T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VİRÜS ARACILI GEN SUSTURMA (VIGS) YÖNTEMİYLE HAŞHAŞ SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE ALKALOİD ÜRETİMİNİN MODİFİKASYONU

Deniz Ece ŞALLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Eş Danışman

Dr. Deniz KÖM

Ocak, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VİRÜS ARACILI GEN SUSTURMA (VIGS) YÖNTEMİYLE HAŞHAŞ SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE ALKALOİD ÜRETİMİNİN MODİFİKASYONU

Deniz Ece ŞALLI tarafından hazırlanan tez çalışması 20.01.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Dr. Deniz KÖM
TÜBİTAK-MAM-BYYB EBAG
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof Dr. Semiha ERİŞEN, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr.Öğretim Üyesi Esma ULUSOY, Üye

Üsküdar Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Semiha ERİŞEN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Virüs Aracılı Gen Susturma (VIGS)Yöntemiyle Haşhaş Süspansiyon Kültüründe Alkaloid Üretiminin Modifikasyonu başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Deniz Ece ŞALLI

İmza

Bu çalışma, 5213303 numaralı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) projesi kapsamında desteklenmiştir.

Babama…

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca göstermiş olduğu hoşgörü, sabır ve samimiyet ile her türlü desteğini esirgemeyen, kendi ayaklarımın üstünde durma şansını sunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Semiha ERİŞEN'e, bu çalışmayı hazırlarken geçirdiğim süreçte kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, her zorlandığım noktayı bana kolaylaştırarak sabır ve ilgiyle ilerlememi sağlayan eş danışmanım Dr. Deniz KÖM'e, her daim şefkat, güler yüzü ve desteğini yanımda hissettiğim saygıdeğer Doç. Dr. Selma ONARICI'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca her türlü sorunumda yardım edip tüm bu çalışma sürecine bizzat eşlik eden TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde birlikte çalıştığım tüm bursiyer arkadaşlarıma, bu süreçte geçirdiğim zorlukları ve sevinçleri benimle birlikte göğüsleyen arkadaşlarıma,

Hayatımın her anında olduğu gibi bu süreçte de maddi manevi en büyük destekçim, hayattaki en büyük şansım olan sevgili aileme, teşekkürü borç bilirim.

Deniz Ece ŞALLI

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ xi
TABLO LİSTESİ xiii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti....1
1.2 Tezin Amacı....3
1.3 Hipotez....3
2 GENEL BİLGİ 4
2.1 *Papaver somniferum* L. *(Haşhaş)*....4
2.2 Sekonder Metabolit Alkaloidler....8
2.3 Haşhaş Bitkisinde Alkaloid Biyosentezi....9
2.4 Haşhaş Alkaloidleri ve Kullanım Alanları....12
2.5 Bitkilerden Sekonder Metabolit Üretim Stratejileri....15
2.5.1 Doku Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimi....15
2.5.2 Metabolik Mühendisliği ile Sekonder Metabolit Üretimi....17
2.5.3 Bitkilerde Virüs Aracılı Gen Susturma (VIGS)....20
3 MATERYAL-METOT 24
3.1 Materyal....24
3.1.1 Bitki Materyali....24
3.1.2 Bakteri Suşları....24
3.1.3 Plazmitler....24
3.1.4 Besin Ortamları ve Çözeltiler....26
3.1.5 Elektroforez Tamponları, DNA Ladderlar ve Kitler....29
3.1.6 Kullanılan Cihazlar....32
3.2 Metot....33
3.2.1 *CODM, T6ODM, DIOX2* Genlerinde VIGS İçin Hedeflenen Bölgelere Özel Primerlerin Dizaynı....33
3.2.2 Haşhaş Bitkilerinin Yetiştirilmesi ve Total RNA İzolasyonu....35
3.2.3 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi....36
3.2.4 TRV2 Plazmitine Klonlanacak Sekansların PCR ile Eldesi....37

3.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi ve PCR Ürünlerinin İzolasyonu 38
3.2.6 Hedeflenen DNA Sekanslarının TRV2 Plazmitine Klonlanması 39
3.2.7 VIGS-pTRV2 Plazmitlerinin *E. coli*' ye Transformasyonu 41
3.2.8. Bakteri Stoklarının Oluşturulması 42
3.2.9. Bakterilerden Plazmit İzolasyonu 43
3.2.10 TRV1, TRV2 ve VIGS-pTRV2 Plazmitlerinin *A. tumefaciens*'e Transformasyonu 44
3.2.11 Haşhaş Bitkisinde Somatik Embriyo İndüksiyonu ve Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması 45
3.2.12 Haşhaş Somatik Embriyolarının VIGS-pTRV2 ve TRV1 Plazmitlerini içeren *A. tumefaciens* ile Transformasyonu 46
3.2.13 *CODM, T6ODM, DIOX* Geni veya Genleri Susturulmuş Somatik Embriyolarda Gerçek Zamanlı PCR ile Gen İfade Analizi 48

4 BULGULAR **54**

4.1 Bitki Materyalinden Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi 54
4.2 TRV2 Plazmitine Klonlanacak Sekansların Agaroz Jelde Görüntülenmesi ve PCR Ürünlerinden İzolasyonu 54
4.3 TRV2 Plazmitinin Kesimi ve Agoroz Jelden İzolasyonu 56
4.4 Hedef DNA Sekanslarının Kesimi ve TRV2 Plazmitine Ligasyonu 57
4.5 VIGS-pTRV2 plazmitlerinin *E. coli 'ye* Transformasyonu 58
4.6 VIGS-pTRV2 içeren *E. coli* 'den Plazmit İzolasyonu 60
4.7 TRV1, TRV2 ve VIGS-pTRV2 Plazmitlerinin *A. tumefaciens* 'e Transformasyon 60
4.8 Haşhaşda Somatik Embriyo İndüksiyonu ve Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması 63
4.9 Haşhaş Somatik Embriyolarının A. *tumefaciens* ile Transformasyonu 65
4.10 *CODM, T6ODM, DIOX* Gen ve Genleri Susturulmuş Somatik Embriyolarda Gen İfadesi Analizi 67

5 75

SONUÇ VE ÖNERİLER **75**

KAYNAKÇA **79**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **88**

SİMGE LİSTESİ

dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
n	Mol
M	Molar
s	Saniye
°C	Santigrat
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

4OMT	3'-hidroksi-N-metil-(S)-koklaurin 4'-O-metiltransferaz
6OMT	6-O-metiltransferaz
AT	Bağlanma Sıcaklığı
BÇ	Baz Çifti
BIA	Benzil İzokolin Alkaloidleri
CDNA	Komplementer DNA
CNMT	Koklaurin N-metiltransferaz
CODM	Kodein- O-Demetilaz
COR	Kodeinon Redüktaz
DIOX2	Retikülin Oksidaz
DNA	Deoksribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
GC	Guanin-Sitozin
KB	Kilo Baz
KEGG	Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi
LB	Luria Bertani Besin Ortamı
MRNA	Mesajcı RNA
MS	Murashige ve Skoog Besin Ortamı
N7OMT	(R,S)-retikülin7-O-metiltransferaz
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PPM	Bitki Koruyucu Karışım

PTGS	Transkripsiyon Sonrası Gen Susturulması
RNA	Ribonükleik Asit
RNAİ	RNA İnterferans
SALR	Salutaridin Redüktaz
SALSYN	Salutaridin Sentaz
SAT	Salutaridinol-7-O-Asetiltransferaz
SİRNA	Küçük İnterferaz RNA
STORR	1,2-dehidroretikülin sentaz
STOX	Tetrahidroprotoberberin Oksidaz
T6ODM	Tebain 6-O-Demetilaz
TAE	Tris Astetat EDTA Tamponu
TBE	Tris Borat EDTA Tamponu
TM	Erime Sıcaklığı
TRV	Tütün Çıngırak Virüsü
VIGS	Virüs Aracılı Gen Susturulması

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 *P. somniferum* L. bitkisinin taksonomik hiyerarşisi (TÜBİVES, 2022) 4
Şekil 2. 2 *P. somniferum* bitkisinin genel görünümünü gösterir illüstrasyon (Wilhem,1885 http://www.biolib.de/).....5
Şekil 2. 3 *P. somniferum*' un Türkiye üzerindeki dağılımı (TÜBİVES).....6
Şekil 2.4 19.yy'da çocuklar için kullanılan afyon içeren şurup reklamı.....9
Şekil 2.5 *P. somniferum* bitkisinde benzilizokinolin alkaloid biyosentezi 11
Şekil 2.6 Morfinin 2 boyutlu kimyasal yapısı ($C_{17}H_{19}NO_3$).....13
Şekil 2.7 Kodeinin 2 boyutlu kimyasal yapısı ($C_{18}H_{21}NO_3$).....13
Şekil 2.8 Tebainin 2 boyutlu kimyasal yapısı ($C_{19}H_{21}NO_3$).....14
Şekil 2. 9 Papaverinin 2 boyutlu kimyasal yapısı ($C_{20}H_{21}NO_4$).....14
Şekil 2. 10 Noskapinin 2 boyutlu kimyasal yapısı ($C_{22}H_{23}NO_7$).....15
Şekil 2.11 VIGS basamakları 22
Şekil 3. 1 pYL192 (TRV1) plazmitinin tüm genom haritası.....25
Şekil 3. 2 pYL156 (TRV2) plazmitinin tüm genom haritası.....25
Şekil 3. 3 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA uzunluk markırları 31
Şekil 3. 4 *P. somniferum* bitkilerinin yetiştirilmesi 35
Şekil 3. 5 Somatik embriyoların *A. tumefaciens* ile transformasyonu 48
Şekil 3. 6 Örneklerin gerçek zamanlı PCR plate konumları 52
Şekil 4. 1 TRV2 plazmitine klonlanacak sekansların PCR sonrası agaroz jelde görüntüsü.....55
Şekil 4. 2 TRV2 plazmitinin jelden izolasyonu.....57
Şekil 4. 3 TRV2 plazmitine insert edilecek DNA sekanslarının jel görüntüleri 58
Şekil 4. 4 VIGS-pTRV2 plazmitlerinin koloni PCR analizi jel görüntüleri 59
Şekil 4. 5 VIGS-pTRV2 plazmitlerinin ve TRV1-TRV2 plazmitlerinin *A. tumefaciens* LBA4404 'e transformasyonu sonrası antibiyotikli besi ortamında oluşan koloniler 61
Şekil 4. 6 VIGS-pTRV2 plazmitlerinin ve TRV1-TRV2 plazmitlerinin *A. tumefaciens* LBA4404 suşunda koloni PCR analizi jel görüntüleri 62
Şekil 4. 7 1-2 haftalık aseptik fideler 63
Şekil 4. 8 Somatik embriyo indüksiyon aşamaları.....64
Şekil 4. 9 Somatik embriyo süspansiyon kültürleri 65
Şekil 4. 10 İnokulasyon sonrası kültür ortamı 67
Şekil 4. 11 VIGS uygulaması sonrası örneklerden izole edilen Total RNA jel görüntüsü 68
Şekil 4. 12 cDNA dilüsyonlarına ait jel görüntüsü 69

Şekil 4. 13 *CODM* gen ifadesi değişim grafiği....70
Şekil 4. 14 *COR* gen ifadesi değişim grafiği....71
Şekil 4. 15 *T6ODM* gen ifadesi değişim grafiği....71
Şekil 4. 16 *DIOX2* gen ifadesi değişim grafiği....72
Şekil 4. 17 *N7OMT* gen ifadesi değişim grafiği....72
Şekil 4. 18 *CNMT* gen ifadesi değişim grafiği....73
Şekil 4. 19 *4OMT* gen ifadesi değişim grafiği....73

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 Dünyada ana üretici ülkeler bazında morfin amaçlı yasal haşhaş hasat alanları (Hektar) (TMO, 2019) 7
Tablo 2. 2 *P. somniferum* bitkisinde bulunan önemli alkaloidler (Önmez, 2007) 12
Tablo 3. 1 Çalışmada kullanılan TRV1 ve TRV2 plazmitleri 26
Tablo 3. 2 Çalışmada kullanılan antibiyotik-enzim ve büyüme düzenleyiciler 27
Tablo 3. 3 Çalışmada kullanılan besin ortamları ve içerikleri 28
Tablo 3. 4 Agaroz jel elektforez tamponları, RNA yükleme boyası içeriği ve hazırlanışı 30
Tablo 3. 5 Çalışmada kullanılan ticari kitler-enzimler 32
Tablo 3. 6 *CODM, T6ODM, DIOX2* genlerinde hedeflenen bölgelere özel primerler 34
Tablo 3. 7 DNA çoğaltımı için PCR bileşenleri ve final konsantrasyonları 37
Tablo 3. 8 *Bam*HI ve *Xho*I kesim reaksiyon bileşen miktarları 39
Tablo 3. 9 Ligasyon reaksiyonu bileşenleri 40
Tablo 3. 10 Her bir DNA sekansı için hesaplanan ligasyon bileşen miktarları 40
Tablo 3. 11 Koloni PCR bileşenleri ve final konsantrasyonları 42
Tablo 3. 12 TRV2 kontrol primer dizileri 42
Tablo 3. 13 TRV1 kontrol primer dizileri 44
Tablo 3. 14 VIGS uygulamalarında hedeflenen genler ve uygulama kombinasyonları 47
Tablo 3. 15 Hedeflenen genlerin ifade analizlerinde kullanılan primerler 50
Tablo 3. 16 Dream Taq polimeraz reaksiyon bileşenleri ve final konsantrasyonları 51
Tablo 3. 17 Gerçek Zamanlı PCR içeriği ve konsantrasyonları 52
Tablo 4. 1 TRV2 plazmitine klonlanacak sekansların izolasyonu sonrası miktar ve saflık değerleri 56
Tablo 4. 2 TRV2 plazmitinin izolasyon sonrası miktar ve saflık değerleri 57
Tablo 4. 3 VIGS-pTRV2 içeren *E. coli* DH5α ‘lardan izole edilen plazmit miktarları ve saflık değerleri 60
Tablo 4. 4 Büyütülen *A. tumefaciens’*lere ait $O.D._{600}$ değerleri ve uygun O.D. değerlerinin belirlenmesi 66
Tablo 4. 5 VIGS uygulaması sonrası örneklerden izole edilen RNA miktarı ve saflık değerleri 68
Tablo 4. 6 VIGS uygulaması sonrası örneklerde cDNA sentezi için hesaplamalar 69

ÖZET

Virüs Aracılı Gen Susturma (VIGS) Yöntemiyle Haşhaş Süspansiyon Kültüründe Alkaloid Üretiminin Modifikasyonu

Deniz Ece ŞALLI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Eş-Danışman: Dr. Deniz KÖM

Papaveraceae familyasına ait bir tür olan *Papaver somniferum* L. (afyon haşhaşı) kapsül kabukları yüksek oranda noskapin, buprenorfin, morfin, papaverin, tebain ve kodein gibi tıbbi açıdan değerli alkaloidler içerir. Ağrı kesici, spazm giderici ve öksürük baskılayıcı etkileri olan bu maddeler yarı sentetik ilaçların üretimi için önemli bir ticari hammaddedir. Bu alkoloidlerin kimyasal sentezi olmadığından sadece bitkisel kaynaklardan elde edilebilmektedir. Belli bir alkaloidin bitkideki miktarını artırabilmek ancak klasik ve biyoteknolojik ıslah yöntemleri ile mümkün olabilmektedir. Virüs aracılı gen susturma (VIGS), bitkilerde hem viral hem de hücresel mRNA'ları hedef alan, nükleotit dizisine özgü transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) mekanizmasıdır. Yakın zamanlarda, spesifik alkaloid sentaz genlerinin fonksiyonunu araştırmak, ilgili genlerin transkript seviyelerini değiştirmek için etkili bir araç olarak gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında, VIGS tekniği kullanılarak morfin biyosentezinde görevli *CODM, T6ODM, DIOX2* genlerinin susturulmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. Hedeflenen gene özel tasarlanmış primerlerler ile oluşturulan DNA sekansları TRV2 plazmitine klonlanmıştır. Farklı kombinasyonları içeren TRV2 plazmitleri *Agrobacterium tumefaciens* bakterisine aktarılmış ve ardından haşhaş

süspansiyon kültürlerinde somatik embriyolara transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, morfin biyosentezinde anahtar enzimler olan *CODM* ve *T6ODM* gen ifadelerinde %82 ve %65'e varan azalış elde edilmiştir. Ayrıca haşhaşda *A.tumefaciens* aracılı transformasyon için somatik embriyolara maserozim enzimi ön uygulamasını içeren yeni bir protokol geliştirilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar mevcut haşhaş alkaloid üretim stratejilerine katkı sunar niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: *Papaver somniferum*, VIGS, morfin biyosentezi, morfin, metabolik mühendisliği

ABSTRACT

Modification of Alcaloide Production in Opium Poppy Suspension Culture by Virus Induced Gene Silencing (VIGS) Method

Deniz Ece ŞALLI

Department of Molecular Biology and Genetics

Postgraduate Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Co-supervisor: Dr. Deniz KÖM

Capsule shells of *Papaver somniferum* L. (opium poppy), a species belonging to the family Papaveraceae, contain high levels of noscapine and valuable disposable alkaloids such as buprenorphine, morphine, papaverine, thebaine, and codeine. These substances, which have analgesic, antispasmodic, and cough suppressant effects, are important commercial raw materials for the production of semi-synthetic drugs. Since there is no chemical synthesis for these alkaloids, they can only be obtained from plant sources. Increasing the amount of a certain alkaloid in the plant is only possible with classical and biotechnological breeding methods. Virus-induced gene silencing (VIGS) is a post-transcriptional gene silencing (PTGS) defense system that targets both viral and cellular mRNAs in plants. Recently, it has been shown to be an effective tool investigating the function of specific alkaloid synthase genes and alter the transcript levels of related genes. In this thesis, studies were conducted to silence the *CODM*, *T6ODM*, and *DIOX2* genes involved in morphine biosynthesis using the VIGS technique. DNA sequences created with primers designed specifically for the targeted gene were cloned into the TRV2 plasmid. TRV2 plasmids containing different combinations were transfected into

Agrobacterium tumefaciens and then transformed into somatic embryos in poppy suspension cultures. As a result, *CODM* and *T6ODM* gene expressions, which are the key enzymes in morphine production, were reduced by up to 82% and 65%, respectively. Additionally, a new protocol has been developed for *A. tumefaciens* mediated transformation in poppies, which includes the pre-application of the maserozyme enzyme to somatic embryos. The results obtained from the study present the minimum contribution of the current poppy alkaloid production.

Keywords*: Papaver somniferum*, VIGS, morphine biosynthesis, morphine, metabolic engineering

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Papaver somniferum L. (haşhaş) bitkisi insalığın en eski tıbbi bitkilerinden biri olup halen içerdiği narkotik, ağrı kesici ve diğer değerli ve nadir alkaloidler için tek doğal kaynak olmaya devam etmektedir. Bağımlılık yapıcı etkisi nedeniyle yetiştirilmesi Birleşmiş Milletler 1961 ve 1972 Tek Sözleşmesi ve 30 Mart 1961 tarihli özel izne tabidir (U.N. Resmi Gazete, 1972). Bununla birlikte bitkiden daha yüksek alkaloid içeriği elde edilmesine yönelik çalışmalar finansal verimlilik açısından ilaç üretimi ve hammaddesi sanayisinde önemli bir konudur.

Haşhaş alkaloid yollarının incelenmesi için ilk fonksiyonel genomik çalışması haşhaş sakızının sitozolik serum ve vezikül tortularında toplamda 75 farklı proteinin 2 boyutlu SDS-PAGE ile analizidir. Kodeionun redüktaz (COR), enziminin morfinon dalının temsilcisi olduğu ve morfin biyosentezinde görevli olabileceği tespit edilmiştir (Decker vd, 2000).

Millagate ve ekibinin 2004, Ziegler ve ekibinin 2005 yılında gerçekleştirdiği 2 farklı dizileme projesinde *P. somniferum* tohumları incelenmiş, bazı tohum ve bitkilerin morfin içermediği belirlenmiş, yapılan dizileme analizleri sonucunda *top1* mutantına ait cDNA kütüphanesi oluşturulduğunda bu mutantın morfin ve kodein biyosentezi yerine tebain ve oripavine biriktirdiği tespit edilmiştir (Millagate vd, 2004; Ziegler vd, 2005). Çalışma tam olarak hangi genlerin bu dönüşümden sorumlu olduğunu kanıtlamasa da haşhaş alkaloid metabolik ağını aydınlatmak ve nihayetinde onu değiştirmek için yeni yollar açmıştır.

Haşhaş alkaloid biyosentezini anlaşılmasında büyük katkılar sunan Allen ve ekibi, haşhaşta ilk gen susturma çalışması olan RNA interferans (RNAi) yöntemi ile *COR* geninin ekspresyonunu durdurarak morfin içeriğinde azalma elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmanın asıl önemli sonucu gen susuturma sonrası transgenik haşhaşlarda morfin öncüllerinin birikmesi yerine yedi enzimatik basamak önce yer alan retükilin dahil olmak üzere nadir alkaloidlerin biriktiğinin tespit edilmesidir (Allen vd, 2004).

Allen ve ekibinin haşhaşta yaptığı bir diğer RNAi aracılı gen sustuma çalışmasında ise morfin biyosentezindeki salutaridinol-7-O-asetiltransferaz (SAT- SalAT) enzim geninin hem aşırı ekspresyonu hem de baskılanması gerçekleştirilmiştir. Genin aşırı ekpsresyonu bitkide tebain, kodein ve morfin artışına neden olurken, baskılanması ara basamakta görülen salutaridinin birikmesine yol açmıştır (Allen vd, 2008). Kempe ve ekibinin gerçekleştirdiği benzer bir çalışma ile de salutaridin ve tebain arasında SalAT ve SalR enzimlerinin rol aldığı tersinir bir reaksiyon doğrulanmıştır (Kempe vd, 2009).

VIGS, bitkilerin virüs saldırılarına yanıt olarak homolojiye bağlı savunma mekanizmalarını tetiklemesinden yararlanan ve başlangıçta Solanaceae ailesinin gen ürünlerinin biyolojik işlevini belirlemek için özel bir yaklaşım olarak öne çıkmıştır. Haşhaş bitkisinde VIGS çalışmaları da RNAi çalışmalarına yakın dönemde, 2005 tarihinde Hielman ve ekibi tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmada tütün çıngırak virüsüne (TRV) endojen bir gen olan fitoen desatüraz (*PDS*) gen cDNA'sı klonlanmış ve *PDS* gen ifadesindeki azalışa bağlı olarak fenotipte ağartılmış görünüm elde edilmiştir. VIGS metodu, benzil-izokolin alkaloidleri (BIA) yolağı genleri ve enzimleri üzerindeki fonksiyonel genomik çalışmalar için hızlı ve alternatif bir strateji olarak önerilmiştir (Hielman vd, 2005).

Bu önerinin ardından Hagel ve Facchini (2010) morfin biyosentezinde görevli olan *T6ODM* ve *CODM* enzim genlerini VIGS metodu ile susturmuşlardır. Genlerin susturulması tebainin yıkımının inhibisyonu ve dolaylı olarak kodeinon birikimiyle sonuçlanmıştır. Ayrıca CODM enzimi blokajı sonucu bir diğer dönüşüm olan tebaninin oripavine dönüşümü engellendiğinden transgenik bitkilerde oripavine elde edilememiştir.

Morfin biyosentezinde görev alan 6 enzimi kodlayan genin VIGS yöntemi ile sistematik olarak susturulmasını hedefleyen bir diğer çalışmada, *SalSyn*, *SalR*, *T6ODM* ve *CODM* genlerinin susturulduğu bitkilerde morfin seviyesinde azalma görülürken, daha üst basamaklarda yer alan s-retikülin, saluratidin ile morfin-tebain-kodein üçgenindeki tebain ve kodein seviyelerinde artışlar görülmüştür. *COR* ve *SalAT* genleri susturulduğunda ise retikülin ve salutaridin birikimi gözlemlenmiştir (Wikejoon ve Facchini, 2012).

Alagöz ve ekibinin VIGS vektörleri ile tip II CRIPSR/Cas9 sisteminin klavuz RNA (sgRNA) hedeflemesinin birleştirilmesine dayanan çalışmasında haşhaş biyosentezinin

üst basamağında olan *4OMT2* geninin susturulması *Agrobacterium* aracılı transformasyon ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan dizileme analizleri sonucunda transgenik bitkilerde delesyonların gerçekleştiği gözlenmiş ve tebain-morfin miktarının azaldığı HPLC analizleri ile tespit edilmiştir. Çalışma hem sentetik hem de viral vektörlerden kopyalanan sgRNA'lar ile haşhaş bitkisinde alkaloid manipülasyonun gerçekleştirilebileceğini gösteren ilk çalışma niteliğindedir (Alagöz vd, 2016).

1.2 Tezin Amacı

Doku kültüründe rejenerasyon potansiyeli yüksek somatik hücrelerin homojen, hızlı ve fazla miktarda büyüme avantajına sahip olan süspansiyon kültürlerinin oluşturulması, alkaloid ve depo kimyasalların üretim stratejilerindendir. Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalar ile VIGS tekniğinin belirli alkaloid sentaz genlerinin transkript seviyelerini artırmak veya azaltmak için etkili bir araç olarak gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, *P. somniferum* bitkisinde *CODM*, *T6ODM* ve *DIOX* genlerini hedefleyen VIGS plazmitlerinin tasarlanması; tek veya aynı anda 2 farklı geni hedefleyen plazmit kombinasyonlarını taşıyan *A. tumefaciens* suşları aracığıyla haşhaş süspansiyon kültürlerde somatik embriyoların transformasyonu ve buna bağlı olarak haşhaş benzilizokolin yolağı üzerinde modifikasyonların gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. VIGS tekniği ile elde edilen bu sonuçlar, haşhaş benzilizokolin yolağının modifikasyonu ve belirli alkaloiderin miktarının kalıcı olarak değiştirilmesi için oluşturulacak stratejilere önemli katkılar sağlayacaktır.

1.3 Hipotez

Biyosentez yolağında bloke olan genin ifadesinin azalmasına bağlı olarak alt basamağında bulunan genlerin de ifadesinin azalması, üst basamağında bulunan genlerin ifadesinin birikmeden dolayı artması muhtemeldir. Çalışmamızda VIGS plazmitlere klonan *CODM*, *T6ODM* ve *DIOX* genlerini hedefleyen sekansların haşhaş somatik embriyolara başarıyla transformasyonu ve sonrasında bu genlerin ifadesinin azalması, buna bağlı olarak da üst ve alt basamaktaki genlerin de ifadesinde artı veya eksi yönlü değişimler olması beklenmektedir.

2
GENEL BİLGİ

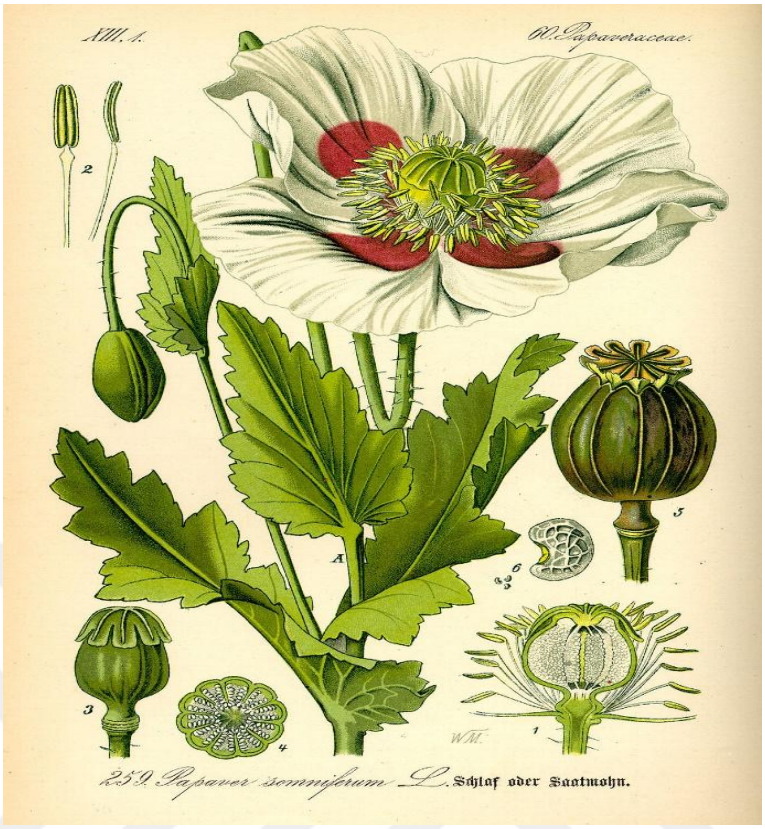
2.1 *Papaver somniferum* L. *(Haşhaş)*

Papaveraceace (Gelincikgiller) ailesinin *Papaver* cinsinin bir türü olan *P. sominefrum* L. (Şekil 2.1) Latincede rüya görmek anlamına gelir ve bitki, Papaveraceae ailesinin karakteristik özelliği olan tohumlar hariç kapsüller de dahil olmak üzere tüm bitki kısımları kesildiğinde bu kısımlarından sızan sulu veya sütlü içeriğe sahiptir (Janick, 1997).



Şekil 2. 1 *P. somniferum* L. bitkisinin taksonomik hiyerarşisi (TÜBİVES, 2022)

Tek yıllık ve otsu bir kültür bitkisi olan haşhaş, Şubat-Mart ve Ekim aylarında olmak üzere hem yazlık hem kışlık ekimi yapılabilmektedir. Ekim zamanına göre vejetasyon süresi 110-280 gün aralığındadır. Bitki; 30-170 cm aralığında uzayabilir, olgunlaştığında bitki gövdesi ve kapsülü sarımsı bir kahve renge sahiptir, dalları tüysüzdür ve üzeri yeşilimsi gri bir katmanla örtülüdür. Çiçekleri beyaz, mor veya kırmızı renge sahip olabilmektedir, döllendikten sonra kapsül benzeri oval veya fıçı şekilli kapalı meyveleri oluşur, kapsüller karakteristik olarak üst kısmında stigma denen yıldızımsı kanatlara sahiptir, hasat zamanı kapsüllerin tamamen kuruduğu zamandır. Tohumları oldukça küçük noktamsı ve sarı, gri, kahverengi, mavi gibi çeşitli renklerde bulunabileceği gibi çiçeklerin açtığı renge göre de farklılık gösterebilmektedir (Şekil 2.2) (Gümüşçü, 1996).

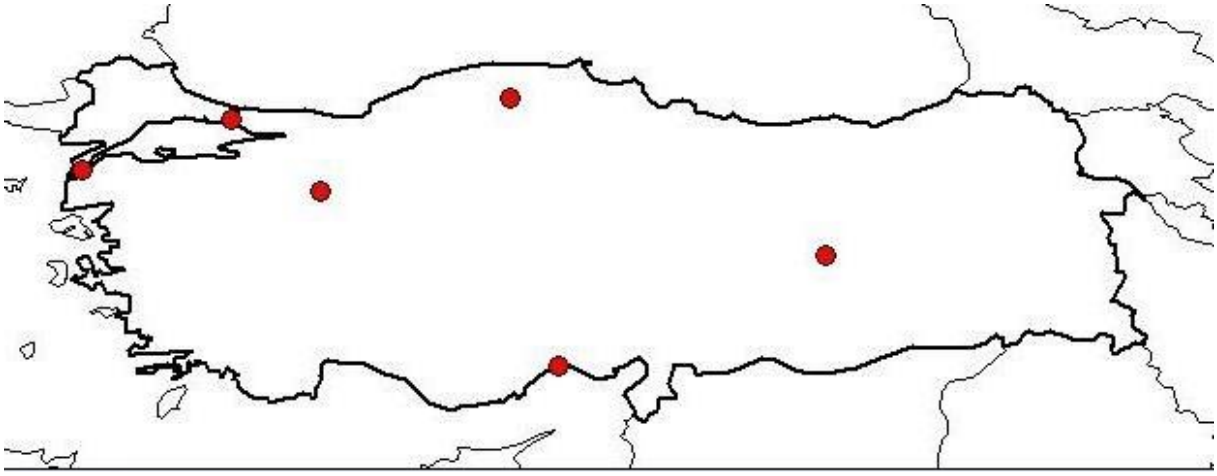


Şekil 2. 2 *P. somniferum* bitkisinin genel görünümünü gösterir illüstrasyon (Wilhem,1885 http://www.biolib.de/)

Haşhaş düşük sıcaklıklara dirençlidir ancak ideal yetişme şartı güneşli ve sıcak iklimdir. Kil miktarı fazla ve çok fazla çakıl içeren toprak türleri dışında her toprakta gelişebilir ve yıllık yağış ihtiyacı 600-700 mm arasındadır (Camcı vd, 2008).

Hitit ve Sümer metin kalıntılarında rastlanan haşhaş çiçeği resimlerinden yola çıkarak tarımının Anadolu'da M.Ö. 3000'den itibaren yapıldığı kabul edilir. Günümüzde ise Birleşmiş Milletler Teşkilatı gözetimi altında geleneksel üretici olarak Türkiye ve Hindistan olmak üzere Avustralya, Fransa, İspanya, Macaristan'da ekimine izin verilmektedir (Kahraman, 2011).

Türkiye Bitkileri Veri Servisi (TÜBİVES) verilerine göre, ülkemizde İstanbul, Kastamonu, Çanakkale, Elazığ, Eskişehir, Mersin'de çeşitli taksonları yetişmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3 *P. somniferum*' un Türkiye üzerindeki dağılımı (TÜBİVES)

Bitkinin tohumu ve kapsülü ekonomik değeri olan 2 önemli kısmıdır.

Haşhaş tohumları %40-60 oranında yağ ihtiva eder. Bu yağın yemeklik kullanımının yanı sıra boyacılık, sabun sanayisi gibi endüstriyel alanlarda da tercih edilmesi nedeniyle önemli bir yağ bitkisidir. Bununla birlikte kapsülden elde edilen ve ekonomik katma değeri çok yüksek olan yaklaşık 30-40 farklı alkaloid nedeniyle tıbbi açıdan da oldukça kıymetli bir bitkidir (Koç vd, 2006). Kapsüller morfin, papaverin, tebain, kodein, noskapin, buprenorfin gibi narkotik ağrı kesicileri içermesi nedeniyle yarı sentetik ilaç üretiminde önemli bir ticari hammaddedir (Wijekoon ve Facchini, 2011). Opioid bazlı analjezikler şiddetli ağrıların giderilmesi ve palyatif bakım için en etkili ve ucuz tedaviler arasında yer almaya devam etmektedir, ancak bağımlılığa neden olmaları nedeniyle kötüye kullanımı önlemek için özel tıbbi reçete gereklidir (Guo vd, 2018).

Bağımlılık yapıcı etken maddelere sahip bir bitki olması nedeniyle üretimi, ekimi ve satışı Birleşmiş Milletler tarafından kontrol edilmektedir ve bu konudaki hükümleri Uluslararası Antlaşmalar ile tescillenmiştir. Ülkemizde ise haşhaş ekiminin kontrolü, haşhaş kapsülü, ham afyon ve tıbbi afyon üretimi, satın alınması, bunlardan uyuşturucu madde imalatı, yurt içinde satışı ve ihracı konularında, Bakanlar Kurulunun 13/04/1987 tarih, 87/11703 sayılı kararıyla Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü görevlendirilmiş olup, günümüzde bu görev halen söz konusu kurumca yürütülmektedir (Eken, 2004).

Dünyada yasal ve geleneksel haşhaş üreticisi olan Türkiye, Hindistan, Avusturya gibi ülkeler bu statüleri nedeniyle haşhaş ticaretinde değiştirelemeyecek satış kotasına sahiptirler. Örneğin opait hammaddelerinin önde gelen ithalatçısı olan ABD, morfinin %80'ini geleneksel tedarikçileri olan Türkiye ve Hindistan'dan kalan %20'sini diğer ülkelerden satın almak zorundadır. Bu uygulama kısaca 80/20 kuralı olarak bilinir (TMO, 2019).

2019 yılı TMO Haşhaş Raporu verilerine göre dünyada ana üretici ülkeler bazında morfin amaçlı yasal haşhaş ekim alanları içerisinde (Tablo 2,1) Türkiye %59 ile en yüksek paya sahiptir.

Tablo 2. 1 Dünyada ana üretici ülkeler bazında morfin amaçlı yasal haşhaş hasat alanları (Hektar) (TMO, 2019)

Yıllar	Türkiye	Hindistan	Avustralya	Fransa	İspanya	Macaristan	Diğer	Toplam
2015	61.591	5.422	6.947	8.450	2.867	5.302	7.111	97.690
2016	29.922	557	7.293	6.780	5.694	3.520	7.219	60.985
2017	23.731	8.721	3.445	4.893	1.231	2.003	8.290	52.314
2018	45.135	4.710	3.205	5.628	1.238	514	2.832	63.262
2019	56.511	6.107	3.100	7.486	8.578	3.110	2.750	87.642

Ülkemizde çoğunlukla geleneksel aile işletmeleri ile yapılan haşhaş tarımı ve çizilmemiş haşhaş kapsül üretimi 2015 yılından itibaren Afyon, Amasya, Burdur, Balıkesir, Eskişehir, Manisa, Uşak, Denizli, Isparta, Kütahya, Konya, Çorum, Tokat illerinde gerekli izin belgelerinin sağlanması şartı ile TMO'nun belirlediği alanlarda serbesttir. Hasat edilen ürünler yine TMO tarafından yıllık belirlenen ücretlerle satın alınmaktadır.

Haşhaş ürünlerini değerlendirmek ve dünya pazarında yasal alkaloid ihtiyacının karşılanması amacıyla 1976 yılnda Afyonkarahisar ilinde Afyon Alkaloidleri Fabrikası (AAF) kurulmuştur. Kurum, yılda 25.000 ton çizilmemiş haşhaş kapsülü işleyerek 80-100 ton aralığında morfin üretimi gerçekleştirir. Bunun yanı sıra kodein sülfat, dionin, dihidrokodein tiyosiyanat gibi yarı sentetik ilaç hammaddeleri (API) sentezlemekte olup

alanında dünyada en büyük fabrikadır. AAF' de üretilen yıllık 20.000 ton tohumun yanında morfin ve türevleri ülke içi gereksinim karşılandıktan sonra kalan %95'i tıbbi amaçlı olarak ihtiyaç sahibi ülkelere ihracatı gerçekleştirilmektedir. Üretimin yeterli seviyede seyretmesi nedeniyle bu ürünlerin veya tohumların ithalatı yapılmamaktadır.

Günümüzde tohumlardan elde edilen morfin oranının %0,4'ten dünya ticaretinde kabul gören %2 oranına çıkarılarak birim kapsülden elde edilen morfin oranının arttırılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur. Bu sayede uluslararası pazarda avantaj kazanmak, ayrıca sürdürebilir ve kararlı haşhaş tarımı ile fabrika üretim verimi arttırılarak maliyetin düşürülmesi hedeflenmekedir. Dünyada tıbbi ve ticari değeri olan haşhaştan elde edilen diğer alkaloitlerin ticari ölçekte üretimine yönelik tarımsal ve biyoteknolojik Ar-Ge çalışmaları da sürdürülmektedir (TMO, 2019).

2.2 Sekonder Metabolit Alkaloidler

Bitkiler normal yaşam döngülerini sürdürmek için karbonhidrat, protein ve lipidlerden oluşan ürünleri üretir ve tüketirler. Bunlar primer metabolitler olarak adlandırılır. Bitkinin hayat döngüsünden ziyade böcek, mantar gibi patojenlere, yüksek sıcaklık, nem gibi abiyotik stres koşullarına karşı savunma ve yanıt molekülleri olarak ikincil-sekonder metabolitler üretir (Wu ve Chappell, 2008). Bu metabolitler elde edikleri biyosentez yollarına göre asetil CoA'dan melavonik asit yoluyla sentezlenen terpenler, aminoasitlerden kökenlenen azot içeren bileşikler ve fenilalaninden sentezlenen fenolik bileşikler olmak üzere 3 ana grupta sınıflandırılırlar. Bu bileşikler insan yaşamında oldukça önemli yere sahiptirler ve gıda, ilaç, kozmetik, ziraat, tıp alanlarında değerli hammaddeler olarak yer alırlar (Eray Vuran ve Türker, 2021).

Sekonder metaboltilerin azotlu bileşikler sınıfında yer alan alkaloitler, 3000 yıldır insanlar tarafından kullanılan kuvvetli fizyolojik ve farmakodinamik aktiviteye sahip, bazik karakterli kimyasal bileşiklerdir. Biyolojik aktivitelerine bağlı olarak yaklaşık 12.000 alkaloidin farmasötik, narkotik ve zehir olmak üzere farklı kullanımları bulunmaktadır (Zulak vd., 2006; Gürkök vd., 2010). Çoğunlukla otsu bitkilerden elde edilen alkaloitler belli bir seviyede toksittir ve öncelikli görevi mikrobiyal savunmadır (Bakır, 2020). Örneğin baldıran otu özütü olarak bilinen coniine oldukça zehirlidir ve motor sinir ucu felcine neden olmaktadır, tarihsel süreçte intihar ve ölümlerde bu bitkinin kullanımına oldukça sık karşılaşılır. İnsanlık tarihindeki en eski ilaçlardan biri olan Theriak, kurutulmuş yılan eti, şarap ve haşhaş afyonu karışımıyla yapılarak

örümcek, akrep ve yılanlara karşı ilaç olarak kullanılmıştır. Yine haşhaş afyonu uyuşturucu ve sakinleştirici etkisinden dolayı uzun bir süre çocuk ve yetişkin ilacı olarak kullanılmıştır (Fabbiri, 2002; Wink, 1998; Taşlıgil ve Şahin, 2018) (Şekil 2.4).



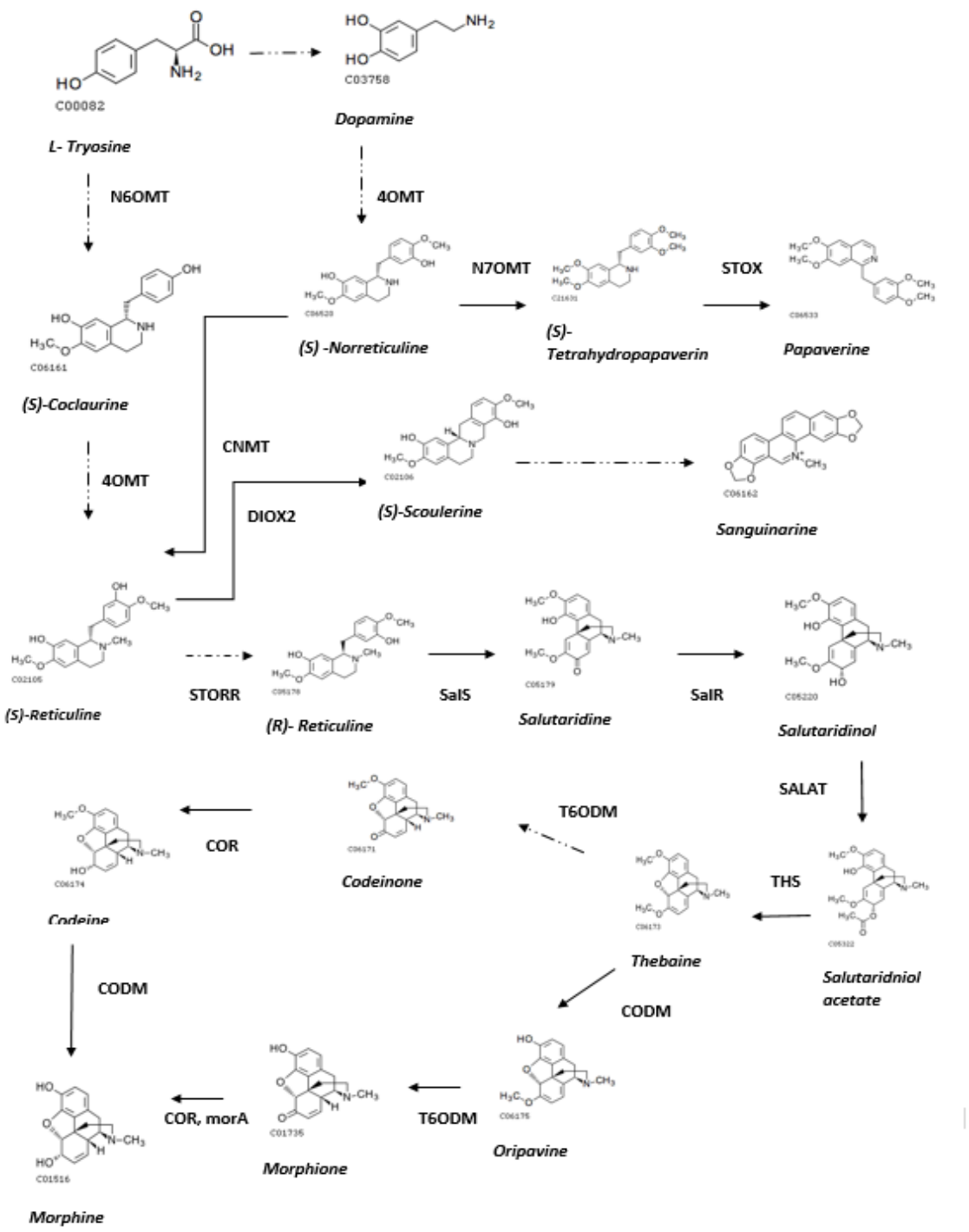
Şekil 2.4 19.yy'da çocuklar için kullanılan afyon içeren şurup reklamı

(https://museum.dea.gov/museum-collection/collection-spotlight/artifact/soothing-syrup)

2.3 Haşhaş Bitkisinde Alkaloid Biyosentezi

Haşhaş bitkisindeki değerli ürünler sebebiyle BIA metabolizmasının biyokimyası ve fizyolojisi 1960'lı yıllardan beri çalışılan popüler bir konudur (Hagel ve Facchini, 2013). BIA biyosentezi; fenilalanin, trozin ve triptofan biyosentezinden sonra L-tirozinin bir seri amino asit transferazı ile başlar ve S-norkoklaurin ve dopamin olmak üzere iki sentez koluna ayrılır. S-norkoklaurine, S-retikuline 6-O-metiltransferaz (6OMT) ve 3'-hidroksi-N-metil-(S)-koklaurine 4'-O-metiltransferaz (4OMT) tarafından metil ilavesi yapılır. Diğer yandan 4OMT ve diğer enzimler dopamini S-norretikülüne dönüştürür, ardından koklaurin N-metiltransferaz (CNMT), S-norretikülini morfin sentez yolunun başlangıç ürünü olan S-retiküline dönüştürür. Ek olarak, (R,S)-retikülin7-O-metiltransferaz (N7OMT) ve tetrahidroprotoberberin oksidaz (STOX) S-norretikülin'den papaverine dönüşümü katalize eder. Bir yan dalda, retikülin oksidaz (DIOX2), (R)-retikülinden en son sanguinarine kadar bir dizi reaksiyon başlatır. Diğer dalda (R)-retikülin, 1,2-dehidroretikülin sentaz (STORR) tarafından S-retiküline dönüştürülür. S-retikülinin tebaine dönüşümü, salutaridin sentaz (SalSyn), salutaridin redüktaz (SALR), salutaridinol-7-O-asetiltransferaz (SAT) ve tebain 6-O-demetilaz (T6ODM), kodeinon redüktaz (COR), kodein O-demetilaz (CODM) enzimleri ile

kodein ve son olarak morfin üretimi katalize edilir (Şekil 2.5) (Ziegler vd, 2006; Pienkny vd, 2009; Hagel ve Facchini, 2010; Beaudoin ve Facchini, 2014; Hagel ve Facchini, 2013; Gürkök vd, 2016;). Bunlara ek olarak, henüz tam olarak anlaşılamayan ve aydınlatılamayan BIA biyosentez basamakları mevcuttur (Gürkök vd, 2016).



Şekil 2.5 *P. somniferum* bitkisinde benzilizokinolin alkaloid biyosentezi

(Kesik çizgiler birden fazla reaksiyonun varlığını gösterirken, düz çizgiler tek bir reaksiyonu gösterir.6-O-metiltransferaz (6OMT) ,3'-hidroksi-N-metil-(S)-koklaurin 4'-O-metiltransferaz (4OMT), koklaurin N-metiltransferaz (CNMT) , (R,S)-retikülin7-O-metiltransferaz (N7OMT), tetrahidroprotoberberin oksidaz (STOX), retikülin oksidaz (DIOX2) , 1,2-dehidroretikülin sentaz (STORR), salutaridin sentaz (SalSyn), salutaridin redüktaz (SALR), salutaridinol-7-O-asetiltransferaz (SAT), tebain 6-O-demetilaz (T6ODM), kodeinon redüktaz (COR), kodein O-demetilaz (CODM).)

2.4 Haşhaş Alkaloidleri ve Kullanım Alanları

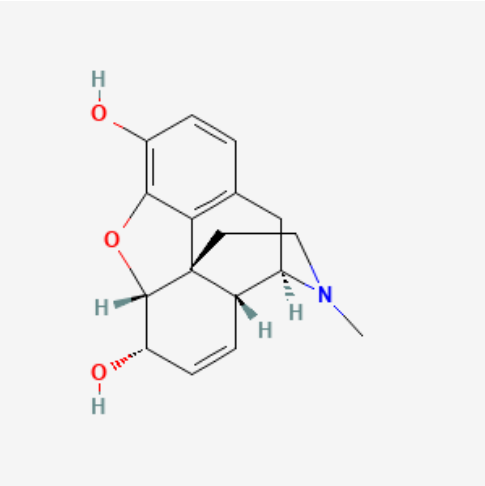
Kimyasal ve sentetik üretimler benzilizokinolin alkaloitlerinin morfinan alt sınıflarından herhangi biri için henüz ticari olarak elverişli değildir ve afyon haşhaşı tek kaynak olmaya devam etmektedir (Guo vd, 2018). Bitkinin kapsüllerinde bulunan alkaloitlerin en önemlileri; morfin, kodein, tebain, noskapin ve papaverindir. Tablo 2.2'de görüldüğü gibi yaklaşık 24 alkaloidin teşhisi yapılmıştır. Bu alkaloitler içerisinde tıpta ve eczacılıkta daha çok kullanılan ve bu nedenle üretimi ve eldesi popüler olan morfin, kodein, tebain, noskapin, papaverin alkaloitlerinin izolasyonu ve türevlendirilmesi konusunda araştırmalar devam etmektedir.

Tablo 2. 2 *P. somniferum* bitkisinde bulunan önemli alkaloidler (Önmez, 2007)

Adı	Formülü	Keşfin Sahibi	Tarih
Morfin	$C_{17}H_{19}O_3N$	Sertürner	1816
Narkotin	$C_{22}H_{23}O_7N$	Robiquet	1817
Kodein	$C_{18}H_{21}O_3N$	Robiquet	1832
Narsein	$C_{23}H_{27}O_8N$	Pelletier	1832
Tebain	$C_{19}H_{21}O_3N$	Windholz	1835
Pseudomorfin	$C_{17}H_{18}O_3N$	Smiles	1835
Papaverin	$C_{20}H_{21}O_4N$	Hesse	1848
Kriptopin	$C_{21}H_{25}O_5N$	Hesse	1864
Roadin	$C_{21}H_{21}O_6N$	Hesse	1867
Lantopin	$C_{23}H_{25}O_4N$	Hesse	1870
Mekonidin	$C_{21}H23O_4N$	Hesse	1870
Kodamin	$C_{20}H_{25}O_4N$	Hesse	1870
Lavdanin	$C_{20}H_{25}O_4N$	Hesse	1870
Lavdonasin	$C_{21}H_{27}O_4N$	Hesse	1871
Hidrokotarnin	$C_{12}H_{15}O_3N$	Hesse	1871
Oksinarkotin	$C_{22}H_{23}O_8N$	Becket ve Wright	1876
Protepin	$C_{20}H_{19}O_5N$	Hesse	1878
Ksantalin	$C_{20}H_{19}O_5N$	Smith	1893
Papaveramin	$C_{21}H_{25}O_6N$	Hesse	1903
Aporein	$C_{18}H_{16}O_2N$	Pavesi	1905
Neopin	$C_{18}H_{21}O_4N$	Smith	1911
Porfidroksin	$C_{19}H_{23}O_4N$	Rakshit	1919
Narkotolin	$C_{21}H_{21}O_7N$	Wrede	1937

Morfin (Şeki 2.6) ilk kez 1803 yılında Sertürner tarafından keşfedilmiştir. Morfin kuvvetli bir analjezik ve narkotiktir (Tanker vd. ,2007). Günümüzde içeriğinde morfin bulunan ilaçların beyin korteksindeki ağrı merkezini stimüle etmesi nedeni ile keyif verici madde olarak alışkanlık yapması hekim kontrolü olmadan bu türden ilaçların

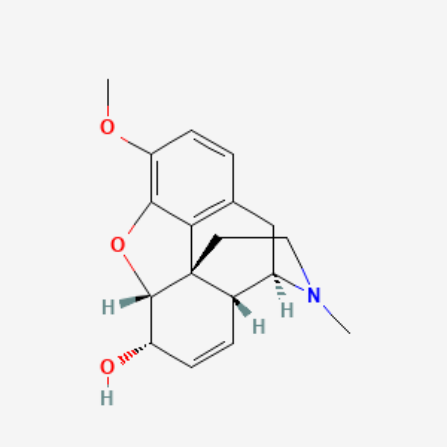
kullanımı yasaklanmıştır (Üstün, 1998; Tanker, 2003). Bu ilaçlar özellikle tıpta cerrahi operasyonlar ve ameliyat sonrası tedavilerde kullanılmaktadır (Crozier vd., 2006).



Şekil 2.6 Morfinin 2 boyutlu kimyasal yapısı ($C_{17}H_{19}NO_3$)

(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5288826#section=Structures, 2022)

Kodein ilk kez 1832 yılında Robiquet tarafından keşfedilmiş olup morfinin metil iyodür ile o-metillendirilmesiyle endüstriyel olarak da elde edilmektedir (Şekil 2.7). Morfine kıyasla daha zayıf bağımlılık yapıcı etkisinin olmasının yanı sıra ağrı kesici, öksürük kesici özellikleri mevcut olup ve bu içerikli ilaçlarda hammaddedir (Küçük, 1996).

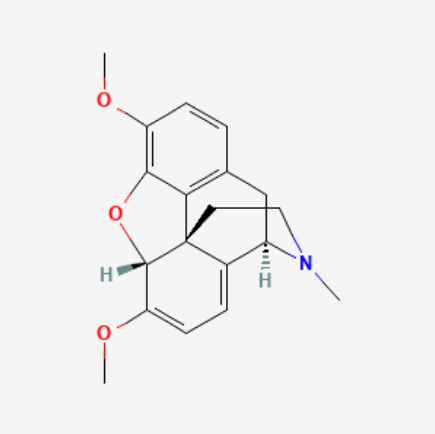


Şekil 2.7 Kodeinin 2 boyutlu kimyasal yapısı ($C_{18}H_{21}NO_3$)

(https://pubchem. ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284371,2022)

Tebain ilk kez 1983 yılında Windholz ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Kodeinon türevidir (Şekil 2,8). Merkezi sinir sistemini uyarıcı etkisi bulunan tebain ilaç

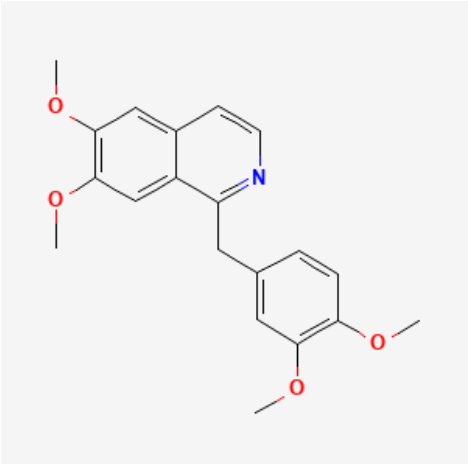
olarak kullanılmaz, artan kodein ihtiyacı nedeniyle hammadde olarak kullanılmaktadır (Arslan, 2008).



Şekil 2.8 Tebainin 2 boyutlu kimyasal yapısı ($C_{19}H_{21}NO_3$)

(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5324289,2022)

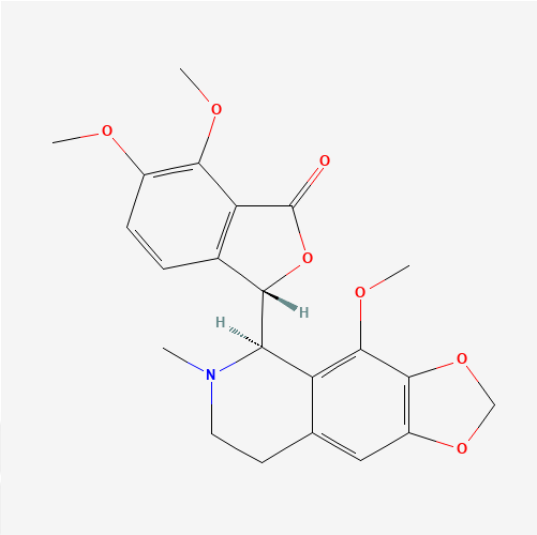
Papaverin, Merck tarafından 1849 yılında morfin ve kodein ekstrakte edildikten sonra elde edilmiştir (Şekil 2,9). Sitomegalovirüs (herpes virüsü- CMV) ile mücadelede kullanılan antiviral alkaloidlerin en önemlisidir. Uyuşturucu ve ağrı kesici etkisi düşüktür. Sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde, peptik ülser, sindirim sistemindeki komplikasyonlar ve kas spazmlar gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan ilaçların içeriğinde bulunmaktadır (Küçük, 1996; Tanker ve Tanker, 2003; Önmez, 2007; Tanker ve ark., 2007).



Şekil 2. 9 Papaverinin 2 boyutlu kimyasal yapısı ($C_{20}H_{21}NO_4$)

(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4680#section=Structures, 2022)

Noskapin (Narkotin) (Şekil 2.10), 1817 yılında Robiquet tarafından keşfedilmiştir. Antitussif (öksürük kesici) özelliği vardır. Uyuşturucu ve ağrı kesici etkisi düşüktür. Toksik değildir fakat yüksek dozda histamin salınımı yan etkisi mevcduttur bu nedenle bronşit ve astım hastalarının tedavisinde kullanılamamaktadır (Küçük 1996; Tanker ve Tanker 2003; Önmez 2007).



Şekil 2. 10 Noskapinin 2 boyutlu kimyasal yapısı ($C_{22}H_{23}NO_7$)

(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/275196,2022)

2.5 Bitkilerden Sekonder Metabolit Üretim Stratejileri

İnsanlar tarafından tarihin uzun yılları boyunca bitkiler, primer ihtiyaçların karşılanması amacıyla besin kaynağı olmasının yanı sıra sahip oldukları değerli sekonder metabolitleri tıbbi ilaç, boya, böcek ilacı, parfüm vb ürünlerin eldesinde, antioksidan, koku ve tatlandırıcı olarak gıdalarda ve çeşitli endüstrilerde hammadde olarak kullanılmaktadır (Yang vd, 2010). Tarihsel gelişimle birlikte biyotik ve abiyotik streslere dirençli, yüksek verimli bitkilerin yetiştirilmesi yanında artırılmış sekonder metabolit ve besin içeriğine sahip bitkilerin geliştirilmesinde doku kültürü, gen aktarımı/düzenlemesi gibi yeni teknolojiler kullanılmaktadır (Alagöz vd, 2016).

2.5.1 Doku Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimi

Alkaloidler dahil olmak üzere bitki kaynaklı değerli metabolitlerin eldesi için ihtiyaç duyulan ürünlerin karşılanmasında bitki büyümesinin yavaşlığı, bitkilerin aşırı toplanmasının bazı önemli bitki popülasyonlarının ciddi derecelerde tahribatına yol açması gibi zorluklar alternatif yöntemlerin araştırılmasına neden olmuştur. Temelde

tek bir somatik bitki hücresinden yeni tam bir bitki oluşması özelliğinin keşfi ile, istenilen özelliği içeren bitki hücreleri bu ürünlerin eldesi için alternatif olarak düşünülmüştür. Bitki hücre kültürleri, geleneksel olarak sekonder metabolitlerin üretimiyle bağlantılı çeşitli zorlukların üstesinden gelme fırsatı sağlamaktadır (Roberts ve Schuler, 1997). 1900'lü yıllardan beri kullanılan doku kültürü tekniği, klasik üretim yöntemlerinin bağlı olduğu tohum ve vejetasyon süresi gibi süreçlere bağlı kalınmadan, bitkinin istenilen herhangi bir dokusundan alınan küçük bir parçasının, uygun besin maddeleri içeren besin ortamına alınarak optimum ve steril çevre koşullarında in vitro olarak yeni doku, bitki veya bitkisel ürün yetiştirilmesine dayanan bir üretim yöntemidir (Dinçer vd, 2016).

Bitkinin istenilen ürünü en fazla bulunduran kısımdan (kök, gövde, yaprak, sap, embriyo, polen gibi) yeni doku veya bitkisel ürün üretimi için eksplant adı verilen bitki parçası alınarak doku kültürüne başlanılması teorik olarak ilgili ürünün artmış miktarda eldesini sağlayacak ilk adımdır. Kültür ortamında eksplanttan gelişen farklı yapılar sekonder metabolit üretimim için tercih edilir. Kök kültürleri, büyüme hızı oldukça fazla, oluşturulduktan sonra kültür devamlılığı için çoğunlukla inkübasyon ve ek hormon ihtiyacı duymayan, *A. rhizogenes* türü bakterilerle indüklenebilen ve organize yapısı nedeniyle kararlı oluşundan dolayı tercih edilir. Somatik embriyo kültürleri ise depo kimyasalların üretiminde tercih edilmekte olup ve istenilen bitki kısmına rejenerasyon potansiyelinin fazla olması gibi avantaja sahiptir. Kallus kültürleri, büyüme düzenleyici içeren ortamlarda indüklenen, morfolojik olarak farklılaşmamış ve bu nedenle istenilen dokunun eldesi için potansiyel kaynak olarak kullanılan kültürlerdir. Tüm bu hücre kültürlerinin sıvı ortamda kültüre edilmesiyle elde edilen, homojen, hızlı ve fazla miktarda büyüme avantajına sahip olan süspansiyon kültürleri alkaloit üretimi için en sık tercih edilen doku kültürü çeşididir (Oluk, 2006; Eray ve Türker, 2021). Yumurtalık, akciğer, meme, pankreas gibi kanser türlerinin tedavisi için kullanılan palitaksel (taksol) miktarının *Taxus baccata* süspansiyon kültürlerinde arttırılmış eldesi, doku kültürüyle sekonder metabolit elde edilmesi uygulamalarının dönüm noktasıdır (Malik vd, 2011).

Sekonder metabolitler bitkide çoğunlukla patojenler, istilacılar ve çevresel uyarılara yanıt olarak üretilirler. Bu açıdan savunma yanıtının biyotik veya abiyotik streslerle tetiklenmesi istenilen ürünlerin elde edilmesiyle sonuçlanabilir (Zho vd, 2005). Biyokimyasal düzeyde bir dizi hücresel aktiviteyi kontrol edip moleküler seviyede

genlerin ifadesini arttırmaya yönelik yeteneğe sahip olan metil jasmonat (Gai vd, 2016), salisilik asit (Kehine vd, 2016), maya kitosanı gibi hücre duvarı ekstraktları vb elisatör molekülleri ile stres yanıtları uyarılabilir. Ayrıca ışık, sıcaklık, pH, karbon ve fosfat kaynakları, öncüller, büyüme düzenleyiciler, istenilen metabolitlerin eldesi amacıyla kurulan kültürlerde ürün miktarını arttırmaya yönelik kurgulanarak nihayetinde artmış ürün elde edilebilir (Gonçalves ve Romano, 2018).

Sentez yolağında bulanan iki ara üründen istenilen ürünün eldesi için; istenmeyen ürünün hidroliz, esterleşme, metilasyon gibi kimyasal sürecin uyarılması ile istenen ürüne dönüşümünü tanımlayan biyodönüşüm ise önemli bir uygulama alanıdır. Örneğin kurulan bir kültürde; istenilen ürünün yıkılmasını katalizleyen substrast ortama verilmez ise ürün yıkılmayacak ve sonuç ürünün artmış eldesi olacaktır (Yılmaz, 2021).

Kültürlerin enzim fermantörleri gibi daha büyük hacimlerde oksijen, besin kaynağı ve çalkalama stresi gibi sınırlamalar olmaksızın biyoreaktörlerde kurulması ile büyük çaplı sekonder metabolit üretimi elde edilebilir. Karıştırmalı tank reaktörleri, kabarcıklı kolon reaktörleri, hava taşımalı reaktörler bitkiler için tasarlanan biyoreaktör çeşitlerinden bazılarıdır. Biyoreaktör çalışmaları, bitki hücre kültürlerinden sekonder metabolitlerin olası bir ticari üretiminin endüstriyel süreçlerle uyumlu bir şekilde son adımını temsil etmektedir (Topçu ve Çölgeçen, 2015).

Bununla birlikte mikroorganizmalara kıyasla oldukça büyük ve kompleks hücreler olma, süspansiyon kültürlerinde kümelenmeye yatkınlık ve karıştırma stresine sahip olma, bitki materyaline duyulan fazla ihtiyaç, üretilen ürünün devamlılığının olmaması, dönem dönem kalite ve saflığın düşmesi gibi özellikler büyük hacimde üretim için zorluklardandır (Dörnenburg ve Knorr, 1995). Bu nedenle in vitro üretim anti kanser alkaloitleri gibi pahalı ilaçlar veya daha büyük ticari pazar olan ucuz alkaloit eldesi için tercih edilen bir yöntem olmamıştır. Alternatif olarak genetik mühendisliği teknikleri gibi biyoteknolojik yaklaşımlar sekonder metabolitlerin verim ve kalitesinin iyileştirmesi için yeni fırsatlar sunmaktadır (Yang ve Stöckigt,2010).

2.5.2 Metabolik Mühendisliği ile Sekonder Metabolit Üretimi

Kelime anlamı olarak rekombinat DNA teknolojisi ile hücrenin enzimatik, taşıma ve düzenleyici fonksiyonları gibi hücresel aktivitelerin manipüle edilmesi olan metabolik mühendisliği, sınırlayıcı basamak olan metabolit biyosentez yollarının ve bu yoldaki enzimlerin/genlerin tanımlanmasına dayanır. Tanımlanan genlerinin izole edilerek hücre

hatlarına klonlanması ve gen ifadesini artıran promotörlerin klonlamaya dahil edilerek bitki hücrelerine transfrmasyonu mümkündür. Bitkilere uygulanan metabolik mühendisiliği teknikleri endojen biyokimyasal yolların manipüle edilmesine izin vererek, bir bitkinin mevcut doğal ürünlerinin aralığının ve kapsamının değiştirilmesine, zararlılara ve hastalıklara karşı direnç kazanmasına, gıda bitkilerinde istenmeyen bileşiklerin seviyesinin düşürülmesine, vitaminler ve antioksidanlar gibi gıdada arzu edilen bir bileşiğin seviyesinin arttırılmasına, yiyeceklere ve/veya süs bitkilerine yeni bir özellik (renk, tat, koku) kazandırılması gibi faydalı ve ticari dönüşümleri sağlayacaktır (Verpoorte vd, 2002).

Bitki sekonder metabolitleri için ilk metabolik mühendisliği girişimleri arasında çiçek renklerinin modifikasyonu yer alır. Çiçek renkleri esas olarak flavonoidler, betalainler ve karotenoidler tarafından sağlanır. Farklı bitkilerde çiçek rengi modifikasyonuna yol açan chalcone sentaz geninin 'sense' veya 'antisense ' edilmesiyle karanfil (Holton, 1996), petunya (Shimada vd, 1999; Bradley vd, 1998; Davies vd, 1998) gibi bitkilerde çiçek renk değişimi sağlanarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise petunya bitkisinden izole edilen antioksidan kalkon izomeraz geninin domatese aktarılmasıyla domatesteki antioksidan flavonitlerin miktarı arttırılarak besin değeri artırılmıştır (Muir, 2001). Kâğıt endüstrisinde ham madde olan selülozun biyosentezinde ligninden ayrılması metabolik mühendisliğin bir diğer ilgi konusudur. Biyosentez basamaklarında lignin azaltılması veya enzimatik reaksiyonlarla bileşiminin değiştirilerek daha kolay ekstrakte edilebilir hale getirme çalışmaları mevcuttur (Franke vd, 2000). Bu çalışmalardaki bir diğer önemli kazanım ise enzim aktivitelerinin doğrulanması noktasında çeşitli ara bileşiklerin varlığının keşfedilmesidir.

Fitokimyasalların in vitro üretimi alanındaki çabalara rağmen, berberin, shikonin, ginsenositler ve paklitaksel gibi sekonder metabolitler için sınırlı sayıda endüstriyel proses geliştirilmiştir (Rao ve Ravishankar, 2002). Genellikle alkaloidlerin in vitro üretiminden elde edilen miktar ticarileştirme için çok düşük olduğundan, metabolik mühendisliği ile üretimi artırmak için; ilgili genlerin önüne gen ifadesini arttıracak CaMV35s, Saps, TGa1 (CmYLCV) Sysn gibi promotorların eklenmesi (Ali ve Kim, 2019), tek gen dönüşümleri, tek bir metabolit sentezleyen çoklu genlerin koordinasyonu, hız sınırlayıcı enzimleri kodlayan genlerin aşırı ekspresyonu yoluyla biyosentetik bir yol boyunca karbon akışını artırmak veya geri besleme mekanizmasını

engelleyerek rekabetçi yan yolları bloke etmek ve katabolizmayı azaltmak gibi stratejiler kullanılabilir (Yağcı, 2008; Karuppusamy, 2009).

Son 10 yıldır yaygın olarak kullanılan Çinko Parmak Nükleaz (ZFN), Transkripsiyon Aktivitörü Benzeri Efektör Nükleaz (TALEN), Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (CRISPR) gibi dizi spesifik nükleazlar, DNA'da hedeflenen bölgeye spesifik olarak bağlanma ve ardında DNA'da çift iplikli kırılmalar meydana getirerek hücre tamir mekanizmalarını devreye sokarken hücre tarafından seçilen tamir mekanizmasına da bağlı olarak hedef genomda istenilen modifikasyonu meydana getiren, yeni nesil genom düzenleme araçlarındandır (Bortesi ve Fischer, 2015). Hedef bölge, ZFN için 18 ila 36 baz çifti, TALEN için ise 24 ila 40 baz çifti arasında değişmektedir. ZFN'ler ve TALEN'ler ile nokta mutasyonları, delesyonlar, insersiyonlar, inversiyonlar, duplikasyonlar ve translokasyonlar gibi genom modifikasyonları mümkündür. Bu araçlardan en gözdesi ve DNA'da ameliyat yapan teknoloji olarak adlandırılan CRISPR teknolojisi ise temelde ZFN, TALEN gibi diğer yeni nesil genom düzenleme yöntemleriyle benzerlik gösterse de basit tasarımı, kolay kullanım yöntemleri, ekonomik oluşu, aynı anda birden fazla gen bölgesi manipülasyonun hedeflenebilmesi, istenildiği zaman hedef bölgenin özgüllüğünü arttırabilmek amacıyla sgRNA ve nükleaz aktivitesine sahip olan Cas9 enziminin modifiyesine izin vermesi gibi yeni seçenekler sunmaktadır (Akbudak vd, 2017). Ayrıca CRISPR/Cas sistemleri ile, iyileştirici özellikler bitki genomlarına kolaylıkla manipüle edilebilir. Birden fazla gen nakavtını etkileyerek transgenik bitki üretimi gibi artık klasik sayılabilecek yöntemlerin hız kısıtlayıcı basamaklarını içermezler. Bu nedenle gen modifikasyon süreci hızlandırmak için oldukça önemli sistemlerdir (Jaganathan vd, 2018; Malzahn vd, 2017).

Transkripsiyon seviyesinde, genom düzenlemesi olan bu düzenlemelere ek olarak transkripsiyon sonrası çift zincirli RNA'nın hedeflenmesi yani RNA interfernas mekanizması kullanılarak transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) mekanizmaları uygulamaları mevcuttur. PTGS; konakçı hücre mRNA'larının homoloji gösterdiği bir başka RNA sekansına özel bozulması ile gen ifadesine gidecek bir transkriptin olmaması ile sonuçlanır. Patojenlere karşı savunma mekanizması olarak PTGS'nin keşfi, genom düzenleme aracı olarak bu yöntemin de kullanılabileceği görülmüştür.

Dolayısıyla bitki sekonder metabolitlerinin üretimini iyileştirmek için PTGS ‘ın olası kullanımları araştırılmıştır (Nielsen ve Temporiti, 2019).

2.5.3 Bitkilerde Virüs Aracılı Gen Susturma (VIGS)

VIGS, tek sarmallı RNA oluşturmak için bir viral vektör kullanarak bitkilerde hem viral hem de hücresel mRNA'ları hedefleyen, nükleotit sekansına özgü savunma mekanizması olan PTGS'nin indüklenmesini içerir (Wijekoon ve Facchini, 2011). VIGS, ilk olarak virüs enfeksiyonundan kurtulma olgusu olarak tanımlanmıştır. Virüs bulaşmış bitkilerde daha sonra aynı virüs veya yakın akrabası tarafından enfekte edildiğinde bu enfeksiyona karşı direnç gösterdiği keşfedilmiştir. Bitkide yeni elde edilen dokulara da bu bağışıklık bilgisini viral genetik materyalin bitki genomuna dahil edilmesiyle aktardığının da keşfiyle genlerin ifadesinin baskılanması noktasında araç olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır. Bu potansiyelin anlaşılmasıyla bitkide kullanılan en yaygın fonksiyonel genomik araçlardan olmuştur (Senthil ve Mysore, 2011). Ayrıca çeşitli bitki türlerinde belirli genlerin işlevini analiz etmek için de kullanılmaktadır (Wijekoon ve Facchini, 2011).

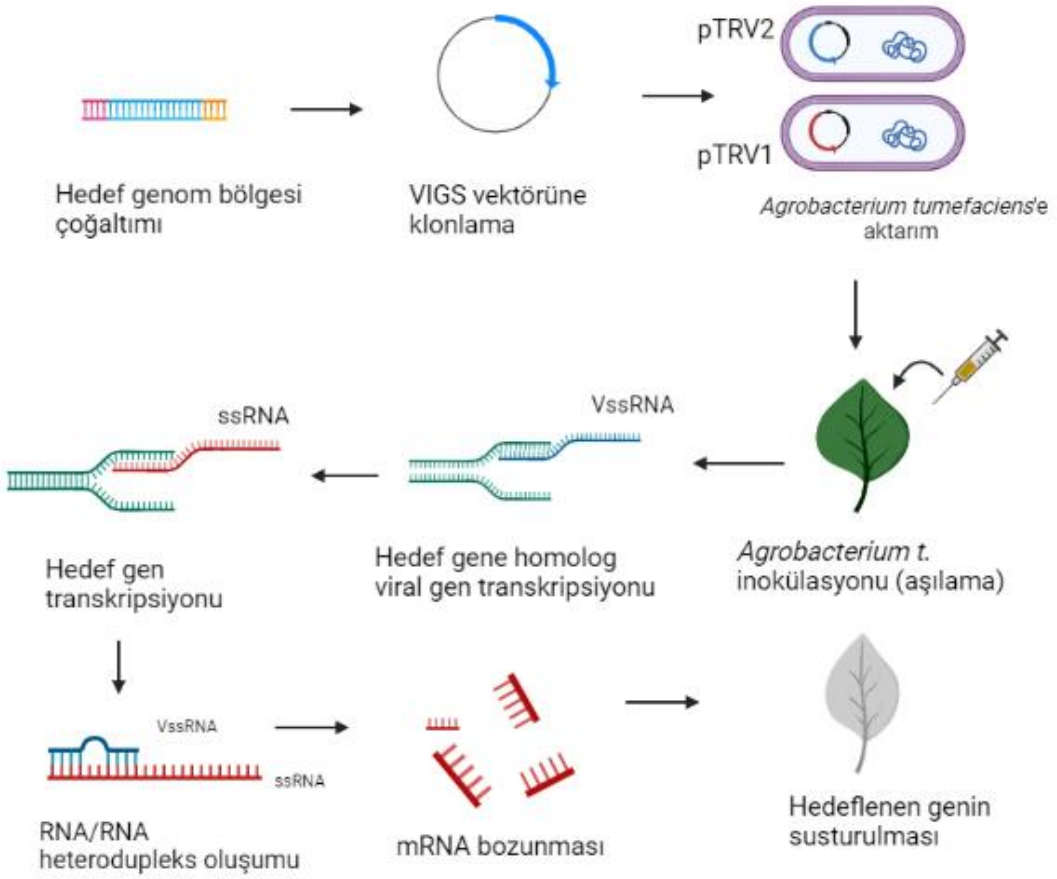
VIGS uygulamasında üç ana adım vardır; susturulması hedeflenen konakçı genlerin parçalarını içerecek viral genomların mühendisliği, bitki konakçılarını enfekte etme ve bitkinin virüs enfeksiyonuna karşı savunma mekanizmasının bir parçası olarak hedef genleri susturma (Senthil ve Mysore, 2011).

İlk adımda kullanılan VIGS vektörleri Ti-plazmitinden türetilmiş ikili vektörlerdir. Vektörlerden biri viral genom bölgesine hedef gen parçasının insert edilmesinde kullanılır. Diğer vektör ise insert edilen gen parçasının konak hücrede ifadesini sağlayan viral genleri içermektedir. Viral genom bölgesi olarak adlandırılan bölgede, konakçı bitkide hedeflenen gen parçasını eklemek için 200 -1300 bç uzunluğundaki bir dizinin varlığına izin veren çoklu klonlama bölgesi bulunur. İnsert edilecek DNA sekansının belirlenmesinde hedeflenecek genin cDNA analizi susturma etkinliği açısından oldukça önemlidir. Genlerin intron bölgeleri VIGS ‘e rehberlik etmezler ve bu nedenle ekzonlar kullanılmalıdır. Buna ek olarak tek ve spesifik bir genin susturulması için VIGS vektörlerine klonlanacak genin spesifik alanları taranmalı ve dizi ona göre seçilmelidir. Örneğin bir çalışmada tüm gen ailesinin işlevi araştırılıyorsa gen içerisindeki korunmuş diziler kullanılabilir. Bu aşamadaki başarıyı etkileyen bir diğer faktör ise hedef bitki ve dokuya göre seçilecek olan viral vektörlerdir (Shi vd, 2021).

VIGS uygulamalarında geniş konakçı yelpazesi, meristemi enfekte etme yeteneği ve hafif semptomlara neden olması gibi özellikleri ile tütün çıngırak virüsü (TRV) başta olmak üzere arpa mozaik virüsü (BMSV), patates X virüsü (PVX) en yaygın kullanılan vektörlerdir (Sung vd, 2014).

İkinci adım, viral genom mühendisliği ile hedefe yönelik tasarlanan VIGS vektör plazmitlerinin bitki konakçılarına aktarımıdır. Bu aşamada *A. tumefaciens*'in bitki konakçı hücrelerine gen aktarma yeteneğinden yararlanılır. Yaralanma gibi stres koşulları altında, bitki hücrelerinden salgılanan asetosiringon gibi fenolik bileşikler bakteride bulunan Ti-plazmitindeki vir genleri uyarılır ve T-DNA bölgesi bitki hücrelerine transfer edilir. İn vitroda *A. tumefaciens* aracılı gen aktarımında bakteri inokülasyonu için iğnesiz şırınga ile aşılama, vakumla infiltrasyon, spreyleme, bitki dokularını yaralama gibi teknikler kullanılır. VIGS uygulamalarında kullanılacak *A. tumefaciens* suşu, hedef bitkiye göre seçilmelidir. GV3010, GV2260, AGL-1, LBA4404 ve EHA105 *A. tumefaciens* suşlarından bazılarıdır (Hwang vd, 2017). İnokülasyon sonrası hedef gen parçasını içeren T-DNA bölgesi, konakçı bitki hücresine aktarılır ve viral vektör aracılığıyla transkripte edilir.

Üçüncü adımda, transkripte edilen tek zincirli viral RNA, konakçı hücreye ait endojen mRNA'nın üretilmesiyle homoloji yoluyla birleşerek çift sarmallı heterodimer RNA oluşur. RNA yıkımından sorumlu DICER enzimleri bu heterodimer RNA'ı 21-24 nükleotitlik küçük RNA'lara (siRNA) parçalar ve bu parçalar RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) tek zincirli RNA molekülleri şeklinde dahil edilir ve hedef genin mRNA'sının kesimi için sinyal oluşturur. Nihayetinde hedef gen mRNA'ları parçalanır ve ifade edilemez, gen susturulmuş olur (Becker ve Lange, 2010) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 VIGS basamakları

İlk olarak tütün bitkisinde *PDS* geninin susturulmasında kullanılan VIGS tekniği spesifik viral vektörlerin gelişimi ile buğday, soya fasulyesi, arpa, domates, haşhaş gibi çeşitli bitkilerde de kullanılmış ve önemli sonuçların elde edilmesini sağlamıştır (Purkayastha ve Dasgupta, 2009).

VIGS uygulama teknikleri geliştikçe sağladıkları avantajlar da gelişmiştir. ZFN, TALEN ve CRIPSR gibi diğer genom düzenleme teknolojilerine göre kolay ve hızlıdır, genin fenotipi ile takip edildiğinden 3-4 hafta arasında sonuç alınabilir. Post-transkripsiyonel yani geçici uygulamadır, bu nedenle ürünleri zor ve tartışmalı bir prosedür olan transgenik bitkilerin üretimine dahil değildir. 300-500 bç'lik kısma ait sekans bilgisi bir geni çalışma için yeterlidir. %85 homoloji etkinlik için yeterlidir, bu sayede buğday genleri gibi birden çok kopyaya sahip genleri susturmak için kullanılabilir.

Tüm bu avantajlarla birlikte VIGS, birçok bitki türünde çeşitli bitki geliştirme süreçlerinde yer alan genleri karakterize etmek için de kullanılmaktadır. Bir genin veya proteinin işlevini belirlemenin en kolay ve etkili yolu, genin ifadesini azaltmak veya

işlevsel bir proteini kodlamayan bir mutant oluşturmaktır. Tüm genom dizilerinin mevcudiyeti ile birlikte, binlerce genin işlevini belirlemek için büyük ölçekli analizlere olan ihtiyaç artmaktadır. VIGS tekniği ile araştırılmak istenen fenotiplere ait rastgele seçilen cDNA sekansları virüs vektörlerine klonlanarak taranabilir, gen dizileri yeni nesil teknikler ile tanımlanabilir. Ek olarak periyodik VIGS uygulamaları, abiyotik ve biyotik strese odaklanan çalışmalarda çok çeşitli tahliller yapmak için kullanışlıdır. Örneğin, stres toleransı sağlayan bir genin işlevi, bitkileri fideden başlayarak tüm büyüme aşamalarında strese tabi tutarak değerlendirilebilir (Burch vd, 2004). Bununla birlikte, son yıllarda yapılan VIGS çalışmalarında, virüs vektörüne birden fazla gen dizisinin eklenmesi veya farklı gen dizilerini içeren birden fazla virüs vektörleriyle enfeksiyon sonucunda aynı anda birden çok genin susuturulmasının mümkün olduğu gösterilmiştir (Bekele vd, 2019).

Diğer yandan VIGS tekniği, her bitki türünde aynı etkinlikte uygulanamaz, bazı türlerde ise uygun VIGS vektörünün olmaması sebebiyle kullanışsızdır. Ayrıca VIGS vektörlerinin *Agrobacterium* aracılı transferi çoğu bitki için mümkün olsa da etkili bir transformasyon yöntemi mevcut değildir. Bu zorluğun aşılması için kullanılan bakteri-virus vektör konsantrasyonunun arttırılması sonuçları etkileyebilmektedir bu nedenle konakçıda şiddetli viral semptom gösteren vektörler tercih edilmemelidir. Örneğin viral semptomlar nedeniyle üretilemeyen meyve veya çiçek, bu dokularda yer alan gen işlevlerinin değerlendirilmesini engelleyecektir. Ayrıca hedef mRNA'ya ait dizilerin VIGS vektörüne eklenmesi, virüs çoğalmasını engelleyecek sonuçlar doğurabilmektedir (Ekengren vd, 2003).

3
MATERYAL-METOT

3.1 Materyal

Çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Marmara Araştırma Merkezi (MAM), Yaşam Bilimleri Başkan Yardımcılığı (BYYB) Endüstriyel Biyoteknoloji Araştırma Grubu, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan sarflar ve cihazlar aşağıda sunulmuştur.

3.1.1 Bitki Materyali

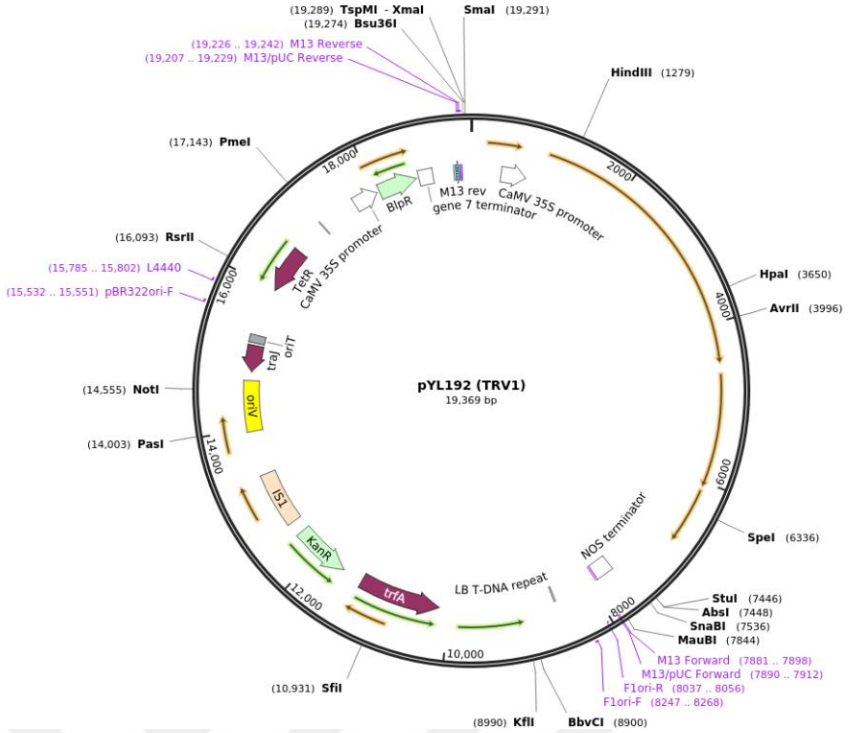
Çalışmada kullanılan *P. somniferum L.* OFIS1 (afyon haşhaşı) çeşidine ait tohumlar TMO'dan temin edilmiştir.

3.1.2 Bakteri Suşları

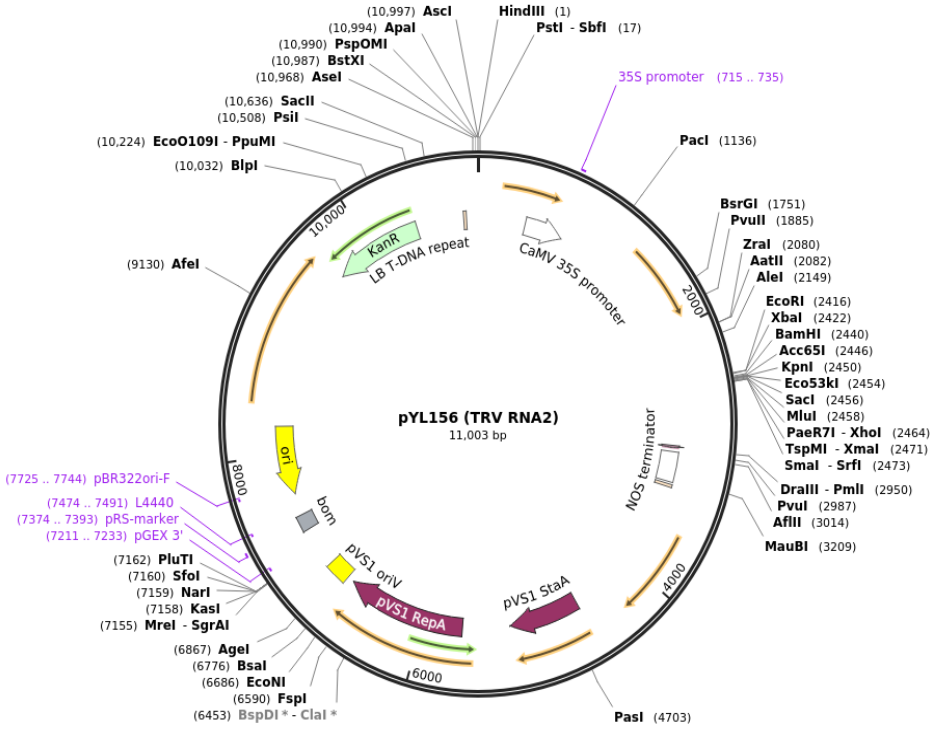
Çalışmada VIGS plazmitlerinin klonlanma ve çoğaltımı aşamalarında *E. coli* DH5α suşu ve haşhaş bitkisine VIGS vektörlerinin transformasyonu aşamasında *A. tumefaciens* LBA4404 suşu kullanılmıştır. Bakteri suşları TÜBİTAK-MAM-BYBB Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.1.3 Plazmitler

Tez çalışmasında Addgene firmasından satın alınarak *E. coli* DH5α suşuna klonlanan pYL156 (TRV2) ve pYL192 (TRV1) plazmitleri kullanılmıştır. TRV1 ve TRV2 plazmitlerinin ikisi de kanamisin antibiyotiğine dirençlilik sağlayan neomisin fosfotransferaz (NPT) genini barındırmaktadır. Çalışmada kullanılan plazmitler Şekil 3.1 ve Şekil 3.2 'de gösterilmiş, Tablo 3.1'de detaylandırılmıştır.



Şekil 3. 1 pYL192 (TRV1) plazmitinin tüm genom haritası



Şekil 3. 2 pYL156 (TRV2) plazmitinin tüm genom haritası

Tablo 3. 1 Çalışmada kullanılan TRV1 ve TRV2 plazmitleri

Plazmit adı	**Bakteri Direnci**	**GenBank ID**	**Referans**
pYL192(TRV1) Addgene #148968	Kanamisin (KanR)	AF406990	Liu vd, 2002
pYL156(TRV2) Addgene #148969	Kanamisin (KanR)	AF406991	Liu vd., 2002

VIGS çalışmalarında ve özellikle haşhaş bitkisindeki uygulamalarda kullanılan TRV1 ve TRV2 vektörleri geniş konakçı yelpazesi, meristem dokuları enfekte etme yeteneği ve hafif semptomlara neden olduğu (Sung vd, 2014) için tercih edilmiştir. Çalışmada *A. tumefaciens* aracılı transformasyon kullanıldığından aşağıda açıklanan dizileri içeren TRV1 ve TRV2 vektörleri ayrıca tercih sebebidir.

Agrobacterium Ti plazmitinden köken alan bu plazmitlerde; transkripsiyon için güçlü CamMV35S promotör dizisi, açık okuma çerçeve (ORF) bölgesi, konakçılarda gen transkripsiyonu için orijin bölgesi (oriV), plazmit replikasyonunu başlatıcı protein olan trfA dizisi, T-DNA'nın sağ ve sol sınırlarını belirleyen sağ ve sol tekrar dizileri (RB ve LB), *Agrobacterium* bakterisinde plazmitin stabilizasyonunu sağlayan, *Pseudomanas* replikasyon proteininden kökenlenen pVSI StaA ve yine aynı kaynaktan kökenlenen *Agrobacterium* konakçısında genin entegrasyonu, ifadesi ve kalıtımı için tercih sebebi olan düşük kopyalı plazmit replikasyonuna izin veren pVS1 repA dizisi, plazmitin seleksiyonunu sağlayan antibiyotiğe direnç marker gen dizileri (KanR) ve *Agrobacterium* konakçısında yukarı akış ORF'nin transkripsiyonunu sonlarından *A. tumefaciens* napolin senteaz terminatör ve poliA sinyal dizi olan NOS bölgelerini içerirler (Liv vd, 2002).

3.1.4 Besin Ortamları ve Çözeltiler

Bakterilerin büyütülmesi, tohumlardan aseptik fide eldesi, in vitro rejenerasyon (somatik embriyogenesis) aşamalarında kullanılan besin ortamları ve bakteri hücrelerinin kompetent hale getirilmesi, somatik embriyolara VIGS plazmitlerini içeren *A. tumefaciens ile* transformasyon aşamalarında kullanılmak üzere çözeltiler hazırlanarak 120°C, 1 atm basınçta 20 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Besin ortamlarına eklenen antibiyotik, enzim ve bitki büyüme düzenleyiciler deiyonize su ile

çözünerek 0,22 μm'lık tek kullanımlık steril filtre ile steril edildikten sonra +4°C 'de muhafaza edilmiştir. Hazırlanan stok çözeltiler ve kullanılan konsantrasyonlar Tablo 3.2'de besin ortamları ve içerikleri ise Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3. 2 Çalışmada kullanılan antibiyotik-enzim ve büyüme düzenleyiciler

Sınıf	**İsim**	**Stok çözelti konsantrasyonları**	**Besin ortamında kullanılan konsantrasyonları**
Antibiyotik	Kanamisin	50 mg/mL	50 mg/L
Enzim	Maserozim R10	1.5 g/mL	1.5 g/L (%0.15 g)
Bitki büyüme düzenleyicisi	NAA	1 mg/mL	1,75 mg/L
Bitki büyüme düzenleyicisi	Kinetin	1 mg/mL	0,125 mg/mL
Vitamin	Askorbik asit	1 mg/mL	30 mg/L–45 mg/L
Sterilizasyon ajanı	Plant preservative Mixture (PPM)	-	1 mL/L
Fenolik bileşik	Asetosiringon	100 mM/mL	100 mM/L

Tablo 3. 3 Çalışmada kullanılan besin ortamları ve içerikleri

Besin ortamı-çözelti ve kullanım alanı	**Hazırlanışı**
Luria Bertani (LB) agar (Bakteri ortamı)	LB agar besi yerinden 35 g tartılarak, 1 L deionize su ile çözülür. Otoklav sonrası kanamisin stoğundan 1 mL eklenir.
LB broth (Bakteri ortamı)	LB Broth besi yerinden 25 g tartılarak 1 L deiyonize su ile çözülür.
½ MS0- katı besin ortamı (Aseptik fide eldesi)	2.2 g MS B5 vitaminleri, 10 g sükroz, 0.5 g MES, 2 g jelrit tartılarak 1 L deiyonize su ile çözülür, pH: 5.8 ayarlanır. Otoklav sonrası 1 mL PPM eklenir.
MS 5.2.V3 (Somatik embriyo oluşumu)	4.4 g MS B5 vitamini, 15 g sükroz, 0.5 g MES, 4 g jelrit tartılarak 1 L deiyonize su ile çözülür, pH: 5.8 ayarlanır. Otoklav sonrası stok çözeltilerden 875 µL NAA, 62,5 µL kinetin ve 2 mL askorbik asit ile 1mL/L PPM eklenir.
½ MS0- Sıvı besi ortamı (Somatik embriyo çoğaltımı/gelişimi)	2.2 g MS B5 vitaminleri, 10 g sükroz, 0.5 g MES tartılarak 1 L deiyonize su ile çözülür, pH: 5.8 ayarlanır. Otoklav sonrası 3 mL askorbik asit stok çözeltisi ve 1mL PPM eklenir.
Enzim çözeltisi (Somatik embriyoların yaralanması)	45,54 g mannitol,1,1 g $CaCl_2$, 2,132 g MES tartılıp 1 L deiyonize su ile çözülür, pH: 5.8 ayarlanır. Maserozim enzim stok çözeltisinden 1 mL eklenir.

Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan besin ortamları ve içerikleri (devamı)

Yıkama çözeltisi (Enzim çözeltisinin besin ortamdan uzaklaştırılması)	2,2 g MS B5 vitamini, 10 g sükroz, 0,5 g MES, 45,54 g manntiol tartılıp 1 L deiyonize su ile çözülür, pH: 5,8'e ayarlanır.
İnokulasyon ortamı (*A. tumefaciens* inokulasyonu)	10 g sükroz, 0,5 g MES, 2,2 g MS B5 vitamini, 18,217 g mannitiol tartılıp 1 L deiyonize su ile çözülür, pH:5,8'e ayarlanır. Otoklav sonrası asetosiringon stok çözeltisinden 1 mL eklenir.

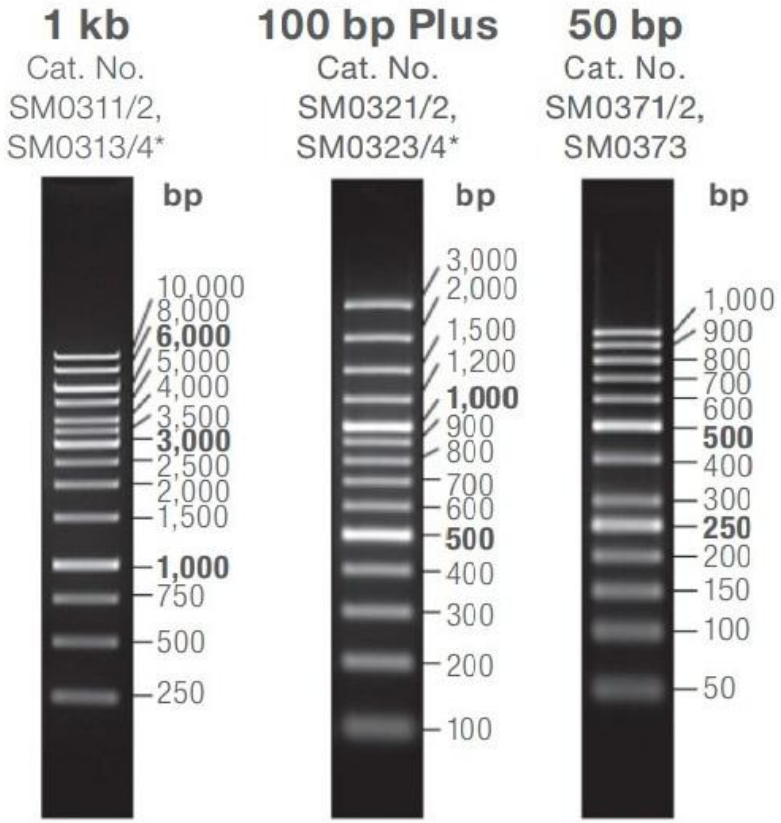
3.1.5 Elektroforez Tamponları, DNA Ladderlar ve Kitler

PCR ürünlerinin yürütülmesi, pozitif kolonilerin seçimi, kesilen hedef sekansları ve TRV2 plazmitinin kontrolü ve jelden izolasyonu için agaroz jel elektroforezinde kullanılan Tris Borat -Etilen diamin tetra asetik asit tamponu (TBE) ve Tris-Asetat-Etilen diamin tetra asetik asit (TAE) tamponlarının ve RNA örneklerinin jele yüklenmesi sırasında kullanılan RNA yükleme boyasının içeriği ve hazırlanışı Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3. 4 Agaroz jel elektforez tamponları, RNA yükleme boyası içeriği ve hazırlanışı

50 x TAE (Agaroz jel elektroforez tamponu)	242 g Tris Baz tartılıp 600 mL deiyonize suda çözülür. Ardından sırasıyla 57 mL asetik asit ve 100 mL 0.5M EDTA eklenip en son toplam hacim 1L'e tamamlanır, pH: 8.5'e ayarlanır. 1xTAE için 20 mL 50xTAE tamponu alınıp 1000 mL'ye deiyonize suyla tamamlanır. 120°C, 1 atm basınçta 20 dk otoklavlanır.
10x TBE (Agaroz jel elektroforez tamponu)	108 gr Tris Baz, 5.5 gr borik asit, 40 mL 0.5M EDTA pH: 8,0 eklenir, son hacim 1L'e tamamlanır, 120°C, 1 atm basınçta 20 dk otoklavlanır. Yürütme tamponu ve jel hazırlığında 1:10 dilüe edilerek 1xTBE kullanılır.
2x RNA elektroforez yükleme boyası	10 mL yükleme boyası için; 9.5 mL formamid, 25 µL %10 SDS, 50 µL 1 mg/10 mL stok çözeltiden bromfenol mavisi + ksilen siyanol, 25 µL 10 mg/mL etidyum bromür,10 µL 0.05 mM EDTA, 390 µL su ile karıştırılır ve -20°C' de saklanır.

PCR ürünlerinin, restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası oluşan DNA parçalarının kontrolü ve DNA parçaların jelden izolasyonu gibi amaçlarla agaroz jel elektroforezinde görüntüleme esnasında kullanılan 50 bç (#SM0373), 100 bç (#SM0323), 1 kb (#SM0311) Gene Ruler markırlarıları Thermo Scientific (ABD) firmasından temin edilmiştir (Şekil 3.3). Agaroz jele yükleme sırasında ise örnekler ticari 6x mor yükleme boyası ile boyanmıştır.



Şekil 3. 3 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA uzunluk markırları

Plazmit İzolasyonu, Total RNa izolasyonu, cDNA sentezi, PCR, gerçek zamanlı PCR aşamalarında kullanılan ticari kitler-enzimler, kitlere ait referans kodları ve menşeileri Tablo 3.5 ‘de verilmiştir.

Tablo 3. 5 Çalışmada kullanılan ticari kitler-enzimler

İsim	Menşei	Referans Kodları
*Xho*I enzimi ve 10x buffer 3.1 tamponu	NEB (ABD)	#R0136S ve #B7203S
*Bam*HI ve 10x buffer 3.1 tamponu	NEB (ABD)	#R0146S ve #B7203S
T4 DNA ligaz ve 10x buffer	Thermo Scientific (ABD)	#EL0014
Taq polimeraz enzimi, 10x CL buffer, $MgCl_2$ buffer	QIAGEN (Almanya)	#K201205
DreamTaq green PCR master mix	Thermo Scientific (ABD)	#K1081
SsoAdvancedUniversal SYBR green supermix	Bio-Rad (ABD)	#1725270
Direct-Zol RNA miniprep plus	Zymo Research (ABD)	#R2072
RevertAid first strand cDNA synthesis kit	Thermo Scientific (ABD)	#K1622
QIAEXII gel exraction kit	Qiagen (Almanya)	#20021
Gene jet plasmid miniprep kit	Thermo Scientific (ABD)	#K0502

3.1.6 Kullanılan Cihazlar

Heraeus;Hera Safe (51012206) steril kabin, Systec DX-150 otoklav, Sartorius CPS320S hashas terazi, AB Veriti (43757896) Thermal Cycler, Bio-RAD CFX96 Real-Time PCR cihazı, Beckman Coulter Microfuge16 mini santrifüj, Becman Coulter Allegra X-22R santrfüj, Gene2 vorteks, Arçelik +4 ve -20°C buzdolabı, Arçelik MD582 Super mikrodalga fırın, Hanna Insturments pH211 pH metre, Velp Scientifici Arec ısıtıcılı

manyetik karıştırıcı, Bio-Rad Power Pac 200 yatay elektroforez güç kaynağı, Bio-Rad Wid Mini-Sub Cell GT yatay elektroforez sistemi, New Brunswick Scientific U725 Innova -80 °C derin dondurucu, Vilber Lourmat Bio-PrintTX4 UV görüntüleme cihazı, İldem 55Lt inkübatör, Infors HT Multitron çalkalayıcılı inkübatör, Inoksan Frenox buz makinesi, Stuart SDH130D ısıtıcı blok, Isolab ultrasonik su banyosu.

3.2 Metot

3.2.1 *CODM, T6ODM, DIOX2* Genlerinde VIGS İçin Hedeflenen Bölgelere Özel Primerlerin Dizaynı

Çalışmada kullanılan primerler, *P. somniferum* (tax no:3469) bitkisine ait *T6ODM* (GQ500139.1), *CODM* (GQ500141.1) ve *DIOX2* (GQ500140) genlerinin NCBI veri tabanında (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) var olan mRNA gen dizisine spesifik olarak Primer3 Input 4.1.0 (https://primer3.ut.ee/) çevrimiçi platformu kullanılarak %GC içeriği %50-55 arasında, Tm dereceleri aralarında maksimum 1 derece fark olacak ve 20-25 baz çifti uzunluğunda olmak üzere dizayn edildi. Tasarlanan primerlerin birbirlerine bağlanma, ikincil yapıları ve saç-toka yapısını oluşturup oluşturmadığı SMS PrimerStat (https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html) ve IDT OligoAnalyzer 3 (https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer) çevrimiçi aracında kontrol edildi. Tasarlanan ileri ve geri primerlerin 5' uçlarına *Bam*HI 5'-GGATCC-3' ve *Xho*I 5'-CTCGAG-3' restriksiyon enzimi kesim bölgeleri eklendi. Her gen için ayrıca literatürde var olan bu genlere özel olarak tasarlanıp VIGS çalışmalarında kullanılmış primerler incelenerek referans alındı (Hagel ve Facchini, 2010; Wikejoon ve Facchini, 2012).

Tasarlanan primerler, kaynakları, bağlanma dereceleri, ürün boyutları Tablo 3,6'da verildi.

Tablo 3. 6 *CODM, T6ODM, DIOX2* genlerinde hedeflenen bölgelere özel primerler

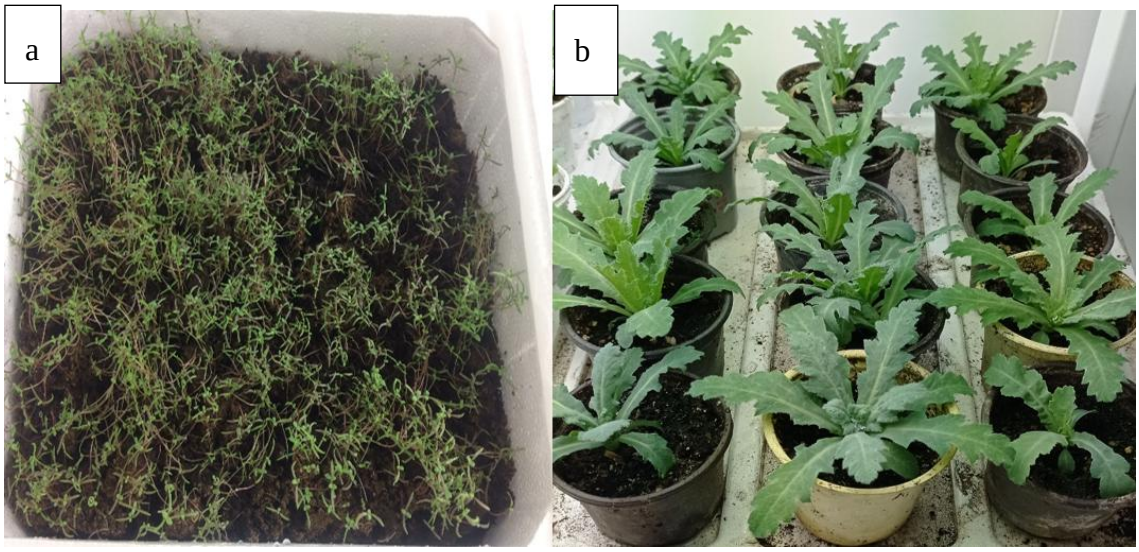
Primerin adı	**Hedef gen**	**Diziler (5'→3')**	**Kaynak**	**Bağlanma sıcaklığı (AT)**	**Ürün boyutu (bç)**
T6ODM_1F	T6ODM	GCGCGGATCCACCTCTACCTAATGCGTTCGT	Tez kapsamında tasarlandı.	58,2	269
T6ODM_1R		GCGCCTCGAGTTCCTCCACAAGATCCCCAT			
T6ODM_2F	T6ODM	GCGCGGATCCCCTTGTCCTCAACCAAAT	Hagel ve Facchini, 2010	48,3	362
T6ODM_2R		GCGCCTCGAGTCCACTTTTAAACAAAGC			
T6ODM_3F	T6ODM	GCGCGGATCCCGACGTGATTGCATGTCA	Wikejoon ve Facchini, 2012	55,1	237
T6ODM_3R		GCGCCTCGAGCACAACGCACTTTCGAGA			
CODM_1F	CODM	GCGCGGATCCCAGAGACACCTGCTTTGTTCA	Tez kapsamında tasarlandı.	58,4	262
CODM_1R		GCGCCTCGAGAAATCTCTCAGTCATCCACGAA			
DIOX2_1F	DIOX2	GCGCGGATCCAGAGTCGGAAATAGGCCCAA	Tez kapsamında tasarlandı.	58	225
DIOX2_1R		GCGCCTCGAGAAGACGGGGAAAGGACAGTT			
DIOX2_2F	DIOX2	GCGCGGATCCTTGATTCGATGAGGATG	Hagel ve Facchini, 2010	42,3	173
DIOX2_2R		GCGCCTCGAGCTTGAGAAAAGTTTTATT			
VIGS_1F	CODM	GCGCGGATCCGTGAGAAAGTGTGAACAT	Wikejoon ve Facchini, 2012	41	312
VIGS_1R		GCGCCTCGAGCAATCCAATACATTATTT			
VIGS_2F	CODM	GCGCGGATCCGCTCTCAATCGCGACAT	Tez kapsamında tasarlandı.	50,6	420
VIGS_2R		GCGCCTCGAGCAACCGTGATTACATCAC			

Tablo 3.6 CODM, T6ODM, DIOX2 genlerinde hedeflenen bölgelere özel primerler (devamı)

Primerin adı	**Hedef gen**	**Diziler (5'→3')**	**Kaynak**	**Bağlanma sıcaklığı (AT)**	**Ürün boyutu (bç)**
VIGS_3F	CODM	GCGCGGATCCTGTGCTTAAATTTCGTGGATGAC	Tez kapsamında tasarlandı.	58,4	127
VIGS_3R		GCGCCTCGAGTCACTTGACCCAAACAGAGTC			

3.2.2 Haşhaş Bitkilerinin Yetiştirilmesi ve Total RNA İzolasyonu

TMO tarafından geliştirilerek tescillenen OFIS1 çeşitine ait haşhaş tohumları torf içeren plastik kare büyük bir saksıya ekildi (Şekil 3.4). Tohumlar çimlendikten 2 hafta sonra her bir bitki torf içeren plastik saksılara aktarıldı. Tüm kültür işlemleri bitki iklimlendirme kabininde 24°C, 12000 lux ışık şiddeti 16/8 aydınlık/karanlık foto periyodunda gerçekleştirildi.



Şekil 3. 4 *P. somniferum* bitkilerinin yetiştirilmesi

a) Çimlenen tohumlardan gelişen 2-3 günlük fideler b) RNA izolasyonunda kullanılan yaprakların alındığı 6-8 haftalık bitkiler

Total RNA izolasyonu 6-8 haftalık bitkilere ait yapraklardan yapıldı. İzolasyon için Zymo Direct-Zol RNA Miniprep Plus kiti kullanıldı. İzolasyon, kit protokolünde minör modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. RNA izolasyon basamakları aşağıda verildi.

1. İlk olarak bitki yaprakları sıvı azotta donduruldu, ezilerek toz haline getirildi.
2. Sıvı azot uçtuktan sonra 30 mg'lık toz örneğin üzerine 500 µL Trizol eklendi, vorteksle karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletilen örnek oda sıcaklığında, 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Süpernatant temiz bir 1,5 ml'lik tüpe alınarak üzerine 300 µL saf etanol eklendi, oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi.
4. Ardından tüm örnekler kit kolonuna yüklenip oda sıcaklığında, 30 saniye 10.000 rpm'de çöktürüldü.
5. DNaz uygulamasına geçildi. 400 µL RNA WashBuffer eklendi, 30 saniye 10.000 rpm'de yine oda sıcaklığında santrifüj edildi. Boş bir tüpte her örnek için 75 µL DNA Digestion Buffer ve 5 µL DNazI ile karıştırılıp kolona yüklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. Süre sonunda kolona 400 µL Directzol RNA Pre-Wash Buffer eklendi, 10.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Bu adım 2 kere tekrarlandı.
7. Ardından kolona 700 µL RNA Wash Buffer eklendi, 30 saniye 10.000 rpm'de oda sıcaklığında çöktürüldü. Kolon boş olarak tekrar toplama tüpüne takılıp 30 saniye 14.000 rpm'de santrifüj edilerek kurutuldu.
8. Son olarak kolon temiz 1.5 ml'lik tüpe alınarak üzerine 55°C'de ısıtılmış 50 µL su eklenildi, 1 dakika 10.000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj ile çözdürülerek elüe edildi.
9. Total RNA çözeltisi temiz 1,5 mL'lik tüpe alınarak Nanodrop (ND-1000 Spectrofotometer) cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbans değerleri okunduktan sonra -20°C derin dondurucuda saklandı.

3.2.3 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

İzole edilen Total RNA'dan RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit ve prtokolü ile cDNA sentezi yapıldı. Reaksiyonda kullanılan kimyasalların miktarları ve reaksiyon aşamaları aşağıda verildi.

1) -Örnek RNA---------- 2 µg (460 ng/µL stok çözeltiden 5 µL kullanıldı)

-oligoDT primer---------- 1 µL

- DEPC su ile 12 µL ‘ye tamamlandı.

- 65°C’de 5 dakika inkübe edilip buza alındı.

2) Sırasıyla;

-5x Reaction Buffer----------4 µL

-Ribolock Rnase Inhib. ----------1 µL

-10 mM dNTP mix ----------2 µL

-Reverderd M-MuWRT (200u/ µL)--1 µL eklendi.

42°C --------60 dakika

70°C---------5 dakika inkübe edilip, -20°C derin dondurucuda saklandı.

3.2.4 TRV2 Plazmitine Klonlanacak Sekansların PCR ile Eldesi

Bir önceki aşamada elde edilen cDNA’lar PCR için kalıp zincir olarak kullanılmak üzere, Tablo 3.6’ da verilen primerler ile reaksiyon koşulları hazırlandı. Reaksiyon-tüp başına kullanılan bileşen miktarı ve final konsantrasyonları Tablo 3.7‘de verildi.

Tablo 3. 7 DNA çoğaltımı için PCR bileşenleri ve final konsantrasyonları

Bileşen	**Final konsantrasyon**
10xCL buffer	1,25x
25 mM $MgCl_2$	2.0 mM
dNTP mix (10 mM her biri)	250 µM
Primer F (10 µM)	0,375 µM
Primer R (10 µM)	0,375 µM
Taq polimeraz	0,625 ünit/reaksiyon
H_2O	-
Kalıp cDNA (100 ng/µL)	10 ng
Toplam	20 µL

Reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı ve aşağıdaki ısı döngülerinde gerçekleştirildi. Primerlerin bağlanma sıcaklıkları birbirinden farklı olduğundan 60-58-56-54-50 °C gradiyentlerde çalışıldı.

95°C --------→ 03: 00 dk

95°C---------→ 01: 00 dk

Bağlanma--→ 00: 30-40 sn

72°C---------→ 01: 00 dk

35 döngü

72°C----------→10: 00 dk

10°C---------- ∞

3.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi ve PCR Ürünlerinin İzolasyonu

PCR ürünleri, reaksiyon sonunda %1,5'luk agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. 100 mL 1xTAE tamponuna 1,5 g agaroz eklendikten sonra mikrodalga fırında kaynatıldı. Agaroz jele 10 mg/mL etidyum bromür stok çözeltisinden 6 µL eklenerek polimerleşmesi için 45 dakika bekletildi. Polimerleşen agaroz jel, içinde 1x TAE tamponu bulunan elektroforez tankında 90V güçte 40 dakika boyunca yürütüldü. PCR ürünleri Qiagen PCR kiti karışımında yükleme boyası bulunması nedeniyle ek olarak boyanmadı. Bant belirteci olarak 50 bç ve 100 bç Gene Ruler kullanıldı. Agaroz jel, UV görüntülüme cihazında görüntülendi.

DNA uzunluk markırına göre pozitif bant varlığı ile doğrulanan PCR ürünleri (Tablo 3.6'da primerlerin PCR ürün boyutları verildi) ürün miktarının arttırılması için direkt PCR ürünün kendisinden GeneJET Gel Extraction kolon tipi saflaştırma kiti kullanılarak izole edildi. İşleme ait basamaklar aşağda verildi.

1. İlk olarak ürün üstüne hacimce 1:2 oranında Binding Buffer eklendi.
2. Ardından 1.1 oranında izopropanol eklenip 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletildi, süre sonunda tüpte bulunan tüm sıvı çekilerek kit kolonuna yüklendi. Kolon 10.000 rpm'de, 1 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi.
3. Kolona 700 µL Wash Buffer eklenip, oda sıcaklığında 1 dakika, 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
4. Kolon oda sıcaklığında, 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek kurutuldu.
5. Kolona 50 µL dH_2O eklenip 1 dakika 10.000 rpm'de elüe edildi ve Nanodrop cihazında miktar ve saflık ölçümleri yapıldı.

3.2.6 Hedeflenen DNA Sekanslarının TRV2 Plazmitine Klonlanması

3.2.6.1 DNA Sekanslarının ve TRV2 Plazmitinin Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi

VIGS çalışmasında kullanılacak DNA sekansları, TRV2 plazmitine insert edilebilmesi için hem plazmit hem sekanslar *Bam*HI ve *Xho*I restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim işlemi Tablo 3,8'de verilen reaksiyon bileşenleri ile 37°C'de 30 dakika, 65°C'de 15 dakika ısı döngülerinde gerçekleştirildi.

Kesim işlemi tamamlanınca, örnekler %0,8'lik agaroz jele, 6x mor yükleme boyası ile boyanarak yüklenip, 40 dk 80V güçte elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Ardından UV ışığı altında görüntülendi.

Tablo 3. 8 *Bam*HI ve *Xho*I kesim reaksiyon bileşen miktarları

Bileşen	**DNA sekansları miktar (µL)**	**TRV2 plazmiti miktar (µL)**
Kesilecek sekans veya plazmit(maks. 1 ng)	40	5
10x buffer 3.1	5	5
*Xho*I	1,5	1,5
*Bam*HI	1,5	1,5
H_2O	2	37
Toplam	50	50

*Bam*HI ve *Xho*I enzimleriyle kesilerek gedik açılmış TRV2 ürününün tamamı 6x mor yükleme boyası ile birlikte %1'lik agaroz jele yüklendi. Uygun boyuttaki lineerize edilmiş TRV2 plazmiti jelden kesilerek alındı ve QIAEXII Gel Exraction Kit ve protokolü kullanılarak jelden izole edildi. İzole edilen ürünlerin miktar ve saflık ölçümü Nanodrop cihazında yapıldı.

3.2.6.2 TRV2 Plazmitine DNA Sekanslarının Ligasyonu

Bio-line Media Calculator (https://www.bioline.com/media/calculator/01_07.html) çevrimiçi aracı yardımıyla hem insert edilecek DNA sekanslarının hem de TRV2 plazmitinin uzunlukları ve izolasyon sonrası ölçülen miktarları kullanılarak ligasyon reaksiyonu için gerekli olan reaksiyon bileşenleri hesaplandı. Ardından Tablo 3.9 ve 3.10'da belirtilen bileşenlerle yapışkan uç ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3. 9 Ligasyon reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	**Miktar (µL)**
10x ligation buffer	2
Plazmit (20-100 ng)	1
Insert DNA parçası (3:1 oranında)	Her bir insert için ayı ayrı hesaplandı.
T4 DNA ligaz	1
H_2O	20'e tamamlanır
Toplam	20

Tablo 3. 10 Her bir DNA sekansı için hesaplanan ligasyon bileşen miktarları

Ürün adı	**ng/ul**	**Boyut**	**fmol/ µL**	**1:5 dilüsyon**	**İnsert (µL)**	**H_2O (µL)**
CODM	16.2	262 bç	95,27	19,05	0,91	15,09
VIGS_2	11,9	420 bç	43,66	8,73	1,99	14,01
VIGS_3	13,1	127 bç	158,94	31,78	0,55	15,45
T6ODM_1	11,6	269 bç	66,44	13,28	1,31	14,69
T6ODM_2	12,3	362 bç	52,35	10,47	1,67	14,33
T6ODM_3	8,9	237 bç	57,86	11,57	1,51	14,49

Tablo 3.10 Her bir DNA sekansı için hesaplanan ligasyon bileşen miktarları (devamı)

Ürün adı	**ng/ul**	**Boyut**	**fmol/ µL**	**1:5 dilüsyon**	**İnsert (µL)**	**H2O (µL)**
DIOX2_1	7,3	225 bç	49,99	9,99	1,74	14,26
TRV2	95,3	11 kb	13,35			

Reaksiyon karışımları her bir insert edilecek DNA sekansı ve TRV2 plazmiti için Tablo 3.6'da verildiği gibi hazırlandıktan sonra 22°C'de 60 dakika, 65 °C 'de 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyon karışımları daha sonra transformasyon işlemlerinde kullanılmak üzere -20°C derin dondurucuda saklandı.

3.2.7 VIGS-pTRV2 Plazmitlerinin *E. coli*' ye Transformasyonu

Hedeflenen DNA sekanslarını içeren TRV2 plazmitlerinin (VIGS-pTRV2) çoğaltılması ve doğrulanması amacıyla kompetent *E. coli* DH5 suşlarına ısı şoku ile aktarıldı. Yapılan işlemler aşağıda verilmiştir.

1. Kompetent bakteri hücreleri buz üzerine alınıp biraz çözüldükten sonra 55 µL bakteri üzerine 10 ng plazmit eklendi, 15 dakika bekletildi.
2. Buzdan alınan bakteriler 42°C'lik sıcak su banyosunda 45 saniye bekletilip ardından tekrar buz üzerine alınarak 2 dakika inkübe edildi.
3. 1,5 mL' lik eppendorf tüplere 900'er µL önceden 37°C 'ye ısıtılmış LB Broth besiyeri eklendi. Bakteri süspansiyonları çalkalayıcılı etüvde 37°C 'de 45 dakika inkübe edildi.
4. Süre sonunda hücreler 1 dakika 3800 rpm'de çöktürüldü, tüpten süpernatantın 850 µL'si atıldı. Geri kalan bakteri süspansiyonu kanamisin içeren LB agar besi yerine yayılarak gece boyu 37 °C etüvde büyümeye bırakıldı.

Transformasyonun kontrolü koloni PCR ile gerçekleştirildi. Transformasyonun ertesi günü koloni oluşturan bakteri hücreleri steril kürdan yardımıyla kanamisin içeren numaralandırılmış LB-Agar besiyerine çizilerek gece boyu 37 °C etüvde büyümeye bırakıldı. Büyüyen bakteri kolonileri ile PCR analizi yapıldı. Isı döngüsü olarak Bölüm 3.2.4'deki döngü uygulandı. Tablo 3.11'de reaksiyonda kullanılan bileşen ve konsantrasyonları, Tablo 3.12'de ise reaksiyonda kullanılan pTRV2 kontrol primerlerinin dizileri verildi.

Tablo 3. 11 Koloni PCR bileşenleri ve final konsantrasyonları

Bileşen	**Final konsantrasyon**
10xCL buffer	1,25x
25 mM $MgCl_2$	2.0 mM
dNTP mix (10 mM her biri)	250 µM
Primer F(10 µM)	0,375 µM
Primer R (10 µM)	0,375 µM
Taq Poly	0,625 unit/reaksiyon
H_2O	-20 µL tamamlanır
Kalıp (koloni)	-
Toplam	20 µL

Tablo 3. 12 TRV2 kontrol primer dizileri

Primer ismi	**Hedef**	**Dizi (5'→3')**
pTRV2_cntrl_F:	TRV2-coat protein	GTAAGGTTACCGAATTCTCTA
pTRV2_cntrl_R:		GAACCGTAGTTTAATGTCTTCG

Reaksiyon sonrası ürünler %1,5'luk agaroz jelde 90V, 40 dakika yürütülüp UV ışığı altında görüntülendi. Pozitif bant veren koloniler işaretlenerek plazmit izolasyonu ve gliserol stok yapmak için +4°C soğutucuya kaldırıldı.

3.2.8. Bakteri Stoklarının Oluşturulması

Bakteri koleksiyonları gliserol stoklar hazırlanarak oluşturuldu. Bu amaçla kontrol primerleri ile PCR gerçekleştirilip agaroz jel elektroforezinde pozitif bant veren kolonilerden, steril kürdanlar ile bir miktar bakteri alınarak 1:1000 oranında kanamisin

içeren 10 mL LB-Broth besiyerine ekildi ve 37°C, 220 rpm'de gece boyu büyümeye bırakıldı. Ertesi gün 500 µL gliserollü LB Broth (%30 gliserol içeren LB-Broth) içeren tüplere bakteri kültüründen 500 µL alınarak vortekslendi. Sıvı azot ile dondurulan örnekler -80°C derin dondurucuda stoklandı.

3.2.9. Bakterilerden Plazmit İzolasyonu

PCR analizinde pozitif bant veren kolonilerden, steril kürdan ile bir miktar bakteri alınarak 1:1000 oranında kanamisin içeren 10 mL LB-Broth besiyerine aktarılarak 37°C, 220 rpm'de gece boyu büyümeye bırakıldı. Ardından Gene Jet Plasmid MiniPrep Kit ile plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. İşlem basamakları aşağıda sunulmuştur

1. İlk olarak 5 mL bakteri süspansiyonu oda sıcaklığında 60 saniye, 10.000 rpm'de çöktürüldü.
2. Ardından pellet üzerine 250 µL Resuspension Solution eklenip vorteksle çözüldü, 250 µL Lysis Solution eklendi ve 4-6 kez tüpteki karışım berraklaşana kadar alt-üst edilerek 3-5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
3. Süre sonunda 350 µL Neutralization Solution eklendi ve yine karışım berrak olana kadar 4-6 kere alt-üst edilip 5 dakika 10.000 rpm oda sıcaklığında santrifüj edildi.
4. Süpernatant 2 mL'lik başka bir tüpe alınıp bir kez daha 5 dakika 10.000 rpm oda sıcaklığında santrifüj edildi.
5. Süpernatant kit içinde bulunan Gene JET spin kolonlarına aktarılıp 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
6. 500 µL Wash Solution kolona eklendi ve 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Bu adım tekrarlandı ve ardından kolonu kurutma amacıyla 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
7. Kolon kapağı 2 dakika açık bırakılarak alkolün uçması sağlandı. Bu sırada kolon 1.5 mL'lik yeni bir tüpe yerleştirildi ve 50 µL distile su eklenip 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
8. Ardından 2 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edilerek elüe edildi. Tüpte kalan plazmit içeren çözelti -20 °C derin donrucuya daha sonra kullanılmak üzere depolandı. İzole edilen plazmitlerin safıklık ve miktar ölçümü Nanodrop cihazında yapıldı.

3.2.10 TRV1, TRV2 ve VIGS-pTRV2 Plazmitlerinin *A. tumefaciens*'e Transformasyonu

TRV1, TRV2 plazmitleri ile *E. coli*' den izole edilen VIGS-pTRV2 plazmitleri A. *tumefaciens* LBA4404 elektrokompetent hücrelere aktarıldı. Bu amaçla:

1- İlk olarak 80 µL kompetent *A. tumefaciens* hücreleri 2 mm'lik steril elektroporasyon küvetlerine alınarak buza yerleştirildi.
2- Üzerine 10 ng plazmit eklendi.
3- 2400V güç uygulanarak elektroporasyon işlemi gerçekleştirildi.
4- Örneklerin üzerine 500 µL daha önceden 28°C'de ısıtılmış LB sıvı besi yeri eklenerek 30 dakika 28 °C'de inkübe edildi.
5- Süre sonunda küvetteki bakteri süspansiyonu 500 µL LB Broth besi yeri içeren 1,5'mL'lik tüplere alındı ve çalkalayıcılı etüvde 28°C ve 200 rpm'de 2,5 saat büyütüldü.
6- 2,5 saatin sonunda kanamisin içeren LB Agar besi yerine 150 µL bakteri süspansiyonunu yayılıp 28°C etüvde gece boyu büyümeye bırakıldı.

Pozitif bakteri kolonilerinin doğrulanması koloni PCR ile gerçekleştirildi. Bunun için transformasyon sonrası bakteri kolonilerinden rastgele 8'şer tanesi seçilerek steril kürdanlar yardımıyla kanamisin içeren numaralandırılmış LB Agar besiyerine çizilerek gece boyu 37°C etüvde büyümeye bırakıldı. Numaralandırılmış bakteriler reaksiyon için kalıp olarak kullanılmak üzere Bölüm 3.2.8'deki protokol kullanılarak koloni PCR yapıldı. TRV1 plazmiti ve VIGS-pTRV2 plazmitleri aktarılan kolonilerin doğrulanmasında kullanılan primer dizileri Tablo 3.13'de ve Tablo 3.10'da verildi.

Tablo 3. 13 TRV1 kontrol primer dizileri

Primer ismi	**Hedef**	**Dizi (5'→3')**
pTRV1_cntrl_F:	TRV1-coat protein	CTTGAAGAAGAAGACTTTCGAAGTCTC
pTRV1_cntrl_R:		GTAAAATCATTGATAACAACACAGACAAAC

Reaksiyon sonrası ürünler %1,5'luk agaroz jelde 90V, 40 dk yürütülüp UV altında görüntülendi. Pozitif bant veren koloniler işaretlenerek gliserol stok yapılmak üzere

+4°C dolaba kaldırıldı. Gliserol stoklar (3.2.7) hazırlandıktan sonra -80°C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2.11 Haşhaş Bitkisinde Somatik Embriyo İndüksiyonu ve Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması

Tüm doku kültürü sürecinde steril çalışma ortamının oluşturulabilmesi ve başarılı kültür süreci için kullanılacak yüzeyler, kullanılmadan önce %70 (v/v)'lik alkolle silindi ve steril kabin 15 dakika UV lambası açılıp beklenildikten sonra kullanıldı. Ayrıca çalışma sırasında kullanılacak bistüri sapı, pens gibi aletler 120°C, 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandıktan sonra steril kabin içerisinde açılıp bek alevinden geçirildikten sonra kullanıldı.

Çalışmada *P. somniferum* tohumları ilk olarak %70'lik etanolde 1 dakika, sonra %25'lik çamaşır suyu ve 1:1000 Tween 20'de 10 dakika çalkalanarak yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu. Ardından 6-7 defa steril deionize su ile yıkandı ve steril filtre kağıtlarına yayılarak kurutuldu. Tamamen kuruyan tohumlar magentalarda bulunan ½ MS0 katı besin ortamına aktarılarak iklimlendirme kabininde 24°C, 16/8 aydınlık/karanlık foto periyodunda çimlenmeye alındı.

Somatik embriyo indüksiyonu için 1-2 haftalık aseptik fidelerin hipokotil-kotiledon kısımları eksplant olarak kullanıldı. Eksplantlar MS5.2.V3 besin ortamında ve 21°C'de, karanlıkta iklimendirme kabininde kültüre alındı.

Eksplantlar somatik embriyo oluşumuna kadar 6-8 hafta boyunca haftada bir aynı içerikli ortamlara alt kültüre alındı. Eksplantlarının üzerinde somatik embriyoların oluşumu gözlendikten sonra somatik embriyolar ayrılarak yine aynı besin ortamında kültüre alındılar. Alt kültürden bir hafta sonra somatik embriyolar 45 mg/L askorbik asit+ 1mL/L PPM içeren ½ MS0-sıvı besin ortamına transfer edilerek süspansiyon kültürleri kuruldu. Süspansiyon kültürleri ilk olarak 50 mL'lik steril erlenlerde 20 mL kültür olacak şekilde kuruldu ve her hafta ortam yenilenerek 20-50-100-200 mL kültürler 50-100-250-500 mL'lik erlenlerde aktarıldı. Süspansiyon kültürleri çalkalayıcılı inkübatörde 21°C, 100 rpm ve karanlıkta inkübe edildi. Yeterli miktarda süspansiyon (300-400 mL arası) kültürü elde edilerek transformasyon aşamasına geçildi.

3.2.12 Haşhaş Somatik Embriyolarının VIGS-pTRV2 ve TRV1 Plazmitlerini içeren *A. tumefaciens* ile Transformasyonu

VIGS-pTRV2 ve TRV1 plazmitlerini içeren *A. tumefaciens* ile haşhaş somatik embriyolarının transformasyonu iki farklı yöntem kullanılarak yapıldı. Birinci yöntemde aşağıda verilen inokülasyon öncesi somatik embriyo süspansiyon kültürlerindeki 3., 4. ve 5. işlemler uygulanmamıştır. İkinci yöntemde ise bu işlemler (enzim çözelti uygulaması ve yıkama) gerçekleştirilmiştir.

A. tumafaciens inokülasyonu öncesi somatik embriyo süspansiyon ön kültürlerinin oluşturulması:

1. Süspansiyon kültürlerinin sıvı kısmı uzaklaştırılarak ½ MS0 ile yıkandı.
2. Kültürler steril filtre kâğıdından süzülerek somatik embriyolar 400 mL ½ MS0 içeren erlene aktarıldı. Elde edilen kültürler 35'er mL olacak şekilde steril 100 mL'lik schoot şişelere dağıtılıp son hacim 50 mL'ye aynı ortam eklenerek tamamlandı ve 130 rpm, 23 °C çalkalamalı etüvde, karanlıkta gece boyunca inkübe edildi (Şekil 3.5a).
3. Çalkalayıcıdan alınan kültürler 1-2 dakika bekletilerek somatik embriyoların dipe çökmesi sağlandı. Besin ortamı hafifçe dökülerek uzaklaştırıldı.
4. Ardından üzerine son hacim 100 mL olacak şekilde enzim çözeltisi (Tablo 3.2) eklenip, 30°C'de 135 rpm'de karanlıkta 5 dakika inkübe edildi (Şekil 3.5b).
5. Enzim çözeltisi uzaklaştırılarak 2 defa yıkama çözeltisi (Tablo 3.2) ile somatik embriyolar yıkandı.

A. *tumefaciens* kültürlerinin oluşturulması;

1. Gliserol stoktan alınan bakteriler 50 mg/L kanamisin içeren 15'er mL LB Broth besiyerine ekildi ve 28°C, 220 rpm çalkalayıcılı etüvde gece boyu büyütüldü. İnokulasyon ortamının son hacimde çalışılacak bakteri OD değerleri 0,1-0,2 aralığında olacak şekilde (Tablo 4.5) bakteri dilüsyonları yapıldı.
2. Bakteri kültürü +4 °C, 4000 rpm de 15 dakika santrafüj yapılarak süpernatant uzaklaştırıldı.
3. Pellet üzerine inokulasyon ortamından (Tablo 3.2) 15 mL eklenerek vortekslendi.

A. tumefaciens ile somatik embriyoların inokülasyonu;

1. Somatik embriyolar 50 ml mannitol içeren (enzim uygulaması yapılan kültürler için) veya içermeyen inokülasyon ortamına aktarılırak kültüre 1 mL *A. tumafaciens* bakteri kültürü eklendi. Hedeflenen gen ve gen susturma kombinasyonlarını Tablo 3.14'de verilmiş ve her bir deneme için ilgili plazmitleri içeren bakteri kültürleri kullanılmıştır.
2. 5 saat boyunca 130 rpm, 23 °C çalkalamalı etüvde karanlıkta inkübe edildi.
3. İnokülasyon sonrasında somatik embriyolar steril deionize ile yıkanarak sıvı azotta donduruldu. Ardından CHRIST-Ice Condenser cihazında liyofize edildi (Şekil 3. 5c).

Tablo 3. 14 VIGS uygulamalarında hedeflenen genler ve uygulama kombinasyonları

Deneme no	**Hedef gen**	**VIGS-pTRV2 DNA sekansı**	**Uygulama kodu ve kombinasyonlar**
1	*CODM*	VIGS_2	V2
2	*CODM*	VIGS_3	V3
3	*T6ODM*	T6ODM_1	T1
4	*T6ODM*	T6ODM_2	T2
5	*DIOX2*	DIOX2_1	D2-1
6	*CODM/DIOX2*	VIGS_2/DIOX2_1	V2+D2-1
7	*CODM/DIOX2*	VIGS_3/DIOX2_1	V3+D2-1
8	*T6ODM/DIOX2*	T6ODM_1/DIOX2_1	T1+D2-1
9	*CODM/T6ODM*	VIGS_3/ T6ODM_1	V3+T1
10	Kontrol (TRV2- boş)	-	-



Şekil 3. 5 Somatik embriyoların *A. tumefaciens* ile transformasyonu

(a) 1/2 MS0 ortamında kültüre alınan somatik embriyolar b) enzim çözeltisi uygulaması c) transformasyon sonrası somatik embriyoların liyofilizasyonu

3.2.13 *CODM, T6ODM, DIOX* Geni veya Genleri Susturulmuş Somatik Embriyolarda Gerçek Zamanlı PCR ile Gen İfade Analizi

Gen ifade analizleri için ilk adım olan kurutulmuş somatik embriyolardan RNA izolasyonu yapıldı. Herbir denemeye ait kuru örneklerden 150'şer mg tartılarak ayrıldı, kalan örnekler -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Örnekler sıvı azotta ezildi ve 30 mg toz örnekten total RNA izolasyonu gerçekleştirildi (Bölüm 3.2.2.). İzolasyon sonrası RNA miktar ve saflıkları Nanodrop ile belirlendi. İzole edilen RNA'lar 1:1 oranında 2x RNA yükleme boyası (Tablo 3.2) ile boyanıp sonra 70°C'de 10 dk, +4 °C'de bir süre bekletilerek lineerize edildi. Ardından hazırlanan %2'lik TBE agaroz jele yüklenip 90V'da elektroforez cihazında yürütülüp UV'de görüntülendi.

Reaksiyonda 1500 mg RNA kullanılarak (Tablo 4.6) RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kiti ile cDNA sentezi yapıldı (Bölüm 3.2.3.). Ardından hedeflenen genlerin gen ifadesindeki değişim seviyelerinin belirlenmesi amacıyla gerçek zamanlı PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

VIGS-pTRV2 plazmitleri aktarılan hücrelerde gen ifadesindeki değişimler *CODM*, *T6ODM* ve *DIOX2* genlerine ek olarak BIA sentez yolağında üst ve ara basamaklarında bulunan *4OMT* (XM_026574923.1), *N7OMT* (113328355), *CNMT* (113294670), *COR* (113294469) genleri için de incelendi.

Gerçek zamanlı PCR için genlerin NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) veri tabanında var olan mRNA gen dizisine spesifik olarak Primer3 Input 4.1.0 (https://primer3.ut.ee/) çevrimiçi platformu kullanılarak %GC içeriği %50-60 arasında, Tm dereceleri arasında maksimum 1-2 derece fark olacak şekilde 58°-60°-62°C'leri arasında 20-25 baz uzunluğunda, ürün boyutu 150-300 baz uzunluğunda olacak doğrultuda tasarlandı. Tasarlanan primerlerin birbirlerine bağlanma, ikincil yapıları ve saç-toka yapısını oluşturup oluşturmadığı SMS PrimerStat (https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html) ve IDT OligoAnalyzer 3 (https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer) çevrimiçi aracında kontrol edildi. *COR* geni için literatürden referans primerler alındı (Kawano vd, 2012). Reaksiyonda kontrol primeri (housekeeping gene) olarak *P. somniferum Actin1* geni kullanıldı. Primerlerlere ait bilgiler Tablo 3.15' de verildi.

Tablo 3. 15 Hedeflenen genlerin ifade analizlerinde kullanılan primerler

Primer adı	**Hedef gen**	**Sekans (5'→3')**	**Kaynak**	**Bağlanma sıcaklığı (AT)**	**Ürün boyutu (bç)**
RT_1F:	*4OMT*	TGAAAGAAGCATGGCACCAG	Tez kapsamında tasarlandı	58.75	191
RT_1R:		CTCCAGCTTGCCCTTCATCA			
RT_9F:	*CNMT*	GGACTCTGAGTGGAAAGCATTAC	Tez kapsamında tasarlandı	59.06	185
RT_9R:		ACCCAAACAACTCTGCTCCA			
RT_11F:	*N7OMT*	GTATCAGCGGGAGGGAAACT	Tez kapsamında tasarlandı	58.20	213
RT_11R:		TTGAGCTGCGAAACCTACTG			
RT_14F:	*COR*	GCGCGGATCCCCTTGTCCTCA ACCAAAT	(Kawano vd, 2012)	60.6	490
RT_14R:		GCGCCTCGAGTCCACTTTTAA ACAAAGC			
RT_25F:	*T6ODM*	TGGAAGGATTTGGACAAGGCT	Tez kapsamında tasarlandı	59.90	228
RT_25R:		TCTCGGCTGCTTGTACTTGT			
RT_26F:	*DIOX2*	ACGAACGCATTAGGTAGAGGT	Tez kapsamında tasarlandı	58,90	155
RT_26R:		ACGAACGCATTAGGTAGAGGT			
RT_27F:	*CODM*	ACGAACGCATTAGGTAGAGGT	Tez kapsamında tasarlandı	59,90	213
RT_27R:		CGACGCTACGGTAAATCCCA			
PS_Actin_F:	*PsACT1*	CACACTGTGCCAATCTATGAG	(Kawano vd, 2012)	57,5	334
Ps_Actin_R:		TGGATACCAGCAGCTTCCATC			

Optimum cDNA konsantrasyonunun belirlenmesi için rastgele seçilen 6. örnek cDNA'sının 1:2,1:5,1:10,1:15,1:20,1:25,1:50 ve 1:100 dilüsyonları ile Dream Taq Green PCR Master Mix ve PS_Actin primerleri kullanılarak PCR kuruldu. Reaksiyon içeriği ve miktarları Tablo 3.16 'da verilmiştir.

Tablo 3. 16 Dream Taq polimeraz reaksiyon bileşenleri ve final konsantrasyonları

Bileşen	**Final konsantrasyon**
2x DreamTaq green M.M	2x
Primer F(10 µM)	0,4 µM
Primer R (10 µM)	0,4 µM
H_2O	25 µL tamamlanır
Kalıp (cDNA dilüsyonları)	Değişen
Toplam	25 µL

Reaksiyon döngüsü;

95°C ---------- 03: 00 dk

95°C---------- 01: 00 dk

60°C ---------- 00: 30 sn

72°C---------- 00: 20 sn

40 döngü

72°C----------10: 00 dk

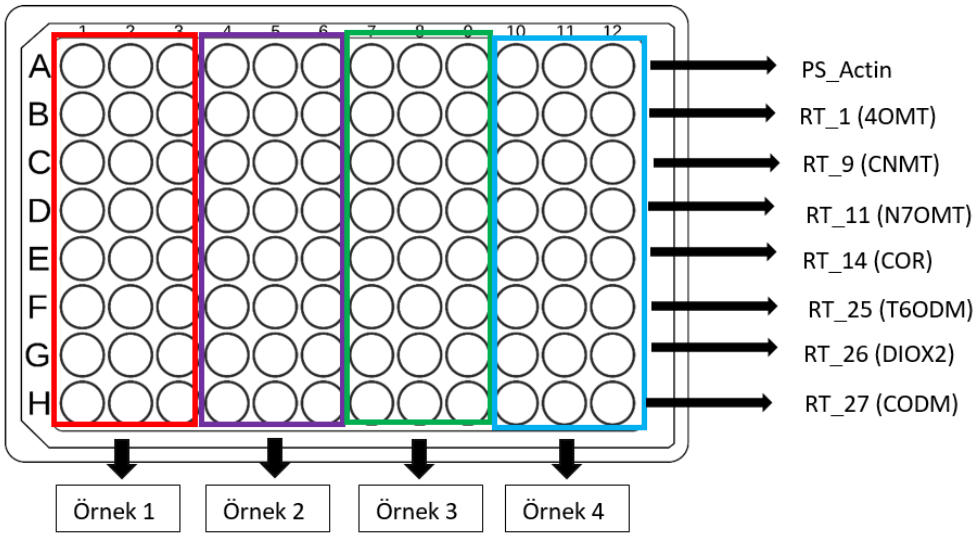
4°C---------- ∞

Reaksiyon sonunda ürünler %1,5 'luk agaroz jelde 90V, 40 dakika yürütülüp görüntülendi. Jelde pozitif bant veren cDNA konsantrasyonuyla devam edildi.

Tablo 3.16'daki koşullarda, Tablo 3.15'de verilen primerler ile 2 µL (1:10) cDNA kullanılarak gerçek-zamanlı PCR gerçekleştirildi. Reaskiyonda Bio-Rad SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix kiti kullanıldı. PCR plate konumları; yatay satırda her primer için ayrı ayrı ve her örnek için 3 'er tekerrür olmak üzere Şekil 3.6'da

gösterildiği gibi yapıldı. Plate vortekslenip 2 dakika 1500 rpm'de çöktürdükten sonra Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR System cihazına yüklendi.

Reaksiyon içeriği ve final konsantrasyonları Tablo 3.17'de verildi. Reaksiyon çalışma döngüsü aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 3. 6 Örneklerin gerçek zamanlı PCR plate konumları

Tablo 3. 17 Gerçek Zamanlı PCR içeriği ve konsantrasyonları

Bileşen	**Final konsantrasyon**
SybrGreen S.Mix	1x
Primer F	0,4 µM
Primer R	0,4 µM
H_2O	20 µL tamamla
Kalıp (cDNA 1:10)	15 ng/ reaksiyon
Toplam	20 µL

Gerçek zamanlı PCR ısı döngüsü;

95°C ---------- 01: 00 dk

95°C---------- 00: 10 sn

60°C ----------00: 40 sn

40 döngü

65-95 °C Melt-Curve Analysis

Reaksiyon sonunda elde edilen Ct verileri CFX Maestro programı ile işlenip $2^{\Delta\Delta Ct}$ metodu (Livak and Schmittgen, 2001) ile kontrol, gene özel VIGS-pTRV2 uygulamaları ve her bir gen için bağıl transkript seviyeleri ve kat indüksiyonu hesaplanarak değişim yüzdesi cinsinden grafikler oluşturuldu.

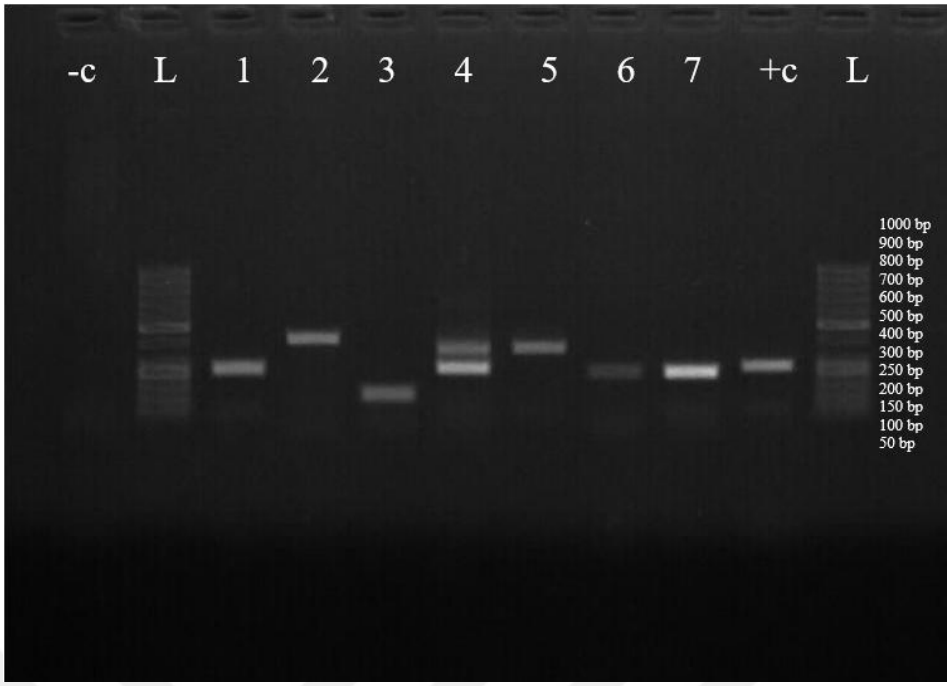
4
BULGULAR

4.1 Bitki Materyalinden Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Altı-sekiz haftalık haşhaş bitkilerinin yapraklarından RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyonu sonrası 460 ng/µL total RNA elde edildi. Total RNA 'nın absorbansları A260/230'de 2,09, A:260/280'de 2,06 olarak ölçüldü. Oranlar 2.0-2.3 aralığında olduğundan izole edilen RNA örneği saf olarak kabul edilerek RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kiti kullanılarak cDNA sentezlendi.

4.2 TRV2 Plazmitine Klonlanacak Sekansların Agaroz Jelde Görüntülenmesi ve PCR Ürünlerinden İzolasyonu

P. somniferum bitkisindeki *CODM, T6ODM* ve *DIOX2* genlerine özel Bölüm 3.2.1' de tasarlanan primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR ardından agaroz jelde yürütülmesi sonucuna her primer için Tablo 3. 4' de verilen özgül boyutlarda PCR ürünleri elde edildi. Literatürden referans primer olarak alınan VIGS_1 ve DIOX2_2 primerleri bağlanma dereceleri (A.T) Taq polimeraz enziminin en düşük çalışma sıcaklığı olan 50 °C' den daha düşük oldukları için PCR ile çoğaltılamadı. Primerlerin optimum çalışma sıcaklıklarının belirlenmesi için gerçekleştirilen sıcaklık gradiyent çalışmaları sonrası; CODM, VIGS_3 ve DIOX2_1 primeleri 60 °C' de pozitif bant verirken, VIGS_2 55 °C; TODM_1 58°C; T6ODM_2 50 °C; T6ODM_3 55 °C' de pozitif bant üretmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1 TRV2 plazmitine klonlanacak sekansların PCR sonrası agaroz jelde görüntüsü

(-c: Negatif kontrol, +c: Pozitif kontrol (CODM1), L: 50 bç Ladder, 1: CODM_1, 2: VIGS_2, 3: VIGS_3, 4: T6ODM_1, 5: T6ODM_2, 6: T6ODM_3, 7: DIOX2_1)

Sadece pozitif bant veren PCR ürünlerinin saf eldesi ve ürün miktarının arttırılması amacıyla direkt PCR ürünün kendisinden GeneJET Gel Extraction kolon tipi saflaştırma kiti kullanılarak izole edildi. PCR ürünlerinden izolasyon sonrası elde edilen miktar ve saflık değerleri Tablo 4.1' de verildi.

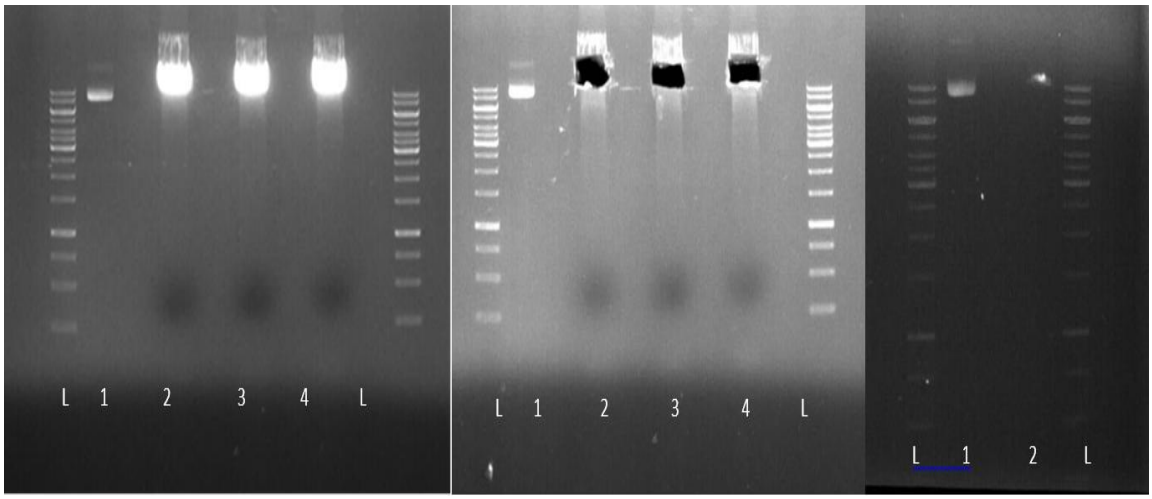
Bu yöntemle saflaştırılan PCR ürünlerinin daha sonra yapılacak kesim reaksiyonları, bu parçaların TRV2 plazmitine ligasyonuyla plazmit oluşturulabileceği ve tüm bu basamakları jele yükleme–kaybetme aşamaları atlanarak yapılabileceği sonucuna varıldı.

Tablo 4. 1 TRV2 plazmitine klonlanacak sekansların izolasyonu sonrası miktar ve saflık değerleri

Ürün adı	**ng/µL**	**A $_{260/280}$**	**A $_{260/230}$**
CODM	16,2	1,70	0,19
VIGS_2	11,9	2,13	0,1
VIGS_3	13,1	1,78	0,06
T6ODM_1	11,6	1,62	0,3
T6ODM_2	12,3	2,16	0,2
T6ODM_3	8,9	1,59	0,4
DIOX2_1	7,3	1,69	0,2

4.3 TRV2 Plazmitinin Kesimi ve Agoroz Jelden İzolasyonu

TRV2 plazmiti ligasyon işlemleri için lineerize edilme amacıyla kesim reaksiyonu gerçekleştikten sonra jelden QIAEXII Gel Exraction Kit ve protokolü ile izole edildi. İzolasyon sonrası elde edilen miktar ve saflıkları Tablo 4.2'de verildi. İzolasyon sırasında jelde görüntüleme- kesme ve tekrar ürünün yürütülmesi gibi adımların her birinde UV altında görüntüler elde edilip TRV2'ye ait görüntüler Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4. 2 TRV2 plazmitinin jelden izolasyonu

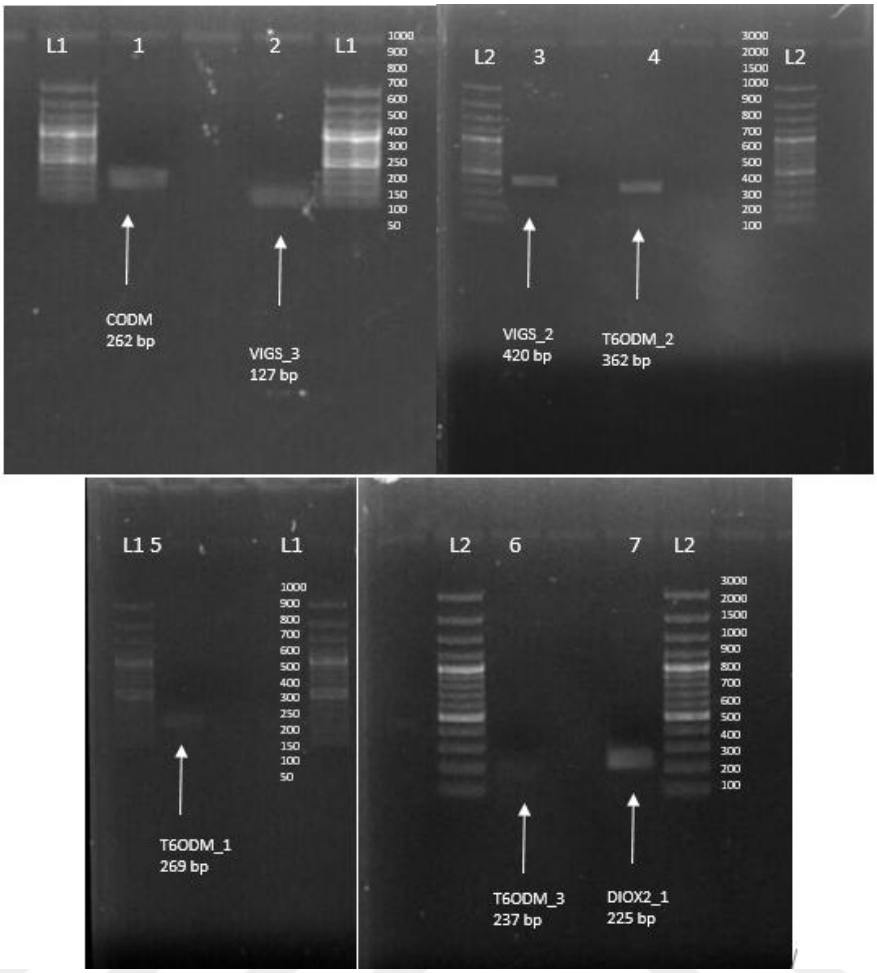
(L: 1 kb DNA Ladder, 1: TRV2-kesilmemiş, 2: TRV2-kesilmiş, 3: TRV2-kesilmiş, 4: TRV2-kesilmiş)

Tablo 4. 2 TRV2 plazmitinin izolasyon sonrası miktar ve saflık değerleri

Ürün adı	**ng/µL**	**A $_{260/280}$**	**A $_{260/230}$**
TRV2	15,9	1,67	1,56

4.4 Hedef DNA Sekanslarının Kesimi ve TRV2 Plazmitine Ligasyonu

Primerlerin tasarımı esnasında eklenen enzim tanıma bölgeleri kullanılarak kesim işlemi gerçekleştirilen ürünler bir sonraki adım olan ligasyon işlemi öncesinde doğrulanması için agaroz jele yüklendi. Kesimler her sekans için tek tek yapılıp agaroz jelde kontrol edildikten sonra ligasyon işlemi için -20°C'de muhafaza edilerek koleksiyon oluşturuldu. Elde edilen bantlara ait görüntüler Şekil 4.3' de verilmiştir.



Şekil 4. 3 TRV2 plazmitine insert edilecek DNA sekanslarının jel görüntüleri

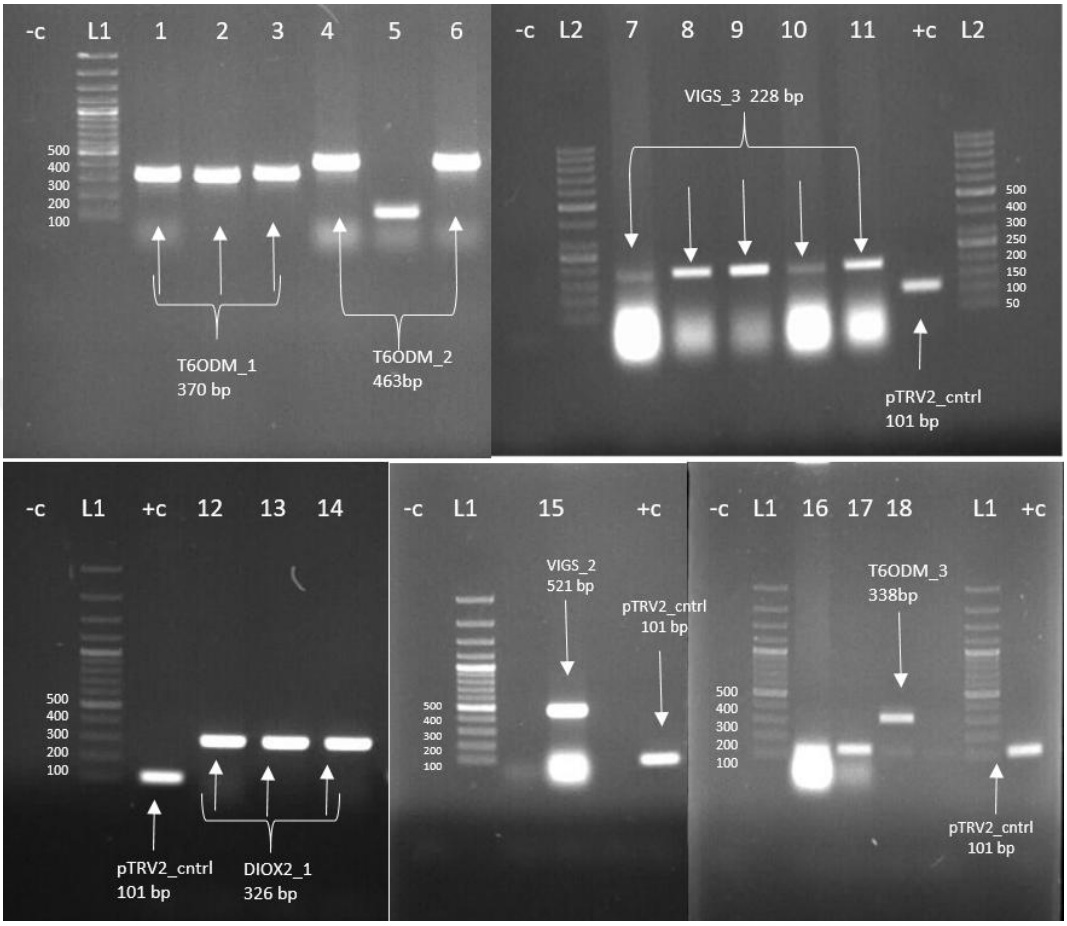
(L1: 50 bp, L2: 100 bp DNA Ladder, 1: CODM, 2: VIGS_3, 3: VIGS_3, 4: T6ODM_2, 5: T6ODM_1 , 6: T6ODM_3 , 7: T6ODM_3 kesilmiş)

Kesim sonucunda elde edilen insert sekanslarının, TRV2 plazmitine ligasyonu T4 DNA Ligaz enzimi ile gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda susturma çalışmalarında kullanılmak üzere farklı insert sekanslarını içeren VIGS-pTRV2 plazmitleri oluşturuldu.

4.5 VIGS-pTRV2 plazmitlerinin *E. coli 'ye* Transformasyonu

VIGS-pTRV2 plazmitleri, Bölüm 3.2.8' de açıklandığı gibi *E. coli* DH5α suşuna transforme edilmesinden sonra kanamisin antibiyotiğini içeren ortamda kolonilerin geliştiği gözlendi. Oluşan koloniler koloni PCR ile doğrulandı. Ortak tek bir kontrol primeri kullanabilmek için pTRV_2_cntrl primeri dizayn edildi. pTRV2_cntrl primeri insertlerin gerçekleştrildiği *Bam*HI ve *Xho*I bölgelerini kapsayacak şekilde 101 bç uzunluğunda ürün veren primerdir. *Bam*HI ve *Xho*I kesim bölgeleri arasına insertlerin yerleştirilmesiyle insert sekans boyutu ve 101 bç' lik bantlar pozitif bant olarak

değerlendirildi. *CODM* genini hedefleyen plazmitlerden birisi olan CODM-pTRV2 plazmiti hariç tüm plazmitlerde pozitif bant elde edildi. Böylece susturma işleminde kullanılacak VIGS-pTRV2 plazmitleri çoğaltıldı ve doğrulandı. Koloni PCR' ına ait jel görüntüleri Şekil 4.4' de verildi.



Şekil 4. 4 VIGS-pTRV2 plazmitlerinin koloni PCR analizi jel görüntüleri

(-c: negatif kontrol, L1: 100 bç, L2:5 0 bç Ladder, +c: boş TRV2 plazmiti, 1: T6ODM_1–pTRV2-1. ,2: T6ODM_1- pTRV2-2. ,3: T6ODM_1- pTRV2-3. ,4: T6ODM2- pTRV2 -1. , 5: T6ODM_2- pTRV2-2. , 6: T6ODM_2- pTRV2-3. , 7: VIGS_ 3- pTRV2-1. ,8: IGS_ 3- pTRV2-2. , 9: VIGS_ 3- pTRV2-3. ,10: VIGS_ 3- pTRV2-4. , 11: VIGS_ 3- pTRV2-5. , 12: DIOX2_1-pTRV2 -1. , 13: DIOX2_1-pTRV2-2. ,14: DIOX2_1-pTRV2-3. ,15: VIGS_ 2- pTRV2-1. , 16: T6ODM_3-pTRV2-1. , 17: T6ODM_3-pTRV2-2. ,18: T6ODM_3-pTRV2-3. plazmitleri)

4.6 VIGS-pTRV2 içeren *E. coli* 'den Plazmit İzolasyonu

Şekil 4.4' de gösterildiği gibi pozitif bant veren kolonilerden her plazmit kombinasyonu için 1 koloni seçilerek Bölüm 3.2.9' da açıkladığı gibi plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası Nanodrop cihazında okunan değerler Tablo 4.3 'de verildi. Olması gereken saflık değeri DNA ölçümleri için $A_{260/280}$ 1.8-1.9 arasındadır. İzolasyon sonrasında uygun miktar ve saflıklarda plazmit elde edildi.

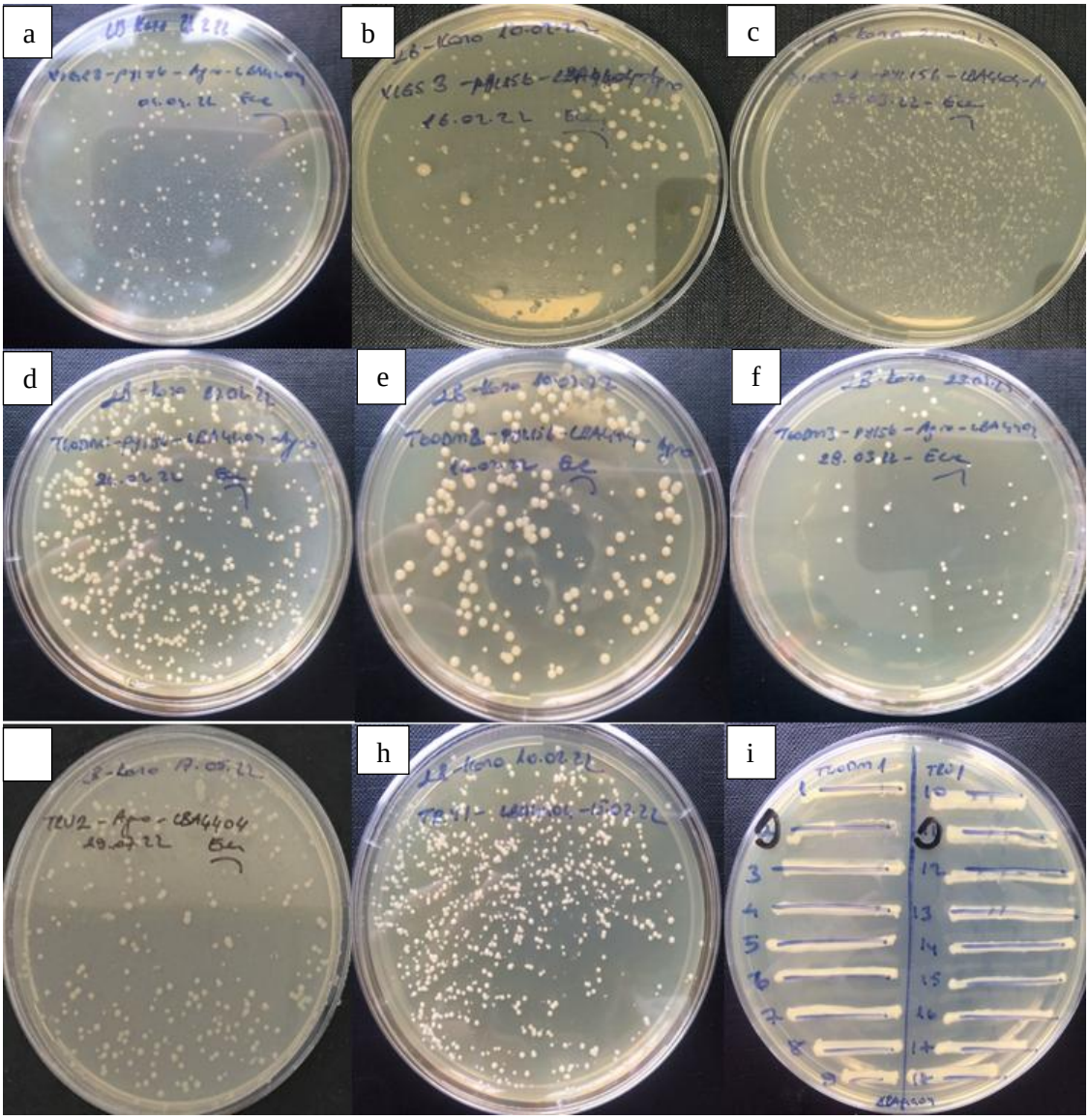
Tablo 4. 3 VIGS-pTRV2 içeren *E. coli* DH5α 'lardan izole edilen plazmit miktarları ve saflık değerleri

Ürün adı	**ng/µL**	**$A_{260/280}$**	**$A_{260/230}$**
VIGS_2-pTRV2	137,4	1,96	2,11
VIGS_3-pTRV2	209,4	1,97	2,59
T6ODM_1-pTRV2	225	1,86	2,61
T6ODM_2-pTRV2	246,4	1,94	2,56
T6ODM_3-pTRV2	125,4	1,96	2,05
DIOX2_1-pTRV2	267	1,95	2,24

4.7 TRV1, TRV2 ve VIGS-pTRV2 Plazmitlerinin *A. tumefaciens* 'e Transformasyon

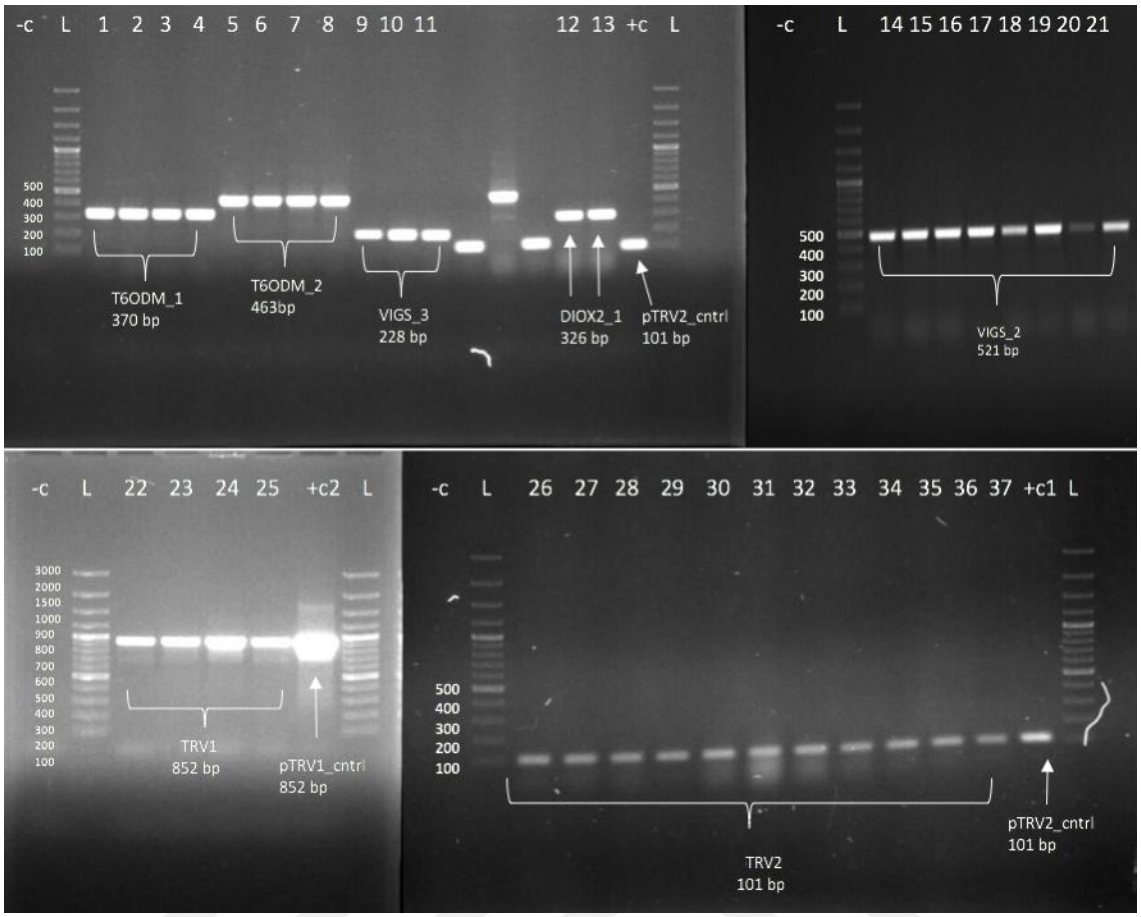
TRV1, TRV2 ve *E. coli*'den izole edilen VIGS-pTRV2 plazmitleri elektroporasyon metodu kullanılarak *A. tumefaciens* LBA4404 elektrokompetent hücrelerine aktarıldı. Kanamisin içeren ortamda yetişen bakteri kolonileri Şekil 4.5'de gösterildi. Koloni PCR sonucunda pozitif bant veren kolonilerin (Şekil 4.6) gliserol stokları hazırlanarak -80°C'de muhafaza edildi. T6ODM_3-pTRV2 plazmitinin *A. tumefaciens'* e aktarımı

sonucu koloni elde edilmesine rağmen, koloni PCR analizi sonucunda pozitif bant üreten koloni tespit edilemedi.



Şekil 4. 5 VIGS-pTRV2 plazmitlerinin ve TRV1-TRV2 plazmitlerinin *A. tumefaciens* LBA4404 'e transformasyonu sonrası antibiyotikli besi ortamında oluşan koloniler

(a)VIGS_2-pTRV2 ,b) VIGS_3-pTRV2 ,c) DIOX2_1-pTRV2 ,d) T6ODM_1-pTRV2 ,e)T6ODM_2-pTRV2, f) T6ODM_3-pTRV2 ,g) boş TRV2 ,h) TRV1 , i)antibiyotikli ortama çizilen T6ODM1 ve TRV1 plazmitlerini taşıyan koloniler)

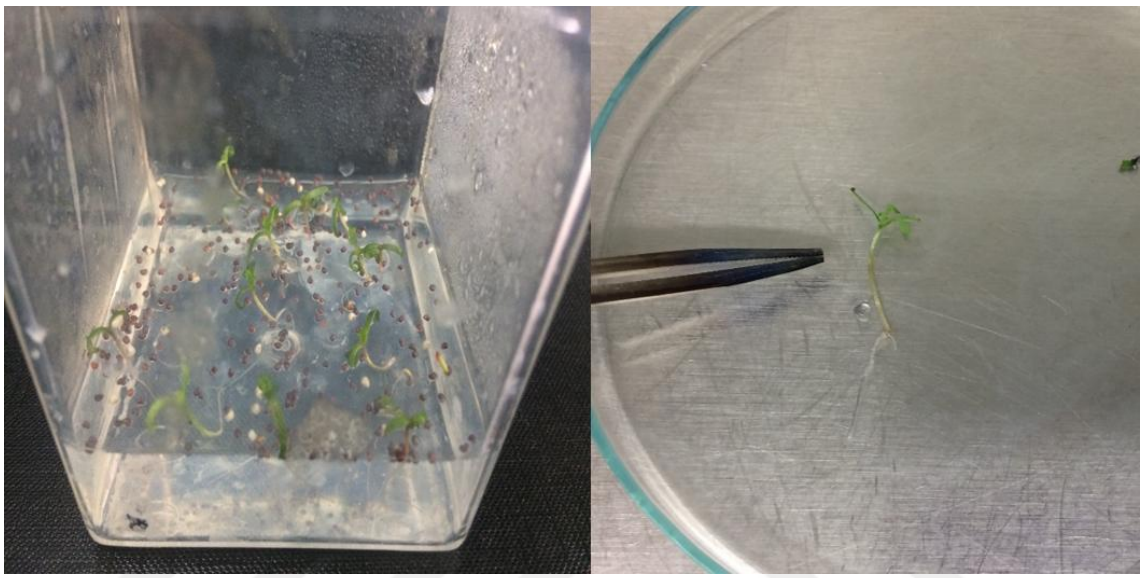


Şekil 4. 6 VIGS-pTRV2 plazmitlerinin ve TRV1-TRV2 plazmitlerinin *A. tumefaciens* LBA4404 suşunda koloni PCR analizi jel görüntüleri

(-c: negatif kontrol, L: 100 bç Ladder, +c1: boş TRV2 plazmiti, +c2: TRV1 plazmiti, 1: T6ODM_1–pTRV2-1. , 2: T6ODM_1- pTRV2-2., 3: T6ODM_1- pTRV2-3. , 4: T6ODM1- pTRV2 -4. , 5: T6ODM_2- pTRV2-1. , 6: T6ODM_2- pTRV2-2. , 7: T6ODM_2- pTRV2-3. , 8: T6ODM_2- pTRV2-4. , 9: VIGS_ 3- pTRV2-1. , 10: VIGS_ 3- pTRV2-2. , 11: VIGS_ 3- pTRV2-3. , 12: DIOX2_1-pTRV2 -1. , 13: DIOX2_1-pTRV2-2. , 14: VIGS2_1-pTRV2-, 15: VIGS2_1-pTRV2-2. , 16: VIGS2_1-pTRV2-3. , 17: VIGS2_1-pTRV2-4. , 18: VIGS2_1-pTRV2-5. , 19: VIGS2_1-pTRV2-6. , 20: VIGS2_1-pTRV2-7. , 21: VIGS2_1-pTRV2-8. , 22:T RV1-1. , 23: TRV1-2. , 24: TRV1-3. , 25: TRV1-4., 26: TRV2-1. , 27: TRV2-2. , 28: TRV2-3. , 29: TRV2-4. , 30:TRV2-1-5. , 31: TRV2-6. , 32: TRV2-6., 33 : pTRV2-7. , 34: TRV2-8. , 35: TRV2-9. , 36: pTRV2-10., 37: pTRV2-11. plazmitleri)

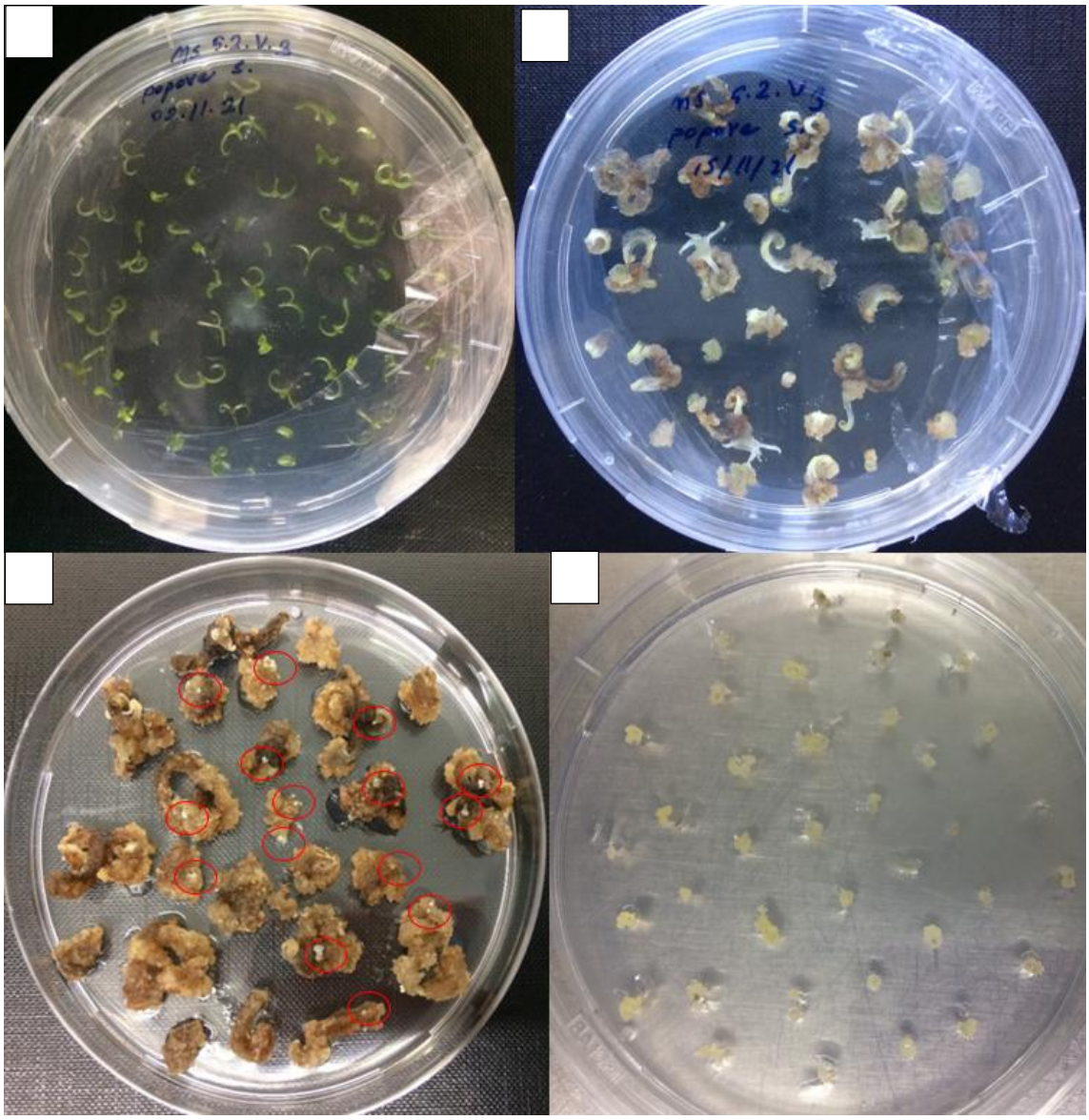
4.8 Haşhaşda Somatik Embriyo İndüksiyonu ve Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması

Bölüm 3.2.11' de anlatıldığı gibi yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlardan gelişen 1-2 haftalık aseptik fidelerin hipokotil-kotiledon (Şekil 4.7) parçalarına ait eksplantlar besin ortamında kültüre alındı ve kültürden, 6-8 hafta sonra ilk somatik embriyolar elde edildi.



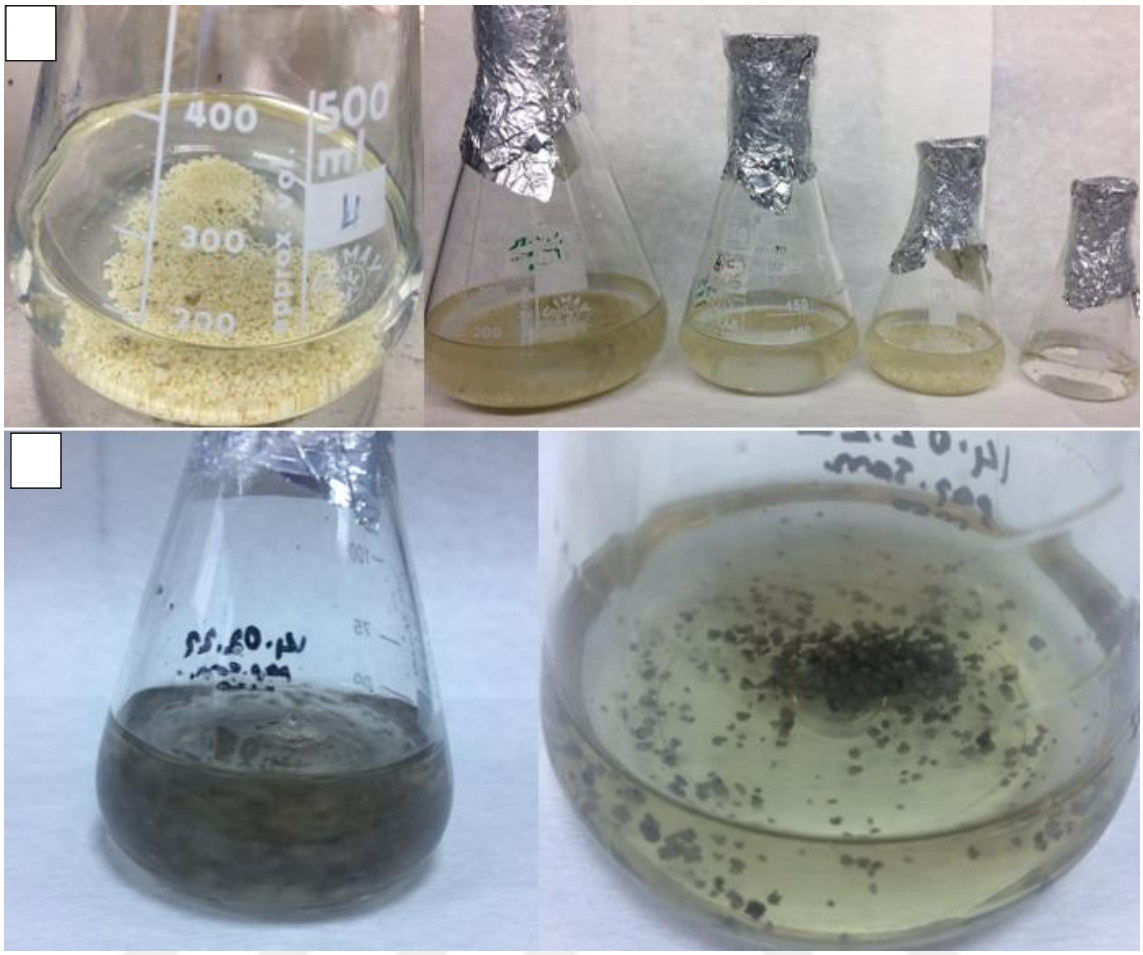
Şekil 4. 7 1-2 haftalık aseptik fideler

Kültürün ilk 4 haftasında eksplantlarda yeşil-beyaz kallus benzeri yapılar gözlenirken 5.haftadan sonra yapıların sertleştiği ve kahverengileştiği gözlendi. Bu kahverengi yapılar 1-2 hafta daha alt kültürlendiğinde ise somatik embriyolar elde edildi. Elde edilen somatik embriyolar küçük, beyaz-krem, yuvarlak, kolay ayrılabilen yapıdadır. Kültür gelişim süreci ve elde edilen somatik embriyolar Şekil 4.8'de verilmiştir. Alt kültürlerde çoğalan embriyolar bir hafta sonra 50-100-250 ve 500 mL'lik erlenlerde 20-50-100-200 mL'lik 45 mg/L askorbik asit ve 1 mL/L PPM içeren ½ MS0 süspansiyon kültür ortamlarına aktarıldı (Şekil 4.9 a). Süspansiyon kültürlerinde kültür süresi 10 günü, sıcaklık derecesi 21°C 'yi aştığında veya kültürler 500 mL'lik erlene büyütüldüğünde kültürlerdeki somatik embriyoların karardığı gözlendi (Şekil 4.9 b). Bu nedenle süspansiyon kültürlerinin haftalık olarak alt kültürleri yapılıp en fazla 250 mL'lik erlende 100 mL'lik kültür olacak şekilde ölçek büyütmesi yapılmıştır.



Şekil 4. 8 Somatik embriyo indüksiyon aşamaları

(a) kültürden bir hafta sonra hipokotil-kotiledon eksplantlarının görüntüsü b) 4 haftalık kültürde gelişen kallus benzeri yapılar c) 6-8 haftalık kültürlerde somatik embriyo gelişmi (kırmızı daire içinde kahverengi eksplant üzerinde gelişen somatik embriyolar belirtilmiştir) d)alt kültüre alınan somatik embriyolar)



Şekil 4. 9 Somatik embriyo süspansiyon kültürleri

(a) 50-100-250-500 mL' lik erlenlere kurulan somatik embriyo süspansiyon kültürleri b) 21°C 'i aşan sıcaklıkta ve 500 mL' lik erlende büyütülen kültürlerde kararan somatik embriyolar)

4.9 Haşhaş Somatik Embriyolarının A. *tumefaciens* ile Transformasyonu

Süspansyon kültürlerindeki somatik embriyolarına VIGS- pTRV2 ve TRV1 plazmitlerinin transformasyonu *A. tumefaciens* aracılığıyla gerçekleştirildi. *A. tumefaciens* kültürleri büyütüldükten sonra O.D. değerleri 0,1-0,2 arası olacak şekilde bakteri miktarı hesapladı (Tablo 4.4).

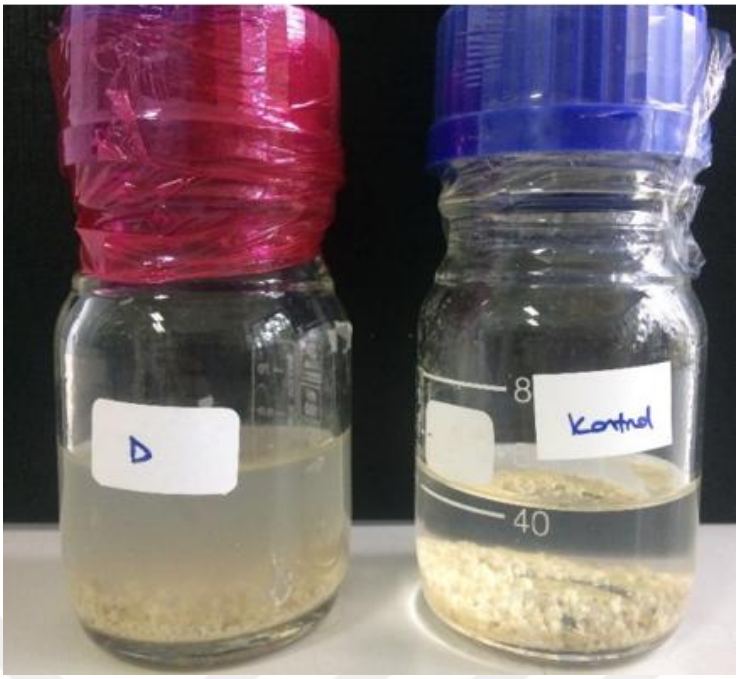
Transformasyon işleminin ilk aşamasında, süspansiyon kültür ortamda bulunan, askorbik asit ve PPM'i uzaklaştırmak için yıkama yapıldı. Ardından A. tumefaciens ile inokulasyon aşamasına geçilen 1. yöntem sonucunda elde edilen hücrelerde gen ifadesinde bir değişme tespit edilmedi. Bu nedenle oluşturulan 2. yöntemde (maserozim

enzim uygulaması) ise, hücrelerde gen ifadesinde değişimler belirlendiğinden bu yöntem ile transformasyonun başarıyla gerçekleştirdiği sonucuna varıldı.

Somatik embriyoların *A. tumafaciens* ile 5 saat inkübasyonu sonucunda bakteri üremesinin bir göstergesi olan ortamda bulanıklık görüldü (Şekil 4.10). Inokülasyon sonrası somatik embriyolar deionize su ile yıkanarak sıvı azotta donduruldu ve CHRIST-Ice Condenser cihazında liyofilize edildi.

Tablo 4. 4 Büyütülen *A. tumefaciens*'lere ait O.D.$_{600}$ değerleri ve uygun O.D. değerlerinin belirlenmesi

Plazmit	**O.D.$_{600}$**	**15 mL besin ortamında (=O.D.x15)**	**50 mL inokulasyon ortamında O.D. /1 mL (=[O.D.x15] /50)**
TRV1	0,920	13,8	0,276
TRV2	0,608	9,12	0,182
VIGS_2-pTRV2	0,965	14,47	0,289
VIGS_3-pTRV2	0,385	5,77	0,115
T6ODM_1-pTRV2	0,710	10,65	0,213
T6ODM_2-pTRV2	0,788	11,82	0,286
DIOX2_1-pTRV2	0,731	11	0,22



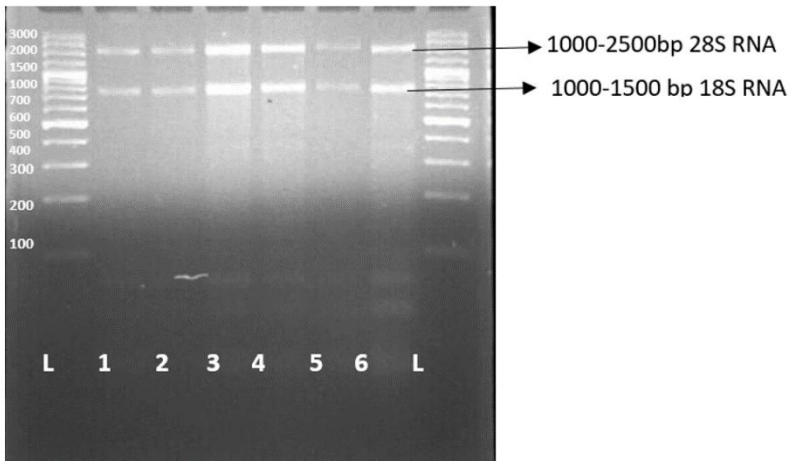
Şekil 4. 10 İnokulasyon sonrası kültür ortamı

4.10 *CODM, T6ODM, DIOX* Gen ve Genleri Susturulmuş Somatik Embriyolarda Gen İfadesi Analizi

Hedeflenen gen veya genlerde susturmaya bağlı olarak ifade seviyelerinde düşüş veya artış beklendi. Gen ifadesi seviyelerindeki değişimin ölçülebilmesi için ilk olarak somatik embriyolardan total RNA izole edilip, miktar ve saflık ölçümleri yapıldı (Tablo 4.5). Ardından rastgele seçilen 6 adet örnek agaroz jel elektroforez yapıldı. Total RNA izolasyonunun başarısı 28S ve 18S RNA bantları görülmesi ile doğrulandı (Şekil 4.11).

Tablo 4. 5 VIGS uygulaması sonrası örneklerden izole edilen RNA miktarı ve saflık değerleri

Örnek	**ng/µL**	**A 280/260**	**A280/230**
1-V2	802,9	2,10	2,25
2-V3	662	2,08	2,26
3-T1	598,4	2,05	2,24
4-T2	803	2,04	2,27
5-D2-1	306,4	2,04	2,24
6-V2+D2-1	645	2,04	2,25
7-V3+D2-1	1034,4	2,04	2,27
8-T1+D2-1	692,4	2,05	2,23
9-V3+T1	612,3	2,04	2,26
10-Kontrol	449,7	2,00	2,20



Şekil 4. 11 VIGS uygulaması sonrası örneklerden izole edilen Total RNA jel görüntüsü

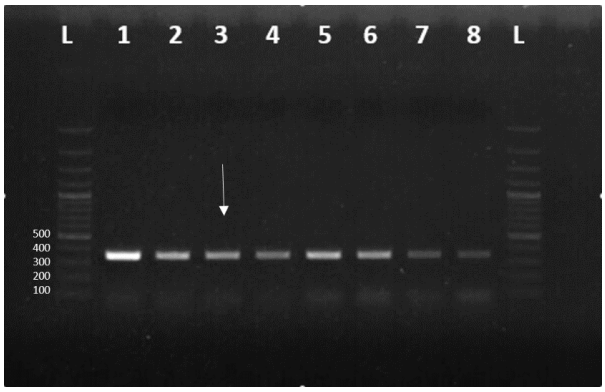
(L: 100 bç Ladder,1: Örnek 2,2: Örnek4, 3: Örnek5, 4: Örnek6, 5: Örnek8, 6: Örnek9)

Reaksiyonda 1500 ng RNA kullanılacak şekilde hesaplamalar yapılıp cDNA sentezlendi. Hesaplamalar Tablo 4.6 ‘da verilmiştir. Gerçek-zamanlı PCR için optimum

cDNA konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla rastgele seçilen 6. denemeya ait cDNA'nın dilüsyonlarıyla yapılan PCR reaksiyon sonrası agaroz jel elektroforezinde elde edilen pozitif bant veren 1:10 dilüsyon ile çalışmasına karar verildi (Şekil 4.12).

Tablo 4. 6 VIGS uygulaması sonrası örneklerde cDNA sentezi için hesaplamalar

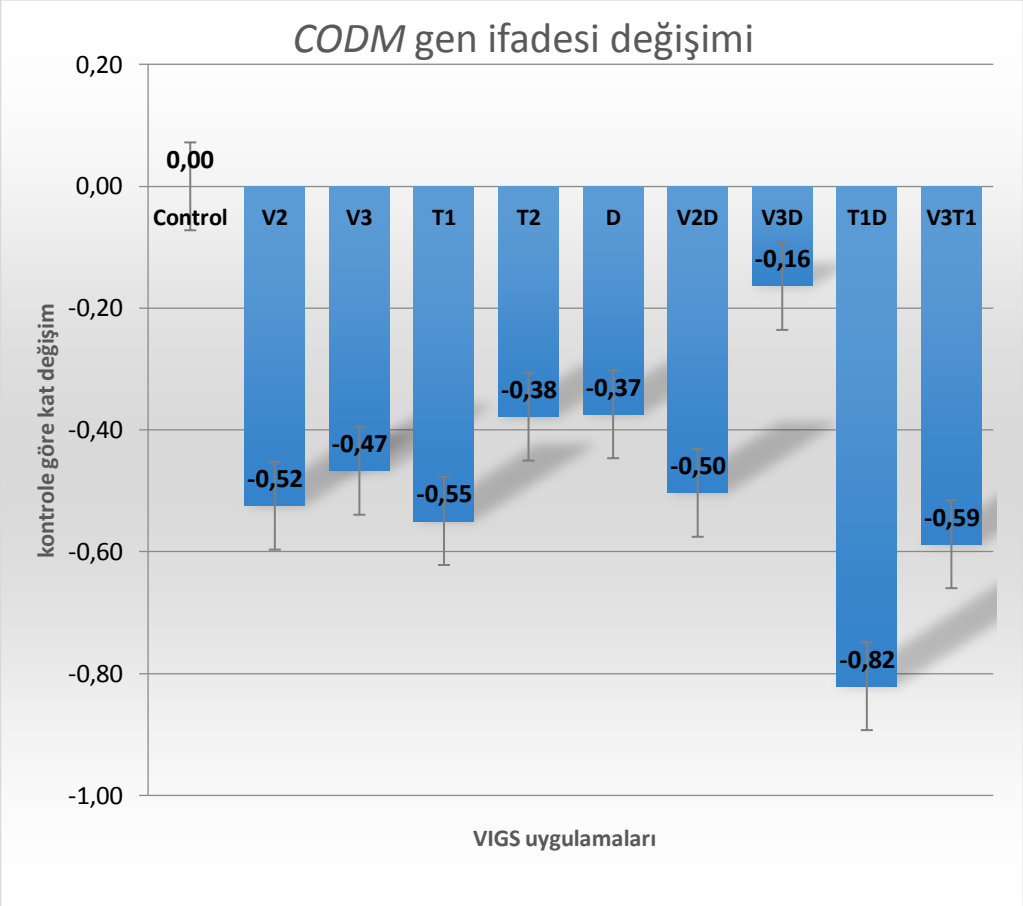
Örnek	**Total RNA konsantrasyonu (ng/µL)**	**1500 ng için kullanılacak miktar (µL) (=15000/ ng)**	**H_20(20 µL tamamlanır) =10-alınacak miktar**
1(V2)	802,9	1,8682	9,1318
2(V3)	662	2,2659	8,7341
3(T1)	598,4	2,5067	8,4933
4(T2)	803	1,8680	9,1320
5(D2-1)	306,4	4,8956	6,1044
6(V2-D2-1)	645	2,3256	8,6744
7(V3-D2-1)	1034,4	1,4501	9,5499
8(T1-D2-1)	692,4	2,1664	8,8336
9(V3-T1)	612,3	2,4498	8,5502
10(Kontrol)	449,7	3,3356	7,6644



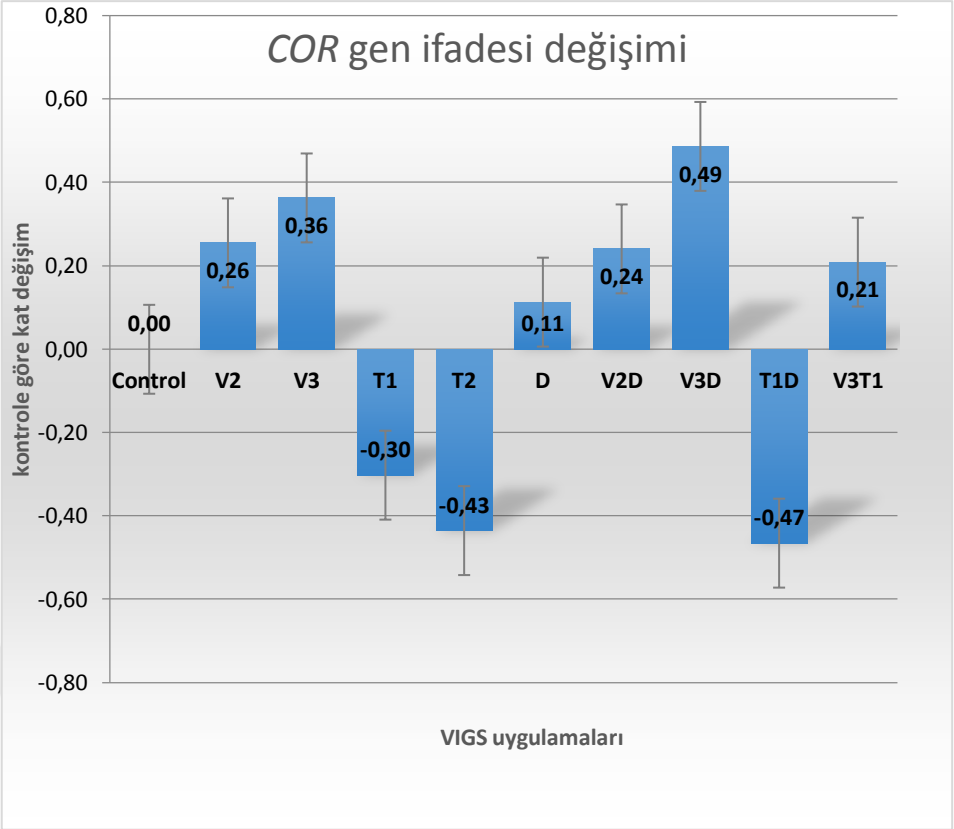
Şekil 4. 12 cDNA dilüsyonlarına ait jel görüntüsü

(L: 100 bç Ladder, dilüsyon oranları ; 1:1:2, 2: 1:5, 3: 1:10, 4: 1:15 , 5:1:20, 6:1:25, 7:1:50, 8:1:100)

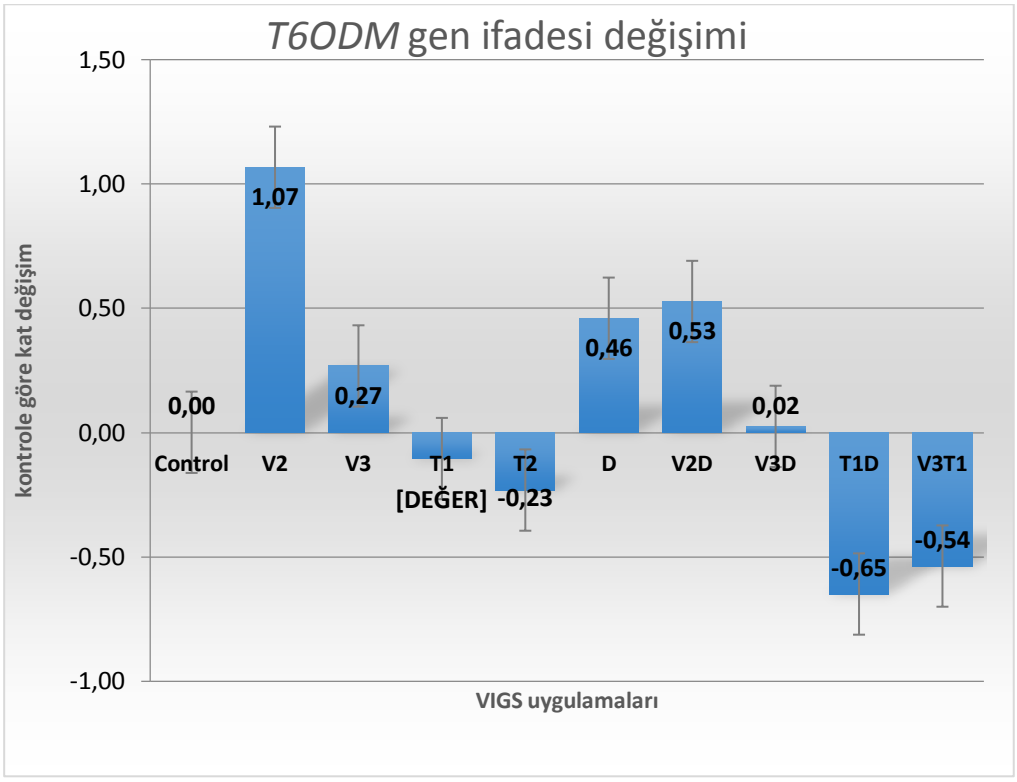
Uygun cDNA konsantrasyonunun belirlenmesiyle tüm örnekler ile gerçek zamanlı PCR gerçekleştirildi. Analizler sonucunda gen ifade seviyelerindeki değişimler kontrol grubu verilerine kıyasla $2^{\Delta\Delta Ct}$ metodu (Livak and Schmittgen, 2001) ile, kat indüksiyonu hesaplanarak değişim yüzdesi cinsinden grafikleri Microsoft Excel uygulamasında oluşturuldu. Gen ifadesindeki değişimleri gösteren grafikler Şekil 4. 14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20'de verildi.



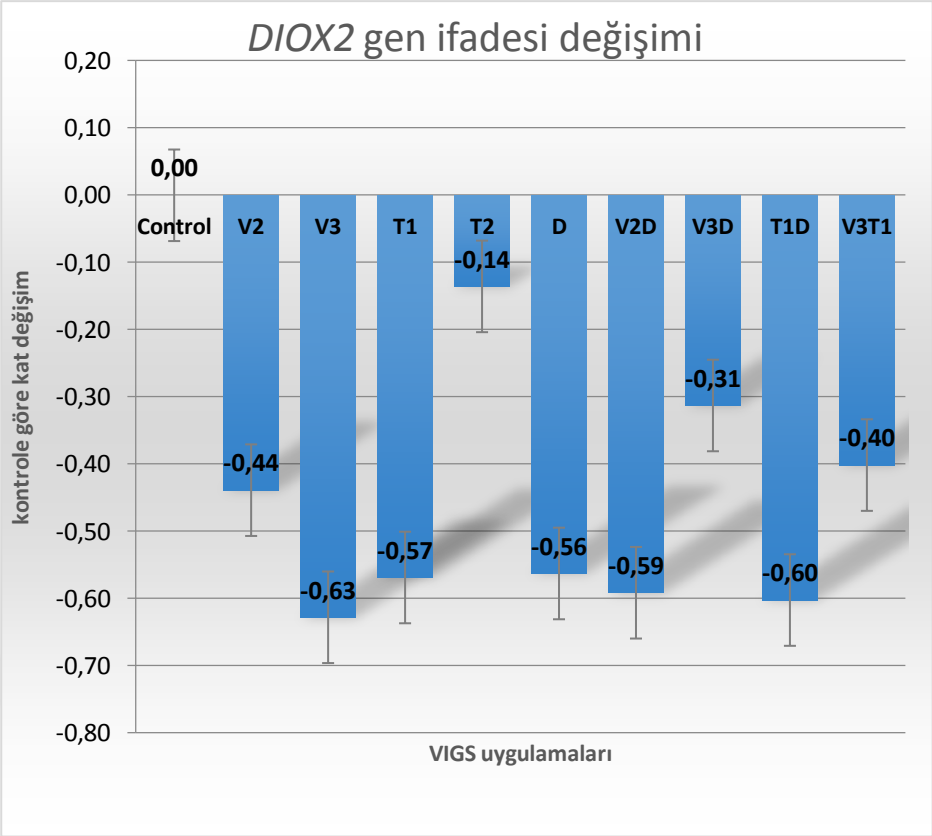
Şekil 4. 13 *CODM* gen ifadesi değişim grafiği



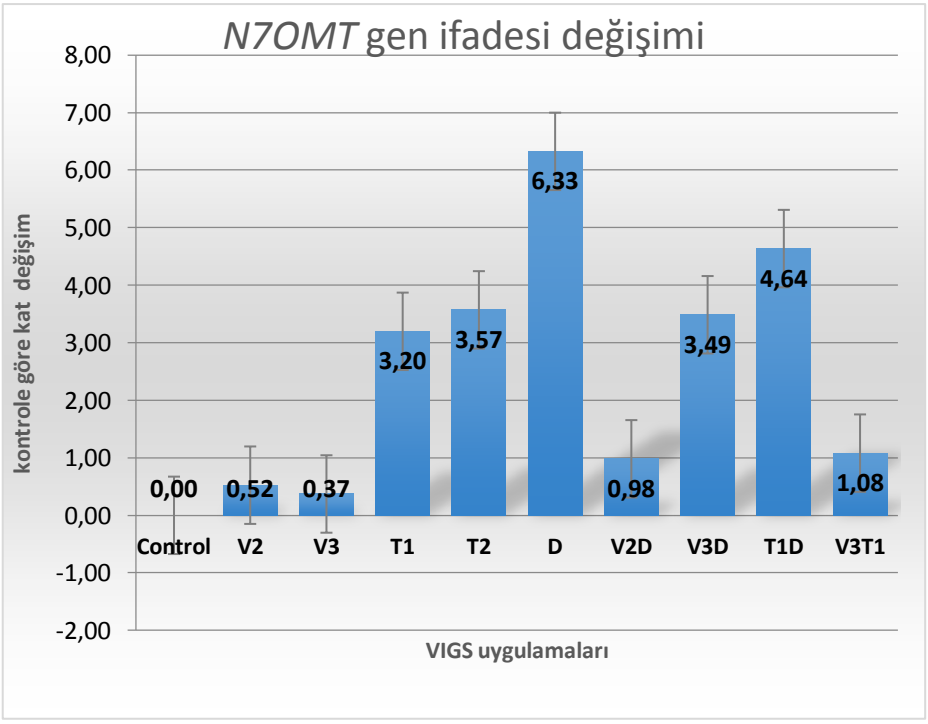
Şekil 4. 14 *COR* gen ifadesi değişim grafiği



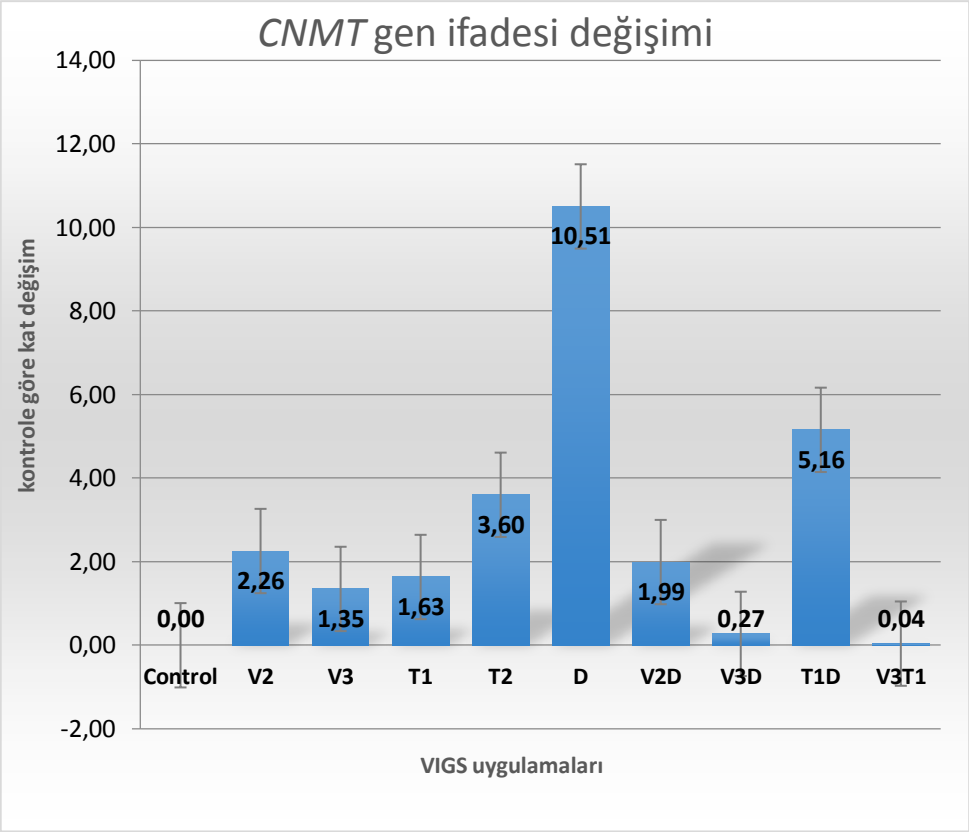
Şekil 4. 15 *T6ODM* gen ifadesi değişim grafiği



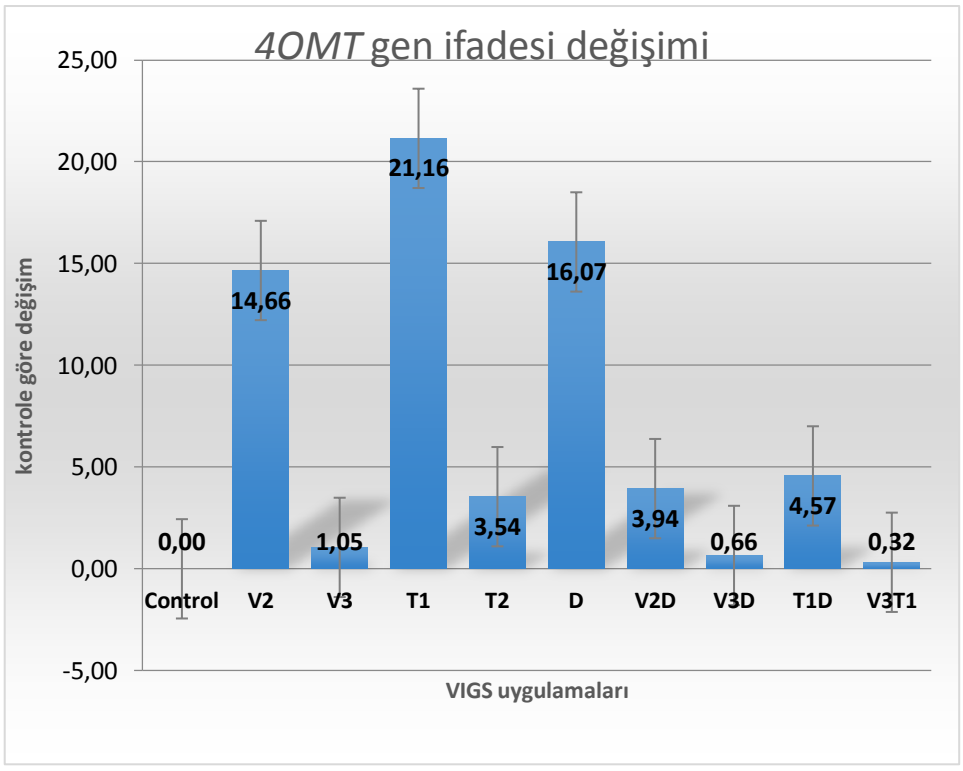
Şekil 4. 16 *DIOX2* gen ifadesi değişim grafiği



Şekil 4. 17 *N7OMT* gen ifadesi değişim grafiği



Şekil 4. 18 *CNMT* gen ifadesi değişim grafiği



Şekil 4. 19 *4OMT* gen ifadesi değişim grafiği

CODM geni hedefli V2 ve V3 VIGS uygulamalarında *CODM* gen ifadesinde kontrole kıyasla %52, *DIOX2* gen ifadesinde %63 'e varan düşüş, COR gen ifadesinde %36'a, *T6ODM* gen ifadesinde %107, *N7OMT, CNMT* ve *4OMT* gen ifadelerinde ise artış elde edildi.

T6ODM geni hedefli T1 ve T2 VIGS uygulamalarında *T6ODM* gen ifadesinde kontrole göre %23, *CODM* gen ifadesinde %55, *COR* gen ifadesinde %43, *DIOX*2 gen ifadesinde %57 'e varan düşüş gözlenirken, *N7OMT, CNMT* ve *4OMT* gen ifadesinde artış gözlendi.

DIOX2 geni hedefli D uygulamasında *DIOX2* gen ifadesinde kontrole kıyasla %56, CODM gen ifadesinde %50 azalma, *COR* gen ifadesinde %11, *T6ODM* gen ifadesinde %46 ve *N7OMT, CNMT* ve *4OMT* gen ifadelerinde de artış görüldü.

Aynı anda hem *CODM* hem *DIOX2 genlerini* hedefleyen V2D, V3D VIGS uygulamalarında *CODM* gen ifadesinde %82, *DIOX2* gen ifadesinde de %59 'a varan kontrole göre azalış, *N7OMT, CNMT,4OMT* genlerinde ve *COR* gen ifadesinde %49, *T6ODM* ise %53 'varan artmış gen ifadesi elde edildi.

Hem *DIOX2* hem *T6ODM* genlerini aynı anda hedefleyen T1D uygulamasında *CODM* gen ifadesinde %16, *T6ODM* gen ifadesinde %65, *DIOX2* gen ifadesinde %60, *COR* gen ifadesinde %47 kontrole göre azalış, *N7OMT, CNMT* ve *4OMT* gen ifadelerinde ise artış elde edildi.

Aynı andan hem *CODM* hem *T6ODM* genlerini hedefleyen V3T1 uygulamasında *CODM* gen ifadesinde %82, *T6ODM* gen ifadesinde %54, *DIOX2* gen ifadesinde %40 kontrole kıyasla azalış, *COR* gen ifadesinde %21, *N7OMT, CNMT* ve *4OMT* gen ifadelerinde ise artış görüldü.

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiyenin geleneksel üreticisi olduğu, yüzyıllardır kullanılan tıbbi bir bitki olan *P. somniferum* bitkisi içerdiği alkaloidler nedeniyle çok çeşitli kullanım alanına sahip değerli bir hammadde kaynağıdır. Bu sebebeple ekonomik ve endüstriyel önemi olan haşhaş afyonunda, izokolin ve özellikle morfin biyosentezindeki yolaklarda genetik düzenlemeler ve metabolik müdahaleler ile istenilen alkaloid miktarlarının elde edilmesi veya istenmeyen ürün geninin susturularak istenilen ürüne dönüşümün desteklenmesine yönelik çalışmalar 2000'li yıllardan beri popülerdir (Allen vd. ,2004; Wijekoon ve Facchini, 2012; Davoudnia vd. ,2016; Sohrabi vd,2018).

VIGS, aynı anda 2 plazmitle yapılan geçici bir transformasyon uygulamasıdır. TRV2 plazmitine hedeflenen genin belirli bir kısmını içeren DNA sekansı aktarılırken, TRV1 plazmitine herhangi bir değişiklik yapılmaz ve bu plazmit aracılığıyla TRV2'deki gen sekansının ifadesi sağlanır. Böylece bitkitedki PTGS uyarılarak ilgili gen susturulur (Hielman vd.,2005). Bu çalışmada öncelikli olarak VIGS plazmitleri hedeflenen genlere özgü olacak şekilde klonlama çalışmalarıyla elde edildi. Ardından VIGS plazmitleri *E. coli* bakterisinde çoğaltılıp doğrulandıktan sonra izole edilip bitki transformasyonuna aracı olacak *A. tumefaciens* LBA4404 suşuna elektroporasyon yöntemi ile aktarılarak çalışmanın gen mühendisliği aşaması tamamlanmıştır.

Morfin oranı yüksek olduğu bilinen OFIS1 çeşidi tohumlarından önce somatik embriyo kültürleri, ardından bu hücrelerin hormonsuz ½ MS0 besin ortamında süspansiyon kültürleri oluşturulmuştur. Somatik embriyolara VIGS plazmitlerinin *A. tumefaciens* aracılı transformasyonu sırasında inokulasyondan önce somatik embriyolara uygulanan ön işlemler iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamalardan enzim çözeltisi ön uygulaması yapılmayan transformasyon çalışmaları sonucunda gen ifadesi seviyelerinde değişim elde edilemedi. Bu durumun embriyonik hücre çeperinin transformasyona izin vermeyişi nedeniyle gerçekleşebileceğinden dolayı Batth ve ekibinin protoplast izolasyon yöntemi referans alınarak enzimatik bir uygulama gerçekleştirilmiştir (Batth vd. ,2021). Bu sayede hücre duvarında bulunan selüloz polisakkaritlerini yıkıma uğratan maserozim enzimi ile hücre duvarı kısmen yaralanarak transformasyona olanak sağlayabilecek şekilde hücreye geçirgenlik kazandırılırken, aynı zamanda mannitol ile

ortamın ozmatik basıncı ve MES ile de pH dengesi korunarak hücrenin canlılığını koruması sağlanmıştır. Ayrıca yaralanmaya bağlı olarak salgılanacak fenolik bileşiklerin artışı transformasyon başarısını arttırmıştır. Enzim çözeltisi ile ön uygulama yapılan somatik embriyolarda transformasyon sonrası gen ifadesindeki değişimlerin gözlenmesi, uygulamanın başarılı olduğunu göstermektedir.

Bu gen susturma çalışmasının direkt olarak somatik embriyolarda başarıyla gerçekleştirilmesi, literatürdeki iğnesiz aşılama, vakumla inflitrasyon, eksplantların *Agrobacterium* ile ko-kültivasyonu ve sonrasında rejenerasyon protokolü ile tam bir bitki oluşturma süreçlerini içeren yöntemlere göre daha hızlı alternatif bir yöntem sunmaktadır (Chittyt vd,2003; Facchini vd,2008). Ayrıca uygulamada somatik embriyoların kullanılmış olması daha sonra yapılacak kalıcı gen düzenleme çalışmaları sonrası tam bir bitkinin elde edilmesi için büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Kontrol dahil 10 farklı kombinasyonda VIGS uygulamalarının sonucunda; *CODM*-*T6ODM* ve *DIOX* genlerinin birini ve ikisini aynı anda hedefleyen, tüm VIGS uygulamalarında *CODM* ve *DIOX* genlerinin ifadesinde kontrole kıyasla azalış tespit edilmiştir. *T6ODM* ve *DIOX* genlerini hedefleyen VIGS uygulamalarındaki (T1, T2, D, T1D) *CODM* gen ifadesindeki kontrole kıyasla azalışın sebebi bu 3 genin dizi benzerliklerinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir. VIGS primerleri tasarlanırken çevrimiçi veri tabanlarında (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) hizalama ile ilgili gen mRNA'larının %84-%90 oranına varan benzerlikle karşılaşılması ve bu nedenle hedeflenecek spesifik bölgelerin seçilmesi sırasında karşılaşılan zorluklar bu sonucu destekler niteliktedir. Elde edilen bu sonuçlar, *CODM* ve *T6ODM* geninin oldukça benzer dizilere sahip oluşunun, bu genlerin morfin biyosentezinin evrimsel sürecine önemli noktada olduğuna ilişkin yayınlarla uyumludur (Guod, 2008; Zhang vd,2022; Li vd, 2020). Literatürdeki çalışmalarda *T6ODM* ve *DIOX2* genlerinin *CODM* geninden kökenlendiği desteklenmektedir (Li vd, 2020). Bu nedenlerle VIGS bölgeleri, bu 3 genin kodlama dizilerinin 3' ucuna doğru en büyük farklılıklara sahip olan alanlardan seçilmesine rağmen T1, T2, D, T1D VIGS uygulamalarında *CODM* gen ifadesinde artış yerine azalış elde edilmiştir.

Morfinonun morfine dönüşüm reaksiyonunda görev alan *COR* genin ifadesi ise beklenildiği gibi *CODM* genini hedefleyen V2-V3 uygulamalarında kontrole kıyasla artış gösterirken (%26-36), T6ODM hedefleyen T1-T2 uygulamalarında %30 ve %43 oranında azalmıştır. Sadece *DIOX* genini hedeflenen uygulamada (D) *COR* gen

ifadesinde düşük seviyede artış görülürken hem *DIOX* hem de *CODM* genini hedeflenen (V2D-V3D) uygulamalarında %49'a varan ifade artışı elde edilmiştir. *T6ODM* gen ifadesi ise *T6ODM* geni hedeflenen tüm uygulamalarda T1, T2, D, T1D azalış gösterirken *CODM* geni hedeflenen V2, V3, V2D, V3D uygulamalarında kontrole kıyasla artmıştır. Bu tez çalışmasında tespit edilen gen ifadelerindeki azalış ve artışlar literatür ile uyumludur (Allen vd. ,2004; Wijekoon ve Facchini, 2012; Sohrabi vd.2018).

Yolaktaki daha üst basamaklar incelendiğinde; tüm VIGS uygulamalarında *N7OMT, CNMT ve 4OMT* genlerinde kontrole kıyasla da ifade artışı tespit edilmiştir. *N7OMT ve CNMT* genlerinde en yüksek oranda ifade artışı *DIOX2* geni hedefleyen D uygulamasında iken, *4OMT* geninde *T6ODM* geni hedefleyen T1 uygulamasında elde edilmiştir. Bu genlerin ifadesindeki artış, Sohrabi ve ekibinin *P. somniferum'*da *CODM, DIOX2* veya *T6ODM* genini hedefleyen VIGS uygulamasının sonucunda *4OMT* geninde ifade artışının tespit edildiği çalışması ile uyumludur (Sohrabi vd.2018).

Bu çalışmadaki VIGS uygulamalarının sonucunda *CODM* gen ifadesinin düşüşü sağlanarak morfine dönüşümün engellenmesi, *COR* gen ifadesinin sabit kalarak ya da tercihen artarak kodein sentezinin teşvik edilmesi, *T6ODM* gen ifadesinde düşüş olmaması, bu sayede yolağın açık kalarak kodein üretiminin sağlanması için gerekli gen ifadelerinin gerçekleştirildiği belirlenmiştir.

Kodein sentezinin teşvik edilmesinin yanı sıra *DIOX2* yolağının hedeflenmesi ve nihayetinde papaverin yolağının uyarılabileceği, böylece ikinci ürün olarak papaverinin de elde edilebileceğine yönelik veriler elde edilmiştir. Ayrıca *DIOX2* geni hedefleyen sekanslar kullanılarak, bu genin yolakta açtığı dallanma noktasının son ürünü ve oldukça önemli bir diğer metabolit olan sanguarin üretiminin baskılanabileceği veya teşvik edebileceği bir diğer çıktıdır. Bu çıktı Davoudnia ve arkadaşlarının çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir (Davoudnia vd. ,2016).

Sonuçlar *P. somniferum* 'dan kodein, teabain, morfin, papaverin, sanguarin gibi önemli metabolitlerin üretiminin teşviki veya baskılanması için *CODM, T6ODM* ve *DIOX2* genlerinde hedeflenen sekansların diğer çalışmalar için de hedef noktaları olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak CRISPR gibi teknikler ile bu modifikasyonların kalıcı hale getirilip nesiller boyu istenilen metaboliti istenilen seviyede üreten bitki-hücre hatları üretebilme

noktasında önemli katkılar sağlamaktadır. Ayrıca somatik embriyo hücrelerine, VIGS plazmitlerinin transformasyonun gerçekleştirilmesinde kullandığımız başarılı protokol (maserozim enzim ön uygulması), sadece haşhaş bitkisinde değil depo sekonder metabolit üreten tüm bitkilerde de alkaloid üretim stratejilerine katı sunar niteliktedir.

KAYNAKÇA

AKBUDAK, M. A., & Kontbay, K. (2017). Yeni Nesil Genom Düzenleme Teknikleri: ZFN, TALEN, CRISPR'lar ve Bitkilerde Kullanımı. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, *26*(1), 111-126.

Akçam Oluk, E. (2006). Bitki Hücre Süspansiyon Kültürleri ve Sekonder Metabolit Üretimi.

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

Ali, S., & Kim, W. C. (2019). A fruitful decade using synthetic promoters in the improvement of transgenic plants. Frontiers in plant science, 10, 1433.

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

Allen, R. S., Millgate, A. G., Chitty, J. A., Thisleton, J., Miller, J. A. C., Fist, A. J., Gerlach, W. L., Larkin, P. J. (2004). RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. Nature Biotechnology, *22*(12), 1559–1566. https://doi.org/10.1038/NBT1033

Arslan, Y., Katar, D., Kayaçetin, F., & SUBASI, İ. (2008). Afyon (Opium) alkaloitleri ve önemi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, *17*(1-2).

BAKIR, Ö. (2020). Sekonder Metabolitler ve Rolleri. *Uluslararası Anadolu Ziraat Mühendisliği Bilimleri Dergisi*, *2*(4), 39-45.

Batth, R., Cuciurean, I. S., Kodiripaka, S. K., Rothman, S. S., Greisen, C., Simonsen, H. T. (2021). Cellulase and Macerozyme-PEG-mediated Transformation of Moss Protoplasts. Bio-Protocol, *10*(19). https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.3782

Beaudoin, G. A. W., & Facchini, P. J. (2014). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, *240*(1), 19–32. https://doi.org/10.1007/S00425-014-2056-8/FIGURES/3

Bekele, D., Tesfaye, K., & Fikre, A. (2019). Applications of virus induced gene silencing (VIGS) in plant functional genomics studies. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, *7*(1), 1-7.

Bortesi L. ve Fischer R., (2015.) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnology Advances, 33(1):41-52

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, *161*(5), 839-851.

Bradley, J. M., Davies, K. M., Deroles, S. C., Bloor, S. J., & Lewis, D. H. (1998). The maize Lc regulatory gene up- regulates the flavonoid biosynthetic pathway of Petunia. *The Plant Journal*, *13*(3), 381-392.

Chitty, J. A., Allen, R. S., Fist, A. J., & Larkin, P. J. (2003). Genetic transformation in commercial Tasmanian cultivars of opium poppy, Papaver somniferum, and movement of transgenicpollen in the field. Functional Plant Biology, 30(10), 1045-1058.

Crozier, A., Clifford, N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites In: Alkaloids. Blackwell Publishing, 102-136.

Davies, K. M., Bloor, S. J., Spiller, G. B., & Deroles, S. C. (1998). Production of yellow colour in flowers: redirection of flavonoid biosynthesis in Petunia. *The Plant Journal*, *13*(2), 259-266.

Davoudnia, B., Ahmadi, J., Fabriki-Ourang, S. (2016). Investigation in expression of key genes involved in sanguinarine biosynthetic pathway in Papaver genus under drought and salinity. Iranian Journal Of Genetics and Plant Breeding, *5*(2), 48. http://www.basic.northwestern.edu/biotools/

Decker G, Wanner G, Zenk MH, Lottspeich F (2000) .Characterization of proteins in latex of the opium poppy (Papaver somniferum) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. Electrophoresis 21:3500–3516

Dinçer, D., Bekçi, B., Bekiryazıcı, F., Tayyip, R., Üniversitesi, E., Sanatlar, G., Ve, T., Fakültesi, M., & Bölümü, M. (2016). *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD Özel Sayı Türkiye'deki Doğal Bitki Türlerinin Üretiminde Doku Kültürü Tekniklerinin Kullanımı*. https://doi.org/10.17100/nevbiltek.211012

Dörnenburg, H. ve Knorr, D. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. Enzyme and microbial technology, 17(8), 674-684.

EKEN Hülya .(2004). Haşhaş . Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü (T.E.A.E)-BAKIŞ. 7(7). ISSN 1303-8346

Ekengren, S.K., Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P. and Martin, G.B. (2003) Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J.* **36**, 905–917.

Eray Vuran, N., Türker, M., Yüzüncü, V., Üniversitesi, Y., Fakültesi, F., Biyoloji, M., Bölümü, G., & Van, T. (2021). Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Miktarını Arttırmaya Yönelik Uygulamalar. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, *33*(3), 487–498. https://doi.org/10.7240/JEPS.900129

Fabbri, C. N. (2007). Treating medieval plague: The wonderful virtues of theriac. *Early science and medicine*, *12*(3), 247-283.

Facchini, P. J., Loukanina, N., & Blanche, V. (2008). Genetic transformation via somatic embryogenesis to establish herbicide-resistant opium poppy. Plant cell reports, 27(4), 719-727.

Gai, Q. Y., Jiao, J., Luo, M., Wang, W., Gu, C. B., Fu, Y. J., & Ma, W. (2016). Tremendous enhancements of isoflavonoid biosynthesis, associated gene expression and antioxidant capacity in Astragalus membranaceus hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. *Process Biochemistry*, *51*(5), 642-649.

Gerth, A., Schmidt, D., & Wilken, D. (2006, August). The production of plant secondary metabolites using bioreactors. In *XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Plant Biotechnology: From Bench to 764* (pp. 95-104).

Gonçalves, S., & Romano, A. (2018). Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools. *Secondary metabolites-sources and applications*, *5*, 81-99.

Guo L.Winzer T.Yang X et al. (2018). The opium poppy genome and morphinan production. *Science*. 343-347,362 (6412)

Gurkok, T., Ozhuner, E., Parmaksiz, I., Özcan, S., Turktas, M., İpek, A., Demirtas, I., Okay, S., & Unver, T. (2016). Functional characterization of 4′OMT and 7OMT Genes in BIA biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, *7*(FEB2016), 98. https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00098/BIBTEX

Gümüşçü Ahmet, Gümüşçü Osman. (1996). TÜRKİYE 'DE HAŞHAŞ VE HAŞHAŞ TARMININ COĞRAFİ DAĞILIŞI. *Türkiye Coğrafyası Araştırma ve Uygulama Merkezi"21. Yüzyıla Doğru Türkiye" III. Coğrafya Sempozyumu.* p:123-141

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

Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2013). Benzylisoquinoline Alkaloid Metabolism: A Century of Discovery and a Brave New World. *Plant and Cell Physiology*, *54*(5), 647–672. https://doi.org/10.1093/PCP/PCT020

Hagel, J., Facchini, P. (2010). Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. Nature Chemical Biology, 6, 273–275. https://doi.org/10.1038/nchembio.317

Hileman LC, Drea S, Martino G, Litt A, Irish VF (2005) Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species Papaver somniferum (opium poppy). Plant J 44:334– 341

Holton, T.A. (1996). Transgenic plants exhibiting altered flower colour and methods for producing same Hwang, H. H., Yu, M., & Lai, E. M. (2017). Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications. The Arabidopsis Book, 15.

Jaganathan, D., Ramasamy, K., Sellamuthu, G., Jayabalan, S., and Venkataraman, G.(2018). CRISPR for crop improvement: an update review. Frontiers in plant science, 9, 985.

Janick Jules. (1997) . Horticultural Reviews- Opium Poppy (Papaver sominefrum) Botany and Horticulture. John Wiley.&Sons Publishing ISBN:0471165298. ISSN:01637851. vol:55 , p: 375-395.

Kahraman, Murat. (2011) TÜRKİYE'DE HAŞHAŞTA UYGULANAN POLİTİKALAR VE HAŞHAŞIN TÜRKİYE İÇİN ÖNEMİ. *T.C. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi*.

Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res*, *3*(13), 1222-1239.

Kehie, M., Kumaria, S., & Tandon, P. (2016). Biotechnological enhancement of capsaicin biosynthesis in cell suspension cultures of Naga King Chili (Capsicum chinense Jacq.). *Bioprocess and biosystems engineering*, *39*(1), 205-210.

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

Koç H., Camcı H., Kadiroğlu A., Gür K. (2006). Seçilmiş bazı haşhaş hatlarının morfin oranları yönünden değerlendirilmesi üzerinde bir araştırma. *Journal Of Crop Research*. p:31-35

Küçük, Y.N. (1996). Türkiye'nin Çesitli Yörelerinde Yetiştirilen Haşhaş Bitkilerinde Alkaloidlerin Esktraksiyonu ve Ekstraksiyonların Susuz Fen Ortamlarda Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Bilimleri Enstitüsü. Ankara, Türkiye.

Li, Y., Winzer, T., He, Z., Graham, I. A. (2020). Over 100 Million Years of Enzyme Evolution Underpinning the Production of Morphine in the Papaveraceae Family of Flowering Plants. Plant Communications, 1(2), 100029. https://doi.org/10.1016/J.XPLC.2020.100029

Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., & Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *30*(4), 415–429. https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2002.01297.X

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expressiondata using real-time quantitative PCR and the2-DDCt method.Methods, 25,402–408.

Ma X., Zhu Q., Chen Y., Liu Y. G. (2016). CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Mol. Plant* 9 961–974. 10.1016/j.molp.2016.04.009

Malik, S., Cusidó, R. M., Mirjalili, M. H., Moyano, E., Palazón, J., & Bonfill, M. (2011). Production of the anticancer drug taxol in Taxus baccata suspension cultures: a review. *Process Biochemistry*, *46*(1), 23-34.

Malzahn A., Lowder L., Qi Y. (2017). Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell Biosci.* 7:21. 10.1186/s13578-017-0148-4

Millgate AG, Pogson BJ, Wilson IW, Kutchan TM, Zenk MH, Gerlach WL, Fist AJ, Larkin PJ (2004) Analgesia: morphine-pathway block in top1 poppies. Nature 431:413–414

Nielsen, E., Temporiti, M. E. E., & Cella, R. (2019). Improvement of phytochemical production by plant cells and organ culture and by genetic engineering. *Plant cell reports*, *38*(10), 1199-1215.

Önmez, H. (2007). Papaver somniferum Bitkisinden Elde Edilen Alkaloitlerin Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözücü ve Metodların Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Konya, Türkiye.

Pienkny, S., Brandt, W., Schmidt, J., Kramell, R., & Ziegler, J. (2009). Functional characterization of a novel benzylisoquinoline O-methyltransferase suggests its involvement in papaverine biosynthesis in opium poppy (Papaver somniferum L). *The Plant Journal*, *60*(1), 56–67. https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2009.03937.X

Purkayastha, A., & Dasgupta, I. (2009). Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *47*(11-12), 967-976.

R. Franke, C.M. McMichael, K. Meyer, A.M. Shirley, J.C. Cusumano, C. Chapple, Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the Arabidopsis gene encoding ferulate 5-hydroxylase, Plant Journal 22 (2000) 223–234

Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology advances, 20(2), 101-153.

S. C. Roberts and M. L. Shuler, Curr. Opin. Biotechnol., 1997, 8, 154– 159.

Sarıyar, G. (2002). Biodiversity in the Alkaloids of Turkish Papaver Species. Pure and Applied Chemistry, 74(4), 557–574.

Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. S. (2011). New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends in plant science*, *16*(12), 656-665.

Shi, G., Hao, M., Tian, B., Cao, G., Wei, F., & Xie, Z. (2021). A methodological advance of tobacco rattle virus-induced gene silencing for functional genomics in plants. Frontiers in Plant Science, 1040.

Shimada, Y., Nakano-Shimada, R., Ohbayashi, M., Okinaka, Y., Kiyokawa, S., & Kikuchi, Y. (1999). Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid- 3′, 5′- hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants 1. *Febs Letters*, *461*(3), 241-245.

Sohrabi, S. M., Ismaili, A., Nazarian-Firouzabadi, F. (2018). Simultaneous over-expression and silencing of some benzylisoquinoline alkaloid biosynthetic genes in opium poppy. Industrial Crops and Products, *123*, 581–590. https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.06.080

Sung, Y. C., Lin, C. P., & Chen, J. C. (2014). Optimization of virus- induced gene silencing in Catharanthus roseus. *Plant pathology*, *63*(5), 1159-1167.

Tanker, M., Tanker, N. (2003). Farmakognozi Cilt 1. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 66, Ankara, Türkiye.

Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M. (2007). Farmasötik Botanik II (III. Baskı). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 93, 397, Ankara, Türkiye.

TAŞLIGİL, N., & Şahin, G. (2018) Tarihsel Süreçte Haşhaş (Papaver somniferum L.) ve Afyon. Tarih Okulu Dergisi (TOD), 11,163-19.

TOPCU, Ş., & ÇÖLGEÇEN, H. (2015). Bitki sekonder metabolitlerinin biyoreaktörlerde üretilmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 9-29.

TOPRAK MAHSULLERİ OFİSİ GENEL MÜDÜRLÜĞÜ (TMO) . (2020). HAŞHAŞ RAPORU 2019. Ankara. Web. https://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/hashassektrraporu.pdf . 2.12.20222

UN General Assembly, 1972 Protocol Amending the Single Convention on Narcotic Drugs, 1961, 9 December 1975, A/RES/3444, available at: https://www.refworld.org/docid/3b00f1c118.html [accessed 21 December 2022]

Üstün, C. (1998). Santral Sinir Sistemine Etkili Tıbbi Bitkilerin Tarihsel Süreç İçinde ve Günümüz Tedavisindeki Yeri. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.

Verpoorte, R., Contin, A., & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews*, *1*(1), 13-25.

Wijekoon Champa P., Facchini Peter J. (2012) . Systematic knockdown of morphine pathway enzymes in opium poppy using virus-induced gene silencing. *The Plant Journal*, *69*(6), 1052-1063.

Wilhelm, Otto. Thomé *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* .1885, Gera, Germany. http://www.biolib.de/ 21.12.22

Wink, M. (1998). A short history of alkaloids. In *Alkaloids* (pp. 11-44). Springer, Boston, MA.

Wu, S. and Chappell, J. (2008) Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. Current Opinion in Biotechnology, 19(2), 145-152.

YAĞCI, C., TOKER, M. C., & TOKER, G. (2008). Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoitler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1), 47-58.

Yang, L., & Stöckigt, J. (2010). *Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. Natural Product Reports, 27(10), 1469.* doi:10.1039/c005378c

YILMAZ, A. G. D. A. (2021). TIBBİ VE AROMATİK BİTKİLERDE UYGULANAN BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLER. 2nd INTERNATIONAL CUKUROVA AGRICULTURE and VETERINARY CONGRESS 4.Adana

Zhang, Y., Wang, J., Yang, L., Niu, J., Huang, R., Yuan, F., Liang, Q. (2022). Development of SSR and SNP markers for identifying opium poppy. International Journal of Legal Medicine, 136(5), 1261–1271. https://doi.org/10.1007/S00414-022-02810-4/FIGURES/6

Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, *23*(4), 283-333.

Ziegler J, Diaz-Cha´vez ML, Kramell R, Ammer C, Kutchan TM (2005) Comparative macroarray analysis of morphine-containing Papaver somniferum and eight morphine-free Papaver species identifies an O-methyltransferase involved

Ziegler, J., Voigtländer, S., Schmidt, J., Kramell, R., Miersch, O., Ammer, C., Gesell, A., & Kutchan, T. M. (2006). Comparative transcript and alkaloid profiling in Papaver species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *The Plant Journal*, *48*(2), 177–192. https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2006.02860.X

Zulak, K.G., Liscombe, D.K., Ashihara, H., Facchini, P. J. (2006). Plant Secondary Metabolites In: Alkaloids, Blackwell Publishing, 102-136.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

Şallı D. , KÖM D., Koltuk G. , Erişen S. , Onarıcı S. (2022). Modifications In The Isoquinoline Pathway In Opium Poppy By Vigs. ISARC INTERNATIONAL SCIENCE AND ART RESEARCH CENTER- 5. INTERNATIONAL SCIENCES AND INNOVATION CONGRESS. 649-650.