

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MORFİN VE NOSKAPİN İÇERİĞİ YÜKSEK HAŞHAŞ (*Papaver somniferum* L.)
GENOTİPLERİNDE RNA KÜTÜPHANELERİNDEN TRANSKRİPSİYON
FAKTÖRLERİNİN TESPİTİ VE İFADE ANALİZİ

Yeliz DEMİRCİ

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Serkan URANBEY

Ocak

2016

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere baēlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Yeliz DEMİRCİ

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Serkan URANBEY danışmanlığında Yeliz DEMİRCİ tarafından hazırlanan bu çalışma 20/01/2016 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Morfin ve Noskapin İçeriği Yüksek Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Genotiplerinde RNA Kütüphanelerinden Transkripsiyon Faktörlerinin Tespiti ve İfade Analizi

Yeliz DEMİRCİ

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Serkan URANBEY

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.), morfin, kodein, noskapin, papaverin ve sanguinarin gibi benzilzokinolin alkaloidlerini üreten değerli bir tıbbi bitkidir. Haşhaşta morfin ve noskapin biyosentezi oldukça karmaşık yollar olup, moleküler seviyede henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmanın amacı; transkripsiyon faktörlerinin, qRT-PCR yöntemi ile morfince ve noskapin içeriği yüksek haşhaş bitkilerindeki ifade seviyeleri ölçülerek, transkripsiyon faktörleri ile BIA biyosentez yolağı arasındaki ilişkinin aydınlatılmasıdır. Çalışmada morfin ve noskapin bakımından zengin haşhaş genotipinde fungal bir elisitör olan Metil Jasmonat (MeJa) ile 3 ve 9 saat süreyle muamele edilmiş, morfin ve noskapin bakımından zengin haşhaş bitkisinin kapsül dokusu kullanılmıştır. Biyosentezi indüklenmiş haşhaş kapsülünde sekonder metabolit sentezi ile ilişkili olduğu düşünülen WRKY transkripsiyon faktörleri seçilmiştir. Morfince ve noskapince zengin *Papaver somniferum* L. genotiplerinde biyotik ve abiyotik stres koşullarında etkili olduğu daha önceki çalışmalarla belirlenen *WRKY16*, *WRKY17*, *WRKY24*, *WRKY59*, *WRKY61* ve *WRKY82* transkripsiyon faktörlerinin 3. ve 9. saat MeJa uygulaması sonrasında ifade seviyeleri ortaya konmuştur. Morfince zengin bitkide, *WRKY16*, *WRKY17*, *WRKY24*, *WRKY59* ve *WRKY 61* genlerinin ifade seviyelerinde kontrol bitkisine göre 9. Saatde anlamlı derecede artış bulunmuştur. Noskapince zengin genotipte ise *WRKY16*, *WRKY17* ve *WRKY61* genleri, morfince zengin bitkiye oranla 3. saatde kontrol bitkilerinde fazla, uygulama yapılmış bitkilerde ise daha az ifade olmuştur. WRKY genlerinin morfin ve noskapince zengin bitkilerde birbirinden farklı ifade olduğu belirlenmiştir.

2015, 74 sayfa

Anahtar kelimeler: Benzilzokinolin alkaloidi (BIA), gen ifadesi, haşhaş, metil jasmonat, transkripsiyon faktörü

ABSTRACT

MSc Thesis

Identification and Expression Analysis of Transcription Factors using RNA Libraries of Opium Poppy Genotypes (*Papaver somniferum* L.) Containing Rich Morphine and Noscapine

Yeliz DEMİRCİ

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Serkan URANBEY

Opium poppy (*Papaver somniferum* L.) is a valuable medicinal plant containing benzyloquinoline alkaloids such as morphine, codeine, noscapine, papaverine and sanguinarine. In Opium poppy, morphine and noscapine biosynthesis pathways are more complicated and not yet been fully elucidated at the molecular level. The purpose of the study was to elucidate relationship between transcription factors and BIA biosynthesis pathway by measuring the expression levels of transcription factors in the genotypes containing rich morphine and noscapin. In this study, capsule tissues of Opium poppy genotypes containing rich morphine and noscapin were used and exposed to fungal elicitor Metil Jasmonat (MeJa) for 3 and 9 hours. In biosynthetically induced poppy capsule, WRKY transcription factors considered to be related with seconder metabolit synthesis were chosen. The expression levels of *WRKY16*, *WRKY17*, *WRKY24*, *WRKY59*, *WRKY61* and *WRKY82* transcription factors revealed to be effective under the biotic and abiotic stress conditions in earlier studies were determined after treatment of fungal elicitor MeJa for 3 and 9 hours. In morphine-rich genotype, the expression levels of *WRKY16*, *WRKY17*, *WRKY24*, *WRKY59* and *WRKY 61* genes were significantly increased compared to control plants at 9th hours. In noscapine rich genotype, *WRKY 16*, *WRKY17* and *WRKY61* genes, compared to plant including high morphine at 3th hours were more expressed at the control plants and showed less expression profile on the plants treated with MeJa. It's determined that WRKY genes were expressed at different levels on the genotypes containing rich morphine and noscapine

2015, 74 pages

Keywords: Benzyloquinolin alkaloid (BIA), gene expression, opium poppy, methyl jasmonate, transcription factor

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımnda beni değerli bilimsel katkılarıyla yönlendiren ve destekleyen, birlikte çalıőmaktan gurur duyduğum danışman hocam **Prof. Dr. Serkan URANBEY**'e, tez çalıőmalarım boyunca benden bilimsel ve maddi katkılarını esirgemeyen ve her zaman yanımda olan **Doç. Dr. Mine TÜRKTAŐ** ve **Doç. Dr. Turgay ÜNVER**'e, beni kıymetli fikirleri ile yönlendiren **Yrd. Doç. Dr. Tuğba GÜRKÖK** ve **Yrd. Doç. Dr. Behçet İNAL**'a, laboratuvar çalıőmalarımnda her zaman yanımda olan, Ünver Lab ekibinden **Yağız ALAGÖZ**, **Gülsüm ZIPLAR**, **Dr. Ebru DERELLİ**, **Günseli BABAÖĞLU**, **Emine AÇAR**, **Dr. Esmā ÖZHÜNER** ve **Yusuf PEKMEZCİ**'ye, her zaman yanımda olan **Yeşim DEMİRCİ**, **Filiz GEZER**, **Sümeyye ARIK**, **Özlem ÖKSÜZER**'e ve son olarak bugüne kadar desteklerini benden hiç esirgemeyen sevgili **ANNEM**'e, **BABAM**'a ve **Gökçen GARANLI**'ya çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	I
ONAY	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
SEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
SİMGELER	XI
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. HAŞHAŞIN BOTANİK ÖZELLİKLERİ İLE TÜRKİYEDE VE DÜNYADA HAŞHAŞ (<i>PAPAVER SOMNIFERUM L.</i>) ÜRETİMİ	3
2.2. SEKONDER METABOLİTLER	5
2.2.1. ALKALOİTLER.....	6
2.2.2. BENZİLİZOKİNOLİN ALKALOİTLERİ (BIA) VE BİYOSENTEZ MEKANİZMASI.....	8
2.2.3. MORFİN ALKALOİDİ VE BİYOSENTEZ YOLAĞI	11
2.2.4. NOSKAPİN ALKALOİDİ VE BİYOSENTEZ YOLAĞI.....	13
2.2.5. ALKALOİDLERİN HÜCRESEL YERLEŞİMİ VE TAŞINIM MEKANİZMASI..	14
2.3. BİTKİSEL HORMONLAR, ELİSİTÖRLER VE BİR ELİSİTÖR OLARAK MEJA UYGULAMALARI	17
2.3.1. BİTKİSEL HORMONLAR	17
2.3.2. ELİSİTÖRLER VE BİR ELİSİTÖR OLARAK MEJA UYGULAMALARI.....	21
2.4. TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ	22
2.4.1. WRKY TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ	23

2.5. QRT-PZR (GERÇEK ZAMANLI PZR) YÖNTEMİ VE GEN İFADELEMESİ ÇALIŞMALARI	24
<u>3. GEREKÇE VE AMAC</u>	<u>26</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM</u>	<u>27</u>
4.1. BİTKİ MATERYALİ	27
4.2. MEJA UYGULAMASI	27
4.3. TOTAL RNA İZOLASYONU	27
4.3.1. RNA TEMİZLEME İŞLEMİ	28
4.3.2. ELDE EDİLEN RNA'LARIN KALİTE VE KONSANTRASYON TAYİNİ.....	28
4.4. cDNA SENTEZİ	29
4.5. TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN TESPİTİ.....	29
4.6. PRİMER TASARIMI.....	30
4.7. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU.....	30
4.8. GERÇEK ZAMANLI QRT-PCR UYGULAMALARI.....	31
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI</u>	<u>33</u>
5.1. RNA İZOLASYONU, MİKTAR VE KALİTE TAYİNİ	33
5.2. EŞ ZAMANLI PZR İLE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN İFADE SEVİYELERİNİN ANALİZİ	33
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	<u>40</u>
6.1. WRKY TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN İFADE PROFİLİ.....	40
6.2. SONUÇ	42
<u>EK-1</u>	<u>56</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>57</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Haşhaş bitkisinin genel görünümü.	3
Şekil 2. 2. Türkiye’de haşhaş ekimine izin verilen iller (10).	4
Şekil 2. 3. Dünya yasal haşhaş ekim alanları (10).	4
Şekil 2. 4. Bitkilerde çeşitli doğal ürünlerin biyosentez yolları ve bu kompleks moleküllerin biyosentezi için önemli olan hücre içi kompartımanlar arasındaki etkileşimin şematik olarak gösterimi (19).	6
Şekil 2. 5. Şekil ve orijinlerine göre alkaloidler.	7
Şekil 2. 6. Haşhaş bitkisinde alkaloid biyosentez yolağının özeti (6).	11
Şekil 2. 7. Morfin alkaloidinin kimyasal yapısı.	12
Şekil 2. 8. Noskapin alkaloidinin kimyasal yapısı (9).	13
Şekil 2. 9. Haşhaş bitkisinde, morfin biyosentezinde arkadaş hücrelerin, latisiferlerin ve kalburlu boruların rolünü gösteren hücreyel yerleşim modeli (6).	15
Şekil 2. 10. Haşhaş bitkisinde BIA’ların biyosentezi ve birikimi arkadaş hücrelerin (ah), kalburlu boruların (kb) ve latisiferlerin (la) koordinasyonlu katılımını içeren çok hücreli modelin şematik gösterimi (64).	16
Şekil 2. 11. Bazı Bitkisel Hormonlar.	18
Şekil 2. 12. Jasmonik asit ve Metil jasmonatin açık formülü (95).	20
Şekil 2. 13. JA sentezi için iki potansiyel yolağın şematik olarak gösterimi (91).	21
Şekil 2. 14. Transkripsiyon faktörlerinin şematik olarak gösterimi.	23
Şekil 4. 1. Haşhaş örneklerinden total RNA izolasyonu.	28
Şekil 4. 2. Nanodrop cihazı.	29
Şekil 4. 3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) cihazı.	31
Şekil 4. 4. qRT-PZR (Gerçek zamanlı PZR) cihazı.	32
Şekil 5. 1. Morfince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY16 genine ait ifade seviyeleri.	34
Şekil 5. 2. Noskapince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY16 genine ait ifade seviyeleri.	34
Şekil 5. 3. Morfince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY17 genine ait ifade seviyeleri.	35
Şekil 5. 4. Noskapince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY17 genine ait ifade seviyeleri.	35

Şekil 5. 5. Morfince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY24 genine ait ifade seviyeleri.	36
Şekil 5. 6. Noskapince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY24 genine ait ifade seviyeleri.	36
Şekil 5. 7. Morfince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY59 genine ait ifade seviyeleri.	37
Şekil 5. 8. Noskapince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY59 genine ait ifade seviyeleri.	37
Şekil 5. 9. Morfince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY61 genine ait ifade seviyeleri.	38
Şekil 5. 10. Noskapince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY61 genine ait ifade seviyeleri.	38
Şekil 5. 11. Morfince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY82 genine ait ifade seviyeleri.	39
Şekil 5. 12. Noskapince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY82 genine ait ifade seviyeleri.	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Bitki sekonder metabolitlerinin yapısal çeşitliliği (17).	5
Çizelge 4. 1. qRT-PZR’de kullanılan primerler ve bağlanma sıcaklıkları.	30
Çizelge 5. 1. RNA örneklerinin NanoDrop 1000 cihazından elde edilen ölçüm değerlerinden bazıları.	33



SİMGELER

°C	Santigrat
18s rRNA	18s ribozomal ribonükleik asit
3'OHaz	Tirozin/tiramin 3-hidroksilaz
3'OMT	Karakterize edilmemiş (uncharacterized) 3'- <i>O</i> -metiltransferaz
4'OMT2	3'-hidroksil- <i>N</i> -methilkoklaurin 4'- <i>O</i> -metiltransferaz (isoform 2)
4-HPAA	4 hidroksifenilasetaldehit
4HPPDC	4-hidroksifenilpürivat dekarboksilaz
6OMT	Norkoklaurin 6- <i>O</i> -metiltransferaz
ABA	Absisik asit
ABC	ATP-bağlayıcı kaset
AOC	Allen oksid siklaz
AOS	Allen oksid sentaz
ARFs	Oksin cevap faktörleri
Aux/IAA	Oksin/indol-3 asetik asit
BBE	Berberin köprü enzimi
BIA	Benzilizokinolin alkaloidleri
BM	Birleşmiş milletler
BR	Brassinosteroid
CAS	Kanadine sentaz
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CK	Sitokinin
CNMT	Koklaurin <i>N</i> -metiltransferaz
CODM	Kodein <i>O</i> -demetilaz
CoOMT	Kolumbamin <i>O</i> -metiltransferaz
COR	Kodeinon redüktaz
CYP719B1	Salutaridin sentaz

DBD	DNA bağlayıcı domain
DBOX	Dihidrosanguinarin oksidaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Dinükleotid trifosfat
EMSA	Electromobility Shift Assay
ERF	Etilen cevap faktörü
ET	Etilen
FP	Folem parankiması
GA	Giberellin, giberellik asit
IAA	Oksin
JA	Jasmonat
KB	Ksilem boruları
KP	Ksilem parankiması
LOX	13-lipoksijenaz
MeJA	Metil jasmonat
mg	Miligram
ml	Mililitre
MSH	N-metilsitlopin 14-hidroksilaz
N7OMT	Norretikülin 7- <i>O</i> -metiltransferaz
NCS	Norkoklaurin sentaz
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NMCH	<i>N</i> -meilkoklaurin 3'-hidroksilaz
NOS	Noskapin sentaz
OPR	12-oxo-phytodienoik asit redüktaz
P6H	Protopin 6-hidroksilaz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

Phe	Fenilalanin
pmol	Pikomol
qRT-PCR	Kantitatif Real Time PCR (Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interferaz
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SA	Salisilik asit
SalAT	Salutaridinol 7- <i>O</i> -asetiltransferaz
SalR	Salutaridin redüktaz
SalSyn	Salutaridin sentaz
SAM	<i>S</i> -adenozil <i>N</i> -metiyonin
SanR	Sanguinarin redüktaz
SAR	Sistemik kazanılmış direnç
SOMT	Skoulerin 9- <i>O</i> -metiltransferaz
SSD	Sinyal-algılayıcı domain
STOX	(<i>S</i>)-tetrahidroksiprotoberberinoksidaz
T6ODM	Tebain 6- <i>O</i> -demetilaz
TAD	Trans-aktive edici domain
TCA	Trikarboksilik asit siklusu
TF	Transkripsiyon faktörü
TMO	Toprak Mahsülleri Ofisi
TNMT	Tetrahidroprotoberberin <i>N</i> -metiltransferaz
TSWV	Tomato spotted wild virüs
TYDC	Tirozin/DOPA dekarboksilaz
VK	Vasküler kambiyum
µl	Mikrolitre
µM	Mikromol

1. GİRİŞ

Bitkilerin çok çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı açık baskı altında kalmaları ve hareketsiz olmaları onları hayatta kalabilmek için farklı savunma sistemleri ve adaptasyonlar geliştirmeye zorlamıştır. Bunlardan birisi de bitkilerin çevrede bulunan patojenlere ve herbivor canlılara karşı, toksik olabilen doğal ürünleri ve sekonder metabolitleri üretmeleridir (1). Bu sekonder metabolitler terpenler, fenolik bileşikler, azot veya kükürt içeren bileşikler olmak üzere 3 temel gruptan oluşurlar. Alkaloitler ise azot içeren üçüncü gruba giren, amino asitlerden türevlenen ve bitkide savunma amaçlı olarak üretilen bileşiklerdir (2, 3). Alkaloitler yüzyıllardır özellikle ilaç ve gıda sanayinde kullanıldığı için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle sekonder metabolitlerin kullanımı ve bitkideki üretim mekanizmaları hakkında oldukça fazla çalışma yapılmaktadır.

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.), dünyada ve ülkemizde geleneksel olarak tarımı yapılan ve opiyat üretimi açısından önemli bir bitkidir. Afyon, haşhaş bitkisinin kapsülünden elde edilir ve içinde çeşitli alkaloitleri yüksek miktarda barındırmaktadır. Haşhaş, narkotik analjezik morfin, öksürük kesici kodein, antimikrobiyal ajan sanguinarin, vasodilatör olarak kullanılan papaverin ve antikanserojenik noskapin gibi çeşitli benzilzokinolin alkaloitlerini (BIA) üretmektedir (4). BIA'ların biyosentez yolağı, çok sayıda enzimin rol oynadığı ve sentez mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamış oldukça karmaşık bir yoldur. BIA biyosentezinin ilk basamağı, tirozin amino asitinden türevlenen dopamin ve 4-hidroksifenilasetaldehit (4-HPAA)'in (NCS) norkoklaurin sentaz enzimi aracılığıyla (S)-norkoklaurin'e dönüşmesiyle başlar (5). (S)-norkoklaurin, çeşitli enzimler aracılığıyla merkezi ara molekül olan (S)-retiküline dönüşür (6). (S)-retikülin ara molekülü ise farklı yolları takip ederek sanguinarin, noskapin, berberin ve morfin alkaloitleri ile sonuçlanır (7). Ortaya çıkan benzilzokinolin alkaloitlerinden morfin, afyonda bulunan 25 civarında alkaloitten en önemli ve en yüksek miktarda bulunanıdır. *Papaver* türleri çeşitli alkaloitleri üretmesine rağmen morfin sadece *P. somniferum* ve *P. setigerum* türleri tarafından üretilmektedir (8). Morfin ham afyonun işlenmesi sonucu elde edilir. Molekülün direkt merkezi sinir sistemi üzerinde etkisi vardır. Bu nedenle tıpta ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. Kapalı formülü $C_{17}H_{19}NO_3$ olup molekül ağırlığı 285.34 g/mol'dür. Suda ve alkolde çözünür. Çok çabuk bağımlılık geliştirildiğinden kontrolsüz kullanımı sakıncalıdır. Açığa çıkan diğer bir BIA türü ise antikanserojenik etkileri olduğu tespit edilmiş noskapindir. Molekülün kapalı formülü $C_{22}H_{23}NO_7$, molekül ağırlığı ise 413.421

g/mol' dır. Afyondaki noskapin oranı %1-10 arasında değişmektedir (9). Her iki alkaloid de tıbbi ve ekonomik açıdan büyük öneme sahiptir.

Türkiye ve Hindistan, Birleşmiş Milletler Teşkilatınca geleneksel haşhaş üreticisi ülkeler olarak kabul edilmektedir. Türkiye, Dünya haşhaş ekim alanları içerisinde %45 gibi büyük bir alana sahiptir. Aynı zamanda ülkemizde bulunan Afyon Bolvadin'deki Alkaloid Fabrikası 20.000 ton/yıl çizilmemiş haşhaş üretimi kapasitesiyle alanında dünyanın en büyük üretim merkezlerinden birisidir (10). Bu nedenle haşhaş tarımı ve buna bağlı alkaloid üretimi ülkemiz ekonomisi açısından oldukça önemlidir.

Son yıllarda gelişen genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik yaklaşımlar ile stres koşullarında bitkide savunma sisteminin bir parçası olarak sentezlenen sekonder metabolitlerin biyosentezi anlaşılmasına yardımcı olmaya başlamıştır. Genomik yaklaşımlar ile çeşitli bitkilerde spesifik alkaloid miktarını arttırmaya yönelik çalışmalar hız kazanmış, bu çalışmalar ile yüksek miktarda alkaloid içeren haşhaş bitkilerinin üretilmesinde başarı sağlanmış, fakat buna sebep olan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) yöntemi ile günümüzde nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesi mümkündür. qRT-PZR'ın kullanım alanlarından bazıları patojenlerin saptanması, kromozomlardaki sayısal ve yapısal bozuklukların analizi ve gen anlatımı çalışmalarıdır. qRT-PZR'ın gen ifadesi çalışmalarında daha hassas, daha üretken, verimli ve hızlı olması, araştırmacılar tarafından tercih edilmesini sağlamaktadır (11). Abiyotik ve biyotik stres koşullarında bitkilerde çok sayıda gen ailesi ve gen ifade olmakta bu stres koşullarında aktive olan WRKY genlerinin kodlamakta olduğu transkripsiyon faktörü ailesi yalnızca bitkilerde bulunmaktadır ve bu transkripsiyon faktörleri stres genlerinin ifadesini düzenlerler (12). Transkripsiyon faktörlerinin bu büyük ailesi, savunma sinyalizasyonunda görev alarak, bitki savunması ile ilgili genlerin ifadesini manipüle etmektedir.

Bu çalışmada da, yüksek morfin ve noskapin üretimine sahip olan haşhaş genotiplerinde fungal bir elisitör olan metil jasmonat (MeJa) ile aktive ederek kapsül dokularında qRT-PZR (Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) cihazı kullanılarak, seçilen WRKY transkripsiyon faktörlerine ait gen ifadesindeki farklılıkların belirlenerek genlerin birbiriyle olan koordinasyonu hakkında bilgiler elde edilmeye çalışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. HAŞHAŞIN BOTANİK ÖZELLİKLERİ ile TÜRKİYEDE VE DÜNYADA HAŞHAŞ (*Papaver somniferum* L.) ÜRETİMİ

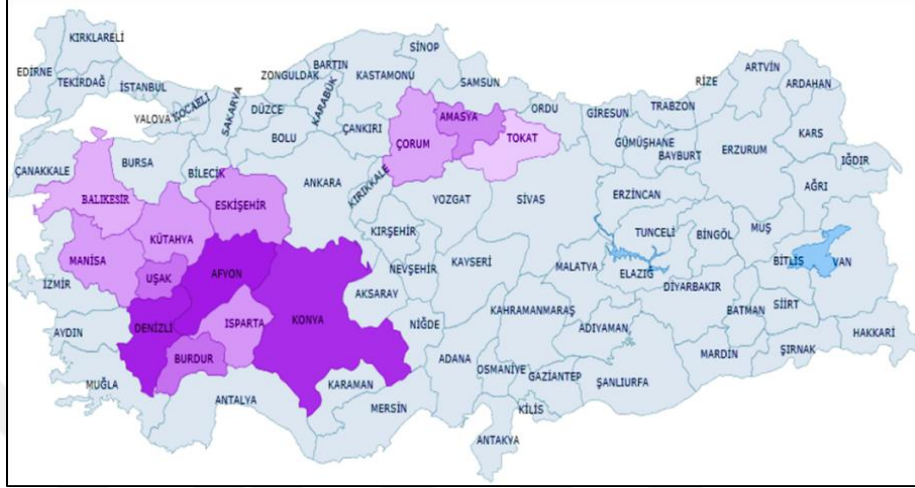
Dünyada 28 cins ve yaklaşık 250 türü bulunan *Papaveraceae* familyasına ait türler genellikle Kuzey Yarımkürenin ılıman ve subtropik bölgelerinde yetişmektedir. Ülkemizde bu familyaya ait 5 cins bulunmaktadır (13, 14). *Rhoedales* takımının *Papaveraceae* familyasının *Papaver* cinsi içinde yer alan *Papaver somniferum* L., ülkemizde geleneksel olarak tarımı yapılan tek yıllık bir kültür bitkisidir. Türkiye’de haşhaşın daha çok *Papaver somniferum* ssp. *anatolicum*un mor ve beyaz çiçekli çeşitleri ekilmektedir (Şekil 2.1). Hititler döneminden bu yana Orta Anadolu’da yetiştirilen haşhaş, ülkemizin en önemli endüstriyel ve tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerinden bir tanesidir. Haşhaş, tohumu %45–54 yağ ve %20–30 protein içermesi nedeniyle gıda, kozmetik ve boya sanayinde kullanılırken, kapsülünde bulunan morfin, kodein, tebain, noskapin, papaverin gibi alkaloidleri bulundurmasından dolayı da tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kapsül dokusunda, bu alkaloidlere ek olarak yaklaşık 30 değişik alkaloid bulunduğu bilinmektedir. Bu alkaloidlerden, türevleri olan katma değerleri yüksek, yarı sentetik ilaç aktif ham maddeleri üretilmektedir (10).



Şekil 2. 1. Haşhaş bitkisinin genel görünümü.

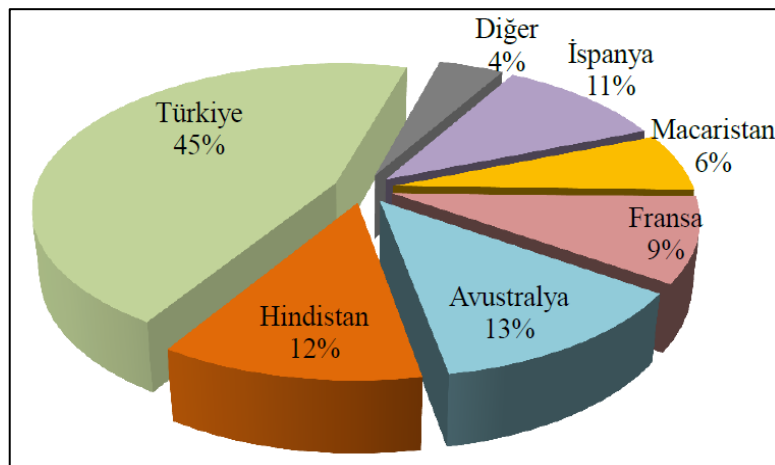
Ülkemizde haşhaş ekimi 3298 Sayılı Uyuşturucu Maddelerle İlgili Kanun ve Yönetmelik çerçevesinde lisansa tabi olarak, kontrollü ve çizilmemiş haşhaş kapsülü üretimi şeklindedir. Bakanlar Kurulu tarafından haşhaş ekimine müsaade edilen yerlerde, Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğüne yapılan planlama çerçevesinde, Birleşmiş Milletler Teşkilatı’nın ülkemize verdiği 70.000 hektar limit dâhilinde haşhaş ekimi ve çizilmemiş kapsül

üretimine izin verilmektedir. Türkiye’de 2014 yılı itibariyle, Afyonkarahisar, Amasya, Burdur, Çorum, Denizli, Isparta, Kütahya, Tokat ve Uşak illerinin tamamında; Balıkesir, Eskişehir, Konya ve Manisa illerinin ise belirli ilçelerinde haşhaş ekimi ve çizilmemiş haşhaş kapsülü üretimi serbesttir (Şekil 2.2) (10).



Şekil 2. 2. Türkiye’de haşhaş ekimine izin verilen iller (10).

Dünyada haşhaştan elde edilen opiyat tüketimi ortalama 400 tondur. Dünyada en büyük opiyat ham madde ithalatçısı olan ABD, aldığı kararla ithalatının %80’lik kısmını ana üretici olan Türkiye ve Hindistan’dan sağlamaktadır. Dünyada haşhaş ekimi; Birleşmiş Milletler Teşkilatı denetiminde yasal ana üretici ülkeler olarak Türkiye, Hindistan, Avustralya, Fransa, İspanya ve Macaristan’da yapılmaktadır. Türkiye ve Hindistan, Birleşmiş Milletler Teşkilatınca geleneksel haşhaş üreticisi ülkeler olarak kabul edilmektedir. Son beş yıllık verilerin ortalamasına göre Türkiye, Dünya haşhaş ekim alanları içerisinde %45’lik bir alana sahiptir (Şekil 2.3) (10).



Şekil 2. 3. Dünya yasal haşhaş ekim alanları (10).

2.2. SEKONDER METABOLİTLER

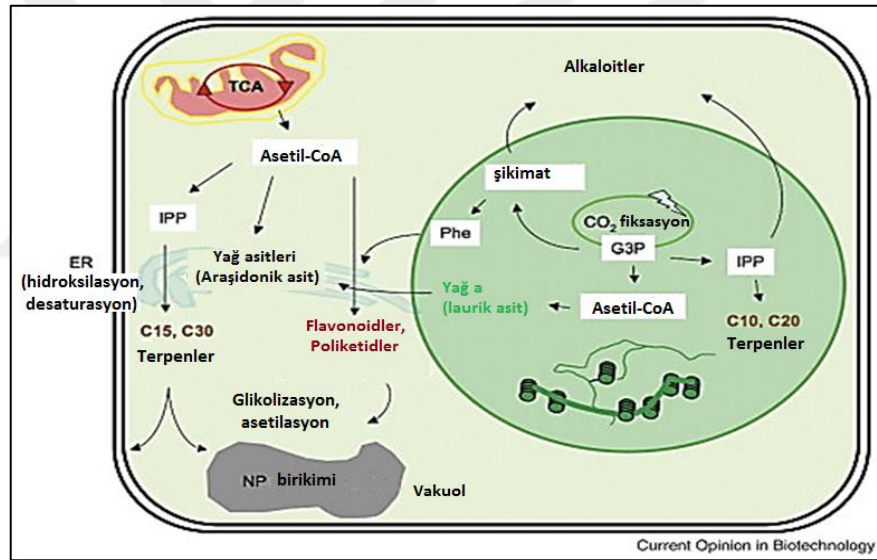
Bitkiler oldukça fazla sayıda ve farklı yapıda doğal ürünler üretirler. Doğal ürünler bitkiler ile onların biyotik ve abiyotik çevreleri arasında ilişki kurmaları açısından önemli fonksiyonları üstlenirler (15). Sekonder metabolitler, “primer metabolitler” gibi normal büyüme, gelişme ve üreme gibi olaylara doğrudan katılmazlar. Bitki sekonder metabolitleri, bitkide herbivorlara, mikroplara ve virüslere karşı savunmada rol alırken, aynı zamanda polen ve tohum yayan hayvanlar için sinyal bileşikleri olarak da görev alırlar. Bu nedenle bitkiler için üreme ve hayatta kalma açısından önemli bileşiklerdir. Çizelge 2.1’de de gösterildiği gibi bitki sekonder metabolitleri genellikle fazla çeşitlilik gösterirler ve bütün yüksek bitkilerde bulunurlar (16). Sekonder metabolitler aynı zamanda allelokimyasal özelliklere sahiptirler. Allelokimyasallar kimyasal savunma bileşikleri olarak, herbivorlarda ya da mikroorganizmalarda moleküler hedefleri olumsuz yönde etkileyerek fonksiyon gösterirler. Bu moleküler hedefler, proteinlerden nükleik asitlere, biyomembranlara, herbivorlar ve mikroorganizmalarda çoğunlukla bulunan metabolitlere kadar çeşitli olabilmektedir (17). Ayrıca pollinator canlıları çeken çiçek pigmentleri olarak ya da hormon olarak görev yapabilirler. Bitki sekonder metabolitleri primer metabolik yolların düzenlenmesi ve sinyal yollarında da etkilidir.

Çizelge 2. 1. Bitki sekonder metabolitlerinin yapısal çeşitliliği (17).

Doğal Ürün	Miktar
Nitrojen İçeren Doğal Ürünler	
Alkaloidler (1)	12,000
Non-Protein amino asitler (2)	700
Aminler (3)	100
Siyanojenik glikozitler (4)	60
Glukosinolatlar (5)	100
Alkamidler	150
Nitrojen İçermeyen Doğal Ürünler	
Monoterpenler (İridoidler dahil) (6)	2,500
Seskuterpenler (7)	5,000
Diterpenler (8)	2,500
Triterpenler, Saponinler, Steroidler (9)	5,000
Tetraterpenler	500
Fenilpropanoidler, kumarinler, lignanlar	2,000
Flavonoidler (10)	4,000
Poliasetilenler, yağ asitleri, vakslar (11)	1,000
Poliketidler (12)	750
Karbonhidratlar	>200

Savunma bileşiklerinin sentezi ve birikimi zamana ve bitkinin organlarına göre çeşitlilik gösterir. Bitkilerde çeşitli doğal ürünlerin biyosentez yolları ve bu kompleks moleküllerin biyosentezi için önemli olan hücre içi kompartımanlar arasındaki etkileşim şekil 2.4’de şematik olarak gösterilmektedir. Savunma bileşikleri tohum, fide, tomurcuk ve genç dokularda fazla miktarda ve aktif olarak sentezlenmektedir. Buna optimal savunma teorisi denmektedir. Çoğalmak ve hayatta kalmak için gerekli olan tohum, çiçek ve meyve gibi dokular savunma bileşikleri bakımından zengindirler (18).

Sekonder metabolitler, bitkilerdeki fizyolojik fksiyonlarının yanı sıra, bitkiye renk gibi karakteristik özelliklerde katmaktadırlar. Ayrıca insanlık tarihi boyunca baharat, renk maddesi ve ilaç olarak da kullanılmışlardır. Bu bileşikler biyosentetik orijinlerine göre, alkaloitler, fenilpropanoidler, poliketidler ve terpenoidler olmak üzere dört farklı grupta sınıflandırılırlar (15).



Şekil 2. 4. Bitkilerde çeşitli doğal ürünlerin biyosentez yolları ve bu kompleks moleküllerin biyosentezi için önemli olan hücre içi kompartımanlar arasındaki etkileşimin şematik olarak gösterimi (19).

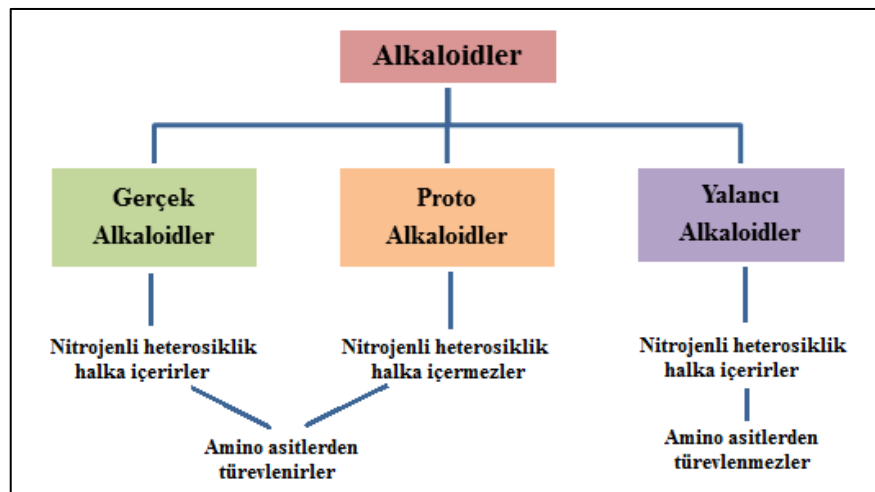
2.2.1. ALKALOİTLER

Alkaloitler, düşük moleküler ağırlıklı, karakteristik olarak toksik ve farmakolojik aktivitelere sahip bileşiklerdir. Bu özellikleri nedeniyle insanlar tarafından uzun yıllardır avlanma, idam ve savaş hallerinde ve hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (19). Fizyolojik olarak bitkide üretilen ve bazik yapılarından dolayı bu ismi alan alkaloitler, geleneksel olarak amino asitlerden biyosentezlenen heterosiklik nitrojen bileşikleri olarak tanımlanırlar. Bilinen 12.000’den fazla farklı yapısıyla alkaloitler, sekonder metabolitlerin

en büyük gruplarından birisidir. Çok sayıda olmaları ve yapısal olarak çok fazla çeşitlilik göstermeleri, alkaloidlerin genel bir sınıflandırmasının yapılmasını güçleştirmektedir (15).

Alkaloid terimi ilk kez, 19.yüzyılın başında W. Meisner tarafından alkali gibi davranan doğal maddeler için kullanılmıştır. İlk izole edilen alkaloid olan morfin 1803 ve 1805 yılları arasında Friedrich Sertürner tarafından saflaştırılmıştır (20). Çiçekli bitkilerin yaklaşık %20'si alkaloid üretirler ve bu türlerin herbirisinin alkaloid birikimi türe özgü bir değişim gösterir. Genellikle bu bileşikler %0.01'den fazla içeren bitkiler, alkaloid içeren bitkiler olarak kabul edilirler (21). *Catharanthus roseus* gibi bazı bitkiler 100'den fazla farklı monoterpene indol alkaloidi içerir (16). Haşhaş kapsülü ise lateks alkaloidleri bakımından zengin bir içeriğe sahiptir (22). Diğer sekonder metabolitler gibi alkaloidler de bitkide kimyasal savunmada görev alan bileşiklerdir.

Alkaloidler şekil ve orijinlerine göre, gerçek alkaloidler, protoalkaloidler ve yalancı alkaloidler olmak üzere üç ana sınıfa ayrılır (Şekil 2.5). Gerçek ve protoalkaloidler amino asitlerden türevlenirken, yalancı alkaloidler amino asitlerden türevlenmezler (23). Genellikle bitkilerdeki alkaloid içeriği, bitki dokularının tamamında homojenlik göstermemektedir. Bitkinin tipine bağlı olarak, en fazla konsantrasyon *banotu* (*Hyascymous niger* L.) bitkisinde olduğu gibi yapraklarda ve meyvede yada *Strychnine tree* bitkisinde olduğu gibi tohumda, *Rauwolfia serpentina*'daki gibi kökte veya cinchona'daki gibi kabukta olabilir (24). Ayrıca aynı bitkinin farklı dokuları da farklı alkaloid çeşitlerini içerebilir (25). Alkaloidler geleneksel olarak bitkilerden izole edilmiş olmalarına karşın, hayvanlarda, böceklerde, deniz omurgasızlarında ve mikroorganizmalarda da bulunabilirler (26).



Şekil 2. 5. Şekil ve orijinlerine göre alkaloidler.

Alkaloitler, biyolojik ve ekolojik aktivitelerine, kimyasal yapılarına ve biyosentez yollarına göre sınıflandırılabilirler. Bilinen bazı alkaloit çeşitleri:

- Monoterpenoid indol alkaloitleri
- Tropan alkaloitleri ve nikotin
- Pürin alkaloitleri
- Pirolizidin alkaloitleri
- Quinolizidin alkaloitleri
- Benzilzokinolin alkaloitleri (BIA)' dir (27). Haşhaş bitkisinde sentezlenen önemli alkaloitler benzilzokinolin alkaloitleridir (27-29).

2.2.2. BENZİLİZOKİNOLİN ALKALOİTLERİ (BIA) VE BİYOSENTEZ MEKANİZMASI

Benzilzokinolin alkaloitleri bitki özelleşmiş metabolitlerinin yapısal olarak farklı bir grubudur. Haşhaş farklı yapısal alt gruplara sahip olan morfinyan, protoberberin, benzofenantridin, fitalidizokinolin, aporfin, pavin, roeadin ve protopin alkaloitleri gibi çok sayıda BIA biriktirir. Narkotik analjezik morfin ve kodein, antimikrobiyal ajan sanguinarin ve berberin ve antikanserojenik etkilere sahip noskapin bunlardan bazılarıdır (7). Latekste en çok bulunan alkaloitler morfinyan (morfin, kodein ve tebain), fitalidizokinolin noskapin ve 1-benzilzokinolin papaverin alkaloitleridir. Buna karşılık en çok bulunan kök alkaloitleri ise fenzofenantridinler; sanguinarin ve dihidrosanguinarindir (30). BIA biyosentezinde çok sayıda enzim görev yapmaktadır.

BIA biyosentezi, temel olarak tirozin aminoasidinin dopamin hem de 4-hidroksifenilasetaldehit molekülüne tirozindekarboksilaz (TYDC) enzimi ile dekarboksilasyon, orto-hidroksilasyon ve deaminasyonu ile başlar (31). (*S*)-norkoklaurinin (*S*)-retiküline dönüşümü 6. pozisyondaki O-metilasyon, N-metilasyon, 3'-hidroksilasyon ve ikinci bir O-metilasyonu içerir. (*S*)-retikülin, çoğu BIA yapısal tiplerinin olduğu sentez yolunda merkezi ara ürün olarak bulunmaktadır. (*S*)-retikülinin ara ürün olarak senteze katılmadığı yollardan birisi papaverin biyosentezidir (28). Benzilzokinolin alkaloitlerinin oluşumunda farklı biyosentez yolları bulunmaktadır (Şekil 2.6).

Laudanin yolu ile (*R*) ve (*S*) retikulin laudanine dönüşmektedir. Sınıf II protein ailesinin üyesi olan 7OMT enzimini kodlayan cDNA tanımlanmıştır ve bu enzim metil vericisi

olarak *S*-adenozil *N*-metiyonin (SAM) kullanır ve aktivite göstermek için metal iyonuna gereksinim duymaz (32-34).

Benzofenanthridin ve protoberberin alkaloidlerinin biyosentez yolu Papaveraceae, Fumariaceae, Berberidaceae familyalarının belli türlerinde berberin, sanguinarin gibi sitotoksik benzofenanthridin alkaloidlerinin sentez yoludur. Bu alkaloidler patojen ataklara karşı biriktirilir dolayısıyla fitoaleksinler gibi görev yaparlar (34). Benzofenanthridin alkaloidlerinin biyosentezindeki ilk basamak, (*S*)-retikülin molekülünün *N*-metil grubunun Berberin köprü enzimi (BBE) ile (*S*)-skoulerin molekülünün metilen köprü kısmına dönüşümüdür (35).

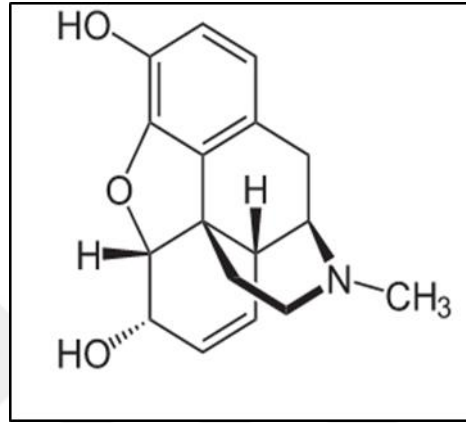
Sanguinarin sentez yolunda, (*S*)-skoulerinin sanguinarine dönüşümünde, üç adet CYP enzimi, bir adet *N*-metiltransferaz ve bir flavoprotein oksidaz enzimini de içeren altı adet enzim rol oynamaktadır. Yolaktaki her bir enzim için ilgili gen izole edilmiştir. Ana hatlarıyla sanguinarin sentez yolunda, (*S*)-skoulerin önce (*S*)-keliantifoline dönüşmektedir. Daha sonraki basamakta (*S*)-keliantifolin, bir CYP enzimi olan SPS enzimi ile (*S*)-sitlopine dönüşür. Bir *N*-metiltransferaz olan TNMT, (*S*)-sitlopiden metil transferi yaparak (*S*)-*cis*-*N*-metilsitlopinini oluşturur. Yine bir CYP enzimi olan MSH, *N*-metilsitlopin 14-hidroksilaz enzimi ile protopine, protopine ise yine bir CYP enzimi olan P6H ile dihidrosanguinarine dönüşür. Sentezin son basamağında DBOX enzimi ile sanguinarin oluşumu gerçekleşmektedir. Ayrıca SanR, sanguinarin redüktaz enzimi ile sanguinarinden dihidrosanguinarin oluşumu gerçekleşebilir. Reaksiyonun son basamağı tersinir bir reaksiyondur (7).

Berberin sentez yolunda, (*S*)-skoulerinin berberine dönüşümünde, metilasyon, metilendioksi köprü oluşumu ve aromatisasyon gerekli basamaklardır. Biyosentezde ilk olarak SOMT aracılığıyla, (*S*)-skoulerinin *O*-metilasyonu gerçekleştirilir ve (*S*)-tetrahidrokolumbamin oluşumu katalizlenir. Önceleri kolumbaminin köprü oluşumundan önce gelen aromatisasyona işaret eden “metilendioksi köprü oluşum enzimi” için substrat olduğu düşünülmekteydi (36). Başlangıçta “berberin sentaz enzimi” gibi görünen bu enzim, daha sonra “peroksidaz” (37) olarak tanımlanmıştır ve gerçek “köprü oluşturan enzim”in oldukça özelleşmiş bir CYP olan “kanadin sentaz (CAS)” olduğu gösterilmiştir. CAS enzimi, hem *Berberidaceae* hem de *Ranunculaceae* hücre kültürlerinde yalnızca (*S*)-tetrahidrokolumbaminini substrat olarak kabul etmektedir (38). CAS enzimi ile metilendioksi

köprü oluşumu gerçekleşir ve (*S*)-kanadin ortaya çıkar. Reaksiyonun son basamağında STOX enzimi, (*S*)-kanadinden berberin oluşumunu katalizlemektedir (7).

Haşhaşa papaverin yolağı henüz netlik kazanmamasına rağmen (*S*)-norkoklaurinden papaverin oluşumunun gerçekleştiği iki farklı yolak olduğu öne sürülmüştür. Birinci yol, tamamiyle *N*-desmetillenmiş ara ürünlerden oluşur (NH yolağı), ikinci yol ise (*S*)-retikülin gibi çeşitli *N*-metillenmiş ara ürünleri içeren yoldur (NCH₃ yolağı) (7). Belirlenmiş hedef genlerin baskılanmasına yanıt olarak ortaya çıkan, *N*-desmetillenmiş bileşenlerin farklı birikimleri, NH yolunun papaverin biyosentezinde birincil yol olduğunu göstermektedir. NH yolunda, 3'OHaz ve 3'OMT enzimleri aracılığıyla (*S*)-koklaurinden, (*S*)-norretikülin oluşmaktadır. 4'OMT ve N7OMT enzimleri ise (*S*)-norretikülin'den (*S*)-tetrahidropapaverin dönüşümünü katalizlerken, reaksiyonun son basamağında DBOX enzimi papaverin oluşumunu gerçekleştirir (7).

promorfinyan alkaloid olan salutaridine ve çeşitli türevlerinin varlığı Euphorbiaceae'nin bazı üyelerinde tanımlanmış olmasına rağmen, morfin biyosentezi Papaveraceae ile sınırlı olan yalnızca birkaç bitki türünde tanımlanmıştır (39). Morfin tıpta ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. Morfin alkaloidi, apomorfin, kodein, etil-morfin, beta-4-morfoliniletilmorfin, benzilmorfin, diasetilmorfin, dihidromorfin, hidromorfon (dihidromorfinon), metopon, morfin-*N*-oksit, desomorfin dihidrodesoksi-morfin) ve *N*-alil-normorfin gibi maddelerin üretiminde kullanılmaktadır (40).



Şekil 2. 7. Morfin alkaloidinin kimyasal yapısı.

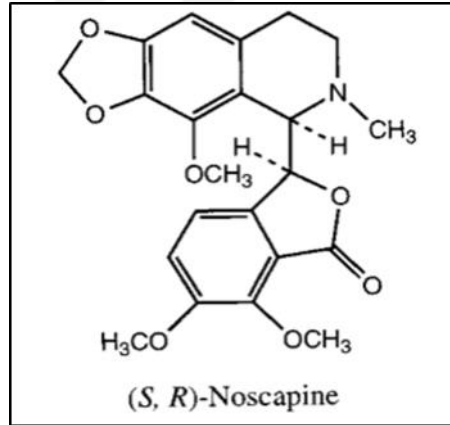
Morfinin biyosentezi (*S*)-retikülinin (*R*)-retiküline epimerizasyonunu gerektirmektedir. (*R*)-retikülin, CYP salutaridine sentaz (CYP719B1) aracılığıyla önce salutaridine (41) ve sonrasında da kısa zincirli bir dehydrogenase/reductase olan salutaridine reductase (SalR) aracılığıyla da salutaridinol'e dönüştürülür (42). Salutaridinol, salutaridinol 7-*O*-acetyltransferase (SalAT) enzimi ile *O*-asetillenir (43, 44). Salutaridinol 7-*O*-acetate, pH 8-9 olduğu ortamda kendiliğinden halkalanma göstererek, ilk pentasiklik morfinyan alkaloid olan tebaine dönüşür (45). Morfin yolağı burada iki kola ayrılır; ilk yolda tebain alkaloidi, 6-*O*-demetilaz (T6ODM) ile kendiliğinden kodeinona dönüşür (46). Kodeinon, bir aldo-keto redüktaz olan kodeinon redüktaz (COR) (47) aracılığıyla kodeine, kodein ise, kodein *O*-demetilaz (CODM) aracılığıyla morfine dönüşür. Alternatif yol ise, önce tebainin CODM vasıtasıyla oripavine 3-*O*-demetilasyonudur. Sonrasında T6ODM, oripavini COR aracılığıyla morfine indirgenen morphinone'e dönüştürür.

Günümüze kadar alkaloid biyosentez yolağının düzenlenmesinin anlaşılması için pek çok çalışmalar yapılmıştır. COR enziminin RNAi yöntemi kullanılarak, fazla ifade olması ile morfin ve türevlerinin artırılmasının hedeflendiği bir çalışmada, enzim miktarının artmasıyla birlikte toplam alkaloid miktarında %28, morfin miktarında %22 artış olduğu

saptanmıştır (48). SalAT geninin aşırı ifade ettirilmesi sonucu tebain, morfin, kodein miktarı artmıştır ve tüm alkaloid içeriğinin de yaklaşık %40 oranında arttığı gözlemlenmiştir (49).

2.2.4. NOSKAPİN ALKALOİDİ VE BİYOSENTEZ YOLAĞI

Narkotin ve gnoskopin olarak da bilinen noskapin ilk izole edilen alkaloidler arasındadır ve bazı haşhaş türlerinin latexinde oldukça fazla miktarda bulunur (7). Şekil 2.8’de kimyasal yapısı verilen noskapin alkaloidinin kapalı formülü $C_{22}H_{23}NO_7$ olup molekül ağırlığı 413.421 g/mol, erime noktası ise $176\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’dır. Molekülün adlandırılması; (3*S*)-6,7-Dimethoxy-3- [(5*R*)-5,6,7,8-tetrahydro-4-methoxy-6-methyl-1,3-dioxolo (4,5-*g*) isoquinolin-5-yl]-1 (3*H*) isobenzofuranone olarak yapılmıştır. Bazı haşhaş türlerinde, noscapine lateks dokusundaki toplam alkaloid içeriğinin büyük çoğunluğundan sorumludur (30). Noskapin aynı zamanda Papaveraceae ve Menispermaceae’nin diğer üyelerinde de bulunur. Öksürük baskılayıcı ve antikanser ajan olması nedeniyle (50), noskapin biyosentezi önemli bir çalışma alanı olmuştur. Noskapin biyosentezi morfin gibi diğer alkaloidler kadar geniş bir şekilde araştırılmamıştır. Noskapin insan ve fare üzerinde düşük toksik etkilere sahiptir (9).



Şekil 2. 8. Noskapin alkaloidinin kimyasal yapısı (9).

Fitalidizokinolin alkaloid olan noskapin ilk izole edilen alkaloidlerden birisidir ve önemli farmakolojik özelliklerinden dolayı halen büyük ilgi görmektedir. Moleküler yapısı uzun yıllardır bilinmesine rağmen, noskapin biyosentezi kısmen anlaşılmıştır. Noskapin biyosentezi, (*S*)-retikülün ara molekülünden türevlenir. İlk olarak berberin köprü enzimi (BBE) ile (*S*)-skoulerine dönüşüm gerçekleşmektedir. Noskapin oluşumu bir dizi metilasyon ve hidroksilasyon reaksiyonunu içermektedir. SOMT1 enzimi (*S*)-skoulerine’den (*S*)-tetrahidrokolumbamin molekülüne dönüşümü gerçekleştirirken,

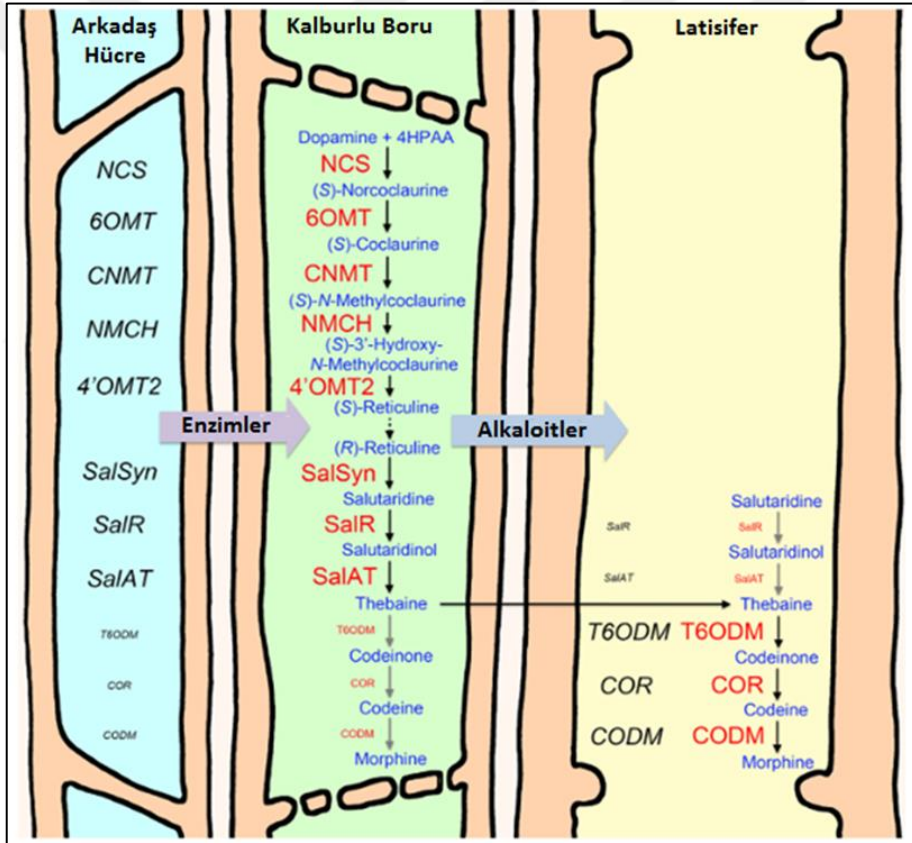
özelleşmiş bir CYP enzimi olan CAS (kanadin sentaz) ile de (S)-kanadin oluşturulur. Reaksiyonun son basamağında narkotinhemiasetalden NOS aracılığıyla noskapin oluşmaktadır (6).

2.2.5. ALKALOİDLERİN HÜCRESEL YERLEŞİMİ VE TAŞINIM MEKANİZMASI

Çok sayıdaki bitki sekonder metabolitleri arasında alkaloitler, güçlü ve farklı biyolojik aktivitelerinden dolayı en önemli grubu oluştururlar ve bazıları klinik amaçlı kullanılır. Bazı alkaloitlerin bitkilerde fotosentetik olarak aktif olan toprak üstü organlardan fotosentetik olarak inaktif olan toprak altı organlara taşındığı bilinmesine rağmen, genellikle tıbbi bitkilerde fazla miktarda kapsül gibi belirli dokularda birikirler. Yapılan çalışmalarla biyosentetik ara moleküllerin özelleşmiş hücrelerden dokudaki diğer tip hücrelere taşınımı ve hücrede bulunan organeller içindeki hareketi gösterilmiştir. Fakat alkaloitlerin membranlar boyunca nasıl taşındığı ve özelleşmiş organlarda bulunan özelleşmiş organellerde nasıl depolandığı hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Haşhaş bitkisinde BIA'ların depolanması ve biyosentezi yoğun bir şekilde araştırılmış ve bu işlemlerde üç ayrı hücre tipinin rol aldığı gösterilmiştir (6, 51-54). *In situ* hibridizasyon çalışmaları arkadaş hücrelerde, immunofloresan işaretleme çalışmaları ise kalburlu borularda biyosentetik gen transkriptlerinin ve enzimlerin yerleşimini göstermiştir. (S)-retikülün oluşumunda ve çeşitli yollarda işlev gösteren karakterize edilmiş genler ve enzimlerin tümü öncelikli olarak sırasıyla arkadaş hücrelerde ve kalburlu borularda yerleşmiştir. Latisiferlerin ise yalnızca alkaloitlerin depolanmasında görevli olduğu gösterilmiştir. BIA biyosentetik genlerin arkadaş hücrelerde ifadelendiği ve sorumlu enzimlerin sonradan kalburlu borulara taşındığı modeli kabul görmektedir. Son olarak, kalburlu borularda sentezlenen alkaloitler, latisifer dokularda bulunan büyük sitoplazmik veziküller içinde depolanmak üzere yakın latisiferlere taşınırlar (6). Latisiferlerin veya lateksin sitoplazması tüm hücrel organelleri ve içinde alkaloitlerin çoğu ayrıştırılmış bir şekilde depolanmış geniş vezikülleri içerir. Morfin, kodein ve tebain hem kökte hem de bitkinin toprak üstü kısımlarında bulunur, özellikle de latisiferlerdeki veziküllerde biriktirilir, sanguinarin ise kök dokusunda biriktirilmektedir (22, 55).

In situ hibridizasyon ve immunofloresan işaretleme yöntemleri, *SalAT* ve *COR* mRNA'larını ve latisiferlerde bulunan sorumlu enzimleri saptamak için başarısız olmasına rağmen (22, 52, 53), *SalAT* ve *COR* transkriptleri latisiferlerin sitoplazmasında ya da

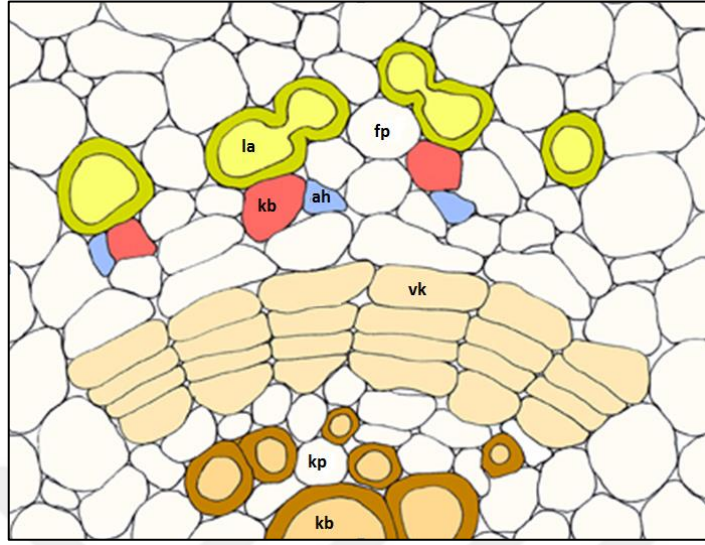
lateksinde de rapor edilmiştir (6, 48, 56, 57). İzole edilmiş lateks ya da lateks dokusu içeren tüm gövde dokusundan elde edilen proteinlerin göreceli olarak miktarını saptamak için yapılan shotgun proteomiks uygulaması, T6ODM, COR ve CODM tarafından katalizlenen morfin biyosentezinin son üç basamağının temel olarak latisiferlerde ortaya çıktığını göstermiştir (6, 58). Kalburlu dokulardan latisiferlere taşınma ihtimali olan başlıca adaylar, morfin yolağında bulunan tebain ve noskapin yolağında bulunan narkotinhemiasetaldir. Bununla birlikte, izole edilmiş lateks dokusunda çoğu yolak ara ürünlerinin saptanması nispeten özelleşmemiş bir taşınma sürecinin olduğunu göstermektedir. Taşınım mekanizması bilinmemesine rağmen, haşhaşta kalburlu borular ve latisiferler arasında plazmodezmanın ortaya çıkışı (6, 59), hem simplastik hem de apoplastik transport rotalarının varlığını mümkün kılmaktadır.



Şekil 2. 9. Haşhaş bitkisinde, morfin biyosentezinde arkadaş hücrelerin, latisiferlerin ve kalburlu boruların rolünü gösteren hüresel yerleşim modeli (6).

Coptis japonica'da, bir ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcısı, berberinin dışarı salınması (60) ve içeri alınmasında (61) görevlidir ve sorumlu olan gen izole edilmiştir (6, 62, 63). Fakat haşhaş bitkisinde bir ABC taşıyıcısının benzer bir fonksiyona sahip olup olmadığı bilinmemektedir. Morfin biyosentez yolağında, BIA biyosentetik gen transkriptlerinin

başlıca konumları, enzim yerleşimi ve taşınmasının olası noktaları şekil 2.9’da şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2. 10. Haşhaş bitkisinde BIA’ların biyosentezi ve birikimi arkadaş hücrelerin (ah), kalburlu boruların (kb) ve latisiferlerin (la) koordinasyonlu katılımını içeren çok hücreli modelin şematik gösterimi (64).

BIA’ların biyosentezi ve depolanmasında önceleri latisiferlerin fonksiyon yaptığı düşünülmese de, son zamanlarda yapılan lokalizasyon çalışmaları komşu floem dokularında katılımını göstermiştir (22, 52-54). Haşhaşta BIA biyosentezi ve birikimi için çok hücreli model şekil 2.10’da gösterilmiştir. Bu modele göre biyosentetik enzimler arkadaş hücrelerde sentezlenirler ve alkaloid biyosentezinin gerçekleştiği kalburlu borulara taşınırlar. Sentezlenen alkaloidlerin büyük bir kısmı komşu latisifer ağlarda depolanır (64).

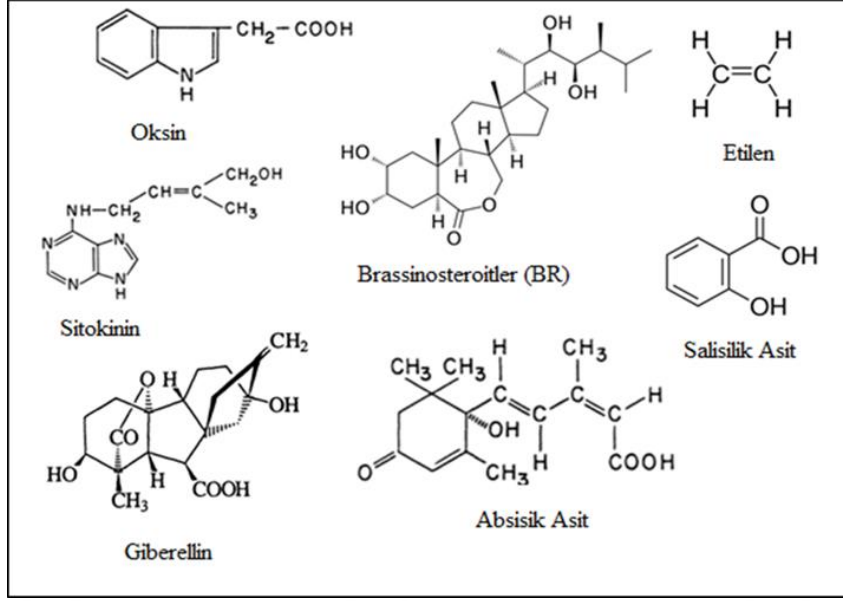
BIA metabolizmasında görev alan bileşenlerin, latisiferlerden uzakta konumlanmış floem hücrelerindeki yerleşimi alkaloid biyosentezinde rol oynayan enzimlerin ve biyosentez yolu ara ürünlerinin hücreler arasında taşındığını göstermektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar kalburlu boru elemanlarının, jasmonik asit (65), askorbik asit (66) ve savunmayla ilgili bileşiklerin (67) biyosentezinde de görev aldığını göstermektedir (31). Ayrıca bitkilerde bulunan değerli alkaloidlerin üretimini arttırmak için yalnızca alkaloidlerin biyosentetik genleri değil aynı zamanda onların taşınmasında rol alan genlerin bilinmesi de önem taşımaktadır (68).

2.3. BİTKİSEL HORMONLAR, ELİSİTÖRLER VE BİR ELİSİTÖR OLARAK MEJA UYGULAMALARI

2.3.1. BİTKİSEL HORMONLAR

Bitkisel hormonlar bitkide üretilen, üretildiği yerden bitkinin diğer kısımlarına taşınabilen ve taşındığı bölgede çok küçük miktarlarda bile yaşamsal olayları yönetebilen organik maddelerdir. Bitkilerde hormonlar genel olarak büyümeyi uyarıcı (oksin, sitokin ve giberellin) ve engelleyen (etilen ve absisik asit) hormonlar olmak üzere sınıflandırılmışlardır (Şekil 2.11). Bu hormonlara ek olarak hormon olarak kabul gören bir bileşik grubu da Jasmonatlar'dır (69). Bitkilerde biyotik stres sonrasında farklı hormonların sinyal mekanizmalarında farklı bileşenler rol oynamaktadır. Biyotik stres farklı fitohormonların seviyelerinde değişiklik meydana getirir. Bitki hormon seviyelerindeki değişimler savunma ile ilgili genlerin ifade seviyelerinde değişikliklere neden olur ve bu durum savunma sisteminin harekete geçmesiyle sonuçlanır (70). Bitkisel hormonlar bitkide gelişim olaylarının düzenlenmesinin yanı sıra biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı bitkinin cevabında ortaya çıkan sinyal yollarında önemli rol oynarlar (Şekil 2. 10). Bitkide biyotik strese karşı oluşan yanıtta anahtar bileşenlerin belirlenmesi ve bu yanıtta salisilik asit (SA), jasmonatlar (JA) ve etilen (ET)'in rolünün anlaşılması konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Son çalışmalar absisik asit (ABA), oksin, giberellik asit (GA), sitokin (CK), brassinosteroidler ve peptid hormonlar gibi diğer hormonlarında bitki savunma sinyal yollarında rol aldığını ancak bitki savunmasındaki rollerinin daha az incelendiğini göstermektedir (70).

Oksin (IAA), bitkilerde ilk keşfedilen hormon grubudur. İlk keşfedilen oksin ise İndolasetik asittir (71). Ortaya çıkan bulgular oksin hormonunun, çeşitli patojenlere karşı yanıtın düzenlenmesinde rol oynayan sinyal ağının önemli bir bileşeni olarak hareket ettiğini göstermektedir. Oksin biyosentez, yıkım ve diğer hormonların sinyal yolları ile ilişkili genlerin ifadesini, savunma ve gelişim cevaplarını düzenler (70, 72). Fakat oksin seviyelerinin diğer hormonların dengesini nasıl etkilediği ve bitkinin farklı patojenlere karşı nasıl spesifik savunma cevabı geliştirdiği hala keşfedilmemiştir (70).



Şekil 2. 11. Bazı Bitkisel Hormonlar.

Sitokininler (CK), kök-hücre kontrolü, vasküler farklılaşma, kloroplast biyogenez, tohum gelişimi, büyüme ve köklerin dallanması, sürgün, yaprak dökülmesi, beslenme dengesi ve stres toleransı gibi farklı işlemleri gerçekleştiren bitki hormonudur (73). Sitokininlerin bitki savunmasındaki rolleri çok az anlaşılmasına rağmen, onların bazı patojenlere karşı gelişen savunma cevabının düzenlenmesinde rol oynadıklarına dair bulgular vardır. Plasmodiophora brassicae ile enfekte edilmiş *Arabidopsiste* yapılan gen ifadesi belirleme çalışmaları kontrol bitkilerine göre 1000'den fazla farklı genin ifadesi ile sonuçlanmıştır. Sitokinin homeostazisinde görevli olan sitokinin sentaz ve sitokinin oksidazlar/dehidrojenazlar düşük seviyede ifade olmuştur. Sitokinin oksidazlar/dehidrojenaz genlerinin fazla ifade olduğu transgenik bitkilerle yapılan çalışmalar *P. brassicae* enfeksiyonuna karşı direnç göstermiştir. Bu durum sitokinin hormonunun *Arabidopsiste* clubroot hastalığının gelişiminde anahtar faktör olarak davrandığını göstermektedir (74). Fakat sitokininlerin bitki savunmasında nasıl etki gösterdiğinin moleküler mekanizması bilinmemektedir (70).

Giberellinler (GA), DELLA proteinler olarak isimlendirilen büyümenin negative regülatörlerinin degradasyonunu uyararak bitki büyümesini teşvik ederler (70). Giberellinler, yalnızca yüksek bitkiler tarafından değil aynı zamanda mantar ve bakteriler tarafından üretilirler (70, 75). Giberellinler, bakteri ve mantarlarda konak bitkiyle etkileşim kurmak için çalışan sinyal faktörleri olarak davranan sekonder metabolitlerdir. Elde edilen bulgular göstermiştir ki, GA ve GA sinyal bileşenleri çeşitli patojenlere karşı

savunma cevaplarının regülasyonunda önemli roller oynamaktadırlar. Fakat savunma cevabı üzerine GA etkisinin mekanizması bilinmemektedir (70)

Absisik asit (ABA), bitki büyüme ve gelişmesinin, tohum çimlenmesi, embriyo olgunlaşması, yaprak dökülmesi ve çevresel stres koşullarına karşı savunma gibi çoğu aşamasının regülasyonuna katılır (76). Son zamanlarda yapılmış çeşitli çalışmalar ABA'nın bitki savunma yanıtında önemli roller oynadığını ortaya koymaktadır (70). ABA, çeşitli bitki patosistemlerinde savunma yanıtlarının negative bir regülatörü olarak iş görmektedir. Fakat ABA'nın savunmada pozitif bir regülatör olduğuyla ilgili bulgular da vardır (77). ABA, bakteriyel enfeksiyone karşı bir bariyer olarak davranan stomal kapanmayı aktive etmektedir (78). Arabidopsiste patojen ile uyarılabilen genlerin meta analiz çalışması, *Pythium irregular* enfeksiyonu ile ABA-regüle edilmiş genlerin yaklaşık üçte birinin uyarıldığını göstermiştir. Bu bulgular ABA'nın bitki hücre metabolizmasının transkripsiyonel yeniden programlanması aracılığıyla bitki savunma sisteminin aktivasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca, *P. irregular* enfeksiyonu sonrasında, JA biyosentezi ve JA cevap genlerinin ifadesi için ABA'ya ihtiyaç duyulduğu bulunmuştur (79).

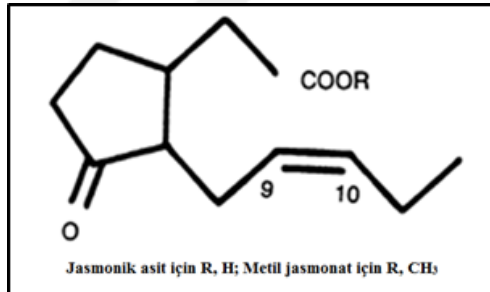
Barassinosteroidler (BR), hayvan steroid hormonları ile yapısal olarak ilişkili hormonlardır ve bitkilerde büyümenin regülasyonunda, gelişim ve çeşitli fizyolojik yanıtlarda görev alırlar (80). BR'lerin tohum çimlenmesi, hücre bölünmesi, hücre uzaması, çiçeklenme, yaşlanma ve abiyotik stres cevabı gibi çeşitli gelişimsel işlemlerde etkili oldukları bilinmesine rağmen, bu hormonların biyotik strese karşı cevapta oynadıkları rol hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, bitki savunma yanıtlarının regülasyonunda BR'lerin rolü olduğunu göstermektedir. BR'lerin savunmada yer alan diğer hormonların biyosentezinde etkili olan genlerin ifade seviyesini etkilediği rapor edilmiştir. Örneğin, Arabidopsiste, Etilen (ACC sentaz) ve JA (OPR3) hormonlarının biyosentezinde rol oynayan genlerin BR'ler tarafından uyarıldığı gösterilmiştir (70, 81, 82).

Salisilik asit (SA), Jasmonik asit (JA) ve Etilen (ET) hormonlarının hem çeşitli patojenler ve haşereler gibi biyotik stres faktörlerine karşı, hem de ozon maruziyeti, yaralanma gibi çeşitli abiyotik stres faktörlerine karşı bitki savunma yanıtlarını düzenlemede esas rolü oynadığı bilinmektedir (83-87). Salisilik asit (SA), bitki savunmasında kritik bir rol oynamaktadır ve biyotrofik ve hemibiyotrofik patojenlere karşı sistemik kazanılmış

dirençin (SAR) oluşturulması gibi savunma yanıtlarının aktivasyonunda yer almaktadır (70, 88).

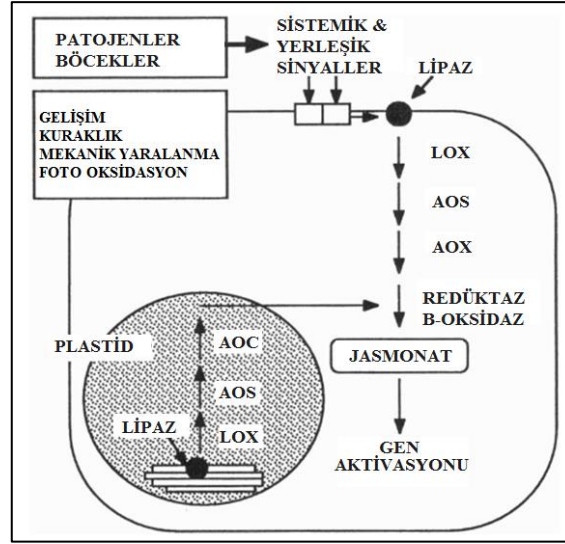
Etilen (ET), bitkilerde bazı stres tepkilerini ve gelişim aşamalarını kontrol eden bir hormondur. Çeşitli çalışmalar patojen girişinden sonra bazı savunma ile ilişkili genlerin ifade seviyesini aktive etmek için JA ve ET sinyalinin genellikle sinerjik olarak çalıştığını göstermektedir (83, 89, 90).

Bu hormonlara ek olarak hormon olarak kabul gören bir bileşik grubu da Jasmonatlar (JA). Tohumlu bitkileri de kapsayan 150 familyaya ait 200 türde bu bileşiğe rastlanmıştır. Jasmonatlar (JA), ilk kez yasemin (jasmin) bitkisinden elde edilmişlerdir. Jasmonatlar linolenik asitten lipoksijenaz-bağımlı bir işlemle türevlenirler (91). Bitkide büyümeyi engelleyici ve yaşlanmayı hızlandırıcı etkiye sahiptirler (92). Jasmonatların, bitki gelişimi boyunca, biyotik ve abiyotik stres gibi çeşitli fizyolojik rolleri de tanımlanmıştır (91). JA, yüksek bitkiler tarafından üretilen ve tohum çimlenmesi, kök gelişimi, verimlilik, meyve olgunlaşması ve yaşlanma gibi işlemlerde görev alan önemli bir büyüme düzenleyicisidir (93, 94) ve aynı zamanda bitkinin karşılaştığı herhangi bir stres durumunda bitki savunma mekanizmasını harekete geçirerek bir uyarıcı olarak görev yapmaktadırlar (69).



Şekil 2. 12. Jasmonik asit ve Metil jasmonatin açık formülü (95).

Jasmonatların sentezlenmesi sonucu ortaya çıkan cevaplardan birisi bitkide sekonder metabolit birikimidir (34). Jasmonatlar bunu sekonder metabolitlerin biyosentezinden sorumlu genlerin ifadelerini değiştirerek yapmaktadır (96, 97). Bitkide tüm organlarda farklı JA sinyal yolu bulunduğu ve yaralanan bölgeye özgü cevap verildiği ortaya konmuştur (98). JA sinyal yolu birkaç yoldan oluşmaktadır. İlk uyarıcı ile lokal ya da sistemik olarak sinyali iletimi başlar (Şekil 2.13). Sinyalin algılanması JA biyosentezini başlatır. JA'nın algılanması sonucunda JA sinyal iletimi salisilik asit, etilen ve diğer sinyal iletim yolları ile iletişim kurar (99).



Şekil 2. 13. JA sentezi için iki potansiyel yolağın şematik olarak gösterimi (91).

2.3.2. ELİSİTÖRLER VE BİR ELİSİTÖR OLARAK MEJA UYGULAMALARI

Elisitör, canlı sistemlere düşük konsantrasyonlarda uygulandığında dahi spesifik bileşenlerin biyosentezini uyaran yada başlatan maddelerdir (100). Elisitörler yapılarına göre abiyotik ve biyotik elisitörler olarak veya orijinlerine göre endojen ve eksojen elisitörler olarak sınıflandırılabilirler. Abiyotik elisitörler genellikle inorganik tuzlar ve Cu ve Cd iyonları gibi elisitör olarak davranan fiziksel faktörler, Ca^{2+} ve yüksek pH'dır. Biyotik elisitörler ise, pektin ve selüloz gibi hücre duvarlarından türevlenen polisakkaritler, mikroorganizma kökenli kitin veya glukanlar, glikoproteinler, G-proteini, reseptörlerle ilişkili ve bir dizi enzim veya iyon kanalını aktive veya inaktive ederek etki gösteren hücreler arası proteinlerdir (101, 102). Eksojen elisitörler, polisakkaritler, poliaminler ve yağ asitleri gibi hücre dışından kaynaklanırken, endojen elisitörler, galakturonid ve hepta- β -glukozitler gibi hücre içinden kaynaklanmaktadır (102).

Fungal bir elisitör olan metil jasmonat (MeJA), jasmonik asitten türevlenen ve bitki yaşlanması, tohum çimlenmesi, kök gelişimi, çiçeklenme, meyve olgunlaşması gibi gelişimsel yollarda ve bitkinin savunmasında görev alan uçucu organik bir bileşiktir. MeJA birçok biyotik ve abiyotik stres durumunda cevap olarak ve orijinal bitki savunma sistemlerinde de sinyal olarak görev yapmaktadır (93, 94). MeJA, JA eşleniği olduğu için biyolojik deneylerde yaygın olarak kullanılmaktadır (103). Çalışmalardan elde edilen bilgilere göre MeJA'nın, *P. somniferum* (104, 105) ve *Catharanthus roseus*'ta (106) alkaloid birikimine yol açan bir dizi reaksiyonu etkilediği bulunmuştur. JA ve metil esteri MeJA diğer bitki hormonları ile sinerjetik ya da antogonistik olarak çalışabilirler. Metil

jasmonat ile etilenin sinerjetik olarak bir grup savunma genini uyardığı bilinmektedir (93, 107). Yapılan mikroarray çalışmaları, etilene cevap transkripsiyon faktörü1 (ERF1)'in jasmonat ve etilene karşı sentezlenen birçok genin ifadesini düzenlediğini ortaya koymuştur (55, 108). Yapılan bir çalışmada, eksojen MeJa uygulaması ile JA sinyal iletim mekanizmasının aktif hale getirilmesi bitki köklerinden flavanoid ve indol gibi sinyal bileşiklerinin salınımını artırmıştır (109). Bu durum toprakta bulunan mikroorganizmaların sayısını değiştirmemiştir fakat rizosfer komünite kompozisyonu üzerinde değişik meydana getirerek JA yolağının bitki-bakteri etkileşimleri üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir (34).

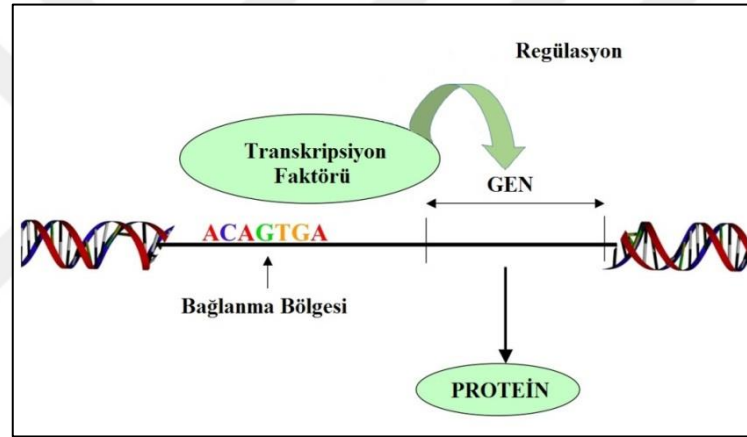
2.4. TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ

Transkripsiyon faktörleri (diziye özgü DNA bağlayıcı faktör), genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için DNA üzerinde belli bir diziye bağlanabilen proteinlerdir (Şekil 2.14). Transkripsiyon faktörleri tek başına veya bir grup proteinle birlikte, RNA polimeraz tarafından bir genin transkripsiyonunu ya (bir aktivatör olarak) kolaylaştırır veya (bir represör olarak) engellemektedirler (110-113). Transkripsiyon faktörleri çoğu hücresel işlem için hayati önem taşımaktadırlar. TF'lerin tanımlayıcı bir özelliği onların bir ya da daha fazla sayıda DNA bağlayıcı domain (DBD) içermesidir (114, 115). Transkripsiyon faktörlerinin biyolojik rollerinden ve önemli fonksiyonlarından bazıları; bazal transkripsiyon regülasyonu, gelişim, hücrelerarası sinyallere cevap, çevresel faktörlere cevap, hücre siklusunun kontrol edilmesi ve patojenezis olarak sayılabilir. Ayrıca bitkilerde metabolit birikimini artırmaya aracılık eden yolların birçok aşamasında düzenleyici olarak bulunurlar (116).

TF'leri, DNA-bağlayıcı domain (DBD), trans-aktive edici domain (TAD) ve opsiyonel olarak sinyal-algılayıcı domain (SSD) içerirler. DBD, DNA'da regüle edilen genlere yakın bulunan spesifik dizilere (enhancer veya promoter) bağlanır. Bu diziler transkripsiyonun başlaması için gerekli dizilerdir. Transkripsiyon faktörlerini bağlayan DNA dizileri genellikle "respons" elementler olarak isimlendirilirler. TAD ise transkripsiyon koregülatörleri gibi diğer proteinler için bağlayıcı bölgeler içermektedir. Bu bağlayıcı bölgeler genellikle aktivasyon fonksiyonları (AF) olarak isimlendirilirler (117). Opsiyonel olarak, dışarıdan gelen sinyalleri algılayan ve bu sinyalleri transkripsiyon kompleksinin geri kalan kısımlarına ileterek genin az ya da çok ifade olmasını sağlayan bir sinyal algılama domaini (SSD) (örneğin bir ligand bağlayıcı domain) içermektedir. Ayrıca DBS

ve SSD, gen ifadesini düzenlemek için transkripsiyon kompleksi içinde bulunan farklı ilişkili proteinler üzerine yerleşebilir.

Transkripsiyon faktörlerini analiz etmek için farklı teknolojiler mevcuttur. Genomik düzeyde belirlemek için, DNA-dizileme ve veritabanı çalışmaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Transkripsiyon faktörlerini western blot yöntemi ile spesifik antikolar kullanılarak protein şeklinde saptamak mümkündür. “Electromobility Shift Assay (EMSA)” yöntemi kullanılarak transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon profilleri belirlenebilir (118). Aktivasyon profillerini belirlemek için bir başka yöntem ise DNA mikroarray temelli bir teknoloji olan ve belirli DNA bağlayıcı dizileri array yüzeyinde bulunduran, farklı transkripsiyon faktörlerinin aynı anda saptanabilmesine olanak sağlayan TF çip sistemidir (119).



Şekil 2. 14. Transkripsiyon faktörlerinin şematik olarak gösterimi.

2.4.1. WRKY TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ

WRKY proteinleri bitkilerde bir gen süperfamilyası olarak ortaya çıkan bir transkripsiyon faktörü grubudur ve bitkide savunma yanıtı yollarının regülasyonunda önemli roller oynamaktadırlar (120). WRKY proteinlerinin adı, bu proteinlerin en önemli özelliği olan ve aile üyeleri arasında oldukça korunmuş 60 amino asitlik bir bölge olan WRKY domaininden gelmektedir. WRKY domaini korunmuş amino asit dizisi olan N-terminal uçta bulunan WRKYGQK dizisi tarafından tanınır. Bitkilerin hareketsiz canlılar olması ve ototrofik yaşam tarzına sahip olmalarıyla bağlantılı olarak çok çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşullarına maruz kalmaları WRKY ailesinin çok geniş olmasının temel sebeplerinden biri olabilir. WRKY proteinleri aynı zamanda trikoma gelişimi ve sekonder metabolitlerin biyosentezi gibi diğer bitkiye özgü işlevlerde de rol oynarlar.

BIA metabolizmasında ilk keşfedilen transkripsiyonel regülatör, *Coptis japonica* bitkisinden izole edilmiştir. Bu çeşitli biyosentetik genlerin regülasyonunda yer alan CjWRKY1 genidir ve CjWRKY1 transkriptlerinin susturulması berberin biyosentezinde yer alan çeşitli gen transkriptlerinin ifadelerinde indirgenmeye sebep olduğu bulunmuştur (12, 27, 48). *Nicotiana attenuata*'da yapılan bir çalışmada *NaWRKY3* ve *NaWRKY6* genlerinin, herbivor tarafından yaralanmaya karşı JA ve JA-izolösin seviyelerini artırarak JA biyosentez genlerinin (LOX, AOS, AOC ve OPR) ifadesini regüle ettiği ortaya konulmuştur (Şekil 2.16a) (121, 122). Bu genler herbivora karşı doğrudan ve dolaylı savunma mekanizmalarında rol oynamaktadırlar. *Boea hygrometrica*'da yapılan bir çalışmada, dehidrasyon ve ABA tarafından uyarılan ve kuraklık toleransında önemli bir rol oynayan BhGolS1 (galaktinol sentaz) geninin promotör bölgesi *BhWRKY1* tarafından uyarıldığı bulunmuştur. Bu etkileşimin transkripsiyon ve kuraklık toleransının aktivasyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır (122, 123).

2.5. qRT-PZR (GERÇEK ZAMANLI PZR) YÖNTEMİ VE GEN İFADELEMESİ ÇALIŞMALARI

“Real-time PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)” teknolojisi, DNA veya mRNA örneklerinin çoğaltılmasını sağlayan ve elde edilen ürünlerin miktarını tek bir tüpte tespit edebilen, son yıllarda kullanımı yaygınlaşmış bir yöntemdir. Floresan işaretleme tekniklerinin moleküler genetik yöntemlerde kullanılmaya başlanması ile bilinen “PZR” yöntemi geliştirilerek oluşturulan teknik, gen anlatım çalışmalarına hız kazandırmıştır (11, 124). Çift zincirli DNA'ya bağlanabilen "SYBR-Green I" floresan boya ile işaretleme en basit metottür. "SYBR-Green I" ile belirleme çok iyi çalışan bir metottür fakat reaksiyon ortamında bulunan primer-dimer oluşumları gibi herhangi bir çift zincirli DNA da floresan ışığa yapabilir. "SYBR-Green I" dışında güvenilir bir şekilde kullanılan ve floresan ışığa yapabildiği üç adet işaretli prob vardır. Bunlar "TaqMan ® probe" veya hidroliz prob, moleküler boncuk yöntemi ve hibridizasyon problemlerini içeren problemlerdir. (125). Adından da anlaşıldığı gibi “gerçek zamanlı PZR” sistemi, PZR reaksiyonu oluşurken monitörden gözlemlemeye olanak sağlamaktadır. "Gerçek zamanlı PZR"ın kullanım alanları, patojen saptanması, gen anlatımının analizi, kromozomlardaki sayısal-yapısal bozuklukların analizi ve son zamanlarda kullanılmaya başlanan "gerçek zamanlı immüno PZR" teknolojisi ile proteinlerin belirlenmesidir. Ticari olarak birçok "gerçek zamanlı PZR" cihazı bulunmaktadır. Bunlar arasındaki temel farklılıklar "eksitasyon" ve "emisyon" dalga boyları, hızı ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasiteleridir. Bu teknoloji çeşitli

alanlarda kullanıcılar tarafından tercih edilmektedir. Gen ifadesi çalışmalarında kullanılmasındaki tercih sebebi ise daha hassas, daha verimli, hızlı ve daha üretken olmasıdır (125). Gen anlatımının belirlenmesi, farklılaşma ve patolojik durumların saptanması için çok önemlidir.



3. GEREKÇE VE AMAÇ

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.), narkotik analjezik morfin, öksürük kesici kodein, antimikrobiyal ajan sanguinarin, vasodilatör olarak kullanılan papaverin ve antikanserojenik noskapin gibi çeşitli Benzilizokinolin alkaloidlerini (BIA) üretmektedir. Ülkemizde ve dünyada tarımı yapılan, endüstriyel ve tıbbi açıdan çok önemli bir bitkidir. Ülkemiz hem haşhaş hem de alkaloid üretimi bakımından önemli bir üretici ülke olup, dünya yasal haşhaş ekim alanları içerisinde %45'lik bir paya sahiptir. Ülkemizde üretilen haşhaş çeşitlerinde kuru kapsüldeki morfin oranı %0,4 civarındadır. Ancak dünyada haşhaş ve morfin ve türevleri üreten ülkelerde, kapsüldeki morfin oranı %2 civarında seyretmektedir. Bu ülkeler birim kapsülden daha fazla morfin üretmek suretiyle üretim maliyetlerini düşürmekte ve uluslararası rekabette avantaj sağlamaktadırlar (10). Bu nedenle ülkemizde haşhaş kapsülünde alkaloid miktarını arttırmaya yönelik ıslah ve genetik manipülasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır. Morfin ve noskapin alkaloid biyosentezinin farklı yollar üzerinden gerçekleştiği bilinmesine rağmen, bu yollarda yer alan genler ve bu genlerin fonksiyonları ve ne şekilde regüle edildikleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. BIA biyosentez yolağı çok sayıda enzimin ve metabolitin yer aldığı oldukça karmaşık bir yoldur. Bitkilerde alkaloid biyosentez yollarında etkili olan çok sayıda TF görev almaktadır (126, 127). WRKY ailesi bitki gelişiminde ve bitki metabolizmasında çeşitli görevleri üstlenen biyotik ve abiyotik stres koşulları ile ilişkili olan transkripsiyon faktörleridir (128).

Bu tez çalışması kapsamında öncelikle, fungal bir elisitör olan MeJa ile muamele edilerek metabolit içeriği artırılmış ve 3. ve 9. Saat sonra hasat edilmiş morfine ve noskapin içeriği yüksek haşhaş genotiplerinin kapsül dokusundan elde edilen küçük RNA kütüphanelerine ait yeni nesil dizileme sonuçları, Blast programı ile analiz edilerek çeşitli transkripsiyon faktörleri belirlenmiştir. Daha sonra belirlenen transkripsiyon faktörlerinin, qRT-PCR yöntemi ile morfine ve noskapin içeriği yüksek haşhaş bitkilerindeki ifade seviyeleri ölçülerek, transkripsiyon faktörleri ile BIA biyosentez yolağı arasındaki ilişkinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. BİTKİ MATERYALİ

Çalışmada morfince ve noskapince zengin haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisi kullanılmıştır. *Papaver somniferum* L.'nin morfin içeriği zengin Ofis-95 çeşidi, ve noskabin içeriği zengin bir haşhaş hattı Toprak Mahsulleri Ofisinden temin edilmiş Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri arazisine 3 tekerrürlü 3 sıra şeklinde ekilmiştir.

4.2. MEJA UYGULAMASI

Bitki petallerini dökmeye başlar başlamaz uygulama yapılmış ve dokular hasat edilmiştir. MeJa uygulaması için öncelikle bistüri yardımı ile kapsülden başlayarak bitkinin gövde ve yaprak dokuları zedelenmiştir. Daha sonra bu bitkilere 100 µM MeJA çözeltisi püskürtme yöntemi ile uygulanmıştır. Kontrol bitkilerine ise 100 ml su içerisine 100 µl etanol ve 100 µl Tween-20 eklenmiş olan karışım uygulanmıştır. Bitkilerin üzerlerinden çözelti damlayacak hale gelene kadar, sprej yoluyla uygulama yapılmıştır. Uygulamadan sonraki 3. ve 9. saatlerde hem kontrol hem de uygulama bitkilerinin kapsülleri hasat edilerek - 80 °C' de saklanmıştır.

4.3. TOTAL RNA İZOLASYONU

Örneklerin kapsül dokusundan 100 mg alınarak steril havanlar içerisinde sıvı azot kullanılarak ezilmiştir (Şekil 4.1). Ezilen dokulardan Trizol (Invitrogen, Kat no: 15596-026) metoduna göre RNA izolasyonu yapılmıştır. Yöntemde, önce ortam steril hale getirilmiştir. Protokolde kullanılacak %75'lik etanol ve izopropil alkol buz içinde soğuk halde tutulmuştur. 2 ml'lik ependorf tüplere 1ml Trizol reaktifi eklenmiştir. Toz haline getirilen 100-150 mg kapsül dokuları tüplere hızlıca boşaltılıp aşağı yukarı çevrilerek tüpler hızlıca karıştırılmıştır. Tüpler 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 1 ml Trizol için 0,2 ml kloroform tüplere ilave edilmiştir. Tüplerin kapakları iyice kapatılıp 15 saniye boyunca elle kuvvetlice çalkalanıp karıştırılmıştır. 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 4°C'de 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı faz yeni tüplere aktarılmıştır ve buzda bekleyen izopropil alkolden 500 µl (Trizol'ün yarısı kadar) bu tüplerin üzerine eklenmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 4°C'de 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Çöken RNA'nın üzerine 1 ml (Trizol kadar) %75'lik etanol eklenerek yıkanmıştır. Örnekler

4°C’de 10000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant atıldıktan sonra dipte kalan RNA çökeltisi kurumaya bırakılmıştır. Tüplere 30 µl ddH₂O eklendikten sonra 10 dakika süreyle 57°C’de ısı bloğunda bekletilmiş ve RNA’ların çözünmesi sağlanmıştır. RNA örnekleri - 80 °C’ye kaldırılmıştır (129).



Şekil 4. 1. Haşhaş örneklerinden total RNA izolasyonu.

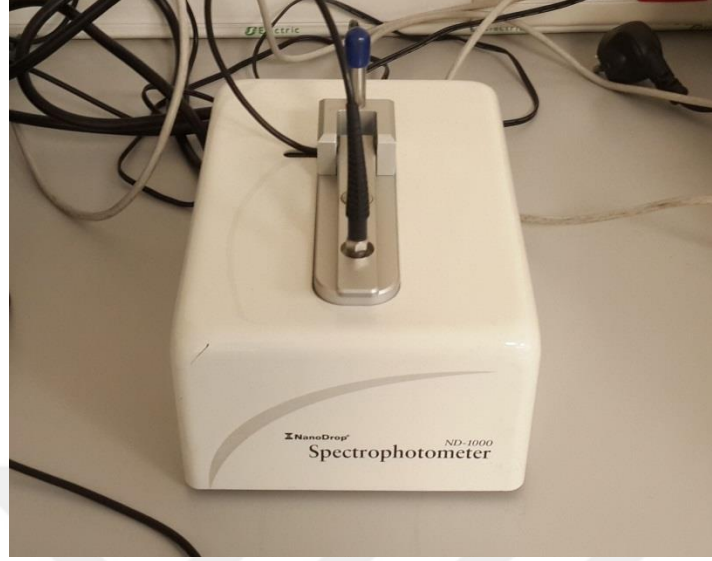
4.3.1. RNA TEMİZLEME İŞLEMİ

RNA temizlenmesi Rneasy, QIAGEN kit protokolüne göre yapılmıştır. Toplam RNA tüpü içindeki miktar ölçülüp toplam 100 ml olacak şekilde RNase-free water eklenmiştir. Daha sonra 350 µl RLT buffer ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 250 µl %96-100’lük etanol konularak RNA karıştırılmıştır. 700 µl’lik toplam hacim spin column içine bu karışım eklenmiş ve 15 sn 10.000 rpm’de santrifüj edilmiştir (NOT: İşlem soğutmalı santrifüjde +4 °C’de yapılmıştır). 500 µl RPE buffer eklenmiş ve 10.000 rpm’de 15 sn santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı atılmıştır. 500 µl RPE buffer eklenmiş ve 10.000 rpm’de 2 dk santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı atılmıştır. Üst kısım alınmış ve alt kısma yeni tüp yerleştirilmiştir. En son artıkların uzaklaştırılması için 1 dk 10.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Alt kısım atılmıştır. Yerine kit içindeki 1.5’luk tüp yerleştirilmiş ve üzerine 30.5 µl RNase-free water eklenmiştir. 1 dk 10.000 rpm’de çevrilmiştir. Daha sonra nanodropta konsantrasyon değerleri ölçülmüş ve jel elektroforezinde %2’lik agaroz jelde RNA’lar yürütülüp görüntülenmiştir.

4.3.2. ELDE EDİLEN RNA’LARIN KALİTE VE KONSANTRASYON TAYİNİ

Elde edilen RNA’ların, NanoDrop cihazında (Thermo Scientific, KS, USA, NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) kalite ve miktar tayini yapılmıştır (Şekil 4. 2). RNA örnekleri 230, 260 ve 280 dalga boylarında ölçülmüştür. A₂₆₀/A₂₃₀ oranının 2,0–2,2 ve A₂₆₀/A₂₈₀ oranının 1,8–2,1 arasında olması, saf RNA izole edildiği anlamına

gelmektedir. İzole edilen RNA'ların bütünlüğü %2'lik agaroz jele 1–2 µL örnek yüklenerek ve 100 volt enerjile 1 saat yürütüldükten sonra görüntülenmiştir.



Şekil 4. 2. Nanodrop cihazı.

4.4. cDNA SENTEZİ

Elde edilen RNA'dan cDNA elde etmek için Fermentas Kiti (Fermentas, Ontario, Canada) kullanılmıştır. Eşit miktarda RNA ile çalışmaya başlamak amacıyla, her bir dokuya ait total RNA'lardan 1000 ng olacak şekilde ayarlanarak RNA kullanılmıştır. 1X için 1 µl Oligo dT, 1000 ng RNA olacak şekilde üzerine su eklenerek toplam hacim 11 µl ye tamamlanmıştır. Tüpler PCR cihazında 65°C'de 5 dk tutulduktan sonra hemen buza gömülmüş ve en az 2 dk buzda bekletilmiştir. Daha sonra herbir tüpe 4 µl 5x Buffer, 2 µL 10 mM dNTP, 1 µl RNase out, 2 µl Revers Transkriptaz enzimi eklenerek toplam hacim 20 µl ye tamamlanmıştır. Örnekler 37 °C'de 60 dk PCR cihazına konulmuş, 70°C'de 5 dk bekletilmiş ve +4 °C'de reaksiyon sona erdirilmiştir. Oluşan tüm cDNA lar için, 18S rRNA primerleriyle (18S rRNA (1706662) İleri 5'-TTTGACTCAACACGGGGAAA-3, 18S rRNA (1706663) Geri 5'-CAGACAAATCGCTCCACCAA-3) PCR optimizasyonu yapılmıştır ve cDNA ların oluşup oluşmadığının kontrolü için %1 lik jelde yürütülmüştür.

4.5. TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN TESPİTİ

Bu amaç için daha önce yapılan bir çalışma kapsamında elde edilen MeJa uygulaması sonrası 3., ve 9. saatlerde hasat edilen morfince zengin haşhaş çeşidinin kapsülüne ait küçük RNA kütüphanelerine ait diziler kullanılmıştır. Okumalar Roche 454-GS FLX+

platformu kullanılarak elde edilmiştir. Bitki WRKY transkripsiyon faktörlerine ait veritabanları indirilmiştir ve okumalardan elde edilen diziler Linux tabanlı Blast programı kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda e-değeri $1e^{-10}$ ve üzerinde homoloji gösteren bölgeler, potansiyel haşhaş WRKY transkripsiyon faktörü dizisi olarak belirlenmiştir.

4.6. PRİMER TASARIMI

Belirlenen transkripsiyon faktörlerine Primer3 programı (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) kullanılarak uygun parametreler ile primer tasarlanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4. 1. qRT-PZR’de kullanılan primerler ve bağlanma sıcaklıkları.

Gen	Primer	Dizi	Sıcaklık
WRKY 16	44379 İleri 44379 Geri	5'-AGTCTTCCTCCTTCCATTTGA-3' 5'-ACTTTAATCGTCCTCTTCAACC-3'	51 °C
WRKY 17	58598 İleri 58598 Geri	5'-AGGGTGAAGAACGATATGATG-3' 5'-GACTCTAAATCCTCCTCCTCT-3'	51 °C
WRKY24	56885 İleri 56885 Geri	5'-TGCAACGTGAAGAAGCAGG-3' 5'-AGCGCAATCCATGAGCTTC-3'	55 °C
WRKY59	64350 İleri 64350 Geri	5'-TTCCAGCTAGTTAGTGGCTC-3' 5'-ATTGCAGGGACTTTGATAGAC-3'	58 °C
WRKY61	39246 İleri 39246 Geri	5'-TCAGGTGTTAGGAGAGATCAG-3' 5'-CTCACTGGTTGTTTGTACAATG-3'	51 °C
WRKY82	58284 İleri 58284 Geri	5'-ATAGAGGAGCACACAGTCATG-3' 5'-CAATCACTTGAGCAAAAGAGCT-3'	51 °C

4.7. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Kantitatif PZR reaksiyonlarına başlamadan önce primerlerin çalışma koşullarının optimizasyonu için öncelikle semi-kantitatif PZR reaksiyonu yapılmıştır (Şekil 4.3). PZR reaksiyonu, 200 µM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 ünite DNA polimeraz, 1X tampon çözeltisi, 100 ng DNA ve her bir primerden 0,5 µM olacak şekilde, toplamda 20 µL hacimde hazırlanmıştır. PZR programı, tek döngü 95 °C 1,5 dk., 35 döngü; 95 °C 40 sn.,

her bir primer için belirlenen uzama sıcaklığında 45 sn., 72 °C 1,5 dk ve tek döngü 72 °C 10 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. PZR ürünleri %1,5'luk agaroz jel üzerinde görüntülenmiştir.



Şekil 4. 3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) cihazı.

4.8. GERÇEK ZAMANLI qRT-PCR UYGULAMALARI

Gen ifadesi analizleri için Roche LightCycler 480 (Roche, Germany) cihazı (Şekil 4.4) ve SYBR Green I Master kit (Roche, Germany, kat. No: 04707516001) kullanılmıştır (130). qRT-PCR deneyleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Öncelikle her bir örnekteki RNA miktarı *P.somniferum* 18S rRNA primerleri (18S rRNA (1706662) İleri 5'-TTTGACTCAACACGGGGAAA-3, 18S rRNA (1706663) Geri 5'-CAGACAAATCGCTCCACCAA-3) kullanılarak normalize edilmiştir. Verilerin analizi için 'threshold' (Ct) değeri alınmıştır. Reaksiyon (1X için), 96 kuyucuklu optik plâtelere 10 µl FastStart SYBR Green I Master Mix (2X, Roche Applied Science, Penzberg, Germany), 0,1 µl İleri (Forward) primer (100 pmol), 0,1 µl Geri (Reverse) primer (100 pmol), 2 µl cDNA ve 7,8 µl nükleaz içermeyen su (PCR Grade) kullanılarak toplam hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Ölçümlerin fluoresan sinyalleri 530 nm'de kaydedilmiş ve "Roche Light Cycler 480 Software" yazılımı aracılığı ile analiz edilmiştir. PZR sonucunda her bir örnek için Ct (Cycle Treshold - Eşik Döngü) değerleri elde edilmiştir. Her bir transkripsiyon faktörüne ait ifade değeri 18S geni ile normalize edilmiş ve ardından

transkripsiyon faktörlerinin anlatım düzeyleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu (131) kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 4. qRT-PZR (Gerçek zamanlı PZR) cihazı.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. RNA İZOLASYONU, MİKTAR VE KALİTE TAYİNİ

Bu tez kapsamında MeJA uygulaması sonrasında 3. ve 9. saatlerde morfin ve noskapin üretimi indüklenmiş uygulama yapılmış ve MeJA uygulaması yapılmamış kontrol bitkisinin kapsül dokusundan örnekler alınarak Trizol protokolüne (129) göre izole edilen total RNA örnekleri Nanodrop 1000 cihazı ile saflık ve konsantrasyon tayinleri yapılmıştır.

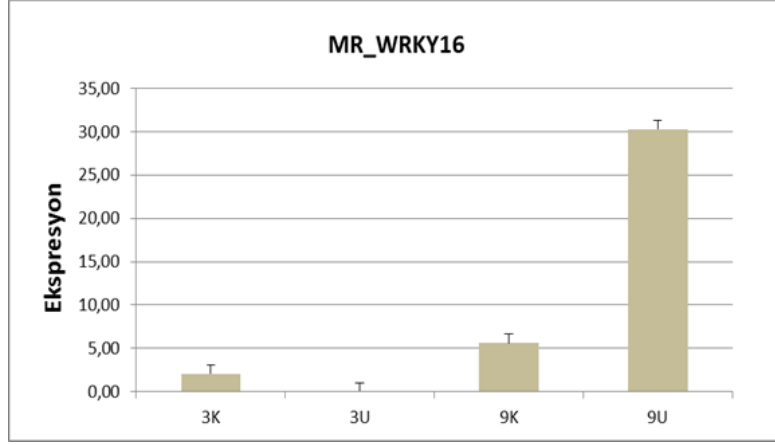
Çizelge 5. 1. RNA örneklerinin NanoDrop 1000 cihazından elde edilen ölçüm değerlerinden bazıları.

Örnekler	Morfince Zengin Bitki			Noskapince Zengin Bitki		
	Nük. asit kons. (ng/µl)	260/280	260/230	Nük. asit kons. (ng/µl)	260/280	260/230
3. saat kontrol	644,2	2,1	2,08	976,4	2,1	1,91
3. saat uygulama	1403,6	2,14	2,13	1556,4	2,15	2,1
9. saat kontrol	1579,7	2,18	2,05	558,8	1,80	2,12
9. saat uygulama	658,1	1,97	1,75	748,2	2,16	2,1

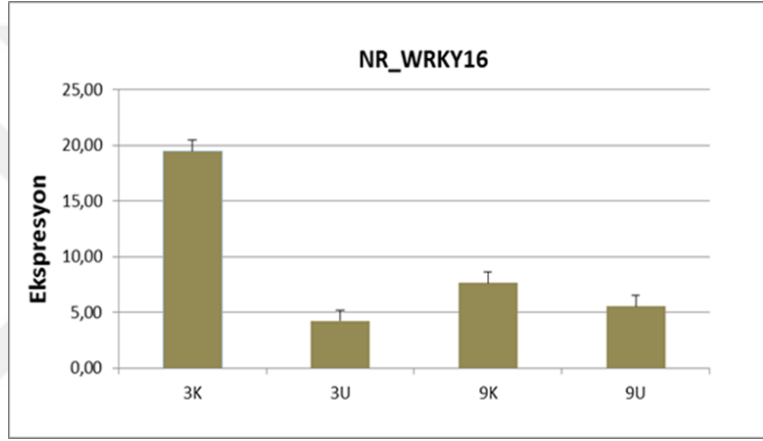
Örneklere ait nanodrop sonuçları olarak; 260/280 oranı 1,80-2,18; 260/230 oranı ise 1,75-2,13 değerleri arasında sonuç göstermiştir (Çizelge 5.1). Aynı zamanda kalitatif analiz için RNA örnekleri %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Ayrıca, Genel olarak her iki zaman dilimine ait RNA kalitesini gösteren parametrelerin birbirine oldukça benzer olduğu ve qRT-PZR yöntemi için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

5.2. EŞ ZAMANLI PZR İLE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN İFADE SEVİYELERİNİN ANALİZİ

Stres koşullarında etkili oldukları bilinen *WRKY16*, *WRKY17*, *WRKY24*, *WRKY59*, *WRKY61* ve *WRKY82* transkripsiyon faktörleri seçilmiştir. Bu transkripsiyon faktörlerinin ifade değişimleri, üç farklı biyolojik tekrar kullanılarak eş zamanlı PZR yöntemi ile Roche LightCycler 480 (Roche, Germany) cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu sayede morfin ile noskapince zengin bitkilerde belirlenen transkripsiyon faktörleri ile ilişkili genlerin ifadelerindeki değişiklikler belirlenmiş ve farklılıklar karşılaştırılmıştır.

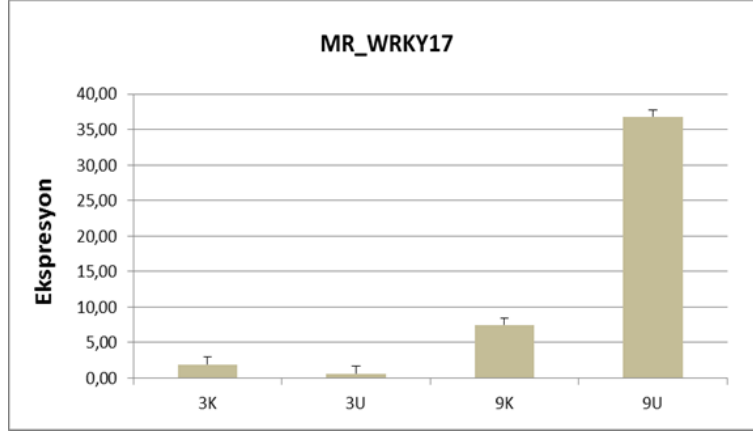


Şekil 5. 1. Morfince zengin haşaşaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY16 genine ait ifade seviyeleri.
K: Kontrol, U: Uygulama



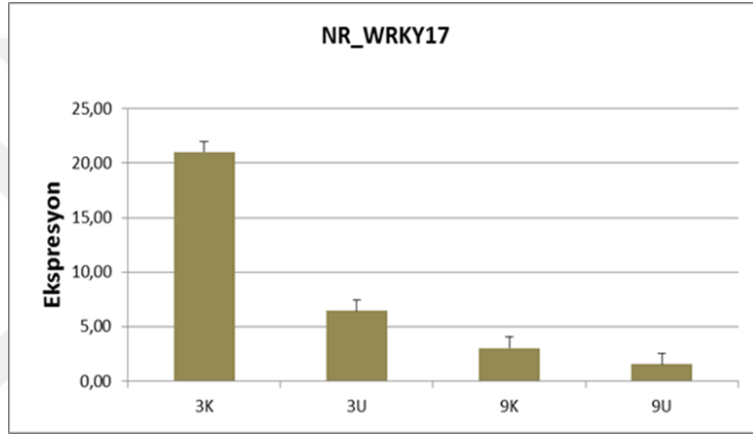
Şekil 5. 2. Noskopince zengin haşaşaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY16 genine ait ifade seviyeleri.
K: Kontrol, U: Uygulama

Şekil 5.1 ve 5.2'de sırasıyla morfince ve noskapince zengin bitkilerde WRKY16 transkripsiyon faktörüne ait genin ifade seviyeleri gösterilmektedir. Morfince zengin (Şekil 5.1) bitkide 3. saate ait sonuçlar kendi içinde kıyaslandığında, uygulama yapılmış bitkide kontrol bitkisine göre gen ifadesinde azalma görülmüştür. 9. saate ait kontrol ve uygulama sonuçları kendi içinde değerlendirildiğinde uygulama yapılmış bitkilerde kontrol bitkilerine göre gen ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, 9. saatte hasat edilmiş bitkilerde 3. saatte hasat edilmiş bitkilere oranla gen ifadesinde genel bir artış bulunmaktadır. Noskopince zengin bitkide ise 3.saat kontrol ve uygulama ile 9. saat kontrol ve uygulama sonuçları birbirine kıyaslandığında ve kendi içinde değerlendirildiğinde uygulama yapılmış bitkilerde kontrollere göre WRKY16 gen ifade seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca 9. saatte hasat edilmiş bitkilerde 3. saatte hasat edilmiş bitkilere oranla ifade seviyesinde bir azalma olduğu saptanmıştır (Şekil 5.2).



Şekil 5. 3. Morfince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY17 genine ait ifade seviyeleri.

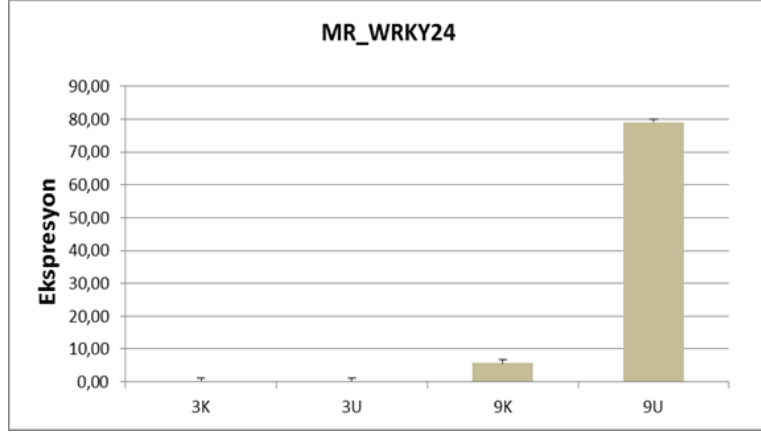
K: Kontrol, U: Uygulama



Şekil 5. 4. Noskopince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY17 genine ait ifade seviyeleri.

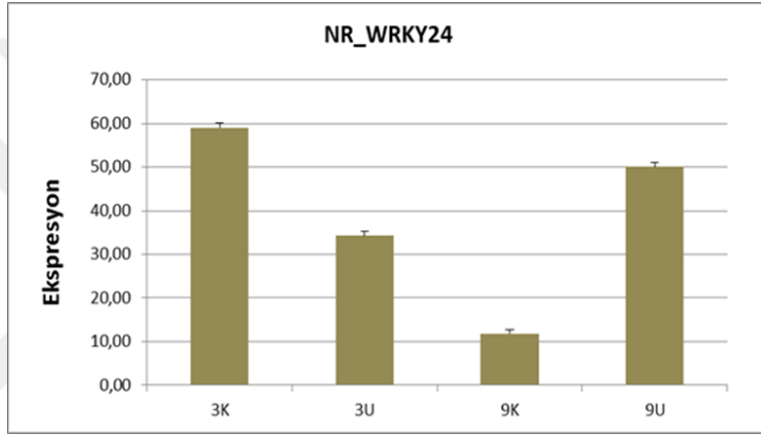
K: Kontrol, U: Uygulama

Şekil 5.3 ve 5.4'de sırasıyla morfince ve noskapince zengin bitkilerde WRKY17 transkripsiyon faktörüne ait genlerin ifade seviyeleri gösterilmektedir. Morfince zengin bitkide (Şekil 5.3) 3. saate ait veriler kendi içinde kıyaslandığında, uygulama yapılmış bitkide kontrol bitkisine göre gen ifadesinde azalma görülmüştür. 9. saate ait kontrol ve uygulama sonuçları kendi içinde değerlendirildiğinde ise uygulama yapılmış bitkilerde kontrol bitilerine göre gen ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, 9. saatte hasat edilmiş bitkilerde, 3. saatte hasat edilmiş bitkilere oranla gen ifadesinde genel bir artış bulunmaktadır. Noskopince zengin bitkide ise 3.saat kontrol ve uygulama ile 9. saat kontrol ve uygulama sonuçları birbirine kıyaslandığında ve kendi içinde değerlendirildiğinde uygulama yapılmış bitkilerde kontrollere göre WRKY17 gen ifade seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca 9. saatte hasat edilmiş bitkilerde 3. saatte hasat edilmiş bitkilere oranla ifade seviyesinde azalma olduğu saptanmıştır (Şekil 5.4).



Şekil 5. 5. Morfince zengin haşaşa bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY24 genine ait ifade seviyeleri.

K: Kontrol, U: Uygulama

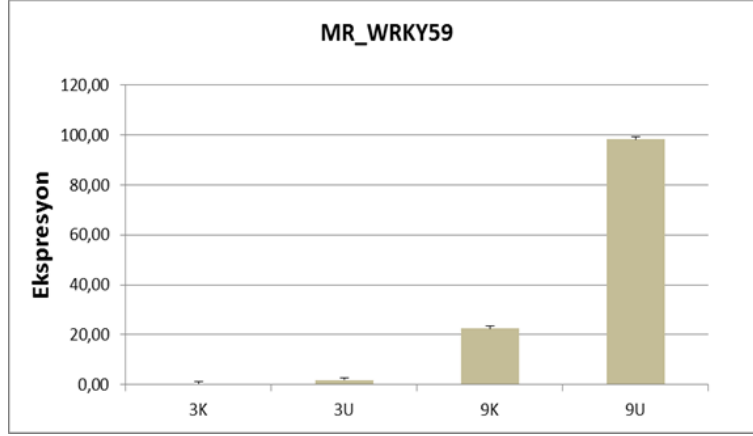


Şekil 5. 6. Noskapince zengin haşaşa bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY24 genine ait ifade seviyeleri.

K: Kontrol, U: Uygulama

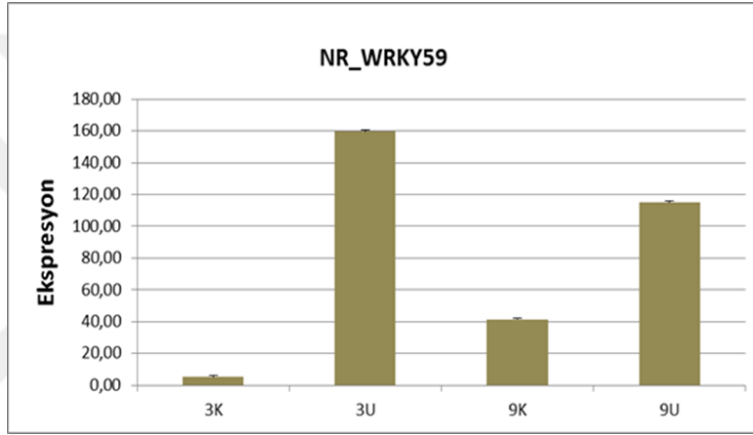
Şekil 5.5 ve 5.6'da sırasıyla morfince ve noskapince zengin bitkilerde WRKY24 transkripsiyon faktörüne ait genlerin ifade seviyeleri gösterilmektedir. Morfince zengin (Şekil 5.5) bitkide 3. saate ait sonuçlar kendi içinde kıyaslandığında, uygulama yapılmış bitkide kontrol bitkisine göre gen ifadesinde belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak, 9. saate ait kontrol ve uygulama sonuçları kendi içinde değerlendirildiğinde uygulama yapılmış bitkilerde kontrol bitkilerine göre gen ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, 9. saatte hasat edilmiş bitkilerde 3. saatte hasat edilmiş bitkilere oranla gen ifadesinde genel bir artış bulunmaktadır.

Noskapince zengin bitkide ise 3. saat kontrol ve 3. saat uygulama kendi içinde kıyaslandığında kontrol bitkisine göre uygulamada azalma olduğu görülürken, 9. saat kontrol ve uygulama sonuçları WRKY24 ifade seviyeleri açısından kendi içinde kıyaslandığında 9. saatte 3. saate oranla bir artış olduğu saptanmıştır (Şekil 5.6).



Şekil 5. 7. Morfince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY59 genine ait ifade seviyeleri.

K: Kontrol, U: Uygulama

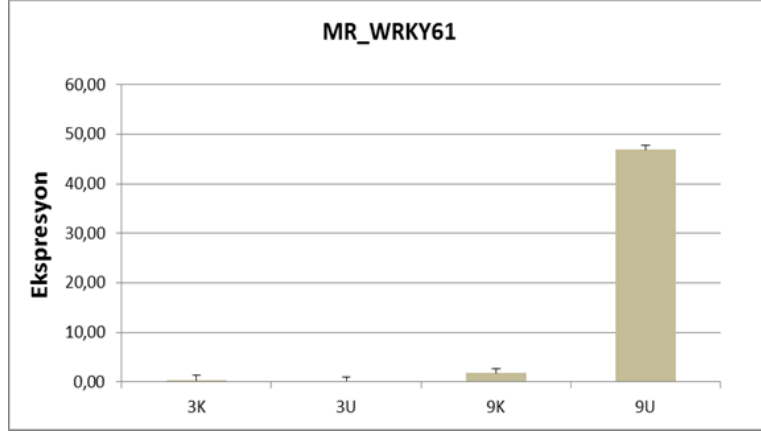


Şekil 5. 8. Noskapince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY59 genine ait ifade seviyeleri.

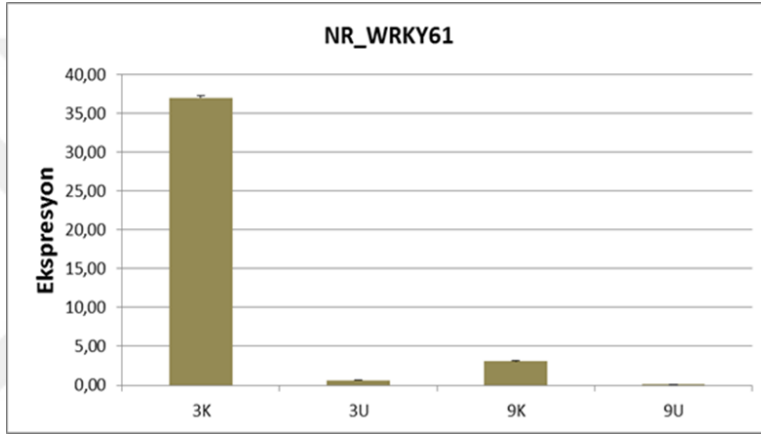
K: Kontrol, U: Uygulama

Şekil 5.7 ve 5.8'de sırasıyla morfince ve noskapince zengin bitkilerde WRKY59 transkripsiyon faktörüne ait genlerin ifade seviyeleri gösterilmektedir. Morfince zengin bitkide (Şekil 5.7) 3. saate ait veriler kendi içinde kıyaslandığında, uygulama yapılmış bitkide kontrol bitkisine göre gen ifadesinde artış olduğu görülmüştür. 9. saate ait kontrol ve uygulama sonuçları kendi içinde değerlendirildiğinde ise uygulama yapılmış bitkilerde kontrol bitilerine göre gen ifadesinde yine bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, 9. saate hasat edilmiş bitkilerde, 3. saate hasat edilmiş bitkilere oranla gen ifadesinde genel bir artış bulunmaktadır.

Noskapince zengin bitkide ise veriler değerlendirildiğinde hem 3 saat hemde 9 saat uygulama yapılmış bitkilerde, kontrol bitkilerine göre WRKY59 gen ifade seviyesinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 5.8).

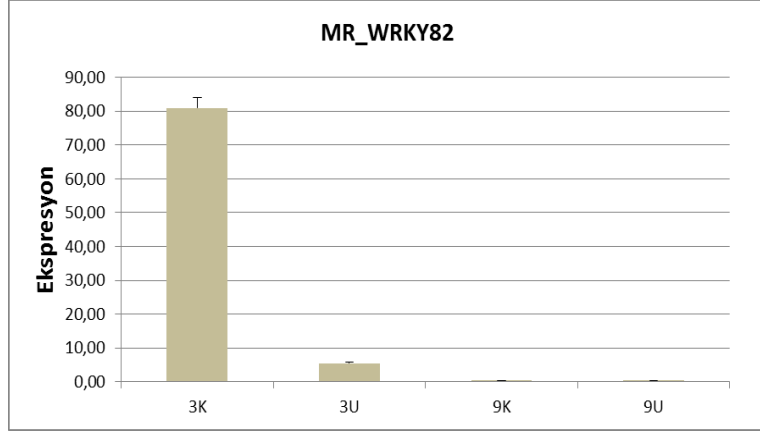


Şekil 5. 9. Morfince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY61 genine ait ifade seviyeleri.
K: Kontrol, U: Uygulama

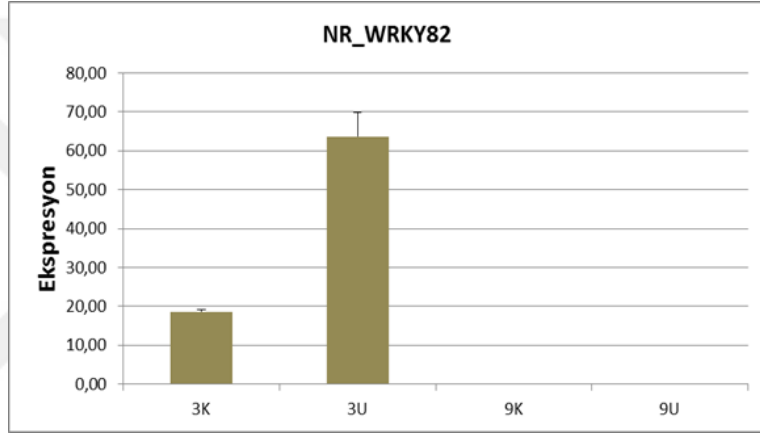


Şekil 5. 10. Noskapince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY61 genine ait ifade seviyeleri.
K: Kontrol, U: Uygulama

Şekil 5.9 ve 5.10'de sırasıyla morfince ve noskapince zengin bitkilerde WRKY61 transkripsiyon faktörüne ait genlerin ifade seviyeleri gösterilmektedir. Morfince zengin (Şekil 5.9) bitkide 3. saate ait sonuçlar kendi içinde kıyaslandığında, uygulama yapılmış bitkide kontrol bitkisine göre gen ifadesinde belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak, 9. saate ait kontrol ve uygulama sonuçları kendi içinde değerlendirildiğinde uygulama yapılmış bitkilerde kontrol bitkilerine göre gen ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, 9. saatte hasat edilmiş bitkilerde 3. saatte hasat edilmiş bitkilere oranla gen ifadesinde genel bir artış bulunmaktadır. Noskapince zengin bitkide ise 3.saat kontrol ve uygulama ile 9. saat kontrol ve uygulama sonuçları birbirine kıyaslandığında ve kendi içinde değerlendirildiğinde her iki saatte de uygulama yapılmış bitkilerde kontrollere göre WRKY61 gen ifade seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca 9. saatte hasat edilmiş bitkilerde 3. saatte hasat edilmiş bitkilere oranla ifade seviyesinde bir azalma olduğu saptanmıştır (Şekil 5.10).



Şekil 5. 11. Morfince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY82 genine ait ifade seviyeleri.
K: Kontrol, U: Uygulama



Şekil 5. 12. Noskapince zengin haşhaş bitkisinde MeJA uygulanması sonucu 3. ve 9. saat bitki örneklerinde elde edilen WRKY82 genine ait ifade seviyeleri
K: Kontrol, U: Uygulama

Şekil 5.11 ve 5.12’de sırasıyla morfince ve noskapince zengin bitkilerde WRKY82 transkripsiyon faktörüne ait genlerin ifade seviyeleri gösterilmektedir. Morfince zengin (Şekil 5. 11) bitkide 3. saate ait sonuçlar kendi içinde kıyaslandığında, uygulama yapılmış bitkide kontrol bitkisine göre gen ifadesinde belirgin bir düşüş gözlemlenmektedir. Ancak, 9. saate ait kontrol ve uygulama sonuçları değerlendirildiğinde uygulama yapılmış bitkilerde kontrol bitkilerine göre gen ifadesinde belirgin bir değişiklik saptanamamıştır. Noskapince zengin bitkide ise 3. saate ait sonuçlar kendi içinde kıyaslandığında, uygulama yapılmış bitkide kontrol bitkisine göre gen ifadesinde belirgin bir artış gözlemlenirken, 9. saat kontrol ve uygulama sonuçları kendi içinde kıyaslandığında WRKY82 gen ifade seviyesinde belirgin bir değişiklik saptanamamıştır. Ayrıca 9. saate hasat edilmiş bitkilerde 3. saate hasat edilmiş bitkilere oranla ifade seviyesinde genel bir azalma olduğu saptanmıştır (Şekil 5. 12).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. WRKY TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN İFADE PROFİLİ

Transkripsiyon faktörü olarak WRKY proteinleri biyotik ve abiyotik stres yanıtı, hormon cevapları ve bitki gelişimini de içeren çeşitli fizyolojik olaylarda rol oynamakta olup (132) çeşitli bitkilerde WRKY transkripsiyon faktörlerinin biyotik ve abiyotik stres cevabındaki rolleri üzerine çalışmalar yapılmış (133) olmasına rağmen haşhaş bitkisinde yapılmış çalışma bulunmamaktadır.

Biyotik stres uygulanmış domates bitkisinde yapılan bir çalışmada, *TSWV* (tomato spotted wild virüs) enfeksiyonu sonrasında bir dizi WRKY transkripsiyon faktörünün farklı şekillerde ifadelendiği gösterilmiştir (134). Bu WRKY'ler içinde *WRKY16* geninin, virüs enfeksiyonuna ve diğer biyotik stres koşullarına karşı en çok ifade olan genlerden birisi olduğu bulunmuştur. Ayrıca diğer bir çalışmada *Solanum lycopersicum*'da ToLCNDV enfeksiyonunun, kontrol bitkisine kıyasla *WRKY16* ifade seviyesinde 14.2 kat artışa yol açtığı gösterilmiştir (135). WRKY transkripsiyon faktörleri SA-bağımlı savunma yanıtlarının önemli düzenleyicileri olup (136, 137) *Arabidopsis*'te *WRKY17* geninin SA/JA etkileşiminde görev aldığı gösterilmiştir. *WRKY17*'nin susturulduğu bir mutantta, SA-yanıt gen transkriptlerinin yüksek seviyede biriktirildiği, JA-yanıt genlerinin ise oldukça düşük olduğu bulunmuştur (138). *Coffe canephora* *CcWRKY17* geninin sarı pas hastalığı, MeJa ve SA uygulamasına karşı oldukça aktive edildiği, yaralanma, meyve olgunlaşması ve nematod uygulamasından sonra ise kısmen aktiflendiği bulunmuştur (120). *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışma ise *WRKY17* geninde oluşturulan mutasyonların, *Pseudomonas syringae* enfeksiyonuna karşı direnci arttırdığını ortaya çıkartmıştır. Çalışma *WRKY17* geninin *P. syringae*'ye karşı bitki direncinin negatif düzenleyicisi olduğunu göstermiştir (139). "Stres hormonu" olarak da adlandırılan ABA, abiyotik stres koşullarına karşı bitki yanıtında aracılık etmektedir. *Oriza sativada* alevron hücrelerin kullanılarak yapıldığı bir gen ifadesi çalışmasında, *OsWRKY24* transkripsiyon faktörünün bir ABA-indüklenebilir promotörünün baskılayıcısı olarak davrandığı bulunmuştur (122, 140). ABA, GA ve ABA+GA uygulamaları yapılmış pirinç bitkisinde, *OsActin1* geni referans alınarak yapılan northern blot çalışmasında alevron hücrelerde *OsWRKY24* geninin mRNA sinyalleri ölçülebilir düzeyde bulunmuştur. ABA muamelesinin *OsWRKY24* transkriptlerini arttırdığı, GA'nın ise 4. ve 24. saat uygulamalar sonrasında *OsWRKY24* geninin ifade seviyesinin azalmasına yol açtığı saptanmıştır. Bu çalışma *OsWRKY24* geninin ABA'ya

yanıt veren bir gen olduğunu göstermektedir (140). Ayrıca *OsWRKY24* geninin kuraklık stresinde az ifade olduğu fakat bakteriyal strese daha fazla ifade olduğu bulunmuştur. Sistemik kazanılmış direnç (SAR), patojenlere karşı uyarılabilir bir bitki savunma yanıtıdır. *Arabidopsis*'te SAR'ın başlangıcı sinyal molekül olan salisilik asitin (SA) birikimiyle başlatılır. SA hastalık direnci için ihtiyaç duyulan çoğu geni aktive etmek için transkripsiyon kofaktör *NPRI*'in nüklear translokasyonunu teşvik eder (136, 141). *NPRI*'in ifadesinin WRKY transkripsiyon faktörlerinin regülasyonu altında olduğu gösterilmiştir (142). Yapılan diğer bir çalışmada *WRKY59* geninin SA-bağımlı savunmada ve *NPRI* in direkt hedefleri olduğu tanımlanmıştır (136). Ayrıca *WRKY59*, SA-indüklenebilir savunmada önemli bir rol oynamaktadır (143). Çeltik bitkisinde yapılan bir çalışmada fungal bir patojen olan *Magnaporthe grisea* enfeksiyonunun *WRKY61* genini de içeren 23 adet WRKY genini (133) aktive ettiği ve gen ifadesinde en az 7 kat artış olduğu gösterilmiştir (144). Nematodlar (RKN Root-Knot Nematode) ile uygulama yapılmış *Solanum lycopersicum* ile yapılan diğer bir çalışmada nematod savunmasında *WRKY61* genlerinin aşırı regüle edildiği bulunmuştur (145). *Magnaporthe grisea* ile enfekte edilmiş yapraklardan izole edilen *OsWRKY82* geni ile ilgili yapılmış bir çalışmada *OsWRKY82* geninin transkript seviyesi, gövde, yaprak ve çiçeklerde taneciklere oranla daha yüksek bulunmuştur. Çalışmada metil jasmonat ve etefon uygulaması ile *OsWRKY82* geni yüksek seviyede ifade edilirken, salisilik asit uygulaması gen ifadesi üzerinde bir etki göstermemiştir. Ayrıca, *OsWRKY82* transkriptleri, yaralanma ve ısı şoku tarafından uyarılabilirken, absisik asit (ABA), soğuk, yüksek tuzluluk ve dehidratasyon ile uyarılmadığı gösterilmiştir. Buna karşılık, gibberellin (GA) *OsWRKY82* ifadesini baskılamaktadır. Bu bulgular, *OsWRKY82*'nin hem biyotik hem de abiyotik stres koşullarına yanıt veren bir gen olduğunu ve patojenlere karşı savunma cevabının düzenlenmesinde rol alabildiğini göstermektedir. Ayrıca JA/Etilen-bağımlı sinyal yolağı tarafından gerçekleşen abiyotik strese karşı tolerasyonu sağlamaktadır. Bu olayların altında yatan moleküler mekanizmalar transgenik analizler ile aydınlatılabilir (146). Başka bir çalışmada, yapay elisitör uygulaması yapılan haşhaşa, 6. ve 9. saatlerde uygulama yapılmayan bitkilere göre bitki savunmasında rolleri olduğu düşünülen morfin ve noskapin gibi bazı alkaloidlerin daha fazla miktarda sentezlendiğini göstermektedir. Ayrıca morfin alkaloidi için 9. saat uygulama yapılan bitkide 6. saat uygulamaya göre daha fazla morfin sentezlenirken, noskapin seviyesindeki değişim için, her iki zaman dilimi arasında net bir farklılık saptanmamıştır (55).

Bu tez çalışmasında da morfince ve noskapince zengin *Papaver somniferum* L. genotiplerinde biyotik ve abiyotik stres koşullarında etkili olduğu daha önceki çalışmalarla ortaya konmuş olan *WRKY16*, *WRKY17*, *WRKY24*, *WRKY59*, *WRKY61* ve *WRKY82* transkripsiyon faktörlerinin 3. ve 9. saat MeJa uygulaması sonrasında ifade seviyeleri ortaya konmuştur. Morfince zengin bitkide *WRKY16*, *WRKY17*, *WRKY24*, *WRKY59* ve *WRKY 61* genlerinin ifade seviyelerinde kontrol bitkisine göre 9. saatde literatürlerle uyumlu bir şekilde anlamlı derecede artış bulunmuştur. Bununla birlikte Noskapince zengin genotipte *WRKY16*, *WRKY17* ve *WRKY61* genleri, morfince zengin bitkiye oranla 3. saat kontrol bitkilerinde fazla, uygulama yapılmış bitkilerde ise daha az ifade olmuştur. Bunun nedeni adı geçen *WRKY* transkripsiyon faktörlerinin stres koşullarına karşı farklı mekanizmalar üzerinden etki etmesi olarak gösterilebilir. Ayrıca, Noskapince zengin çeşitte 3. saat uygulama yapılmış bitkilerde kontrol bitkisine oranla *WRKY59* ve *WRKY82* genlerinin ifade düzeylerindeki artış, daha önce yapılmış araştırmaların bulgularını destekler şekildedir. Yapay elisitör uygulamasına karşı genlerin ifade seviyelerinde ortaya çıkan farklılıklar, bu genlerin hem biyotik hem de abiyotik stres koşullarına yanıt veren genler olduğunu ve patojenlere karşı savunma cevabının düzenlenmesinde rol alabildiğini göstermektedir.

6.2. SONUÇ

Haşhaş bitkisi, sahip olduğu farmakolojik özellikleri dolayısıyla hakkında çok fazla sayıda çalışma yapılmış ve yapılmakta olan tıbbi bir bitkidir. Haşhaşta üretilen BIA'ların biyosentezi ile ilgili çok fazla araştırma yapılmış olmasına rağmen bu mekanizmanın nasıl işlediği hala tam olarak anlaşılamamıştır.

Bu tez kapsamında da, Eş zamanlı PZR teknolojisi kullanılarak fazla miktarda morfin ve noskabin üretimine sahip haşhaş bitkisinin kapsül dokusuna MeJA muamelesi yapıldıktan 3 ve 9 saat sonrasında belirlenen *WRKY* genlerinde ifade seviyelerindeki farklılıklar ortaya konmuştur. Bu bağlamda elde edilen sonuçlar, çeşitli stres koşulları ve elisitör uygulamaları sonrasında, bitkide miktarının değiştiği belirlenmiş olan alkaloidlerin sentezinde yer alan mekanizmaların düzenlenmesinde *WRKY* transkripsiyon faktörlerinin rol aldığını düşündürmektedir.

Haşhaş bitkisinde, belirlenen *WRKY* genlerinin elisitör uygulaması sonrasında ifade profili ortaya konması, bu çalışmanın bu bağlamda özgün olduğunu ortaya koymaktadır. Böylece ilk kez, haşhaş bitkisinde *WRKY* transkripsiyon faktörlerinin bu yollarda düzenleyici rol

oynayabilen proteinler olduğu gösterilmiştir. Yapılan alışma haşhaş bitkisinde temel ve önemli alkaloitlerin biyosentez mekanizmalarının genetik temellerinin ortaya çıkarılmasında ve alkaloit yolaklarının aydınlatması bakımından önemli katkılar sağlayabilecektir. İşlevsel genomik yöntemlerinin belirlenen genlere uygulanmasıyla a) morfin ve noskapin biyosentez mekanizmaları daha iyi açıklanabilir, b) BIA biyosentezi moleküler olarak aydınlatılabilir, c) BIA biyosentezinin düzenlenme mekanizmaları açıklanabilir c) belirlenen transkripsiyon faktörlerinin moleküler yolaklardaki rolleri belirlenebilir, d) transgenik-olmayan ve transgenik yöntemler ilgili BIA'ların sentezini arttırmak amacıyla kullanılabilir. Yapılan bu çalışma ile haşhaşta bitkisinde ve BIA üreten diğer türlerde temel ve önemli alkaloitlerin biyosentez mekanizmalarının genetik temellerinin ortaya konulmasında ve alkaloit yolaklarının daha açıklayıcı hale gelmesinde önemli katkılar sağlayabilecek gelecekte fonksiyonel çalışmalar ile WRKY proteinlerinin etkilediği hedef genler belirlenerek haşhaş genotiplerinde sekonder metabolit içeriğinin artırılarak yeni genotipler geliştirilmesine olanak sağlanabilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Schäfer H, Wink M. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology journal*. 2009;**4**(12):1684-703.
2. VanEtten H, Temporini E, Wasmann C. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2001;**59**(2):83-93.
3. Mazid M, Khan T, Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and medicine*. 2011;**3**(2):232-49.
4. Desgagné-Penix I, Farrow SC, Cram D, Nowak J, Facchini PJ. Integration of deep transcript and targeted metabolite profiles for eight cultivars of opium poppy. *Plant molecular biology*. 2012;**79**(3):295-313.
5. Lee E-J, Facchini PJ. Tyrosine aminotransferase contributes to benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant physiology*. 2011;**157**(3):1067-78.
6. Beaudoin GA, Facchini PJ. Benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*. 2014;**240**(1):19-32.
7. Hagel JM, Facchini PJ. Benzyloquinoline alkaloid metabolism—a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*. 2013:pct020.
8. Garnock-Jones P, Scholes P. Alkaloid content of *Papaver somniferum* subsp. *setigerum* from New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*. 1990;**28**(3):367-9.
9. Ye K, Ke Y, Keshava N, et al. Opium alkaloid noscapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apoptosis in dividing cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;**95**(4):1601-6.
10. Toprak Mahsulleri Ofisi YR. 2014.
11. Günel T, Aydın K. “Real-Time PCR” ve Uygulama Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. 2009;**2**(2):43-5.
12. Kato N, Dubouzet E, Kokabu Y, et al. Identification of a WRKY protein as a transcriptional regulator of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *Plant and cell physiology*. 2007;**48**(1):8-18.
13. Parmaksız İ, Önen H, Yıldırım A, Gümüşcü A, İpek A, Arslan N. Türkiye Doğal Florasında Yetişen *Papaver* Cinsi *Oxytona* Seksiyonuna Ait Gen Havuzunun RAPD ve SSR Teknikleriyle Genetik Karakterizasyonu, Morfolojik ve Alkaloit

- Kompozisyonlarının Kromozom Sayılarıyla İlişkilendirilmesi. Ankara Tübitak. 2009;**105**.
14. Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E, Tohumlu Bitkiler Sistematığı EÜF. Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116 (Ders Kitabı), 4. Baskı, Bornova-İZMİR. 1995.
 15. Osbourn AE, Lanzotti V. Plant-derived natural products: Springer; 2009.
 16. Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*. 2000;**24**:1250-319.
 17. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 2003;**64**(1):3-19.
 18. Wink M. Introduction. *Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*, Second edition. 2010:1-20.
 19. De Luca V, St Pierre B. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in plant science*. 2000;**5**(4):168-73.
 20. Courtwright DT. *Forces of habit: Drugs and the making of the modern world*: Harvard University Press; 2009.
 21. Hegnauer R. The taxonomic significance of alkaloids. *Chemical plant taxonomy*. 1963:389-427.
 22. Weid M, Ziegler J, Kutchan TM. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;**101**(38):13957-62.
 23. Aniszewski T. *Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*: Elsevier; 2007.
 24. Grinkevich N, Safronich L. *Chemical analysis of medicinal plants*. Vysshaya Shkola, Moscow. 1983:170-2.
 25. Orekhov AP. *The Chemistry of the Alkaloids*. Izd Akad Nauk SSSR, Moscow. 1955:128.
 26. Roberts MF. *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*: Springer Science & Business Media; 2013.
 27. Gürkök T, Parmaksız I, Boztepe G, Kaymak E. Alkaloid Biosynthesis Mechanism in Opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Electronic Journal of BioTechnology*. 2010;**1**(2):31-45.

28. Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annu Rev Plant Biol.* 2008;**59**:735-69.
29. Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual review of plant biology.* 2001;**52**(1):29-66.
30. Frick S, Kramell R, Schmidt J, Fist AJ, Kutchan TM. Comparative Qualitative and Quantitative Determination of Alkaloids in Narcotic and Condiment *Papaver somniferum* Cultivars. *Journal of natural products.* 2005;**68**(5):666-73.
31. Facchini PJ, Hagel JM, Liscombe DK, et al. Opium poppy: blueprint for an alkaloid factory. *Phytochemistry Reviews.* 2007;**6**(1):97-124.
32. Pienkny S, Brandt W, Schmidt J, Kramell R, Ziegler J. Functional characterization of a novel benzyloquinoline O-methyltransferase suggests its involvement in papaverine biosynthesis in opium poppy (*Papaver somniferum* L). *The Plant Journal.* 2009;**60**(1):56-67.
33. Ounaroon A, Decker G, Schmidt J, Lottspeich F, Kutchan TM. (R, S)-Reticuline 7-O-methyltransferase and (R, S)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase of *Papaver somniferum*—cDNA cloning and characterization of methyl transfer enzymes of alkaloid biosynthesis in opium poppy. *The Plant Journal.* 2003;**36**(6):808-19.
34. Gürkök T. Morfin İçeriği İndüklenmiş Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Bitkisinde Genom Düzeyinde Transkriptom Analizi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 2013:340 sayfa.
35. Dittrich H, Kutchan TM. Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1991;**88**(22):9969-73.
36. Rueffer M, Zenk M. Berberine synthase, the methylenedioxy group forming nzyme inberberine synthesis. *Tetrahedron letters.* 1985;**26**(2):201-2.
37. Bauer W, Stadler R, Zenk M. Peroxidase Catalyzed Dimerization and Demethylation of Protoberberine Alkaloids*. *Botanica acta.* 1992;**105**(5):370-4.
38. Rueffer M, Zenk MH. Canadine synthase from *Thalictrum tuberosum* cell cultures catalyses the formation of the methylenedioxy bridge in berberine synthesis. *Phytochemistry.* 1994;**36**(5):1219-23.
39. Theuns HG, Theuns HL, Lousberg RJC. Search for new natural sources of morphinans. *Economic Botany.* 1986;**40**(4):485-97.

40. 1953-01-01_3_page005.html. hwuoued-abb. 02. 12. 2015.
41. Gesell A, Rolf M, Ziegler J, Chávez MLD, Huang F-C, Kutchan TM. CYP719B1 is salutaridine synthase, the CC phenol-coupling enzyme of morphine biosynthesis in opium poppy. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;**284**(36):24432-42.
42. Ziegler J, Voigtländer S, Schmidt J, et al. Comparative transcript and alkaloid profiling in *Papaver* species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *The Plant Journal*. 2006;**48**(2):177-92.
43. Grothe T, Lenz R, Kutchan TM. Molecular characterization of the salutaridinol 7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum*. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;**276**(33):30717-23.
44. Lenz R, Zenk MH. Acetyl coenzyme A: salutaridinol-7-O-acetyltransferase from *Papaver somniferum* plant cell cultures: The enzyme catalyzing the formation of thebaine in morphine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;**270**(52):31091-6.
45. Fisinger U, Grobe N, Zenk MH. Thebaine synthase: a new enzyme in the morphine pathway in *Papaver somniferum*. *Natural Product Communications*. 2007;**2**(3):249-53.
46. Hagel JM, Facchini PJ. Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nature Chemical Biology*. 2010;**6**(4):273-5.
47. Unterlinner B, Lenz R, Kutchan TM. Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. *The Plant Journal*. 1999;**18**(5):465-75.
48. Larkin PJ, Miller JA, Allen RS, et al. Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. *Plant biotechnology journal*. 2007;**5**(1):26-37.
49. Kempe K, Higashi Y, Frick S, Sabarna K, Kutchan TM. RNAi suppression of the morphine biosynthetic gene salAT and evidence of association of pathway enzymes. *Phytochemistry*. 2009;**70**(5):579-89.
50. Mahmoudian M, Rahimi-Moghaddam P. The anti-cancer activity of noscapine: a review. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*. 2009;**4**(1):92-7.
51. Facchini PJ, De Luca V. Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *The Plant Cell*. 1995;**7**(11):1811-21.

52. Bird DA, Franceschi VR, Facchini PJ. A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *The Plant Cell*. 2003;**15**(11):2626-35.
53. Samanani N, Alcantara J, Bourgault R, Zulak KG, Facchini PJ. The role of phloem sieve elements and laticifers in the biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy†. *The Plant Journal*. 2006;**47**(4):547-63.
54. Lee E-J, Facchini P. Norcoclaurine synthase is a member of the pathogenesis-related 10/Bet v1 protein family. *The Plant Cell*. 2010;**22**(10):3489-503.
55. İnal B. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.)’da Tebain Üretim Mekanizmasının Yeni Nesil Dizileme Sistemi ile Transkriptom Düzeyinde İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Doktora Tezi. 2015:169 sayfa.
56. Decker G, Wanner G, Zenk MH, Lottspeich F. Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis*. 2000;**21**(16):3500-16.
57. Allen RS, Miller JA, Chitty JA, Fist AJ, Gerlach WL, Larkin PJ. Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression and RNAi suppression of salutaridinol 7-O-acetyltransferase in opium poppy. *Plant biotechnology journal*. 2008;**6**(1):22-30.
58. Onoyovwe A, Hagel JM, Chen X, Khan MF, Schriemer DC, Facchini PJ. Morphine biosynthesis in opium poppy involves two cell types: sieve elements and laticifers. *The Plant Cell*. 2013;**25**(10):4110-22.
59. Facchini PJ, De Luca V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *The Plant Journal*. 2008;**54**(4):763-84.
60. Terasaka K, Sakai K, Sato F, Yamamoto H, Yazaki K. *Thalictrum minus* cell cultures and ABC-like transporter. *Phytochemistry*. 2003;**62**(3):483-9.
61. Sakai K, Shitan N, Sato F, Ueda K, Yazaki K. Characterization of berberine transport into *Coptis japonica* cells and the involvement of ABC protein. *Journal of experimental botany*. 2002;**53**(376):1879-86.
62. Shitan N, Bazin I, Dan K, et al. Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;**100**(2):751-6.

63. Shitan N, Dalmas F, Dan K, et al. Characterization of *Coptis japonica* CjABCB2, an ATP-binding cassette protein involved in alkaloid transport. *Phytochemistry*. 2013;**91**:109-16.
64. Lee E-J, Hagel JM, Facchini PJ. Role of the phloem in the biochemistry and ecophysiology of benzyloquinoline alkaloid metabolism. *Frontiers in plant science*. 2013;**4**.
65. Hause B, Hause G, Kutter C, Miersch O, Wasternack C. Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant and Cell Physiology*. 2003;**44**(6):643-8.
66. Hancock RD, McRae D, Haupt S, Viola R. Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biology*. 2003;**3**(1):7.
67. Walz C, Giavalisco P, Schad M, Juenger M, Klose J, Kehr J. Proteomics of urcurbit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry*. 2004;**65**(12):1795-804.
68. Shitan N, Yazaki K. Accumulation and membrane transport of plant alkaloids. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2007;**8**(4):244-52.
69. Yıldız K, Yılmaz H. Jasmonatlar (Jasmonic acid and Methyl jasmonate) yeni bir bitkisel hormon grubu olabilir mi? *Derim*. 2001;**18**(2):89-95.
70. Bari R, Jones JD. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant molecular biology*. 2009;**69**(4):473-88.
71. Burhan Kaçar AVK, Şule Öztürk. *Bitki Fizyolojisi*. 2010.
72. Paponov IA, Paponov M, Teale W, et al. Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*. 2008;**1**(2):321-37.
73. Müller B, Sheen J. Advances in cytokinin signaling. *Science*. 2007;**318**(5847):68-9.
74. Siemens J, Keller I, Sarx J, et al. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2006;**19**(5):480-94.
75. MacMillan J. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2001;**20**(4):387-442.
76. Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, et al. An update on abscisic acid signaling in plants and more.... *Molecular plant*. 2008;**1**(2):198-217.
77. Mauch-Mani B, Mauch F. The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current opinion in plant biology*. 2005;**8**(4):409-14.

78. Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*. 2006;**126**(5):969-80.
79. Adie BA, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez MM, et al. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 2007;**19**(5):1665-81.
80. Bajguz A. Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2007;**45**(2):95-107.
81. Yi HC, Joo S, Nam KH, Lee JS, Kang BG, Kim WT. Auxin and brassinosteroid differentially regulate the expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant molecular biology*. 1999;**41**(4):443-54.
82. Muessig C, Lisso J, Coll-Garcia D, Altmann T. Molecular analysis of brassinosteroid action. *Plant Biology*. 2006;**8**(3):291-6.
83. Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. 2005;**43**:205-27.
84. Lorenzo O, Solano R. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current opinion in plant biology*. 2005;**8**(5):532-40.
85. Broekaert WF, Delauré SL, De Bolle MF, Cammue BP. The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol*. 2006;**44**:393-416.
86. Loake G, Grant M. Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Current opinion in plant biology*. 2007;**10**(5):466-72.
87. Balbi V, Devoto A. Jasmonate signalling network in Arabidopsis thaliana: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist*. 2008;**177**(2):301-18.
88. Grant M, Lamb C. Systemic immunity. *Current opinion in plant biology*. 2006;**9**(4):414-20.
89. Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Métraux J-P, Broekaert WF. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 1998;**10**(12):2103-13.
90. Thomma BP, Penninckx IA, Cammue BP, Broekaert WF. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current opinion in immunology*. 2001;**13**(1):63-8.
91. Creelman RA, Mullet JE. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;**92**(10):4114-9.

92. Kocaçalışkan İ. Bitki Fizyolojisi. 2008.
93. Creelman RA, Mulpuri R. The oxylipin pathway in Arabidopsis. The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists. 2002;**1**.
94. Creelman RA, Mullet JE. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual review of plant biology. 1997;**48**(1):355-81.
95. Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1992;**89**(6):2389-93.
96. Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. Trends in plant science. 2001;**6**(5):212-9.
97. Ng DW, Zhang C, Miller M, et al. cis-and trans-Regulation of miR163 and target genes confers natural variation of secondary metabolites in two Arabidopsis species and their allopolyploids. The Plant Cell. 2011;**23**(5):1729-40.
98. Tytgat TO, Verhoeven KJ, Jansen JJ, et al. Plants know where it hurts: root and shoot jasmonic acid induction elicit differential responses in Brassica oleracea. 2013.
99. Turner JG, Ellis C, Devoto A. The jasmonate signal pathway. The Plant Cell. 2002;**14**(suppl 1):S153-S64.
100. Radman R, Saez T, Bucke C, Keshavarz T. Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnology and Applied Biochemistry. 2003;**37**(1):91-102.
101. Veersham C. In Elicitation: Medicinal Plant Biotechnology. CBS Publisher, India; 2004.
102. Namdeo A. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacognosy reviews. 2007;**1**(1):69-79.
103. Pauwels L, Morreel K, De Witte E, et al. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;**105**(4):1380-5.
104. Holková I, Bezáková L, Bilka F, Balažová A, Vanko M, Blanáriková V. Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in Papaver somniferum suspension cultures. Plant Physiology and Biochemistry. 2010;**48**(10):887-92.

105. Huang F-C, Kutchan TM. Distribution of morphinan and benzo [c] phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*. 2000;**53**(5):555-64.
106. Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Current opinion in plant biology*. 2001;**4**(3):202-9.
107. Cheong J-J, Do Choi Y. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *TRENDS in Genetics*. 2003;**19**(7):409-13.
108. Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*. 2003;**15**(1):165-78.
109. Badri DV, Loyola-Vargas VM, Du J, et al. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* roots treated with signaling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. *New Phytologist*. 2008;**179**(1):209-23.
110. Roeder RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends in biochemical sciences*. 1996;**21**(9):327-35.
111. Nikolov D, Burley S. RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;**94**(1):15-22.
112. Lee TI, Young RA. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual review of genetics*. 2000;**34**(1):77-137.
113. Latchman DS. Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1997;**29**(12):1305-12.
114. Mitchell PJ, Tjian R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*. 1989;**245**(4916):371-8.
115. Ptashne M, Gann A. Transcriptional activation by recruitment. *Nature*. 1997;**386**(6625):569-77.
116. Memelink J, Gantet P. Transcription factors involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry Reviews*. 2007;**6**(2-3):353-62.
117. Wärnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson J-Ak. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Molecular endocrinology*. 2003;**17**(10):1901-9.
118. Wenta N, Strauss H, Meyer S, Vinkemeier U. Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;**105**(27):9238-43.

119. Sermeus A, Cosse J-P, Crespin M, et al. Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity. *Mol Cancer*. 2008;**7**(1):27.
120. Ramiro D, Jalloul A, Petitot A-S, De Sá MFG, Maluf MP, Fernandez D. Identification of coffee WRKY transcription factor genes and expression profiling in resistance responses to pathogens. *Tree genetics & genomes*. 2010;**6**(5):767-81.
121. Skibbe M, Qu N, Galis I, Baldwin IT. Induced plant defenses in the natural environment: *Nicotiana attenuata* WRKY3 and WRKY6 coordinate responses to herbivory. *The Plant Cell*. 2008;**20**(7):1984-2000.
122. Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ. WRKY transcription factors. *Trends in plant science*. 2010;**15**(5):247-58.
123. Wang Z, Zhu Y, Wang L, et al. A WRKY transcription factor participates in dehydration tolerance in *Boea hygrometrica* by binding to the W-box elements of the galactinol synthase (BhGolS1) promoter. *Planta*. 2009;**230**(6):1155-66.
124. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine*. 2002;**8**(6):257-60.
125. Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2007;**27**(5):763-7.
126. Liu D-H, Ren W-W, Cui L-J, Zhang L-D, Sun X-F, Tang K-X. Enhanced accumulation of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* hairy roots by overexpression of transcriptional factor ORCA2. *Afr J Biotechnol*. 2011;**10**(17):3260.
127. Hong S-B, Peebles CA, Shanks JV, San K-Y, Gibson SI. Expression of the *Arabidopsis* feedback-insensitive anthranilate synthase holoenzyme and tryptophan decarboxylase genes in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Journal of biotechnology*. 2006;**122**(1):28-38.
128. Okay S, Derelli E, Unver T. Transcriptome-wide identification of bread wheat WRKY transcription factors in response to drought stress. *Molecular Genetics and Genomics*. 2014;**289**(5):765-81.
129. Unver T. Detection and characterization of plant genes involved in various biotic and abiotic stress conditions using DDRT-PCR and isolation of interacting proteins. *Biotechnology Ankara: Middle East Technical University*. 2008.
130. Turktas M, Inal B, Okay S, et al. Nutrition metabolism plays an Important role in the alternate bearing of the olive tree (*Olea europaea* L.). 2013.

131. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*. 2001;**25**(4):402-8.
132. Wu H, Ni Z, Yao Y, Guo G, Sun Q. Cloning and expression profiles of 15 genes encoding WRKY transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Progress in Natural Science*. 2008;**18**(6):697-705.
133. Ramamoorthy R, Jiang S-Y, Kumar N, Venkatesh PN, Ramachandran S. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant and cell physiology*. 2008;**49**(6):865-79.
134. Huang S, Gao Y, Liu J, et al. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. *Molecular genetics and genomics*. 2012;**287**(6):495-513.
135. Mandal A, Sarkar D, Kundu S, Kundu P. Mechanism of regulation of tomato TRN1 gene expression in late infection with tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV). *Plant Science*. 2015;**241**:221-37.
136. Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. 2006.
137. Maleck K, Levine A, Eulgem T, et al. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature genetics*. 2000;**26**(4):403-10.
138. Koornneef A, Pieterse CM. Cross talk in defense signaling. *Plant physiology*. 2008;**146**(3):839-44.
139. Hu Y, Dong Q, Yu D. *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant science*. 2012;**185**:288-97.
140. Xie Z, Ruas P, Shen QJ. Regulatory networks of the phytohormone abscisic acid. *Vitamins & Hormones*. 2005;**72**:235-69.
141. Kinkema M, Fan W, Dong X. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *The Plant Cell*. 2000;**12**(12):2339-50.
142. Yu D, Chen C, Chen Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *The Plant Cell*. 2001;**13**(7):1527-40.
143. Eulgem T. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends in plant science*. 2005;**10**(2):71-8.
144. Jimmy JL, Babu S. Role of OsWRKY transcription factors in rice disease resistance. *Tropical Plant Pathology*. 2015;**40**(6):355-61.

145. Bhattarai KK, Xie Q-G, Mantelin S, et al. Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway. *Molecular plant-microbe interactions*. 2008;**21**(9):1205-14.
146. Peng X-x, Tang X-k, Zhou P-l, et al. Isolation and expression patterns of rice WRKY82 transcription factor gene responsive to both biotic and abiotic stresses. *Agricultural Sciences in China*. 2011;**10**(6):893-901.



EK-1**Kullanılan Makine-Teçhizat Listesi**

Kullanılan Makine – Teçhizat Listesi	
Adı/Modeli	Kullanım Amacı
Elektroforez Tankı	Elektroforez tankı, RNA örneklerinin izolasyon ve PZR sonrasında tayinini yapmak için kullanılmaktadır. Elektroforez jelinin içine oturtulduğu tank sistemidir. Bu cihaz Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü, Moleküler Laboratuvarında kullanılmıştır.
Elektroforez güç kaynağı	Elektroforez tankının bağlandığı güç kaynağıdır. Bu cihaz Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü, Moleküler Laboratuvarında kullanılmıştır.
Nanodrop Cihazı	DNA ve RNA gibi nükleik asitler ile proteinlerin, belirlenen dalga boylarında, çok küçük hacimler kullanılarak miktarını tayin edebilen spektrofotometre temelli bir cihazdır. Bu cihaz Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü, Moleküler Laboratuvarında kullanılmıştır.
qRT-PCR (Eş zamanlı PZR cihazı)	DNA veya mRNA örneklerinin çoğaltılmasını sağlayan ve elde edilen ürünlerin miktarını tek bir tüpte tespit edebilen yöntemdir. Bu ölçümler Çankırı Karatekin Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yapılmıştır.
PZR cihazı	DNA veya mRNA örneklerinin çoğaltılmasını sağlayan bir cihazdır. Bu cihaz Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü, Moleküler Laboratuvarında kullanılmıştır.
Jel Görüntüleme Cihazı	Jelde yürütülen nükleik asitlerin UV ışık altında görüntüsünü almayı sağlayan bir cihazdır. Bu cihaz Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü, Moleküler Laboratuvarında kullanılmıştır.
Santrifüj	RNA izolasyonu aşamasında tüp içerisinde bulunan RNA dışındaki diğer bileşenlerin uzaklaştırılması için merkezkaç kuvvetinin etkisinden yararlanılarak ayırma yapan bir cihazdır. Bu cihaz Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü, Moleküler Laboratuvarında kullanılmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yeliz Demirci

Doğum Yeri: İstanbul

Doğum Tarihi: 15.09.1984

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Ümraniye Lisesi (1997-2000)

Ön Lisans: İstanbul Üniversitesi, SHMYO, Tıbbi Laboratuvar (2001-2003)

Lisans: İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2004-2009)

İş Tecrübesi

Kurumu: Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü

Görevi: Laboratuvar Sorumlusu (2004-2012)

Kurumu: İzmir Ekonomi Üniversitesi, Mühendislik ve Bilgisayar Bilimleri Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü

Görevi: Araştırma Görevlisi (2015)

Kurumu: TÜBİTAK 104-T-240

Görevi: Araştırmacı (2005-2009)

“Poliklorlu bifeniller, organik klorlu pestisitler ve kontamine suların endokrin bozucu ve genotoksik etkilerinin in vitro ve in vivo modellerde araştırılması”

Kurumu: TÜBİTAK 112-O-305

Görevi: Proje Bursiyeri (2012-2013)

“Pamuk Yaprak Kurdu, *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) ile tarımsal savaşta potansiyel hedef mide genlerinin belirlenmesi”

Tezden Çıkan Yayınlar

Yeliz Demirci, Tuğba Gürkök, Turgay Ünver, Mine Türктаş, Serkan Uranbey. 2015. Haşhaş Bitkisinde Transkriptom Verilerinin Biyoinformatik ve Fonksiyonel Analizi. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. Afyon, 21-24 Ağustos (Sözlü Sunum).

Yüksek Lisans Öncesi Yayınlar

1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

Mustafa Duman, Erdal Polat, Mahmut Özer, **Yeliz Demirci**, Necdet Fatih Yaşar, Cebraail Akyüz, Orhan Uzun, Kıvanç Derya Peker, Ece Genç, Sinan Yol. The Effect of Rabeprazole on Lower Esophageal Sphincter Tone in Experimental Rat Model. Journal of Investigative Surgery 03/2013.

Enver Reyhan, Mustafa Duman, **Yeliz Demirci**, Ali Emre Atıcı, Mahmut Özer, Burcu Çevreli, Feza Ekiz, Tahsin Dalgıç, Musa Akoğlu, Ece Genç. Superiority of Ceftriaxon to Cefazolin in a Rat Model of Obstructive Jaundice: An Experimental Study. Journal of Investigative Surgery 12/2012.

Mahmut Özer, **Yeliz Demirci**, Candan Hızıl, Sabit Sarıkaya, İskender Karaltı, Çiğdem Kaspar, Serdar Alpan, Ece Genç. Impact of Genetic Factors (CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2) on Warfarin Dose Requirement in the Turkish Population. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 10/2012.

Mahmut Özer, Mustafa Duman, Sükrü Taş, **Yeliz Demirci**, Muhammet Fatih Aydın, Enver Reyhan, Ali Emre Atıcı, Erdal Birol Bostancı, Musa Akoğlu, Ece Genç. In vitro effects of famotidine and ranitidine on lower esophageal sphincter tone in rats. The Turkish journal of gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology 10/2012; 23(5):438-43.

Mustafa Duman, Mahmut Özer, Enver Reyhan, **Yeliz Demirci**, Ali Emre Atıcı, Tahsin Dalgıç, Erdal B. Bostancı, Ece Genç. In vitro effect of pantoprazole on lower esophageal sphincter tone in rats. World Journal of Gastroenterology 12/2011; 17(46):5105-9.

Mahmut Özer, **Yeliz Demirci**, Sabit Sarıkaya, İskender Karaltı, Çiğdem Kaspar, Candan Hızıl, Serdar Alpan, Ece Genç. The effect of polymorphisms in CYP2C9, CYP4F2, EPHX1 and VKORC1 on warfarin dose in Turkish patients. *Current Opinion in Biotechnology* 09/2011; 22.

2. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

Özlem Demir, **Yeliz Demirci**, Süleyman Sandal and Bayram Yılmaz (2008). Anti-estrogenic effects of a coplanar polychlorinated biphenyl congener in transfected MCF-7 breast cancer and rat hepatoma cells. 3rd Euro-Asian Conference on Hazardous Waste & Human Health, 27-30 March, Yeditepe University, Istanbul. P33.

Bayram Yılmaz, Özlem Demir, **Yeliz Demirci**, Işıl Aksan-Kurnaz and Süleyman Sandal (2008). Endocrine disruptive effects of organochlorinated pesticides in transfected MCF-7 breast cancer and rat hepatoma cells using luciferase assay. 3rd Central and Eastern Europe Conference on Health and the Environment, 19-22 October 2008, Cluj-Napoca, Romania. *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 14: P159.

Yeliz Demirci, Süleyman Sandal, Özlem Demir and Bayram Yılmaz. (2008). Evaluation of estrogenic and anti-estrogenic effects of Aroclor 1221 and 1254 in transfected MCF-7 breast cancer and rat hepatoma cells using luciferase assay. 3rd Central and Eastern Europe Conference on Health and the Environment, 19-22 October 2008, Cluj-Napoca, Romania. *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 14: P28.

Süleyman Sandal, Niyazi Tuğ, **Yeliz Demirci**, Ayvacı H and Bayram Yılmaz. (2009). Investigation of DNA damage in exfoliated human mammary epithelial cells recovered from lactating mothers in Istanbul. 13th World Congress on Human Reproduction, 5-8 March 2009, Venice, Italy. P301.

3. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Toprak, U., Guz, N., **Demirci, Y.** 2014. Kışlayan Süne, *Eurygaster* spp. (Hemiptera: Scutelleridae)'de mide gen analizi. 5. Bitki Koruma Kongresi, Antalya, Şubat 3-5. (Sözlü Sunum)

Toprak, U., **Demirci, Y.**, Guz, N., Hegedus, D.D., Coutu, C., Baldwin, D., Yurtkuran, Z., Gürkan, M.O., Bayram, Ş. 2014. Pamuk yaprak kurdu, *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) ile savaşımında hedeflenebilecek potansiyel mide genleri. 5. Bitki Koruma Kongresi, Antalya, Şubat 3-5.

Toprak, U., Yurtkuran, Z., Aşutlu, G., **Demirci, Y.**, Gürkan, M.O. 2013. Böceklerle Mücadele’de Kimyasal Tarım İlaçlarına Bir Alternatif: Bakuloviral biyopestisitler ve Formülasyonları. 4. Ekoloji Kongresi, Tekirdağ, Mayıs 2-4.

Yeşim Gürol, **Yeliz Demirci**, Ayşe Sesin Kocagöz. 2006. İki yeni dezenfektanın etkinliğinin diğer dezenfektanlarla karşılaştırılması. 04-08 Haziran, Antalya. (Poster Sunumu).

