). Computational characterization of substrate and product specificities, and functionality of S-adenosylmethionine binding

- pocket in histone lysine methyltransferases from Arabidopsis, rice and maize. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 86(1), 21-34.
88. Seffer, I., Nemeth, Z., Hoffmann, G., Matics, R., Seffer, A. G., & Koller, A. (2013). Unexplored potentials of epigenetic mechanisms of plants and animals—theoretical considerations. *Genetics & Epigenetics*, 5, GEG-S11752.
 89. Siloto, R. M., Findlay, K., Lopez-Villalobos, A., Yeung, E. C., Nykiforuk, C. L., & Moloney, M. M. The Accumulation of Oleosins Determines the Size of Seed Oilbodies in Arabidopsis W OA.
 90. Sivanesan, I., Nayeem, S., Venkidasamy, B., Kuppuraj, S. P., Rn, C., & Samynathan, R. (2022). Genetic and epigenetic modes of the regulation of somatic embryogenesis: a review. *Biologia futura*, 73(3), 259–277. <https://doi.org/10.1007/s42977-022-00126-3>
 91. Su, Y. H., Tang, L. P., Zhao, X. Y., & Zhang, X. S. (2021). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 228-243.
 92. Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., ... & Shinkai, Y. (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & development*, 16(14), 1779-1791.
 93. Tang, L. P., Zhang, X. S., & Su, Y. H. (2020). Regulation of cell reprogramming by auxin during somatic embryogenesis. *Abiotech*, 1(3), 185-193.
 94. Tao, L., Zhou, Y., Luo, Y., Qiu, J., Xiao, Y., Zou, J., ... & Zhao, Y. (2024). Epigenetic regulation in cancer therapy: From mechanisms to clinical advances. *MedComm–Oncology*, 3(1), e59
 95. Tresas, T., Isaoglou, I., Roussis, A., & Haralampidis, K. (2025). A Brief Overview of the Epigenetic Regulatory Mechanisms in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(10), 4700.
 96. Tripodi, P. (2025). Next generation breeding in the omics era. *Reproduction and Breeding*, 5(2), 88-91.
 97. Tyagi, P., Singh, D., Mathur, S., Singh, A., & Ranjan, R. (2022). Upcoming progress of transcriptomics studies on plants: An overview. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1030890.

98. Tyagi, P., Singh, D., Mathur, S., Singh, A., & Ranjan, R. (2022). Upcoming progress of transcriptomics studies on plants: An overview. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1030890.
99. Wang, H. M., Enns, J. L., Nelson, K. L., Brost, J. M., Orr, T. D., & Ferrie, A. M. R. (2019). Improving the efficiency of wheat microspore culture methodology: Evaluation of pretreatments, gradients, and epigenetic chemicals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 139, 589-599.
100. Wang, H., Xu, Y., Zhang, Z., Zhang, G., Tan, C., & Ye, L. (2024). Development and application of transcriptomics technologies in plant science. *Crop Design*, 100057.
101. Wang, M., Li, R., & Zhao, Q. (2023). Multi-omics techniques in genetic studies and breeding of forest plants. *Forests*, 14(6), 1196.
102. Wang, M., Li, R., & Zhao, Q. (2023). Multi-omics techniques in genetic studies and breeding of forest plants. *Forests*, 14(6), 1196.
103. Wang, Y., Li, H. L., Zhou, Y. K., Guo, D., Zhu, J. H., & Peng, S. Q. (2021). Transcriptomes analysis reveals novel insight into the molecular mechanisms of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *BMC genomics*, 22, 1-18.
104. Wickramasuriya, A. M., & Dunwell, J. M. (2015). Global scale transcriptome analysis of *Arabidopsis* embryogenesis in vitro. *BMC genomics*, 16(1), 301.
105. Wójcik, A. M., Krypczyk, K., Buchcik, W. M., & Gaj, M. D. (2025). From root to embryogenic transition: *WOX5* reprograms plant somatic cells via auxin-mediated pathways. *BMC Plant Biology*, 25(1), 642.
106. Wójcikowska, B., & Gaj, M. D. (2017). Expression profiling of *AUXIN RESPONSE FACTOR* genes during somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Plant cell reports*, 36(6), 843–858. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2114-3>
107. Wójcikowska, B., Chwiałkowska, K., Nowak, K., Citerne, S., Morończyk, J., Wójcik, A. M., ... & Gaj, M. D. (2024). Transcriptomic profiling reveals histone acetylation-regulated genes involved in somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics*, 25(1), 788.
108. Wójcikowska, B., Wójcik, A. M., & Gaj, M. D. (2020). Epigenetic regulation of auxin-induced somatic embryogenesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2307.

109. Woodward, A. W., & Bartel, B. (2018). Biology in Bloom: A Primer on the *Arabidopsis thaliana* Model System. *Genetics*, 208(4), 1337–1349. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300755>
110. Wu, H., Zhang, K., Li, J., Wang, J., Wang, Y., Yu, J., ... & Zhu, K. (2024). Somatic embryogenesis from mature sorghum seeds: an underutilized genome editing recipient system. *Heliyon*, 10(1).
111. 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.
112. Xu, L., & Jiang, H. (2020). Writing and reading histone H3 lysine 9 methylation in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 11, 452.
113. Yang, Y., Saand, M. A., Huang, L., Abdelaal, W. B., Zhang, J., Wu, Y., ... & Wang, F. (2021). Applications of multi-omics technologies for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 12, 563953.
114. Yoo, H., Park, K., Lee, J., Lee, S., & Choi, Y. (2021). An optimized method for the construction of a DNA methylome from small quantities of tissue or purified DNA from arabidopsis embryo. *Molecules and cells*, 44(8), 602-612.
115. Yu, G., Wang, L. G., Han, Y., & He, Q. Y. (2012). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics: a journal of integrative biology*, 16(5), 284-287.
116. Yuan, H. Y., Kagale, S., & Ferrie, A. M. (2024). Multifaceted roles of transcription factors during plant embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1322728.
117. Yuan, H. Y., Kagale, S., & Ferrie, A. M. (2024). Multifaceted roles of transcription factors during plant embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1322728.
118. Zhang, Q., Ruan, F., Yang, M., & Wen, Q. (2023). Natural compound chaetocin induced DNA damage and apoptosis through reactive oxygen species-dependent pathways in A549 lung cancer cells and in vitro evaluations. *IET nanobiotechnology*, 17(5), 465-475.
119. Zhang, W. J., Tang, L. P., Peng, J., Zhai, L. M., Ma, Q. L., Zhang, X. S., & Su, Y. H. (2024). A WRI1-dependent module is essential for the accumulation of auxin and lipid in somatic embryogenesis of Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, 242(3), 1098-1112.

120. Zhao, Y., Cao, R., Li, J., Xu, Y., Zhou, L., & Ye, Y. (2025). Lipid droplets in plants: turnover and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, *16*, 1625830.

