

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***A.belladonna* SAÇAK KÖK**
KÜLTÜRÜNDE SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ



NACİYE YAĞIZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2019

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***A.belladonna* SAÇAK KÖK KÜLTÜRÜNDE**
SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ

NACİYE YAĞIZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANLARI
I. DR. ÖĞR. ÜYESİ FATMA İNCİ ÖZDEMİR
II. DOÇ. DR. TİJEN TALAS OĞRAŞ

GEBZE
2019

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**SECONDARY METABOLITE PRODUCTION
IN THE *A.belladonna* HAIRY ROOT
CULTURE**

NACİYE YAĞIZ

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISORS

I. ASIST. PROF. FATMA INCI OZDEMİR

II. ASSOC. PROF. DR. TIJEN TALAS OGRAS

GEBZE

2019



GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10/07/2019 tarih ve 2019/31 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 06/08/2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Naciye YAĞIZ'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Dr. Öğr. Üyesi Fatma İnci ÖZDEMİR

ÜYE

: Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE

: Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Bu çalışma *Atropa belladonna* bitkisinden *Agrobacterium rhizogenes* transformasyonu ile elde edilen saçak köklerdeki sekonder metabolit miktarının, doku kültürü ile elde edilen saçak köklerdeki ve doğadan toplanan köklerdeki sekonder metabolit miktarının karşılaştırılması amacı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, transformasyon ile elde edilen kökler 30 g/L süktroz sıvı ½ MS besi ortamında kültüre alınarak çoğaltılmalarının ardından PCR ile transformasyon doğrulanmıştır. Diğer yandan doku kültürü ile elde edilen 2 aylık *Atropa belladonna* bitkisinin kökleri ile 0,1 mg/L Indol-3-bütirik asit (IBA) içeren sıvı ½ MS besi ortamında kültüre alınarak çoğaltılmışlardır. Daha sonra transgenik saçak kökler, transgenik olmayan kökler, IBA kültürü ile elde edilen saçak kökler ve doğadan toplanan köklere ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstreler İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) işlemi uygulandıktan sonra HPLC işlemi ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma sonucunda İTK işleminde transgenik *Atropa belladonna* köklerinde daha parlak lekeler görülmüştür. İTK ve HPLC işlemi sonuçlarına göre ise en yüksek miktarda metabolit transgenik *Atropa belladonna* kök örneklerinde görülmüştür.

Sonuç olarak *Atropa belladonna* bitkisine başarılı bir şekilde transformasyon işlemi gerçekleştirilerek saçak kökler elde edilmiştir. Böylece bu çalışmada kullanılan transformasyon yönteminin ileriki çalışmalarda kullanılabileceği tespit edilmiştir. Sekonder metabolit miktarını arttırmak için ise transgenik köklere elisitör gibi destekleyicilerin uygulanması ile daha verimli sonuçlar elde edileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Atropa belladonna*, *Agrobacterium rhizogenes*, saçak kök, sekonder metabolit, alkaloid, *atropin*.

SUMMARY

The aim of this study was to compare the secondary metabolite content of the hairy roots obtained by transformation of *Agrobacterium rhizogenes* from *Atropa belladonna* plant, secondary metabolite content of the hairy roots obtained from tissue culture and roots collected from nature. For this purpose, the roots obtained by transformation were cultured in liquid ½ MS medium containing 30 g/L sucrose and then transformations of hairy roots were confirmed by PCR. On the other hand, the roots of 2-month-old *Atropa belladonna* obtained by tissue culture were cultured and grown in liquid ½ MS medium containing 0,1 mg / L IBA. Then, transgenic hairy roots, non-transgenic roots, hairy roots obtained by IBA culture and roots collected from nature were extracted. After the TLC process was applied to the extracts, quantification was performed by HPLC.

As a result of this study, more bright spots were seen in the transgenic *Atropa belladonna* roots in TLC procedure. According to the results of HPLC an TLC, the highest amount of metabolite was obtained in transgenic *Atropa belladonna* root samples.

As a result, *Atropa belladonna* plant was successfully transformed and hairy roots were obtained. Thus, it has been determined that the transformation method used in this study can be used in future studies. In order to increase the amount of secondary metabolite, it was concluded that more efficient results can be obtained by the application of elicitor to the transgenic roots.

Key Words: *Atropa belladonna*, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, secondary metabolite, alkaloid, *atropine*.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde TÜBİTAK destekli olarak 117H001 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ihtiyaç duyduğum anlarda yardımlarını esirgemeyen değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Fatma İnci ÖZDEMİR'e teşekkür ederim. Tez çalışmalarımın başarı ile yürütülmesini sağlayan, bilgi ve deneyimleri ile yoluma ışık tutan, fikirlerinden yararlandığım danışman hocam Doç. Dr. Tijen TALAS OĞRAŞ'a teşekkürler.

Tez çalışmam boyunca ihtiyacım olan her anımda yanımda olan, bilgi ve tecrübeleri ile yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Selma ONARICI, Dr. Birsen CEVHER KESKİN ve Dr. Deniz KÖM'e teşekkür ederim. TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvarı'nda deneylerin gerçekleştirilmesinde ve tez yazma sürecimde fikirleri ile destek olan, birlikte çalışmaktan keyif aldığım kıymetli arkadaşım Emre ERDEM'e sonsuz teşekkürler. Laboratuvarda maddi ve manevi desteklerinden dolayı Rahmi BÜYÜKKESKİN'e teşekkür ederim. Tez çalışmamın ekstraksiyon işlemlerinde sağladığı laboratuvar desteğinden dolayı TÜBİTAK MAM Malzeme Enstitüsü'nden Dr. Elif TAHTASAKAL'a teşekkür ederim. HPLC işlemlerinde verdiği destekten dolayı TÜBİTAK MAM Kimyasal Teknolojisi Enstitüsü'nden Dr. Nilüfer ERDEM'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı tamamladığım TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü personeline ihtiyaç duyduğumda her zaman yardımcı oldukları için teşekkür ederim.

Hayatımın her anında hiçbir zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman ve her konuda yanımda olan ve beni destekleyen AİLEME tüm kalbimle sonsuz teşekkürler.

Ayrıca tez çalışmamın tamamlanmasında ve hayatımın her anında desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olacağını bildiğim MURAT ÖZTÜRK'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Atropa belladonna</i> (Güzelyavrat otu) Bitkisi	4
2.1.1. <i>Atropa belladonna</i> 'nın Sınıflandırması	6
2.1.2. <i>Atropa belladonna</i> 'nın Morfolojik Özellikleri	6
2.1.3. <i>Atropa belladonna</i> 'nın İklim ve Toprak İstekleri	7
2.1.4. <i>Atropa belladonna</i> 'nın Tarımı ve Verimi	7
2.1.5. <i>Atropa belladonna</i> 'da Bulunan Sekonder Metabolitler	8
2.2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	13
2.2.1. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 'in Filogenetik Sınıflandırması	13
2.2.2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> Transformasyonunun Mekanizması	14
2.2.3. Ri Plazmit	16
2.2.4. Ri T-DNA Genleri	18
2.2.5. Saçak Kök Formu	22
2.2.6. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> Transformasyonu ile Meydana Gelen Saçak Köklerden Sekonder Metabolit Üretmenin Avantajları	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM	26
3.1. MATERYALLER	26
3.1.1. Bitki Materyali ve Bakteri Suşu	26
3.1.2. Kullanılan Malzemeler	26

	<u>Sayfa</u>
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	29
3.2. YÖNTEM	30
3.2.1. Tohum Sterilizasyonu ve Çimlendirme	30
3.2.2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC 15834 Bakterisinin Çoğaltılması ve İnokülasyonu	32
3.2.3. Bitki Yapraklarının <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ile İnokülasyonu ve Saçak Köklerin Oluşturulması	33
3.2.4. Plazmit İzolasyonu	36
3.2.5. Dokudan PCR İşlemi	37
3.2.6. Köklerden DNA İzolasyonu	38
3.2.7. Transformasyonun PCR Yöntemi ile Doğrulanması	39
3.2.8. IBA ile Saçak Kök Kültürlerinin Kurulması	39
3.2.9. <i>Atropa belladonna</i> Köklerinin Ekstraktlarının Hazırlanması	40
3.2.10. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	41
3.2.11. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	42
4. BULGULAR	44
4.1. Yüzey Sterilizasyonu ve Çimlendirme Ortamı Bulguları	44
4.2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC 15834 Bakterisinin Çoğaltılmasına İlişkin Bulgular	46
4.3. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC 15834 İnokülasyonu ve Saçak Köklerin Oluşturulmasına İlişkin Bulgular	47
4.4. Saçak Köklerden DNA İzolasyonu Bulguları	49
4.5. Transformasyonun PCR Yöntemi ile Doğrulanmasına İlişkin Bulgular	52
4.6. IBA Bitki Büyüme Düzenleyicisi ile Saçak Kök Kültürlerinin Kurulmasına İlişkin Bulgular	53
4.7. <i>Atropa belladonna</i> Kök Ekstraktlarının Hazırlanmasına İlişkin Bulgular	54
4.8. İnce Tabaka Kromatografisine (İTK) İlişkin Bulgular	55
4.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisine (HPLC) İlişkin Bulgular	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	61
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	73
EKLER	74

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
%	: Yüzde
ABA	: Absisik asit
cm	: Santimetre
CORF	: “C-terminus part ORF”
CTAB	: “Cetylrimethylammonium bromide”
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EtOH	: Etanol
GA	: Giberellik asit
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
IAA	: İndol-3-asetik asit
IBA	: İndol-3-bütirik asit
kb	: Kilobaz
L	: Litre
LB	: “Lysogeny Broth”
m	: Metre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
µm	: Mikrometre
MS	: Murashige ve Skoog
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
N	: Normalite
nm	: Nanometre

NORF	: “N-terminal domain ORF”
ORF	: “Open reading frame”
PBS	: “Phosphate buffered saline”
PCR	: “Polymerase chain reaction”
pH	: “Power of hydrogen”
pRi	: Ri Plazmit
PVP	: Polivinilpirolidon
RB	: Retinoblastoma
rcf	: “Relative centrifugal force”
Ri	: “Root inducing”
RN	: Ribonükleik asit
rol	: “Root locus”
rpm	: “Revolutions per minute”
T-DNA	: Transfer DNA
T _C -DNA	: “T- Central DNA”
TE	: Tris-EDTA
T _L -DNA	: “Left T-DNA”
T _R -DNA	: “Right T-DNA”
TSS	: “Transfer stimulator sequence”
TÜBİVES	: Türkiye Bitkileri Veri Servisi
YEP	: “Yeast Extract Peptone”
YMB	: “Yeast Mannitol Broth”
vir	: “Virulence region”

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>		<u>Sayfa</u>
2.1	: Türkiye’de <i>Atropa belladonna</i> bitkisinin doğal yayılım alanları.	4
2.1.2	: <i>Atropa belladonna</i> bitkisi.	7
2.1.5.a	: <i>Atropa belladonna</i> bitkisinde bulunan alkaloidler.	11
2.1.5.b	: <i>Atropa belladonna</i> ve ilgili <i>Solanaceous</i> türlerindeki tropan alkaloid biyosentetik yolu.	12
2.2.2	: Bitki genetik transformasyonu için <i>Agrobacterium</i> Ri plazmit bazlı T-DNA transferinin şematik gösterimi.	15
2.2.3.a	: <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ’in agropin tipi Ri plazmidinin şematik gösterimi.	17
2.2.3.b	: <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ’in mannopin tipi Ri plazmidinin şematik gösterimi.	18
2.2.4.a	: T _L -DNA’da gen lokasyonlarının şematik gösterimi.	19
2.2.4.b	: T _R -DNA’da gen lokasyonlarının şematik gösterimi.	19
3.2.1	: <i>Atropa belladonna</i> tohum kabuklarının zımpara kağıdı kullanılarak uzaklaştırılması.	31
4.1.a	: 5. Yöntem ile çimlendirilen tohumlar.	45
4.1.b	: MS ortamındaki <i>Atropa belladonna</i> bitkisi.	45
4.2.a	: Katı LB ortamında çoğaltılan <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC 15834 bakterisi.	46
4.2.b	: Sıvı YMB besi ortamında çoğaltılan <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC 15834 bakterisi.	47
4.3.a	: 10. Yöntem transformasyonu ile <i>Atropa belladonna</i> yapraklarından elde edilen saçak kökler.	48
4.3.b	: Transformasyon sonucunda elde edilen kök örneklerinin büyüme yüzdelerinin karşılaştırılması.	49
4.4.a	: 30 günlük kültür sonrasında elde edilen potansiyel transgenik kökler.	50
4.4.b	: <i>Atropa belladonna</i> köklerinden izole edilen DNA’ların agaroz jeldeki görüntüsü.	51
4.5	: Transformasyon doğrulaması için PCR işlemi uygulanan örneklerin agaroz jeldeki görüntüsü.	52

<u>Sekil No:</u>		<u>Sayfa</u>
4.6	: 30 günlük IBA'lı <i>Atropa belladonna</i> kök kültürleri.	53
4.8.a	: İTK işlemi sonrasında silika plakanın UV cihazında 254 nm dalga boyundaki görüntüsü.	55
4.8.b	: İTK işlemi sonrasında silika plakanın UV cihazında 366 nm dalga boyundaki görüntüsü.	56
4.8.c	: İTK işlemi sonrasında silika plakanın dragendorf püskürtülmüş görüntüsü.	57
4.9.a	: Standart <i>atropinin</i> HPLC kromatogramı.	58
4.9.b	: E1 örneğinin HPLC kromatogramı.	58
4.9.c	: E2 örneğinin HPLC kromatogramı.	59
4.9.d	: E3 örneğinin HPLC kromatogramı.	59
4.9.e	: E4 örneğinin HPLC kromatogramı.	60

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.1	: <i>Atropa belladonna</i> 'nın filogenetik sınıflandırması.	6
2.1.5	: Sekonder metabolitlerin biyosentez basamaklarına göre sınıflandırılması.	9
2.2.1	: <i>Agrobacterium rhizogenes</i> bakterisinin filogenetik sınıflandırması.	13
2.2.2	: <i>Vir</i> genlerinin sentezlediği proteinler ve fonksiyonları.	16
2.2.4	: <i>Agrobacterium rhizogenes</i> T-DNA genleri, kodladıkları proteinler, fonksiyonları ve konak bitki hücresindeki fenotipik değişiklikler.	20
3.1.2.a	: Tohum sterilizasyonu ve çimlendirme işlemlerinde kullanılan malzemeler.	26
3.1.2.b	: Bakteri kültürü ve sıvı kök kültürü işlemlerinde kullanılan malzemeler.	27
3.1.2.c	: Transformasyonun doğrulanması, ekstraksiyon ve analiz işlemlerinde kullanılan malzemeler.	28
3.1.2.d	: PCR işleminde kullanılan primerler.	29
3.1.3	: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.	29
3.2.2	: <i>A. rhizogenes</i> bakterisinin çoğaltılmasında kullanılan besi ortamları.	33
3.2.5	: Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR karışımı.	37
3.2.7	: Bioline MyTaq PCR karışımı.	39
3.2.8	: IBA ile kurulan saçak kök kültürleri.	40
3.2.11	: HPLC cihazı bilgileri.	43
4.1.a	: Yüzey sterilizasyonu yöntemlerinin sonuçları.	44
4.1.b	: Çimlendirme ortamı sonuçları.	45
4.3.a	: Uygulanan transformasyon yöntemleri ile elde edilen saçak kök oranları.	48
4.3.b	: Transformasyon sonrasında elde edilen köklerin ağırlık ve büyüme yüzdesi sonuçları.	49
4.4	: Saçak köklerden elde edilen DNA'ların nanodrop sonuçları.	50
4.6	: 30 günlük IBA'lı kültürlerin köklerin ağırlık ortalamaları ve büyüme yüzdesi sonuçları.	54

Tablo No:**Sayfa**

4.7 : Tropan alkaloit ekstrlerinin ağırlıkları.

54



1. GİRİŞ

İnsanlık tarihinin başlangıcından itibaren bitkilere büyük ilgi duyulmuş, bitkiler hem doğal olarak hem de çeşitli manipölasyonlarla yoğun bir çalışma konusu olmuştur. Beslenme, barınma, yakacak ihtiyacı, giyim ve savunma gibi birçok farklı ihtiyaçlarda kullanılan bitkiler canlılığın devamında büyük önem arz etmektedirler.

Türkiye, sahip olduğu iklim ve ortam koşulları nedeniyle bitki türü bakımından oldukça zengin bir ülkedir. Bu zenginlik; üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunması, Güney Avrupa ile Güney Batı Asya arasında köprü olması, pek çok cins ve seleksiyonun orijin ve farklılaşma merkezinin Anadolu olmasından kaynaklanmaktadır. Her yıl yeni bulguların eklendiği Türkiye florasındaki bitki taksonu sayısı (tür, alt tür ve varyete düzeyinde) 12000 civarındadır ve Avrupa Kıtası'nda yayılış gösteren bitki türlerinin sayısına yakındır [Avcı, 2016].

Metabolizma, organizma tarafından gerçekleştirilen tüm biyokimyasal reaksiyonların kompleksidir. Birincil metabolik yollar sadece birkaç son bileşiğe yol açarken, sekonder metabolik yollar çok fazla madde açığa çıkmasını sağlar. Bitkilerin çevresel etkenlere adaptasyonlarında önemli rol oynadığı bilinen bu sekonder metabolitler farmasötik olarak aktif ilaçların önemli bir kaynağıdır [Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002; Hussain ve ark., 2012]. Bitkilerdeki biyolojik olarak aktif sekonder metabolitler, glikozitler, alkaloidler, polifenoller (flavonoidler, terpenoidler, kumarinler, saponinler) ve uçucu yağlardır.

Son zamanlarda bitkilerde bulunan sekonder maddeler üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Tedavide kullanılan bazı sentetik ilaç hammaddelerinin sağlık açısından yan etkiler meydana getirmesi veya bitkilerden elde edilen hammaddelerin sentetik olarak elde edilememesi gibi nedenlerden dolayı tıbbi bitkilerdeki sekonder metabolitlerin önemi son derece artmıştır [Aytac, 2019].

Ticari uygulamalar için uygun yüksek sekonder metabolit elde etmek için, yetiştirme koşullarının iyileştirilmesi, yüksek verimli hücre hatlarının seçilmesi, kültürlenmiş dokuların öncül beslenmesi ve genetik transformasyonu kullanılarak, doku kültürlerinin biyosentetik aktivitelerinin arttırılması üzerinde yoğunlaşmıştır [Misawa & DiCosmo, 1995].

Transgenik saçak kök kültürleri, bitki doku kültürünün sekonder metabolitlerin üretimindeki rolünde devrim yarattı. *Agrobacterium rhizogenes* tarafından indüklenen saçak kökler, son birkaç on yılda sekonder metabolit üretimindeki bitki köklerinin bir yöntemi olarak popüler hale gelmiştir [Karuppusamy, 2009].

Çeşitli bitki kültürleri ile yapılan birçok çalışma, morfolojik farklılaşmanın devam etmesine izin verilirse ikincil metabolit üretiminin *in vitro* olarak geliştirildiğini göstermiştir [Tabata, Yamamoto, Hiraoka, & Konoshima, 1972; Bhandry, Collin, Thomas, & Street, 2017]. Bu nedenle, farklılaşmış organların ticari katalizörler olarak farklılaşmış hücrelere göre daha mit verici oldukları dşnlmelidir. Organize bitki dokusunun kültürüyle ilgili bir sorun, hücre büyümesinin, kallus veya süspansiyon kültürlerinden çok daha düşük olmasıdır. Kök uçlu meristemdeki hücre bölünmesi, köklerin sıvı kültürde uzamasına ve büyümesine izin verdiği için, kullanılan organların kök olması durumunda bu sorun bir dereceye kadar hafifletilir. Üretildikten sonra, saçak kökler, sıvı ortamda kltrlenebilir [Sharp & Doran, 1990].

Saçak kökler, genetik ve biyosentetik stabiliteleri, hormondan bağımsız hızlı büyümeleri, yoğun lateral dallanmaları, jeotropizma hareketi yapmamaları ve bakımlarının kolaylığı ile karakterize edilir. Saçak köklerde fazla miktarda sekonder metabolit sentezlenir [Giri & Narasu, 2000; Guillon, Trmouillaux-Guiller, Pati, Rideau, & Gantet, 2006]. *Agrobacterium rhizogenes*'in enfekte ettiği bitki materyalinden kaynaklanan saçak kökler tarafından üretilen bu sekonder metabolitler, çoğu durumda, genellikle transforme olmayan köklerde sentezlenenlerle aynıdır (Sevon & Caldentey, 2002). Bu zellik, genetik stabilite ve genellikle hormonsuz ortamlarda tüylü köklerin hızlı büyümesi, onları özellikle farklı türdeki uygulamalar için uygun hale getirir [Matveeva & Sokornova, 2016]. *Atropa belladonna*'nın sahip olduğu sekonder metabolitlerden olan *atropin*, özellikle tıpta sıkça kullanılan önemli bileşiklerden biridir. Günümüz tıbbı, genetiği değiştirilmiş çeşitlerden çıkarılan tonlarca *atropin*den yararlanırken, artan talep doğrultusunda üretimlerinin yeni, kimyasal ve biyoteknolojik yöntemler ile arttırılma yoluna gidilmektedir.

Ülkemiz sahip olduğu iklimi ve coğrafik yapısı sayesinde oldukça çeşitli türlere ev sahipliği yapmasına rağmen ilaç sanayilerinin ihtiyaı olan hammaddelerin % 70'den fazlası ithal edilmektedir [Aytac, 2019]. Alkaloid ve alkaloid türevleri ise bu ithalatla önemli bir yere sahiptir. Buna karşılık alkaloid içeren *Atropa belladonna* gibi bitkiler ülkemizde doğal olarak bulunmakta ve kültür çalışmalarında kullanılabilmektedir.

Büyük ölçekli bitki hücre kültürü, normalde bitkilerden elde edilen kimyasalların üretilmesi için alternatif bir araçtır. Bununla birlikte, bitki hücreleri bu amaç için henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır; zayıf sekonder metabolit sentezi ve kültür dengesizliği birçok bitki kültürü sisteminin ticarileşmesini engellemiştir. Bitki hücresi süspansiyonları yerine genetik olarak dönüştürülmüş köklerin uygulanması, bu sorunlara olası bir çözümdür.

Tüketimin ve bitkisel kaynaklara olan ihtiyacın artması ile birlikte ülkemizde bulunan tıbbi bitkiler doğadan toplanarak etken madde ihtiyacı için kullanılmakta ve ihracatı sağlanmaktadır. Doğadan kontrolsüz bitki toplanmasının, aşırı otlama ve diğer bitkilerin yerini alması gibi zararları bulunmaktadır. Bu durumun sonucu olarak da bitkilerin nesli tükenme aşamasına gelmektedir. *Atropa belladonna* gibi tıbbi öneme sahip bitkileri doğadan toplamak yerine kültüre almanın birçok avantajı bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; birim alandan daha fazla ürün elde edilmesi, kalite kontrolünün daha kolay yapılması, nadir ve nesli tükenmekte olan türlerin kaybolmasının önlenmesidir.

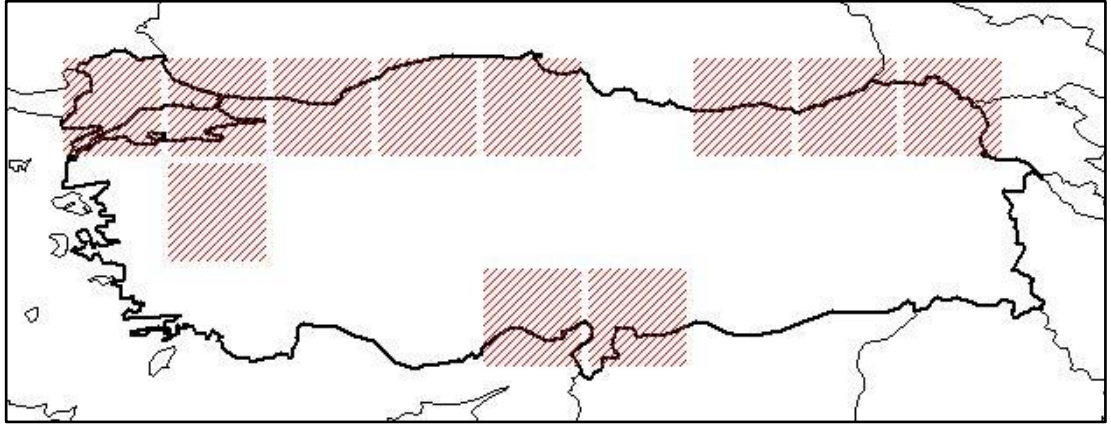
Yapılan çalışmalar *Atropa belladonna* (Güzelyavrat otu) bitkisine doku kültürü yöntemlerinin uygulanabildiğini ve etken madde miktarlarının arttırılabileceğini göstermiştir [Bhandry ve ark., 2017; Tabata ve ark., 1972]. *Atropa belladonna*'nın etken maddesi olan *atropin*, sentetik olarak elde edilebilmesine rağmen etkisi doğal kaynaklardan elde edilenlere göre daha zayıftır ve tercih edilmemektedir. Saçak kök kültürü yöntemi ile bitkiden elde edilen *atropin*, bitki tarafından doğal olarak sentezlenen *atropin* ile aynıdır [Sevon & Caldentey, 2002].

Bu çalışmada *Atropa belladonna*'nın etken maddelerinin elde edilmesinde *Agrobacterium rhizogenes* transformasyonu sonucunda elde edilen saçak kökleri ve IBA bitki büyüme düzenleyicisi ile oluşturulan saçak kökleri ile kurulan kültür yöntemi çalışmalarının arttırılması ve etken maddelerin saflaştırılarak gereksinim duyulan alanlara hammadde sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Atropa belladonna* (Güzelavrat otu) Bitkisi

Solanaceae (Patlıcangiller) familyasından olan *Atropa belladonna* (Güzelavrat otu) Türkiye’de; Adana, Artvin, Bolu, Çanakkale, Hatay, İstanbul, Kastamonu, Kırklareli, Kütahya, Sinop ve Trabzon illerimizde yabani olarak yetişmektedir. Ülkemizde ağırlıklı olarak dağılımı Şekil 2.1’de A1, A2, A3, A4, A5, A7, A8, A9, B2 C5 ve C6 grid karelerinde görülmektedir. Avrat otu, Ayı çileği (Trabzon), Ayı liforu (Trabzon), Ayı ligarbası (Trabzon), Deli otu, Güzelavrat otu, İpkeseği (Beşikdüzü-Trabzon), Kurt böğürtleni (Azdavay-Kastamonu), Yabani tütün (Hamsiköy-Trabzon), Yidin (Tirebolu-Giresun) ve Yiğdin otu (Azdavay-Kastamonu) gibi isimleri bulunmaktadır (TÜBİVES).



Şekil 2.1: Türkiye’de *Atropa belladonna* bitkisinin doğal yayılım alanları.

Dünya çapında ise Avrupa (Avustralya, Ukrayna, ve Arnavutluk), Kafkasya, Kuzey Afrika (Cezayir, Fas) ve Kuzey Irak’ta doğal olarak yetişmektedir ve Amerika’da, Avrupa’da ve Hindistan ile Pakistan’ın da bir kısmında tarımı yapılmaktadır [Asha & M.P, 2014; Townsend & Davis, 2007]. “Belladonna”, “ölümcül gece gölgesi”, “divale”, “dwale”, “banewort”, “şeytanın meyvesi”, “yaramazın kirazı”, “ölüm meyvesi”, “güzel ölüm”, “dwayberry” ve “şeytanın bitkisi” gibi isimlerle de bilinmektedir [Rita & Animesh, 2011].

Atropa adının Yunan mitolojisindeki tanrılardan olan, kader ipini kesen Atropos'tan türetildiği söylenirken; *belladonna* adı İtalyan dilinde “güzel bayan” anlamına gelir. 16 yy.da özellikle İtalyan kadınları, göz bebeklerini büyüterek daha büyüleyici bir bakışa sahip olmak amacı ile *Atropa belladonna* meyvelerinin suyunu gözlerine damlatmışlardır. Ayrıca bitkinin kökleri, yaprakları ve meyveleri tuhaf bir delilik haline ve halüsinasyonlara ve hatta ölüme neden olan son derece toksik atropin, skopolamin ve hiyosiyamin alkaloidlerini içerir [Bektaş ve ark., 2016]. Bu nedenle Roma imparatorunun öldürülmesinden; Anglo-Saxson (İskoç suikastçileri)'ların zehirlenmesi gibi olaylar ile uzun süre antik çağların klasik zehirlerinden biri olarak kullanılmıştır. Diğer taraftan sahip olduğu halüsinojenik etki sebebi ile büyücülükte de kullanılmıştır [M. Lee, 2007]. Alkaloidler, *Atropa belladonna* bitkisi bütün kısımlarında bulunsa da en çok kullanılan kısım bitkinin yapraklarıdır [Aytac, 2019].

Atropa'nın farklı bitki kısımları geleneksel olarak farklı amaçlar için, örneğin; artrit ve kas spazmlarının yanı sıra akut enfeksiyonlar, astım, kolit ve daha birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır [Nisar, Malik, & Zargar, 2013; Godara ve ark., 2014]. Raporlar, *Atropa belladonna*'nın meyvelerinin ve yapraklarının, gastrointestinal sorunları tedavi etmek için kullanılabileceğini göstermiştir. Bitki ayrıca antispazmodik etkileri ve astım ve bronşit tedavisi nedeniyle bitkisel ilaçlarda kullanılmaktadır [Southgate, Egerton, & Dauncey, 2000; Cıkla ve ark., 2011]. Alkaloidleri, postganglionik muskarinik reseptörleri ve asetilkolinin bağlanma bölgesini merkezi sinir sisteminde rekabetçi bir şekilde bloke ederek antikolinerjik sendroma yol açmaktadır [Southgate ve ark., 2000; Çaksen ve ark., 2003; Joshi, Wicks, & Munshi, 2003]. Çocukların alkaloidlere karşı daha duyarlı olmaları nedeni ile, çok küçük bir miktar ciddi zehirlenme belirtilerine ve ölüme yol açabilmektedir [Bektaş ve ark., 2016]. Ayrıca bu alkaloidler anestezik ve spazmolitik ve göz ameliyatlarında kullanılmaktadır [Fatemeh Ashtiania, 2011]. Bunların dışında ağrı kesici olarak, boğmaca ve sigara kullanımı nedeni ile oluşan nefes darlığı sorunlarında, böbrek ve safra taşı sorunlarında, göz muayenelerinde, idrar yolları ve safra kesesi rahatsızlıklarında, iltihapları önlemede, kalp hastalıklarında, Parkinson hastalığında, romatizma ağrılarının azaltılmasında, spazm gidermede, düşük ve yüksek tansiyon sorunlarında ve ter ve mide salgılarını hafifletmede kullanılmaktadır [Aytac, 2019].

2.1.1. *Atropa belladonna*'nın Sınıflandırması

Atropa belladonna bitkisi *Solanaceae* (Patlıcangiller) ailesinden olan çok yıllık otsu bir bitkidir. *Atropa* cinsi için bilinen 39 bilimsel tür ismi mevcuttur. Bunlardan 4 tanesi kabul edilmiştir. Tablo 2.1.1'de *Atropa belladonna*'nın filogenetik sınıflandırması gösterilmiştir.

Tablo 2.1.1: *Atropa belladonna*'nın filogenetik sınıflandırması.

Alem	<i>Plantae</i>
Alt alem	<i>Viridiplantae</i>
Bölüm	<i>Tracheophyta</i>
Sınıf	<i>Magnoliopsida</i>
Alt sınıf	<i>Asteridae</i>
Takım	<i>Solanales</i>
Aile	<i>Solanaceae</i>
Cins	<i>Atropa</i>
Tür	<i>Atropa belladonna</i> L.

2.1.2. *Atropa belladonna*'nın Morfolojik Özellikleri

Atropa belladonna (Şekil 2.1.2) dallanmış, çok yıllık ve otsu bir bitkidir. Çoğunlukla etli köke sahip bir yarı çalı formundadır. 1,5-2 metreye kadar yükselip, toprak seviyesinin biraz üstünden itibaren dallamaya başlar ve gölgeli yerlerde yetişir [Cikla ve ark., 2011]. Sapları yeşil ve morumsu renk gösterir. Oval yaprakları 18 cm uzunluğa kadar gelişim gösterebilir, belirgin damarlara sahiptir ve alt yüzeyleri tüylüdür. Çan şeklindeki çiçekleri ise dipleri sarı, üst kısımları soluk mor ve az koku özelliklerini taşır ve 2-3 cm uzunluğundadır. *Atropa belladonna* bitkisi yaz boyunca çiçeklidir [Aytac, 2019]. Meyveleri olgunlaşmadan önce yeşil renktedir. Olgunlaştıkça yeşilden parlak siyaha doğru uzan renklere sahip olurlar ve yaklaşık 1 cm uzunluktadırlar. Bitkinin tohumları oldukça küçük olup, yaklaşık 1000 tohumun ağırlığı 1 g kadardır. Tohumların uzunluğu 1,5-1,8 mm ve genişliği 1-1,5 mm kadardır. Kabuğu sert, yüzeyi ağımsı, mat veya hafif parlak renklidir.



Şekil 2.1.2: *Atropa belladonna* bitkisi.

2.1.3. *Atropa belladonna*'nın İklim ve Toprak İstekleri

Atropa belladonna 90-180 m kadar yüksekliklerde, 50-55 derece kuzey enlemleri arasında yetişirken; gölgelenmenin fazla olduğu kireçli topraklarda deniz seviyelerinde de yetişebilir. Hem ılıman hem de kurak iklimlerde yetişebilse de nemli toprakları tercih eder. Bunun yanında yaz ayları ılık ve kurak geçen güneşli bölgelerde yetiştiği zaman alkaloid içeriğinin daha yüksek olduğu görülmüştür [Aytac, 2019]. Ağaçların gölgesinde, ormanlık tepelerde, tebeşir veya kireçtaşında çalı formunu oluşturur; fazla güneşe maruz kalan bitkiler bodur hale gelir. Doğal koşullar altında büyüyen türler daha çok böcek saldırılarına maruz kalır [Rita & Animesh, 2011].

2.1.4. *Atropa belladonna*'nın Tarımı ve Verimi

Oldukça geniş bölgelerde tarımı yapılabilen *Atropa belladonna*, kök saplarından ve tohumlarından elde edilir. Tohumlar martın ilk yarısına kadar ekilmektedir. Fakat tohumların çimlenmesi dormansi durumu nedeni ile 2-3 ay geciktiği için tohum yerine kök saplarının tercih edildiği çiftçiler tarafından bildirilmiştir [N.S & Prasad, 2014].

Ekim yapıldıktan sonra bir yıl içerisinde 1.5 metreye kadar uzayan *Atropa belladonna*'nın çiçeklenmesi eylül ayına kadar sürer. Kış aylarında çok fazla dallanmayı önlemek amacı ile 80-90 cm kadar yukarıdan yapraklar ve üst kısımlar kesilerek toplanır.

İkinci yıl çiçeklenme zamanında bitkinin tamamı kesilerek bir kısmı sıvı ekstre yapımında kullanılırken bir kısmı ise kurutularak bandaj, gliserin, kuru ekstre, merhem ve tentür hazırlığı gibi işlemlerde kullanılır. İki ya da üç yılda bir ağustos ayında kökler sökülerek yaşlı bitkiler toplanır ve benzer yöntemler için kullanılır. Dikim yapıldıktan sonra azot ve fosfor alt gübre olarak verilirken bir ay sonra üst gübre olarak tekrar azot verilir [Özgüven, Kırıcı, & Şener, 1986].

Atmosfer şartlarındaki değişiklikler *Atropa belladonna*'nın bulundurduğu total alkaloit miktarında farklılıklara neden olmaktadır. En fazla alkaloit oranı güneşli ve kurak bölgelerde yetişmiş olan bitkilerden elde edilmektedir. Mayıs ve haziran gibi güneşlenmenin fazla olduğu aylarında alkaloit oranının %0,6, güneşlenmenin az olduğu koşullarda ise alkaloit oranının %0,3 olduğu raporlanmıştır. [Rita & Animesh, 2011].

2.1.5. *Atropa belladonna*'da Bulunan Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolit terimi ilk kez 1891 yılında Kossel tarafından primer metabolit karşısı olarak tanımlanmıştır. Theis ve Lerdau ise sekonder metabolitleri 2003 yılında bitkilerin ürettiği, fotosentez sonucu açığa çıkmayan, bazı fizyolojik süreçler sonucunda oluşan ve solunum veya fotosentez gibi önemli olaylar için gerekliliği bulunmayan maddeler olarak tanımlamışlardır [Erkoyuncu & Yorgancılar, 2015].

Bir bitkideki sekonder metabolizma, bitkinin kendi ortamında hayatta kalmasında büyük rol oynar. Tozlayıcıların çekiciliği, avcılara ve hastalıklara karşı savunma vb. sekonder metabolitlerin rollerine örnek olarak verilebilir [Wink, 1988].

Sekonder metabolitler primer metabolizma basamaklarının ara ürünlerinden bazı metabolik basamaklarda üretilirler ve genel olarak biyosentez basamaklarına göre sınıflandırılırlar [Bourgau, Gravot, Milesi, & Gontier, 2001]. Çoğu referansta, bitkilerden ekstrakte edilen sekonder metabolitlerin üç ana sınıfa ayrıldığı belirtilmektedir: terpenoidler, alkaloitler ve fenolikler (Tablo 2.1.5) [Kabera J., 2014].

Tablo 2.1.5: Sekonder metabolitlerin biyosentez basamaklarına göre sınıflandırılması.

Tip	Örnek
Terpenoidler	
Hemiterpen	Prenol
Monoterpen	Limonen
Sesquiterpen	ABA (Absisik asit)
Diterpen	Giberellin
Triterpen	Lanosterol
Tetraterpen	Likopen
Politerpenler	Vitamin E
Alkaloitler	
	Skopolamin
	Atropin
	Hiyosiyamin
	Solanin
Fenolikler	
	Fenol
	Salisilik asit

Atropa belladonna modern tıp için büyük bir öneme sahiptir ve eczacılık endüstrisi için yetiştirilmesi oldukça yaygındır. Hem tıbbi uygulamalarda kullanılan hem de suikastçiler tarafından kullanılmış olan çeşitli alkaloitlere sahiptir. Bitkinin bütün kısımlarında tropan alkaloitler bulunurken en zehirli kısmı köküdür, fakat bu durum numunelere göre farklılık gösterebilir. *Atropa belladonna* toksik etkiye sahip olduğu için deride tahrişe neden olarak alerji meydana getirebilir. Bir araştırmada sonucunda total alkaloit oranının köklerde % 1.25 olduğu, yapraklarda ise % 0.91 olduğu gösterilmiştir [Özgüven, Sener, & Kirici, 1984].

Tropan alkaloitleri, insanoğlunun bildiği en eski ilaçlar arasındadır. Zehirli cins olarak sınıflandırılan *Solanaceae* ailesi bitkilerinden olan *Atropa*, birçok alkaloit içeren tür olarak tanınmıştır ve çeşitli etnik grupların halk tıbbındaki kayıtlarında bol olduğu bilinmektedir. 1819'da Meissner ("alkaloit" terimini icat eden kişi), bu zehirli bitkilerin aktif prensiplerinin karakter olarak alkalın olduğunu ve böylece ekstraksiyon

teknikleriyle izole edilebildiğini ve dolayısıyla bireysel alkaloid bileşiklerinin 1830'dan itibaren izole edilmeye başlandığını ilk fark eden kişi olmuştur [Gryniewicz & Gadzikowska, 2008].

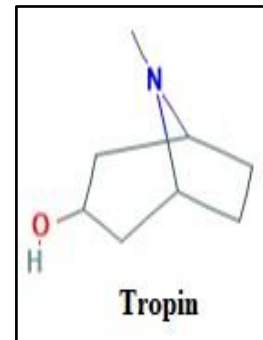
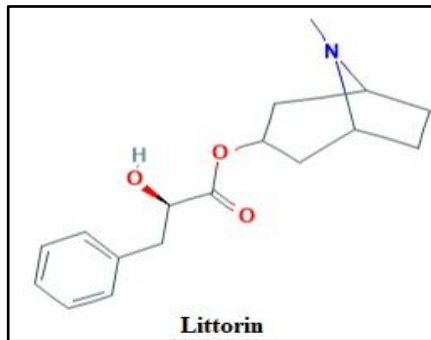
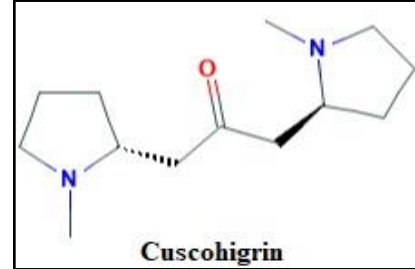
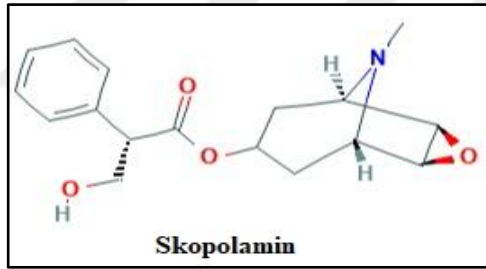
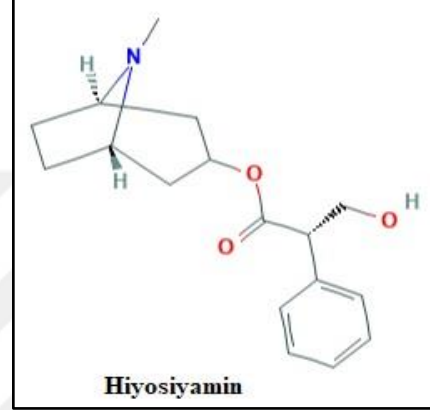
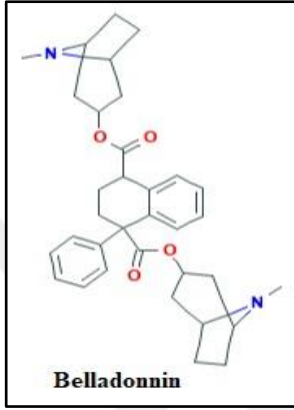
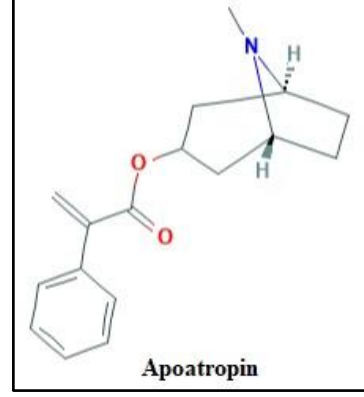
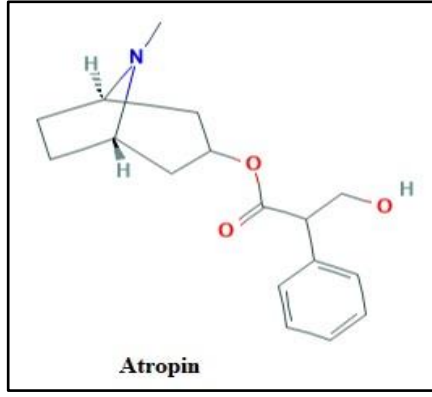
Tropan alkaloidleri, yedi karbonlu bir halka boyunca bisiklik bir azot köprüsünün varlığı ile tanımlanan bir alkaloidler sınıfıdır. Özellikle *Solanaceae* cinslerinden olan *Atropa*'da yaygındır [Griffin & Lin, 2000]. Tropan alkollerinin ve alifatik ya da aromatik olan çeşitli yapı asitlerinin esterleridir [Kazeem ve ark., 2010].

Atropa belladonna bitkisinin sahip olduğu tropan alkaloidlerini meydana getiren en önemli alkaloidler *atropin*, *apoaotropin*, *belladonnin*, *hiyosiyamin* ve *skopolamin*'dir. Aynı zamanda *Atropa belladonna* bitkisinde *cuscohigrin*, *littorin* ve *tropin* alkaloidleri de bulunur (Şekil 2.1.5.a). Bu alkaloidlerden *skopolamin* önemli ticari değere sahiptir.

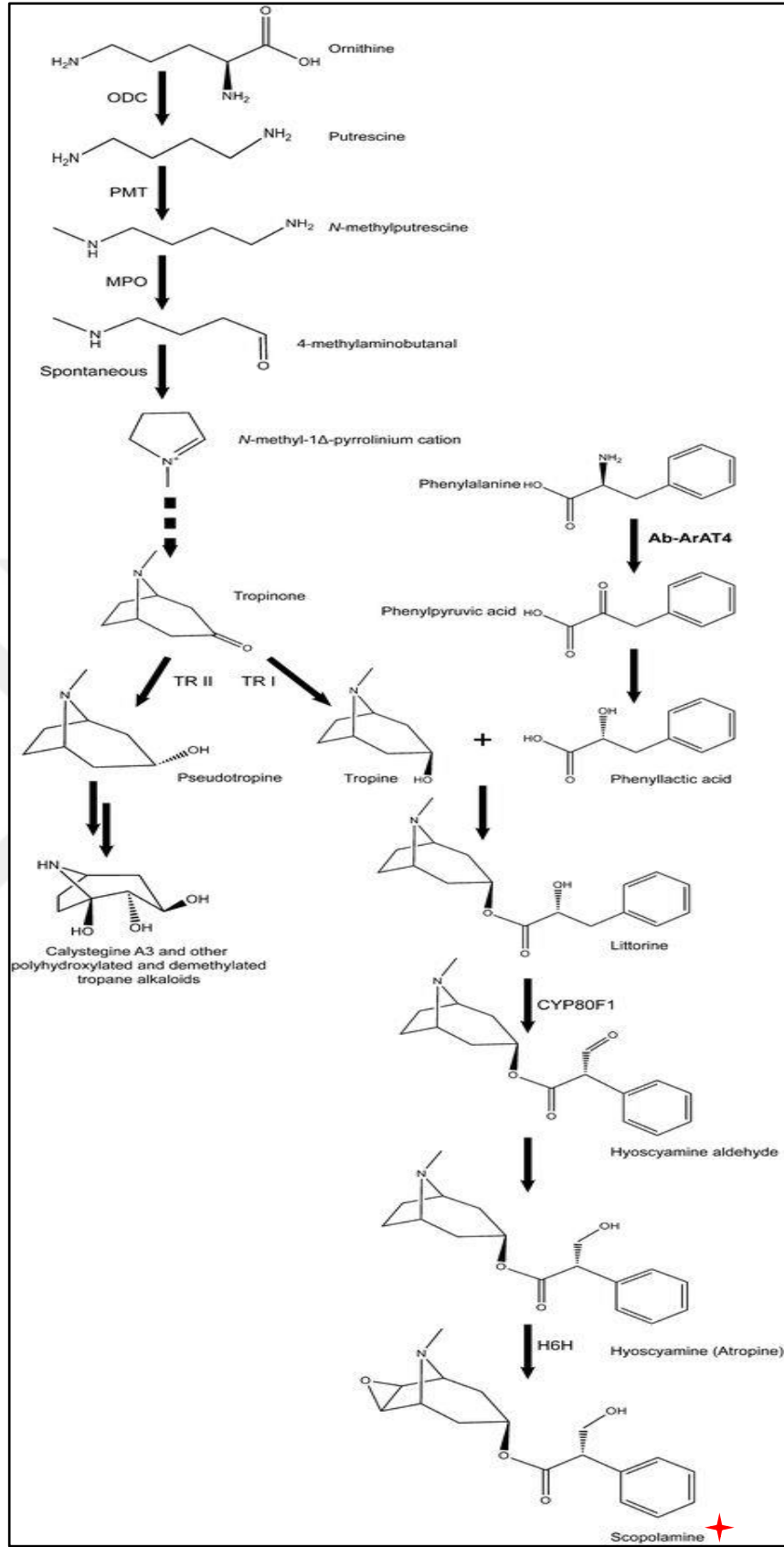
Skopolamin, antiemetikten yeniden canlandırmaya çeşitli tıbbi uygulamalarda kullanılan en değerli tropan alkaloidlerden biridir ve ayrıca yeni nesil ilaçların sentezinde bir hammadde görevi görür. *Skopolamin*'in bir sorgu yardımcısı olarak (veya “gerçek serumu”) kullanımı zayıf bir şekilde belgelenmiştir [Gryniewicz & Gadzikowska, 2008].

Skopolaminin farmakolojik etkileri çok çeşitlidir. İlaç, lokomotif aktivitesini, nörotransmisyonu ve kısa süreli belleği etkileyen MSS üzerinde belirgin etkiler sergiler. Klinik uygulamaları arasında hareket hastalığı semptomlarının hafifletilmesi, anestezi için ön tedavi, alkol krizlerinde sakinleştirme, ruh hastalığı veya delilik ve parkinson titremelerinin tedavisi yer almaktadır. Ayrıca, yeni MSS ilaç adaylarının test edilmesinde yararlı olduğu düşünülen, yaşlanma ve bunamada gözlenen işlev bozukluklarını modellemede geçici bilişsel açıkları uyarmak için kullanılır [Renner, Oertel, & Kirch, 2005].

Skopolaminin biyosentezi (Şekil 2.1.5.b) tam olarak anlaşılmamıştır, ancak poliamin putresini elde etmek için proteinojenik olmayan amino asit ornitin ornitin dekarboksilaz tarafından dekarboksilasyonu ile başlatılmaktadır [Michael, Furze, Rhodes, & Burtin, 2015].



Şekil 2.1.5.a: *Atropa belladonna* bitkisinde bulunan alkaloidler.



Şekil 2.1.5.b: *Atropa belladonna* ve ilgili *Solanaceous* türlerindeki tropan alkaloid biyosentetik yolu.

2.2. *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes, çubuk şeklinde (0.6 – 1.0 x 1.5 – 3.0 µm boyutlarında), gram negatif bir toprak bakterisidir [Erwin & Townsend, 1907]. Tek tek veya çiftler halinde bulunabilen, flagellası vasıtası ile hareket eden *Agrobacterium rhizogenes* bakterileri spor formu oluşturmazlar [Ozyigit, Dogan, & Artam Tarhan, 2013].

Agrobacterium rhizogenes, saçak kök oluşumu için gereken, yüksek oranda korunmuş bir “çekirdek” DNA bölgesini içeren büyük bir kök indükleyici (Ri) plazmidinin varlığı ile karakterize edilir [Filetici, Spano, & Costantino, 1987; Veena & Taylor, 2007; S. B. Gelvin, 2009]. *Agrobacterium rhizogenes*, genetik transformasyon sonucu enfekte olmuş bitkilerde saçak kök formuna neden olur [Weller & Stead, 2002; Weller, Stead, & Young, 2005].

2.2.1. *Agrobacterium rhizogenes*’in Filogenetik Sınıflandırması

Agrobacterium cinsi için 10 tür mevcuttur. Tablo 2.2.1’de *Agrobacterium rhizogenes*’in filogenetik sınıflandırması gösterilmiştir.

Tablo 2.2.1: *Agrobacterium rhizogenes* bakterisinin filogenetik sınıflandırması.

Alem	<i>Bacteria</i>
Şube	<i>Proteobacteria</i>
Sınıf	<i>Alphaproteobacteria</i>
Takım	<i>Rhizobiales</i>
Aile	<i>Rhizobiaceae</i>
Cins	<i>Agrobacterium</i>
Tür	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>

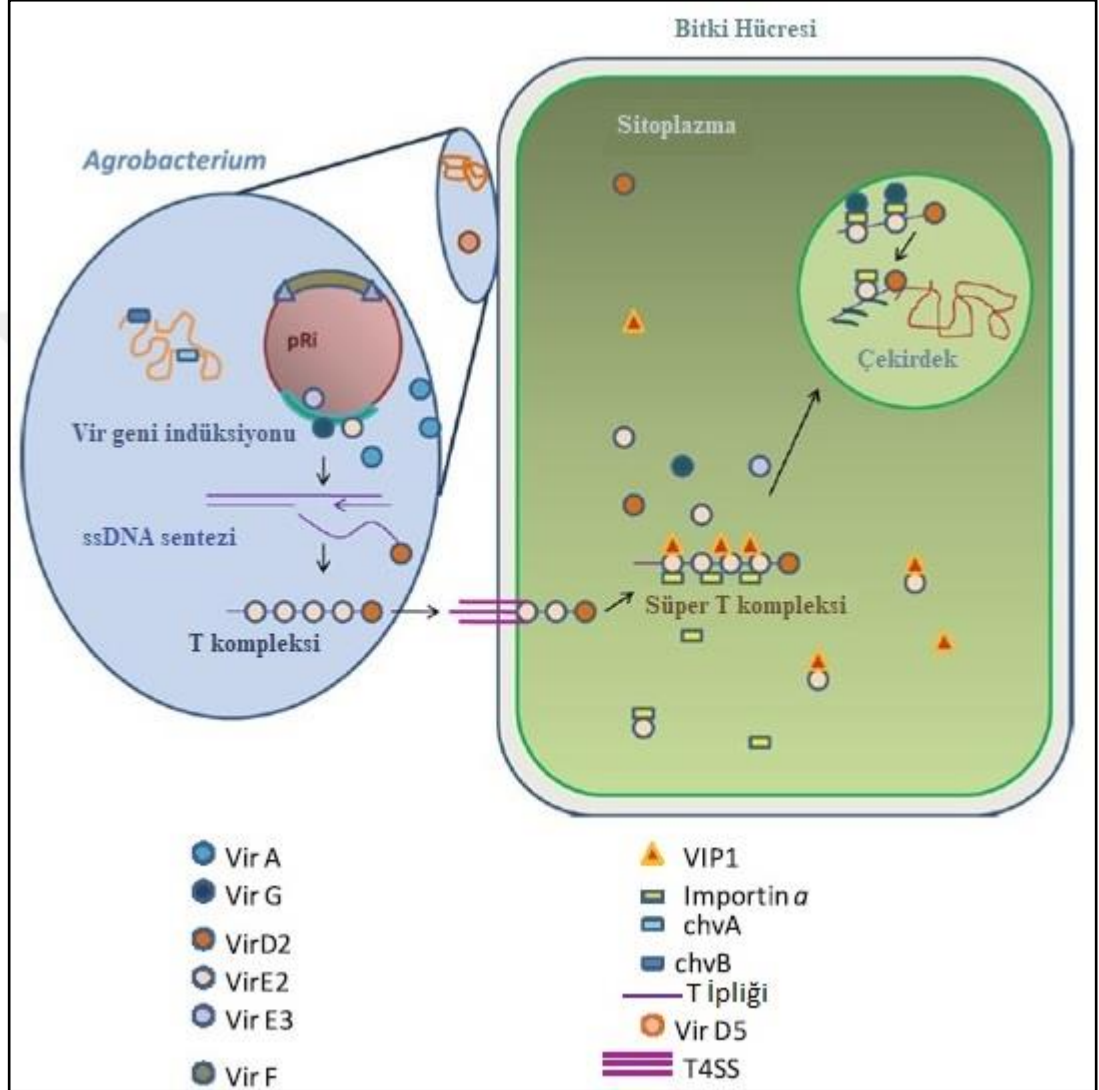
2.2.2. *Agrobacterium rhizogenes* Transformasyonunun Mekanizması

Saçak kök indüksiyonunun moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır [Sevon & Caldentey, 2002; Veena & Taylor, 2007]. Bununla birlikte, saçak kök oluşum süreci beş basamağa bölünebilir:

- Salgılanan fenolik bileşikler tarafından bakteri – bitki bağlanması ve aktivasyonu
- Bakteri hücrelerinde süreçlerin gerçekleşmesi
- T kompleksinin bakteri hücrelerinden bitki hücrelerine taşınması
- DNA entegrasyonu ve ekspresyonu
- Saçak kök oluşumunun başlaması

Bitki parçaları üzerindeki yaralı bölgelerden salgılanan fenolik bileşikler ile bakteriden bitkiye gen aktarımı başlar. Salgılanan fenolik bileşikler *Agrobacterium rhizogenes*'deki *virA* ve *virG* genleri ile algılanır ve bakteri, bitki üzerindeki bu yaralı bölgelerden bitki hücrelerine bağlanır. Bu bakteri – bitki bağlanması *virB* genlerinin bakteri ve bitki hücreleri arasında oluşturduğu bir tür köprü sayesinde gerçekleşir. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA'sının sınır bölgelerinde yapışık halde bulunan *virD* genleri, T-DNA'da bir çentik oluşturur ve T-DNA'yı paket haline getirir. *virD* bu olayı yerine getirerek endonükleaz görevini gerçekleştirir. *virD* geni tarafından paketlenen ve *virB* genlerinin bakteri ve bitki hücreleri arasında oluşturduğu köprüden geçen T-DNA, bitki sitoplazmasında nükleer lokalizasyon görevini sağlayan *vir* genleri (Tablo 2.2.2) sayesinde bitki hücresindeki çekirdeğe doğru yönlendirilir [Giri & Narasu, 2000]. Bunun yanında *Agrobacterium rhizogenes* kromozomlarının üzerindeki *chvA*, *chvB*, *pscA* ve *attR* genlerinin de transformasyonda rol aldıkları bilinmektedir [Demirci, 2017]. Bitki hücrelerine bağlanan *Agrobacterium rhizogenes* plazmidinin (Ri plazmidi) üzerindeki T-DNA bölgesinin bitki hücrelerine aktarılması ve bitki genomuna entegrasyonu (Şekil 2.2.2) sonucunda saçak kök oluşumu ve opin sentezi başlamaktadır. Opinler bakteriler tarafından azot, enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılan amino asit ve şeker türevleridir [Sinkar, Pythoud, White, Nester, & Gordon, 1988].

Agrobacterium rhizogenes'in Ri plazmidindeki T-DNA'nın bitki hücresine taşınmasında görev alan sınır bölgeleri bulunmaktadır. Sınır bölgeleri T-DNA "transfer stimulator sequence" (TSS) olarak adlandırılır ve tekrarlayan 8 baz çiftlik dizilerden oluşur [Veena & Taylor, 2007].



Şekil 2.2.2: Bitki genetik transformasyonu için *Agrobacterium* Ri plazmit bazlı T-DNA transferinin şematik gösterimi. Virülans efektör proteinlerinin ve bitki proteinlerinin isimleri kutuda gösterilmiştir.

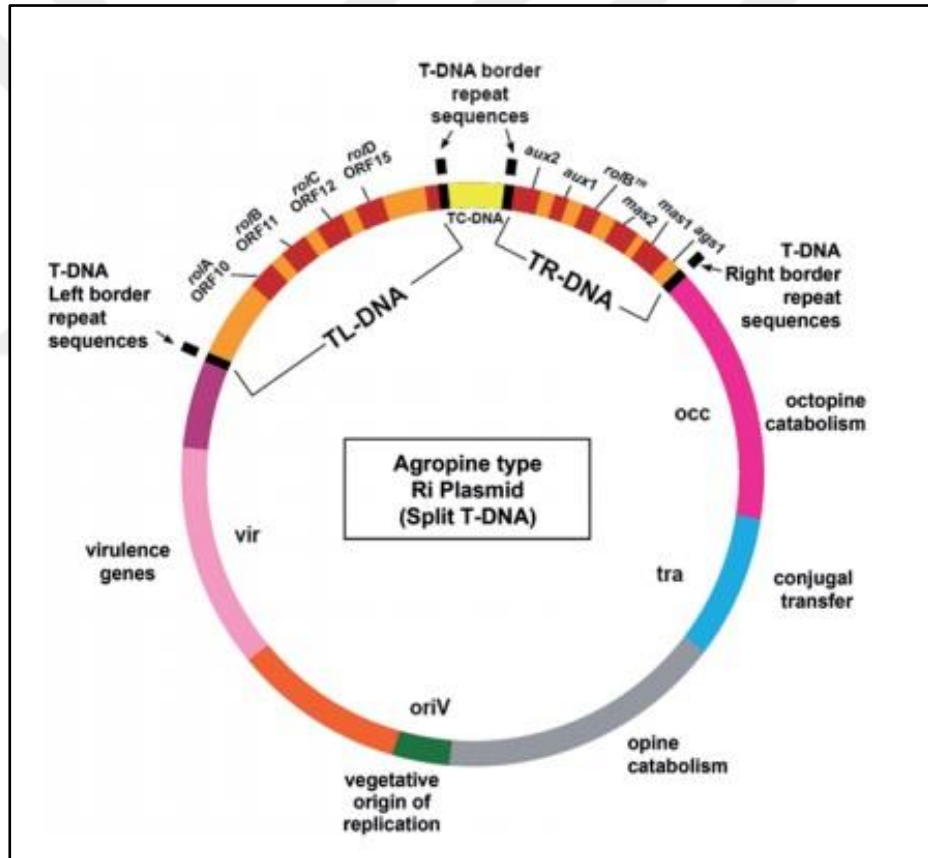
Tablo 2.2.2: *vir* genlerinin sentezlediği proteinler ve fonksiyonları.

Vir Proteinleri	Fonksiyonları
vira	Fenolik bileşikleri algılama
virG	Bütün vir operonlarının ekspresyonlarını uyarma
virB	T iplikçığının bitki hücresine girmesi için por oluşturma
virD1	T-DNA'yı sınır dizilerinden gevşetme
virD2	T-DNA'yı sınır dizilerinden kesme ve T iplikçığını bitki çekirdeğine yönlendirme
virE2 – virD2	T iplikçığını bitki çekirdeğine yönlendirme
virE2	T iplikçığını bitki hücresinde denatürasyondan koruma
virB – virD4	T iplikçığını ve vir proteinlerini bakteriden bitki hücresine aktarma
virF	T-DNA bitki genomu entegre olmadan önce T iplikçiklerine ait proteinleri açma

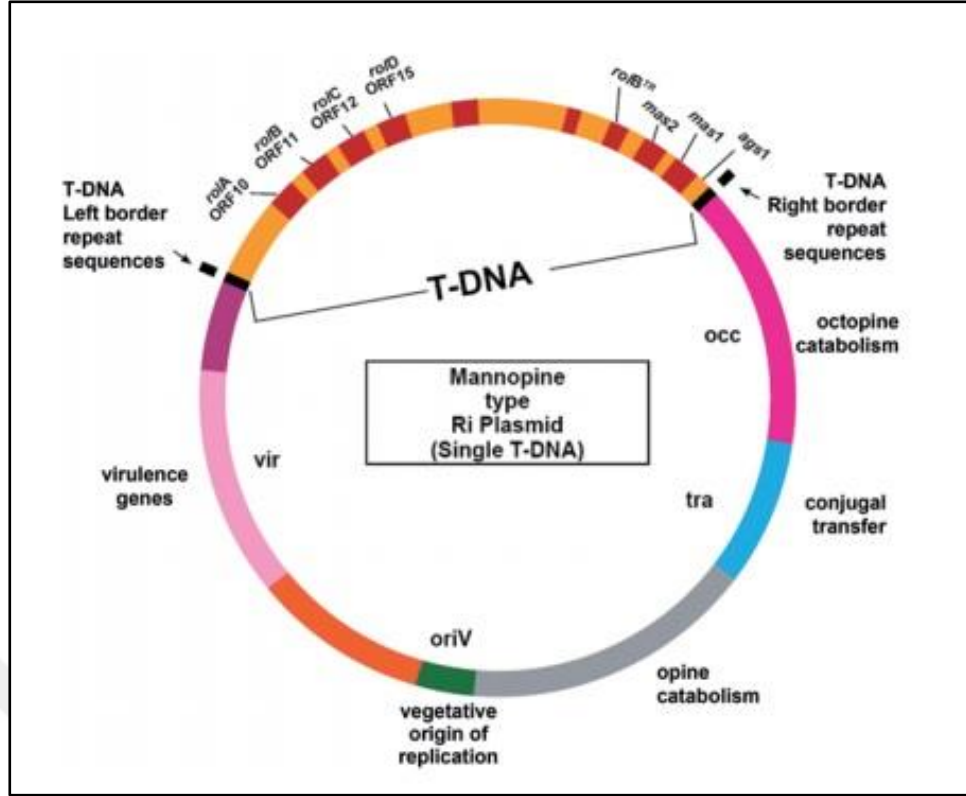
2.2.3. Ri Plazmit

Tüm *Agrobacterium rhizogenes* suşlarında Ri plazmidi, kök başlatma ve geliştirmede rol oynayan ve opin biyosentezi için gerekli genleri (rol genleri) taşıyan T-DNA olarak bilinen bir bölgeye sahiptir [Slightom, Durand-Tardif, Jouanin, & Tepfer, 1986; Hansen, Das, & Chilton, 1994]. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA'sı, sadece Ri plazmit konjugasyonu, opin sentezi ve katabolizması için değil, aynı zamanda T-DNA'nın başlatılması, aktarılması ve entegrasyonu için işlevlerde bulunan küçük bir Ri plazmit bölgesini (yaklaşık 200 kb) oluşturur [Ozyigit, 2012]. Her ne kadar T-DNA bakteri kökenli genler içeriyorsa da, bu genler, enfekte olmuş bitki hücrelerinde ekspresyonlarını sağlayan ökaryotik düzenleyici sekanslara sahiptir [Giri & Narasu, 2000]. T-DNA'nın bitki hücresinin genomik DNA'sına entegrasyonundan sonra, T-DNA, *Agrobacterium rhizogenes* tarafından besin kaynağı olarak kullanılan, opin olarak bilinen olağandışı amino asit şeker türevlerinin sentezini yönlendiren enzimleri eksprese eder [Petit ve ark., 1983; Moyano ve ark., 1999; Estrada-Navarrete ve ark., 2006; Bensaddek, Villarreal, & Fliniaux, 2008; Ozyigit, 2012].

Agrobacterium rhizogenes suşları tarafından üretilen en az iki sınıf opin vardır. Bu sınıflardan biri agropin grubunun opinleri ile temsil edilirken, diğer sınıf agrosinopin grubudur. *Agrobacterium rhizogenes* suşlarının çoğu, agrosinopin tipi opinler ve bazı veya birkaç agropin tipi opin üreten suş üretme yeteneğine sahiptir. Agropin, mannopin, agropinik asit ve mannopinik asit içeren agropin tipi opinler, agropin tipi (Şekil 2.2.3.a) olarak bilinen suşlar tarafından üretilirken, agropin tipi olarak bilinen tüm agropin tipi opinler, mannopin tipi (Şekil 2.2.3.b) olarak bilinen suşlar tarafından üretilir [F. F. White, Ghidossi, Gordon, & Nester, 1982; Petit ve ark., 1983; Tempé, Petit, & Farrand, 1984; Savka, Ravillion, Noel, & Farrand, 1990; Estrada-Navarrete ve ark., 2006].



Şekil 2.2.3.a: *Agrobacterium rhizogenes*'in agropin tipi Ri plazmidinin şematik gösterimi.



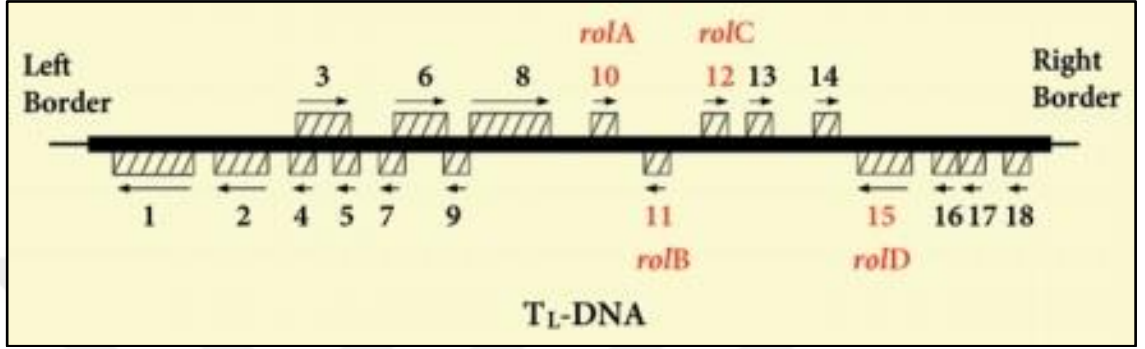
Şekil 2.2.3.b: *Agrobacterium rhizogenes*’in mannopine tipi Ri plazmidinin şematik gösterimi.

2.2.4. Ri T-DNA Genleri

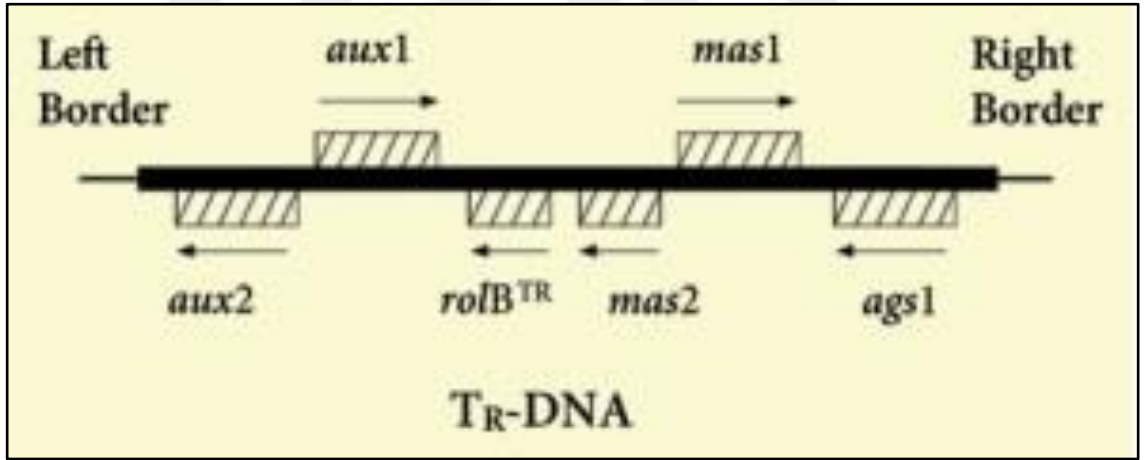
Hem sol T-DNA (T_L -DNA) (yaklaşık 15 – 20 kb) (Şekil 2.2.4.a) hem de sağ T-DNA’nın (T_R -DNA) (yaklaşık 8 – 20 kb) (Şekil 2.2.4.b) “bölünmüş” T-DNA (Tablo 2.2.4) olarak adlandırılan bitki genomuna bağımsız transformasyonları, agropin tip suşlarda pRi tarafından gerçekleştirilirken; mannopine tip suşlarda sadece tek bir T-DNA (T_L -DNA) transfer edilir. pRi’nin T_L -DNA’sı, *rolA*, *rolB*, *rolC* ve *rolD* olarak gösterilen dört rol genini içerir [Schmülling, Schell, & Spena, 1988; Stummann, Olesen, & Henningsen, 1989; Stanton B. Gelvin, 2003; Petersen Bensaddek ve ark., 2008]. Ri plazmidinde, T_L –DNA ve T_R -DNA, Şekil 2.2.3.a’da görüldüğü gibi T-Central DNA (T_C -DNA) ile temsil edilen, en az 15 kb entegre olmayan DNA ile birbirlerinden ayrılır.

Saçak kök fenotipi, ürünleri T_L -DNA’da bulunan belirleyiciler olarak işlev gören genlerle (*rolA*, *rolB*, *rolC* ve *rolD*) ilgilidir [Tepfer, 1984; Taylor, Amasino, White, Nester, & Gordon, 1985; Jouanin ve ark., 1987; Nakamura ve ark., 1988;

Schmülling ve ark., 1988; Sinkar ve ark., 1988]. Bu genler ORF 10, 11, 12 ve 15 bölgelerinde bulunurlar ve hücrelerin kök olarak farklılaşmasını sağlayarak saçak kök oluşumunu gerçekleştirirler [Giri & Narasu, 2000]. Buna karşılık T_R-DNA üzerindeki genlerin saçak kök meydana gelmesinde doğrudan bir etkisi bulunmamaktadır [Cardarelli ve ark., 1985; Ryder, Tate, & Kerr, 1985; Smulders ve ark., 1991].



Şekil 2.2.4.a: T_L-DNA'da gen lokasyonlarının şematik gösterimi.



Şekil 2.2.4.b: T_R-DNA'da gen lokasyonlarının şematik gösterimi.

Tablo 2.2.4: *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genleri, kodladıkları proteinler, fonksiyonları ve konak bitki hücresindeki fenotipik değişiklikler.

Gen	Protein	Fonksiyon	Fenotip
<i>rolA</i>	-DNA bağlayıcı proteinlerde yaygın olan sekans motifi -Düzenleyici transkripsiyon faktörü	-Yayılabılır faktör ile hücre uzamasını inhibe etme -Hormon konsantrasyonlarını azaltma -Oksine duyarlılığı arttırma -GA'nın hormon fizyolojisini hafifletme -Poliamin metabolizmasına müdahale etme -H ⁺ ATPaz aktivitesi ile plazma zarı arasında ilişki kurma	-Bodurlaşma -Koyu yeşil buruşuk yapraklar -Uzunluk ve genişlik oranının değişmesi -Yoğun çiçeklenme -Çiçeklenmenin gecikmesi -Kompakt çiçeklerin sayısının azalması
<i>rolB</i>	Plazma zarına yerleşir	-Oksin sinyalinin alımı ve dönüştürülmesindeki değişiklikler -Yeni meristem oluşumunu uyarma -Sekonder metabolizmayı uyarma	-Hızlı büyüme -Kök meristem neoformasyonu -Fazla dallanma -Plagiotropizm
<i>rolC</i>	-Kökte floeme özgü ekspresyon -Yaprakta düşük ekspresyon -Sürgün ucunda ekspresyon sağlamaz	-Hücre boyutunu küçültme -Absisik asit (ABA), poliamin ve etilen seviyelerini azaltma -Sürgün meristemlerinin oluşumu sağlama -Şeker metabolizmasını ve taşınımını düzenleme -Yüksek seviyelerde sekonder metabolitlerin üretimini uyarma	-Kısa internotlu dallanmış cüce bitkiler -Internotlarda azalmış epidermal hücre boyutu -Sivri uçlu yapraklar -Erken çiçeklenme -Azaltılmış çiçek boyutu -Azaltılmış polen üretimi

Tablo 2.2.4: Devam.

Gen	Protein	Fonksiyon	Fenotip
<i>rolD</i>	-Sadece agropin tipi suşlarda ekspresyon -Sitozolik protein -Zayıf dokularda organa özgü ekspresyon	-Tek başına kök oluşumunu indükleyememe -Çevresel stresin bir sonucu olarak savunma tepkisi sağlama	-Artan çiçeklenme -Azaltılmış köklenme -Apikal meristem hariç, her organın dokusunu uzatma ve genişletme -Kallus büyümesi sonucu tümör oluşumunun başlaması
<i>rolB^{TR}</i>	CX5R motifi olmayan N-terminal kısmı 14 amino asit içerir	Agropin tip Ri plazmidinde T _R -DNA üzerinde <i>rolB</i> homologluğunu gerçekleştirme	-Aşağı doğru bükülmüş buruşuk yapraklar -Kök tabanında oluşan sürgünler -Gecikmiş büyüme
ORF3n	-Fenolik enzimlerin modifikasyonu -Sekonder metabolizmayı ve / veya hormonların taşınması	Dokuların ayrılmasında negatif regülatör rolü oynama	-Gecikmiş çiçeklenme -Daha az yoğun çiçeklenme -Değişen internod uzaması, yaprak morfolojisi ve üst yapraklarda nekrotik uçlar -Bazal yaprakların sepallerinde nekroz belirtisi olmaması
ORF8	- N-terminal bölgesi (NORF8) ve C-terminal kısmından (CORF8) oluşan füzyon proteini -Tryptofan monooksijenaz aktivitesi	-Sükroz taşınımını düzenleme -N-terminal bölgesi şeker / nişasta birikimine neden olur -C-terminal bölgesi şeker / nişasta birikimini azaltır	-Büyüme geriliği -Klorotik ve nekrotik yapraklar -Yüksek seviyede şeker (glikoz, 21ransge ve sükroz) ve nişasta birikimi

Tablo 2.2.4: Devam.

Gen	Protein	Fonksiyon	Fenotip
ORF13	Retinoblastoma (RB) bağlayıcı bir motif olan LxCxE içerir	-Hormon homeostazı ve hücre döngüsünü düzenlenme -Kök apikal meristeminde mitoz sayısını arttırma -Farklılaşmayı tetikleme	-Yoğun yeşil ve hızlı çoğalan kallus gibi hücre çoğalmasını indüklemeye -Düzensiz yaprak oluşumu -Keskin yaprak damarları -Kısaltılmış ve değişken internod uzunluğu -Anormal ve asimetrik çiçekler -Yerçekimine doğru kök gelişimi -Kökte azaltılmış hücre sayısı ve hücre boyutu
ORF13a	Özellikle yaprak damarı dokularında dokuya özgü şekilde bulunur	-Kök indüksiyonu için gereklidir -Kendisi için düzenleyici işlevi görür	Fenotipte bir değişiklik olmaz
ORF14	Oksin benzeri etki	ORF13 ile birlikte kök oluşumunu uyarır	Morfolojik değişiklik olmaz

2.2.5. Saçak Kök Formu

“Saçak kök” terimi ilk olarak 1900’de Stewart ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Saçak kök formunun ayırt edici özelliği, kök kütlelerinin oluşmasıdır. *Agrobacterium rhizogenes* enfeksiyonunu takiben tüylü kök oluşumu, çok sayıda küçük kökün ince tüyler olarak doğrudan enfeksiyon bölgesinden çıkması sonucu oluşur [Chandra, 2012]. Saçak kök formu yatay açı ile büyümenin yanı sıra; kısa internodlar, yüksek derecede yan dallanma, buruşuk yapraklar, azalmış apikal baskınlık, kök tüylerinin bolluğu, anormal çiçek üretimi, gelişmiş büyüme oranları ve değişen sekonder metabolit birikimi ile karakterizedir [Ackermann, 1977; Tepfer, 1983; Balandrin, Klocke, Wurtele, & Bollinger, 1985; Pellegrineschi, Damon,

Valtorta, Paillard, & Tepfer, 1994; Flores, Vivanco, & Loyola-vargas, 1999; S. H. Lee ve ark., 2001; Casanova ve ark., 2004; Veena & Taylor, 2007].

Bitkiler yaralandığı zaman, fenolik bileşikler yaralı kısımlardan salınır ve bu durum *Agrobacterium rhizogenes* çekiciliğine neden olur. Bakteri, kemotaksis ile yaralı bölgelere doğru hareket eder ve bitki hücrelerini enfekte eder. Daha sonra yara bölgesinde enfeksiyon, ardından bakterilerin kök uyarıcı (Ri) plazmidinden (pRi) belirli bir DNA segmentinin (T-DNA) aktarılması gerçekleşir [Kumar, Sharma, Prasad, Gururaj, & Ravishankar, 2006]. *Agrobacterium rhizogenes* kaynaklı kökler, dış kaynaklı bitki büyüme düzenleyicileri olmadan *in vitro* büyüme özelliğine sahiptir [S. H. Lee ve ark., 2001; Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002].

Transformasyon işlemleri sonrasında meydana gelen köklerin transgenik olup olmadığını belirlemek için T-DNA veya opin belirleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bitki genomunda T-DNA varlığının belirlenmesi, transformasyon doğrulama işlemi için en güvenilir metottur. PCR yöntemi T-DNA tespitinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir [Georgiev, Georgiev, Weber, & Pavlov, 2008]. Saçak kök kültürlerinde transformasyonun doğrulanmasında *rolA*, *rolB* veya *rolC* primer çiftleri kullanılır [S. H. Lee ve ark., 2001; Guillon ve ark., 2006].

Agrobacterium rhizogenes Ri T-DNA ile transformasyonu takiben birçok dikotiledonlu bitkide saçak kökler indüklenmiştir [Costantino ve ark., 1994; Nilsson & Olsson, 1997]. Ri T-DNA genlerinin ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalar, T_L bölgesinin *rolA*, *rolB* ve *rolC* genlerinin, saçak kökleri indüklemek için yeterli olduğunu belirtirken, T_R bölgesinin yardımcı genleri, saçak kök fenotipinden sorumlu olduğunu göstermiştir. Bugüne kadar, *rolB* geni en fazla dikkati çeken gen bölgesidir, çünkü etkisizleştirildiğinde, kök oluşumunu tamamen baskılandığı görülmüştür ve test edilen tüm bitkilerde bireysel olarak kök oluşumunu indükleyebilen tek gen bölgesidir. *RolB*-transgenik bitkileri ve *rolB*'nin meydana getirdiği köklerin büyüme modeliyle ilişkili morfolojik değişiklikler, oksin ile "aşırı duyarlı bir durum" olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, artmış oksin içeriği, normal köklerle karşılaştırıldığında saçak köklerin farklı büyümeleri ve morfolojileri için tek olası neden değildir. Aslında, saçak kökler genellikle oksine karşı normal emsallerinden daha yüksek hassasiyet gösterirler. Bu nedenle oksinler saçak köklerin büyümesini ve gelişimini kontrol eden ana faktör olarak kabul edilir [C. Liu ve ark., 2002].

Bakteri transfer DNA'nın (T-DNA) karakterizasyonu ve bu T-DNA'da bulunan genlerin ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalar, kök indükleyici (Ri) plazmidinin T_L bölgesinin *rol A*, *B* ve *C* genlerinin, saçak kökleri indüklemek için yeterli olduğunu gösterir [Frank F. White, Taylor, Huffman, Gordon, & Nester, 1985; Spena, Schmülling, Koncz, & Schell, 1987]. T_R bölgesinin yardımcı genleri (oksin biyosentezini kodlayan bakteri genleri) saçak kök fenotipinden sorumludur [Amselem & Tepfer, 1992]. Bu nedenle, oksinin, kök indüksiyonun kendisi değil ise bile en azından saçak kök büyümesini ve gelişimini kontrol eden ana faktör olduğu kabul edilir [Biondi, Lenzi, Baraldi, & Bagni, 1997].

Saçak kök oluşumunun birçok pratik uygulamaları vardır ve kök salması zor olan birçok bitki türü nedeniyle çok fazla ticari ilgi görmektedir [Davies, Davis, & Kester, 1994]. Oksin indol-3-asetik asit (IAA), köklenmeyi teşvik etmek için kullanılan ilk bitki hormonudur [Cooper, 1935]. O sıralarda, ikinci bir sentetik oksin olan indol-3 bütirik asidin (IBA) de köklenmeyi desteklediği ve IAA'dan daha etkili olduğu keşfedildi [Zimmerman & Wilcoxon, 1935]. IBA şu anda birçok bitki türünü köklendirmek için ticari olarak dünya çapında kullanılmaktadır [Ludwig-Müller, Vertocnik, & Town, 2005].

2.2.6. *Agrobacterium rhizogenes* Transformasyonu ile Meydana Gelen Saçak Köklerden Sekonder Metabolit Üretmenin Avantajları

Fazla miktarda yan dallanmalar ve bol miktarda kök saçakları ile karakterize olan saçak kökler plagiotropik özellik gösterir [Hu & Du, 2006]. Tıbbi açıdan önemli olan birçok bitkiden sekonder metabolitler elde edilmektedir. Bu sekonder metabolitlerin bitkilerde gen düzeyinde ve moleküler seviyelerde sentezi hala bütünüyle anlaşılabilmiş değildir [Ono & Tian, 2011]. Buna karşılık sekonder metabolitlerin geniş ölçekte üretilmesinde organize hücre kültürlerindeki morfolojik farklılıklar arasında kuvvetli bir bağlantı bulunmaktadır [Mehrotra, Kukreja, Khanuja, & Mishra, 2008]. Bu sayede saçak kök kültürlerinin sekonder metabolitlerin kaynağı olarak kullanılması büyük bir potansiyel olarak görülmektedir [Giri & Narasu, 2000].

Sekonder metabolit üretiminde saçak kök kültürlerinin kullanılmasının saçak köklerin bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı ortamlarda da hızlı bir şekilde büyümesi ve saçak köklerden yüksek miktarda sekonder metabolit elde edilebilmesi gibi avantajları vardır. Saçak kökler organ kültürü olduğu için sekonder metabolit üretme kabiliyeti; tam bitkiden, hücre süspansiyon kültürlerinden ve kallus kültürlerinden fazladır [Danphitsanuparn, Boonsnongcheep, Boriboonkaset, Chintapakorn, & Prathanturarug, 2012].

Son yıllarda, *Agrobacterium rhizogenes* transformasyonu ile elde edilen transgenik saçak kökler düşük maliyet, genetik ve biyokimyasal kararlılık, saçak köklerden elde edilen sekonder metabolitlerin ana bitki ile aynı yapıda olması gibi özellikleriyle avantaja sahip olmaktadır [Giri & Narasu, 2000; Banerjee ve ark., 2001; Banerjee, Singh, & Rahman, 2012].

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERİYALLER

3.1.1. Bitki Materyali ve Bakteri Suşu

Bu tez çalışmasında kullanılan *Atropa belladonna* bitkisinin elde edilmesi için kullanılan tohumlar, Doç. Dr. Tijen TALAS OĞRAŞ tarafından Bursa ilinin İnegöl ilçesinden temin edilmiştir.

Transformasyon işlemleri sırasında kullanılacak olan *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 bakteri suşu ATCC: The Global Bioresource Center firmasından 18.06.2018 tarihinde temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler

Tohum sterilizasyonu ve çimlendirme işlemlerinde kullanılan malzemeler Tablo 3.1.2.a'da gösterilmiştir. Bunlara ek olarak otoklavlanmış distile su (dH₂O) da tohum sterilizasyonu aşamasında kullanılmıştır.

Tablo 3.1.2.a: Tohum sterilizasyonu ve çimlendirme işlemlerinde kullanılan malzemeler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Etil Alkol	ISOLAB	920.026.2500
Hidrojen Peroksit	MERCK	1072091000
Nitrik Asit	Sigma	7697-37-2
Sülfürik Asit	Sigma	7664-93-9
Sodyum Hipoklorit	Domestos	0001593 (Ticari)
Tween 20	MERCK	822184
Sükroz	Duchefa	S0809.5000
Glisin	SIGMA	G5417

Tablo 3.1.2.a: Devam.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Nikotinik asit	SIGMA	N4126
Tiamin HCL	SIGMA	T1270
Piridoksin HCL	SIGMA	P6280
Myo-inositol	SIGMA	I5125
Agar	Duchefa	P1001.5000
MS Besi Ortamı	Caisson	MSP01

Bakteri kültürü, transformasyon ve sıvı kök kültürü aşamalarında kullanılan malzemeler Tablo 3.1.2.b’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1.2.b: Bakteri kültürü ve sıvı kök kültürü işlemlerinde kullanılan malzemeler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Pepton	Merck	91079-38-8
Yeast ekstrakt	Merck	8013-01-2
Sodyum Klorür	Sigma	7647-14-5
Mannitol	Sigma	69-65-8
Dipotasyum fosfat	Sigma	60356
Magnezyum sülfat	Sigma	7487-88-9
LB Besi Ortamı	Caisson	LBP01
LB Agar Besi Ortamı	Caisson	LBP02
Gliserol	Sigma	56-81-5
MS Besi Ortamı	Caisson	MSP01
Sükroz	Duchefa	S0809.5000
Glisin	SIGMA	G5417
Nikotinik asit	SIGMA	N4126
Tiamin HCL	SIGMA	T1270
Piridoksin HCL	SIGMA	P6280

Tablo 3.1.2.b: Devam.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Myo-inositol	SIGMA	I5125
IBA (İndol Butirik Asit)	SIGMA	57310

Elde edilen köklerde transformasyon işleminin doğrulanması ve transforme saçak köklerden tropan alkaloidlerinin ekstraksiyonu ve analizi aşamalarında kullanılan malzemeler Tablo 3.1.2.c’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1.2.c: Transformasyonun doğrulanması, ekstraksiyon ve analiz işlemlerinde kullanılan malzemeler.

Malzeme Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Phire Plant Direct PCR Kit	Thermo Scientific™	F130WH
Agaroz	Sigma	A9539
Tris Base	Merck	77-86-1
Asetik Asit	Sigma	64-19-7
EDTA	Sigma	E9884
Bizmut Nitrat	SIGMA	10035-06-0
Asetik Asit	ISOLAB	901.013.2500
Potasyum İyodür	MERCK	1050510100
Kloroform	MERCK	1.02444.2500
Metanol	ISOLAB	947.047.2501
Amonyum Hidroksit	ISOLAB	903.016.2500
Sülfürik Asit	ISOLAB	970.023.2500
Sodyum Sülfat	ISOLAB	969.146.1000
pH Kağıdı	ISOLAB	101.02.001.100
Silika plaka	Merck	1.05554.0001

Primerler Panda, Mehta ve Hazra’nın çalışmaları [Panda, Mehta, & Hazra, 2017] baz alınarak firmadan sipariş edilmiştir. PCR işleminde kullanılan forward ve reverse primerler Tablo 3.1.2.d’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1.2.d: PCR işleminde kullanılan primerler.

Gen	Primer Dizisi	Firma
<i>rolB</i>	Forward: 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA-3' Reverse: 5'-TTAGGCTTCTTTCATTTCGGTTTACTGCAGC-3'	Sentegen

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışması sürecince kullanılan bütün cihazlar Tablo 3.1.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.1.3: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Cihazın Modeli	Firma Adı
Buz Makinesi	F 125 Compact	İNOKSAN
Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C)	4264 N	ARÇELİK
Çalkalamalı İnkübatör	AG CH-4103	INFORS HT
Derin Dondurucu (-20 °C)	CV 135	PHILCO
DNA/RNA UV-Cleaner Box	UVT-B-AR	Biosan
Etüv	EN 500	Nüve
Hassas Terazı	CPA 1003S	Sartorius
Hassas Terazı	GR-202	AND
HPLC Cihazı	LC-20A	Shimadzu
İklim Odası	PG34-3	DigiTech
Jel Dökümantasyon Cihazı	Bio-Print TX4	VILBER LOURMAT
Laminar Akımlı Kabin	F20520162	VELP SCIENTIFICA
Manyetik Karıştırıcı	Heraeus	HERA Safe

Tablo 3.1.3: Devam.

Cihaz Adı	Cihazın Modeli	Firma Adı
Mikrodalga Fırın	MD 582	ARÇELİK
Otoklav	DX-150	Systec
Otomatik Pipet (10 µl)	Z657409	Eppendorf Research
Otomatik Pipet (100 µl)	4222829	Eppendorf Research
Otomatik Pipet (1000 µl)	34566975	Eppendorf Research
Otomatik Pipet (20 µl)	EP4925000065	Eppendorf Research
Otomatik Pipet (200 µl)	Z605778	Eppendorf Research
pH Metre	pH 211	HANNA Instruments
Rotary Evaporatör	I-300 Pro	BUCHI Interface
Spektrofotometre	NanoDrop	ND-1000
Sterilizatör	SL-250	ALC
Ultrasonik Su Banyosu	8891	Cole-Parmer
UV Lamba Cihazı	254-250	CAMAG
UV Lambası	D-63450	Kendro

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Tohum Sterilizasyonu ve Çimlendirme

Atropa belladonna tohumları için uygun olan sterilizasyon yönteminin ve çimlendirme ortamının belirlenmesi amacı ile *Atropa belladonna* tohumlarına yüzey sterilizasyonu işlemleri uygulanmış ve en uygun sterilizasyon yöntemi ve çimlendirme ortamı belirlenmiştir.

Tohum yüzey sterilizasyonu uygulamaları:

1. Yöntem: *Atropa belladonna* tohumları nitrik asit içinde 3 dk bekletildikten sonra steril distile su ile 2 dk boyunca yıkanıp steril filtre kağıdı üzerinde kurutulmuşlardır.

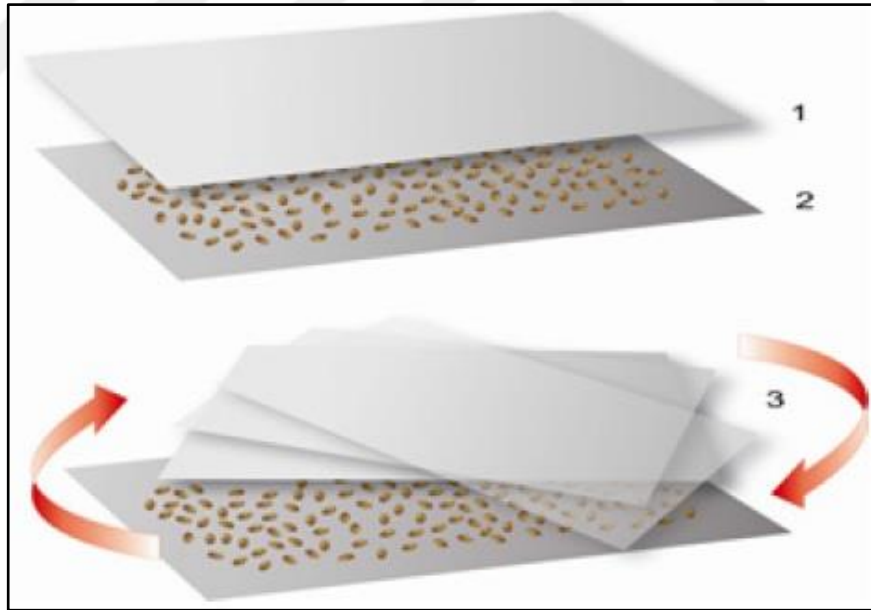
2. Yöntem: *Atropa belladonna* tohumları sülfürik asit içerisinde 1,5 dk bekletildikten sonra steril distile su ile 3 defa yıkanmıştır. Daha sonra % 70'lik etil alkol ile 1 dk boyunca yıkanmalarının ardından tekrar steril distile su ile 1 defa

yıkanmıştır. % 50'lik sodyum hipoklorit ile 10 dk boyunca yıkanmalarının ardından steril distile su ile 3 defa durulanıp steril filtre kağıdı üzerinde kurutulmuşlardır [Aghaei, Bahramnejad, & Mozafari, 2013].

3. Yöntem: *Atropa belladonna* tohumları % 70'lik etil alkol ile 2 dk yıkandıktan sonra % 15'lik hidrojen peroksit ile 2 dk yıkanmıştır. Steril distile su ile 3 defa durulandıktan sonra steril filtre kağıdı üzerinde kurutulmuşlardır.

4. Yöntem: *Atropa belladonna* tohumları % 70'lik etil alkol ile 1 dk boyunca yıkanmıştır. Steril distile su ile 1 defa yıkanmalarının ardından % 50'lik sodyum hipoklorit ile 10 dk boyunca yıkanmıştır. Daha sonra steril distile su ile 3 defa durulandıktan sonra steril filtre kağıdı üzerinde kurutulmuşlardır.

5. Yöntem: Zımpara kağıdı (Atlas Brand-P180C) kullanılarak kabukları tamamen uzaklaştırılan (Şekil 3.2.1) *Atropa belladonna* tohumları % 70'lik etil alkol ile 1 dk yıkanmıştır. Steril distile su ile 1 defa yıkanmanın ardından % 50'lik sodyum hipoklorit ile 10 dk yıkanmıştır. Daha sonra steril distile su ile 5 defa durulandıktan sonra steril filtre kağıdı üzerinde kurutulmuşlardır.



Şekil 3.2.1: *Atropa belladonna* tohum kabuklarının zımpara kağıdı kullanılarak uzaklaştırılması. Tohumlar zımpara kağıdının (2) pürüzlü yüzeyine eşit olarak yayılmıştır. Diğer zımpara kağıdı (1) kullanılarak tohumlara hafifçe bastırılarak dairesel hareketler (3) ile kabukların ayrılması sağlanmıştır.

Kullanılan çimlendirme ortamları:

1. Besi Ortamı: 30 g/L sükroz ve 6 g/L agar içeren MS ortamı

2. Besi Ortamı: 30 g/L sükroz ve 6 g/L agar içeren ½ MS ortamı

Sterilizasyon işlemleri sonrasında *Atropa belladonna* tohumları çimlenme aşaması için 30 g/L sükroz ve 6 g/L agar içeren MS ve ½ MS besisi ortamına aktarılmıştır. Sonrasında tohumlar, 25 °C sıcaklık ve karanlık koşullarının sağlandığı bitki iklim odalarında çimlenmeye bırakılmıştır. Uygulanan yüzey sterilizasyonu yöntemleri sonrasında çimlenme oranları, çimlenme süreleri ve sterilizasyon verimi dikkate alınarak *Atropa belladonna* tohumları için en uygun sterilizasyon yöntemi “5. Yöntem” ve en uygun çimlendirme ortamı “2. Besi Ortamı” olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu yöntem transformasyon işleminde kullanılacak olan *Atropa belladonna* bitkisinin elde edilmesi çalışmalarında kullanılmıştır. Çimlenen tohumlar 30 g/L sükroz ve 6 g/L agar içeren MS besisi ortamına aktarılarak 25 °C sıcaklık ve fotoperiyot (2000-3000 lux ile 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) koşullarının sağlandığı bitki büyütme kabinlerinde kültüre alınmışlardır.

3.2.2. *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 Bakterisinin Çoğaltılması ve İnokülasyonu

Agrobacterium rhizogenes ATCC 15834 bakterisinin çoğaltılması aşamasında katı LB (hazır toz stok), sıvı LB (hazır toz stok), sıvı YEP ve sıvı YMB besisi ortamları kullanılmıştır (Tablo 3.2.2). Bakteriler 15 ml’lik steril tüplerdeki 2 ml LB ortamına aktarılmıştır. 26 °C sıcaklık, 140 rpm çalkalama hızı ve karanlık koşullarda 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında bakteriler sıvı besisi ortamından steril öze yardımı ile steril koşullarda alınmıştır ve katı LB ortamının bulunduğu petri kültür kaplarına inoküle edilmiştir. 26 °C sıcaklıkta, 24 saatlik inkübasyon sonrasında katı besisi ortamında oluşan bakteri kolonilerinden steril koşullarda öze yardımı ile alınarak transformasyon işleminde kullanmak için sıvı LB besisi ortamına aktarılmıştır ve 1,5 ml’lik steril mikrosantrifüj tüpleri içerisinde gliserollü stokları hazırlanarak saklanmak üzere -80 °C’de stoklanmıştır.

Tablo 3.2.2: *A. rhizogenes* bakterisinin çoğaltılmasında kullanılan besi ortamları.

YEP Besi Ortamı	
İçerik	Miktar (g/L)
Yeast ekstrakt	10
Pepton	10
Sodyum klorür	5
YMB Besi Ortamı	
Dipotasyum fosfat	0.5
Magnezyum sülfat	0.2
Mannitol	10.0
Sodyum klorür	0.1
Yeast ekstrakt	1.0
pH : 6.8	

Transformasyon işlemleri sırasında *Atropa belladonna* yaprakları kullanılmıştır. *Atropa belladonna* yapraklarına *Agrobacterium rhizogenes* inokülasyonu için -80 °C stoktan alınan bakteriler canlandırma işlemi için sıvı LB, sıvı YEP ve sıvı YMB besi ortamlarında 26 °C sıcaklık, 140 rpm ve karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır. Çalışmalara YMB besi ortamı ile devam edilmiştir.

3.2.3. Bitki Yapraklarının *Agrobacterium rhizogenes* ile İnokülasyonu ve Saçak Köklerin Oluşturulması

In vitro koşullar altında tohumların çimlendirilmesi sonucunda elde edilen 2 aylık *Atropa belladonna* bitkilerinin yaprak kısımları kullanılarak, transformasyon işleminde *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 bakterisinin eksplantlara nüfuz etmesinde etkisi olabilecek çeşitli yöntemler kullanılmıştır.

Uygulanan transformasyon yöntemleri:

1. Yöntem: Sıvı LB besi ortamında çoğaltılan bakteriler +4 °C’de 3500 rpm’de santrifüjlenerek dibe çöktürülmüş ve pelet kısmı 10 ml sıvı MS ile çözdürüldükten sonra 10 µl asetosiringon eklenmiştir. Yaprak eksplantları ile birlikte 20 dk boyunca falcon tüp içerisinde çalkalandıktan sonra bakteri bulaşmış olan yaprak

eksplantlarındaki sıvı, steril filtre kağıdı ile uzaklaştırılmış ve eksplantlar 2 gün ½ MS besi ortamında kokültüre alınmıştır. Daha sonra 500 mg/L cefotaxime içeren MS besi ortamına (% 0,6 agarlı) aktarılmıştır.

2. Yöntem: Sıvı YEP besi ortamında çoğaltılan bakteriler +4 °C’de 3500 rpm’de santrifüjlenerek dibe çöktürülmüş ve pelet kısmı 10 ml sıvı MS ile çözündürüldükten sonra 10 µl asetosiringon eklenmiştir. Yaprak eksplantları ile birlikte 20 dk boyunca falcon tüp içerisinde çalkalandıktan sonra bakteri bulaşmış olan yaprak eksplantlarındaki sıvı, steril filtre kağıdı ile uzaklaştırılmış ve eksplantlar 2 gün ½ MS besi ortamında kokültüre alınmıştır. Daha sonra 500 mg/L cefotaxime içeren MS besi ortamına (% 0,6 agarlı) aktarılmıştır.

3. Yöntem: Sıvı LB besi ortamında çoğaltılan bakteriler +4 °C’de 3500 rpm’de santrifüjlenerek dibe çöktürülmüş ve pelet kısmı 10 ml sıvı MS ile çözündürülmüştür. Yaprak eksplantları ile birlikte 20 dk boyunca falcon tüp içerisinde çalkalandıktan sonra bakteri bulaşmış olan yaprak eksplantlarındaki sıvı, steril filtre kağıdı ile uzaklaştırılmış ve eksplantlar 2 gün ½ MS besi ortamında kokültüre alınmıştır. Daha sonra 500 mg/L cefotaxime içeren MS besi ortamına (% 0,6 agarlı) aktarılmıştır.

4. Yöntem: Sıvı YEP besi ortamında çoğaltılan bakteriler +4 °C’de 3500 rpm’de santrifüjlenerek dibe çöktürülmüş ve pelet kısmı 10 ml sıvı MS ile çözündürülmüştür. Yaprak eksplantları ile birlikte 20 dk boyunca falcon tüp içerisinde çalkalandıktan sonra bakteri bulaşmış olan yaprak eksplantlarındaki sıvı, steril filtre kağıdı ile uzaklaştırılmış ve eksplantlar 2 gün ½ MS besi ortamında kokültüre alınmıştır. Daha sonra 500 mg/L cefotaxime içeren MS besi ortamına (% 0,6 agarlı) aktarılmıştır.

5. Yöntem: Sıvı LB besi ortamında çoğaltılan bakteri kültürüne soğuk PBS eklendikten sonra +4 °C’de 3500 rpm’de santrifüjlenerek dibe çöktürülmüş ve pelet kısmı 10 ml sıvı MS ile çözündürülmüştür. Yaprak eksplantları ile birlikte 20 dk boyunca falcon tüp içerisinde çalkalandıktan sonra bakteri bulaşmış olan yaprak eksplantlarındaki sıvı, steril filtre kağıdı ile uzaklaştırılmış ve eksplantlar 2 gün ½ MS besi ortamında kokültüre alınmıştır. Daha sonra 500 mg/L cefotaxime içeren MS besi ortamına (% 0,6 agarlı) aktarılmıştır.

6. Yöntem: Sıvı LB besi ortamında çoğaltılan bakteri kültürüne soğuk PBS eklendikten sonra +4 °C’de 3500 rpm’de santrifüjlenerek dibe çöktürülmüş ve pelet kısmı 10 ml sıvı MS ile çözündürüldükten sonra 10 µl asetosiringon eklenmiştir. Yaprak eksplantları ile birlikte 20 dk boyunca falcon tüp içerisinde çalkalandıktan sonra bakteri bulaşmış olan yaprak eksplantlarındaki sıvı, steril filtre kağıdı ile

uzaklaştırılmış ve eksplantlar 2 gün ½ MS besi ortamında kokültüre alınmıştır. Daha sonra 500 mg/L cefotaxime içeren MS besi ortamına (% 0,6 agarlı) aktarılmıştır.

7. Yöntem: Sıvı LB besi ortamında OD₆₀₀=0.6 olana kadar çoğaltılan bakteriler yaprak eksplantları ile birlikte 20 dk boyunca falcon tüp içerisinde çalkalandıktan sonra bakteri bulaşmış olan yaprak eksplantlarındaki sıvı, steril filtre kağıdı ile uzaklaştırılmış ve eksplantlar 2 gün ½ MS besi ortamında kokültüre alınmıştır. Daha sonra 500 mg/L cefotaxime içeren MS besi ortamına (% 0,6 agarlı) aktarılmıştır.

8. Yöntem: Sıvı YEP besi ortamında OD₆₀₀=0.6 olana kadar çoğaltılan bakteriler yaprak eksplantları ile birlikte 20 dk boyunca falcon tüp içerisinde çalkalandıktan sonra bakteri bulaşmış olan yaprak eksplantlarındaki sıvı, steril filtre kağıdı ile uzaklaştırılmış ve eksplantlar 2 gün ½ MS besi ortamında kokültüre alınmıştır. Daha sonra 500 mg/L cefotaxime içeren MS besi ortamına (% 0,6 agarlı) aktarılmıştır.

9. Yöntem: Sıvı YEP besi ortamında OD₆₀₀=0.6 olana kadar çoğaltılan bakteriler ile yaprak eksplantlarına steril edilmiş desikatör içerisinde 30 dk boyunca vakum infiltrasyonu uygulanmıştır ve sonrasında bakteri bulaşmış olan yaprak eksplantlarındaki sıvı, steril filtre kağıdı ile uzaklaştırıldıktan sonra eksplantlar 2 gün ½ MS besi ortamında kokültüre alınmıştır. Daha sonra 500 mg/L cefotaxime içeren MS besi ortamına (% 0,6 agarlı) aktarılmıştır [Demirci, 2017].

10. Yöntem: Sıvı YMB besi ortamında OD₆₀₀=0.6 olana kadar çoğaltılan bakteriler yaprak eksplantları ile birlikte 20 dk boyunca falcon tüp içerisinde çalkalanmıştır. Bakteri bulaşmış olan yaprak eksplantlarındaki sıvı, steril filtre kağıdı ile uzaklaştırılarak eksplantlar 2 gün ½ MS besi ortamında kokültüre alınmış ve daha sonra 500 mg/L amoklavlin içeren MS besi ortamına (% 0,6 agarlı) aktarılmıştır.

Saçak kök meydana getirmek amacı ile *Atropa belladonna* yapraklarına uygulanan transformasyon yöntemleri sonucunda sadece YMB ortamında büyütülen bakteriler kullanılarak gerçekleştirilen ve amoklavlin antibiyotiği kullanılarak bakterilerden temizlenen eksplantlarda (10. Yöntem) başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu yöntem ile elde edilen kökler antibiyotikli ortamlarda bakterilerden temizlenmelerinin ardından antibiyotik içermeyen 30 g/L süktroz ve 6 g/L agar içeren ½ MS besi ortamında alt kültüre alınmışlardır. Daha sonra çoğaltım için sıvı besi ortamlarında kültüre alınmışlardır. Her bir kök hattından 0,2 g kullanılarak kültürler başlatılmıştır. Besi ortamı olarak 30 g/L süktroz içeren ½ MS sıvı besi ortamı kullanılmıştır. 50 ml'lik erlenlerde 10 ml besi ortamı ile 100 rpm, 25 °C, karanlık koşullardaki çalkalayıcıda büyütülen kökler daha sonra 250 ml'lik erlenlerdeki 25 ml

besi ortamında çoğaltılmak için alt kültüre alınmışlardır. 30 günlük kültürler sonucunda elde edilen potansiyel transgenik kökler yaş ağırlıkları alındıktan sonra 40 °C'lik etüvde 48 saat süre ile kurutulmuşlardır ve kuru ağırlıkları da alınıp, çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmışlardır. Transformasyonun doğrulanması amacı ile çok az miktardaki dokudan PCR işleminin gerçekleştirilmesini mümkün kılan Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Kit kullanılarak kök dokularının bir bölümü PCR işleminde kullanılmıştır. Verimli sonuç alınamadığı için elde edilen kökler transformasyonun doğrulanmasında *rolB* genlerinin varlığının tespiti için DNA izolasyonu işleminde kullanılmıştır.

3.2.4. Plazmit İzolasyonu

Agrobacterium rhizogenes ATCC 15834 bakterisinden, transformasyon işleminin doğrulanmasında pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere, plazmit izole edilmiştir. *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 bakterisi 26 °C sıcaklıkta 140 rpm koşullarında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon tamamlandıktan sonra bakteriler 4 °C sıcaklıkta 3500 rpm koşullarında 5 dk santrifüjlenerek dibe çöktürülmüştür. Pelet kısmı plazmit izolasyonu işleminde kullanılmıştır. Plazmit izolasyonu NucleoSpin Plasmid DNA Purification kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Prokoton:

- Bakteri peleti üzerine 500 µl A1 tamponu eklenmiştir ve pelet kalkana kadar vortekslenmiştir.
- Tüpe 500 µl A2 tamponu eklenmiş ve tüp alt üst edilerek 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Tüpe 600 µl A3 tamponu eklendikten sonra tüp alt üst edilerek karıştırılmıştır ve 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine bölünmüşlerdir.
- Tüpler 11000 rcf'te 10 dk santrifüjlendikten sonra süpernatant kolona alınmıştır ve 11000 rcf'te 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Kolonlara 50 °C'de önceden ısıtılmış olan AW tamponundan 500 µl eklenmiştir ve 11000 rcf'te 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Kolonlara A4 tamponundan 600 µl eklenmiştir ve 11000 rcf'te 1 dk santrifüjlenmiştir.

- Kolonlara 70 °C’de önceden ısıtılmış olan AE tamponundan 40 µl eklenmiştir ve 70 °C’de 2 dk bekletildikten sonra 11000 rcf’te 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Örneklerin spektrofotometrik ölçümleri NanoDrop ND-1000 ile gerçekleştirilmiştir ve örnekler agaroz jelde görüntülenmiştir.
- Plazmit DNA örnekleri PCR işleminde kullanılmak üzere stokları hazırlanarak saklanmak üzere -20 °C’ye kaldırılmıştır.

3.2.5. Dokudan PCR İşlemi

Atropa belladonna köklerine DNA izolasyonu yapmadan direkt olarak dokudan PCR işlemini gerçekleştiren Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Kit kullanılmıştır.

Protokol:

- Kök dokusundan küçük bir parça kesilerek (yaklaşık olarak bu nokta • kadar) 20 µl Dilution Buffer içerisine alınmıştır.
- 1-2 dk vorteksledikten 3 dk sonra oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- Dokunun tamamen Dilution Buffer ile kaplandığından emin olunarak kısa spin işlemi uygulanmıştır ve süpernatant kısmından 0.5 µl alınarak PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır.
- PCR karışımı Tablo 3.2.5’te gösterilmiştir. Kontrol karışımında primer olarak kit içeriğinde bulunan Control Primer Mix kullanılmıştır. Forward ve Reverse primer olarak Tablo 3.1.2.d’de gösterilen *rolB* primerleri kullanılmıştır.

Tablo 3.2.5: Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR karışımı.

Bileşenler	25 µl rxn
dH ₂ O	11,2 µl
2x Phire Plant PCR Buffer	12,5 µl
Forward Primer	0,2 µl (Final 10 pmol)
Reverse Primer	0,2 µl (Final 10 pmol)
Phire Hot Start II DNA Polymerase	0,4 µl
Kalıp DNA	0,5 µl

3.2.6. Köklerden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda kullanılacak olan kökler (potansiyel transgenik kökler ve transforme olmayan kök örneği) steril seramik havanlarda sıvı azot içerisinde toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür. Daha sonra köklere DNA izolasyon protokolü [Aksoy, Ataşlar, & Keskin, 2018] uygulanmıştır.

İzolasyon protokolü:

- Toz halindeki her biri 200 mg olan kök dokuları steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra köklerin homojenizasyonu önceden ısıtılmış olan CTAB ekstraksiyon tamponu (100 mM Tris [pH 8.0], 20 mM EDTA [pH 8.0], 1.4 M NaCl, % 0.2 β-merkaptoetanol, % 2 CTAB, % 1 PVP) ile gerçekleştirilmiştir ve 60 °C’de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince her 15 dakikada bir tüpler alt üst edilmiştir.
- Üzerine 1:1 oranında kloroform:izoamil alkol karışımı (24:1) eklenmiş, tüpler alt üst edilerek homojen hale getirilmiş ve 5 dk oda sıcaklığında fazların ayrılması beklenmiştir.
- Süre tamamlandıktan sonra tüpler 10000 rpm hızında 10 dk santrifüjlenmiştir.
- Süpernatant yeni tüplere aktarılmış ve üzerine izopropanol eklenerek gece boyu -20 °C’de bekletilmiştir.
- Gece boyu bekleyen örnekler 13000 rpm hızında 30 dk santrifüjlenmiştir ve DNA çöktürülmüştür.
- DNA peleti 100 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0]) içerisinde çözülmüştür. 1 µl RNaz (10 mg/ml) eklendikten sonra 37 °C’de 30 dk inkübe edilmiştir ve DNA 3 mM amonyum asetat ve % 96 EtOH ile çöktürülmüştür.
- DNA peleti % 70 EtOH ile kaldırılmış ve tüm yüzeyi yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuştur ve sonrasında pelet 100 µl TE tamponu içinde çözülmüştür.
- DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri NanoDrop ND-1000 ile gerçekleştirilmiştir ve örnekler agaroz jelde görüntülenmiştir.
- DNA örnekleri PCR işleminde kullanılmak üzere stokları hazırlanarak saklanmak üzere -20 °C’ye kaldırılmıştır.

3.2.7. Transformasyonun PCR Yöntemi ile Doğrulanması

Atropa belladonna yapraklarına uygulanan *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 transformasyonu sonucu elde edilen köklerin transforme olup olmadığını belirlemek amacı ile kök dokularından izole edilen DNA örnekleri (DNA1D, DNA2B, DNA3B, DNA4B, DNA5B ve DNA6A) ve plazmitte bulunan *rolB* gen bölgesini kodlayan primerler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda negatif kontrol olarak doku kültüründen elde edilen, transforme olmayan *Atropa belladonna* kök DNA'sı kullanılmıştır. PCR işleminde Bioline MyTaq PCR kiti kullanılmıştır. PCR karışımı Tablo 3.2.7'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2.7: Bioline MyTaq PCR karışımı.

Bileşenler	25 µl rxn
dH ₂ O	15,75 µl
5x MyTaq Red Reaction Buffer	5 µl
Forward Primer	1 µl (Final 5 pmol)
Reverse Primer	1 µl (Final 5 pmol)
MyTaq Red DNA Polymerase	0,25 µl
Kalıp DNA	2 µl (100 ng/tüp)

3.2.8. IBA ile Saçak Kök Kültürlerinin Kurulması

Transformasyon sonucunda elde edilen saçak köklerdeki sekonder metabolit miktarı ile karşılaştırma yapabilmek için saçak köklerin oluşturulmasını sağlayan diğer bir yöntem olan IBA bitki büyüme düzenleyicisi ile kök kültürleri kurulmuştur [Zimmerman & Wilcoxon, 1935]. Kültürler kurulurken 2 aylık *Atropa belladonna* kökleri kullanılmıştır. Kültürler 250 ml'lik erlenlerde 25 ml besi ortamı ile 3 tekrarlı olacak şekilde kurulmuştur. Kök kültürü bilgileri Tablo 3.2.8'de verilmiştir.

Tablo 3.2.8: IBA ile kurulan saçak kök kültürleri.

Grup No	Besi Ortamı	Kültür Şartları	Başlangıç Ağırlığı
1	½ MS + 0,1 mg/L IBA	Karanlık, 100 rpm 25 °C	0,2 g
2	½ MS + 0,1 mg/L IBA	Karanlık, 100 rpm 25 °C	0,2 g
3	½ MS + 0,1 mg/L IBA	Karanlık, 100 rpm 25 °C	0,2 g

30 gün sonunda kültürler sonlandırılmış ve yaş ağırlıkları (Hasat sonrası yaş ağırlık) belirlenmiştir. Köklerin büyüme yüzdesi aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

Denklem 1: Büyüme Yüzdesi = [(Hasat sonrası yaş ağırlık – Başlangıç ağırlığı) / Başlangıç ağırlığı] x 100

Kök dokuları 40 °C’de 48 saat boyunca etüv içerisinde kurutulmuş ve ekstraksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere saklanmışlardır.

Kültür koşullarında elde edilen kökler ile doğada yetişmiş *Atropa belladonna* köklerindeki sekonder metabolit miktarlarının karşılaştırılması amacı ile doğadan toplanan bitki kökleri de 40 °C’de 48 saat boyunca etüv içerisinde kurutulmuş ve ekstraksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere saklanmışlardır.

3.2.9. *Atropa belladonna* Köklerinin Ekstraktlarının Hazırlanması

Ekstraksiyon işleminde PCR işlemi sonucuna göre PCR negatif olan DNA1 (E1), IBA bitki büyüme düzenleyicisi ile kurulan saçak kök kültürlerinden elde edilen kökler (3. Grup kökleri, E2), PCR pozitif olan DNA4 (E3) ve doğadan toplanan kök örneği (E4) kullanılmıştır. Ekstraksiyon ön hazırlığı olarak kökler steril seramik havanlarda sıvı azot içerisinde toz haline getirilmişlerdir. Her bir toz kök örneğinden 200 mg tartılmış ve ekstraksiyon işleminde kullanılmıştır.

Kök ekstratlarının hazırlanmasında kullanılan protokol [Kamada, Okamura, Satake, Harada, & Shimomura, 1986] basamakları:

- Çözücü için Kloroform(CHCl₃):Metanol(MeOH):Amonyak(NH₄OH) 15:5:1 oranında karışım hazırlanmıştır.

- 200 mg toz kök materyalinin üzerine 20 ml çözücü eklenmiştir ve materyalin çözünmesi sağlanmıştır.
- 10 dk sonikasyon işlemi uygulandıktan sonra 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve tekrar 10 dk sonikasyon işlemi uygulanmıştır.
- Hazırlanan çözelti kloroform ile ıslatılmış pamuk kullanılarak kapatılan huni içerisinde süzülmüştür.
- 40 °C, 30 rpm koşullarında evaporasyon işlemi ile çözücü uçurulmuştur.
- Ekstraktın bulunduğu balona 10 ml CHCl₃ ve 4 ml 1 N sülfürik asit (H₂SO₄) eklenerek karıştırıldıktan sonra ayırma hunisine aktarılmıştır.
- Ayırma hunisinde fazlar ayrıldıktan sonra alt faz balona alınmıştır.
- Balonlar buz içerisinde alındıktan sonra %28'lik NH₄OH ile pH:10'a ayarlanmıştır ve karışım ayırma hunisine aktarılmıştır.
- Ayırma hunisinde 1 defa 4 ml ve 2 defa 2 ml CHCl₃ ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Alt faz behere alınmıştır ve 2 ml CHCl₃ ve 4 g Na₂SO₄ eklenerek iyice karışması sağlanmıştır.
- Süzgeç kağıdı ile süzildükten sonra 40 °C, 30 rpm koşullarında evaporasyon işlemi uygulanmıştır.
- Elde edilen ekstre 2 ml CHCl₃ ile çözülerek, darası alınmış vialle alınmıştır ve 40 °C, 30 rpm koşullarında evaporasyon işlemi uygulanmıştır.
- Vialdeki kloroform ekstresi tartılarak toplam tropan alkaloit miktarı hesaplanmıştır.

3.2.10. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Atropa belladonna köklerinden hazırlanan kloroform ekstreleri (E1, E2, E3 ve E4) alkaloitlerin varlığının veya yokluğunun tespiti için İTK işleminde kullanılmıştır.

İTK Protokolü:

- İTK tankı içine 5:4:1 oranında Kloroform:Aseton:Amonyum-metanol(3:17) karışımı konulmuştur ve 30 dk boyunca tankın çözücü ile doyması sağlanmıştır.
- Silika jel plakaya (TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 8x20 cm) 1 cm yükseklikten kurşun kalem ile yatay bir çizgi çizilmiştir.

- Bu çizgi üzerinde 1 cm ara ile alkaloit standartları (*tropin* ve *atropin*) ve örneklerin (E1, E2, E3, E4) damlatılacağı yerler belirlenmiştir ve isimleri yazılmıştır.
 - Standartlar plakada belirlenen noktalara kapiler tüp yardımı ile 3'er damla olacak şekilde eklenmiştir.
 - Ekstreler 0,5 ml kloroform ile çözüldükten sonra silika jel plakada belirlenen noktalara kapiler tüp yardımı ile 3'er damla eklenmiştir.
 - Silika jel plaka yürütme tankına yerleştirilmiştir ve 30-45 dk mobil fazın plaka üzerinde ilerlemesi beklenmiştir.
 - Silika jel plaka çeker ocak altında 15-20 dk kuruduktan sonra UV görüntüleme cihazında (254 ve 366 nm dalga boyunda) görüntüleri alınmıştır.
 - Daha sonra Çeker ocakta bir kap içinde silika plakaya dragendorf çözeltisi püskürtülerek *tropin* ve *atropin* alkaloitlerinin varlığının tespiti yapılmıştır.
- Dragendorf Çözeltisi Protokolü [Jia & Tian, 2009] :
- A Solüsyonu: 0.800 g bizmut nitrat (BiONO_3) 50 ml'lik şişe içerisinde 10 ml glasiyal asetik asit (HAc) ile çözüldükten sonra distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.
 - B Solüsyonu: Işık almayan 50 ml'lik şişeye 20 g potasyum iyodür (KI) koyulduktan sonra son hacim 50 ml olacak şekilde distile su ile çözünmesi sağlanmıştır.
 - Daha sonra dragendorf çözeltisini hazırlamak için, ışık almayan 100 ml'lik şişeye 5 ml A solüsyonu ve 5 ml B solüsyonu koyularak distile su ile son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.2.11. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Ekstraksiyon işlemi sonrasında köklerden elde edilen kloroform ekstresi İTK ile kontrol edildikten sonra kloroform uçurulmuştur. Daha sonra *atropin* standardı (Sigma) ve kök ekstraktlarının HPLC analizi için numuneler hazırlanmıştır ve *atropin* standardı referans alınarak HPLC ile analiz gerçekleştirilmiştir. HPLC cihazına ait bilgiler Tablo 3.2.11'de gösterilmiştir.

Atropin Standardı İçin Numune Hazırlama:

- Hassas olarak 3.0 mg *atropin* standardı tartılarak balon jöjeye aktarılmıştır.
- Metanol eklenerek elle çözüldükten sonra tampon çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır.
- 0,45 µm PTFE filtreden geçirilerek süzölmüştür.
- Süzöldükten sonra vialle alınarak HPLC cihazında enjeksiyon gerçekleştirilmiştir.

Kök Ekstraktları İçin Numune Hazırlama:

- Kök ekstraktlarının üzerine metanol eklenerek elle çözüldükten sonra tampon çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır.
- 0,45 µm PTFE filtreden geçirilerek süzölmüştür.
- Süzöldükten sonra vialle alınarak HPLC cihazında enjeksiyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2.11: HPLC cihazı bilgileri.

Cihaz	HPLC Shimadzu
Dedektör	UV-VIS, DAD
Kolon	Zorbax Extend C18, 100x4,6 mm, 3,5 µm
Dalga Boyu	210 nm
Akış Hızı	1,0 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Analiz Süresi	5 dakika
Kolon Sıcaklığı	40 °C
Alıkonma Zamanı	~ 2 dakika
Mobil Faz	% 82 A, %18 B

A solüsyonu : 7 g potasyum dihidrojen fosfat 606 ml su içinde çözülmüştür. İçine 3,5 g sodyum dodesil sülfat eklenmiştir. Seyretilik fosforik asit çözeltisi ile pH değeri 3,50'ye ayarlanmıştır. 320 ml asetonitril eklendikten sonra süzölmüştür ve degaze edilmiştir.

B solüsyonu: Asetonitril

4. BULGULAR

Atropa belladonna bitkisinde *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 transformasyonu ile elde edilen saçak kökler, *Atropa belladonna*'dan doku kültürü sonucu elde edilen kökler ile kurulan IBA'lı kültürlerin İTK ve HPLC sonuçları aşağıda başlıklar halinde sunulmuştur.

4.1. Yüzey Sterilizasyonu ve Çimlendirme Ortamı Bulguları

Atropa belladonna tohumları için en uygun yüzey sterilizasyonu yöntemini belirlemek amacı ile uygulanan tekrarlı yöntemlerden elde edilen ortalama sonuçlar Tablo 4.1.a'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre kontaminasyonun görülmediği ve %90.5 ile en yüksek çimlenme oranının elde edildiği (Şekil 4.1.a) “5. Yöntem” ile çalışmalar sürdürülmüştür.

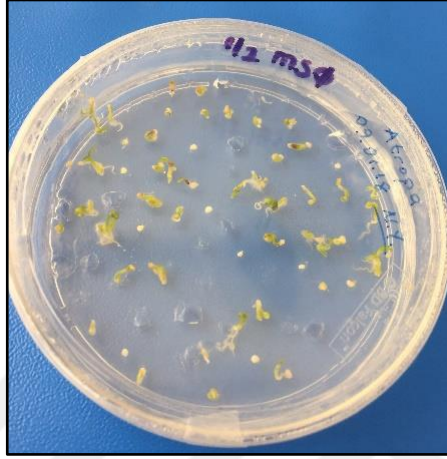
Tablo 4.1.a: Yüzey sterilizasyonu yöntemlerinin sonuçları.

Yöntem	Kontaminasyon Durumu (%)	Çimlenme Oranı (%)
1. Yöntem	74	0
2. Yöntem	68	0
3. Yöntem	0	24.8
4. Yöntem	0	68.0
5. Yöntem	0	90.5

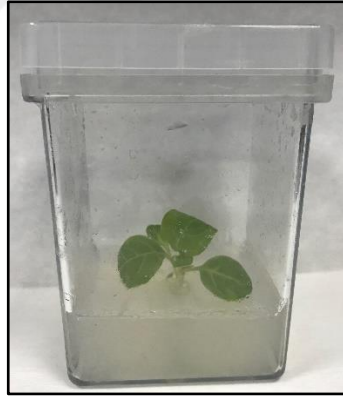
Tohumların çimlenme oranlarını arttırmak amacı ile en uygun çimlendirme ortamını belirlemek için yapılan tekrarlı çalışmalardan elde edilen ortalama sonuçlar Tablo 4.1.b'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre %90.5 ile en yüksek çimlenme oranının elde edildiği “30 g/L süktroz ve 6 g/L agar içeren ½ MS ortamı (2. Besi ortamı)” ile çalışmalar sürdürülmüştür. Çimlenen tohumlar 30 g/L süktroz ve 6 g/L agar içeren MS besi ortamı aktarılmıştır (Şekil 4.1.b).

Tablo 4.1.b: Çimlendirme ortamı sonuçları.

Çimlendirme Ortamı	Çimlenme Oranı (%)
1. Besi ortamı	82.6
2. Besi ortamı	90.5



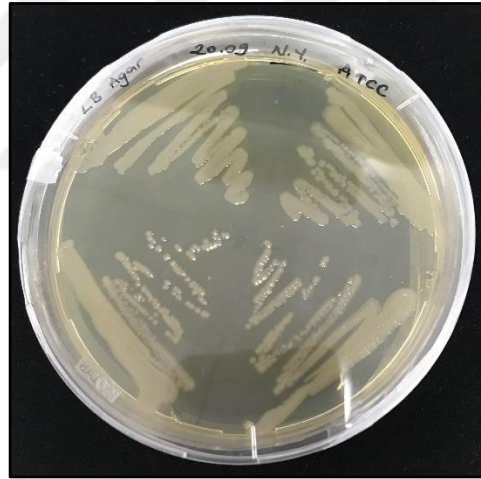
Şekil 4.1.a: 5. Yöntem ile çimlendirilen tohumlar.



Şekil 4.1.b: MS ortamındaki *Atropa belladonna* bitkisi.

4.2. *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 Bakterisinin oğaltılmasına İlişkin Bulgular

Agrobacterium rhizogenes ATCC 15834 bakterisi katı LB ortamında büyütüldükten (Şekil 4.2.a) sonra tek koloniler ile hazırlanan gliserollü stoklardan transformasyon aşamasında kullanmak amacı ile yapılan canlandırma çalışmalarında LB, YEP ve YMB ortamları kullanılmıştır. Bunun sonucunda LB ve YEP ortamlarında bakteri çoğalmasının YMB ortamına göre daha yavaş olduğu görülmüştür. Bakterilerin transformasyon aşamasında kullanılabilmesi için uygun yoğunlukta olup olmadığını belirlemek amacı ile spektrofotometrede OD₆₀₀ dalga boyunda ölçüm gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlara göre çalışmalara YMB besi ortamında, 26 °C sıcaklık, 140 rpm ve karanlık koşullarda çoğaltılan bakteriler ile devam edilmiştir (Şekil 4.2.b).



Şekil 4.2.a: Katı LB ortamında çoğaltılan *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 bakterisi.



Şekil 4.2.b: Sıvı YMB besi ortamında çoğaltılan *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 bakterisi.

4.3. *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 İnokülasyonu ve Saçak Köklerin Oluşturulmasına İlişkin Bulgular

Saçak kök oluşturmak amacı ile *Atropa belladonna* yapraklarına 10 farklı *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 transformasyonu yöntemi uygulanmıştır. Bu çalışmaların transformasyon frekansı (TF) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır ve sonuçlar Tablo 4.3.a’da gösterilmiştir. Uygulamalar sonrasında saçak kök oluşumu sadece “10. Yöntem” kullanılarak yapılan transformasyondan elde edilmiştir (Şekil 4.3.a).

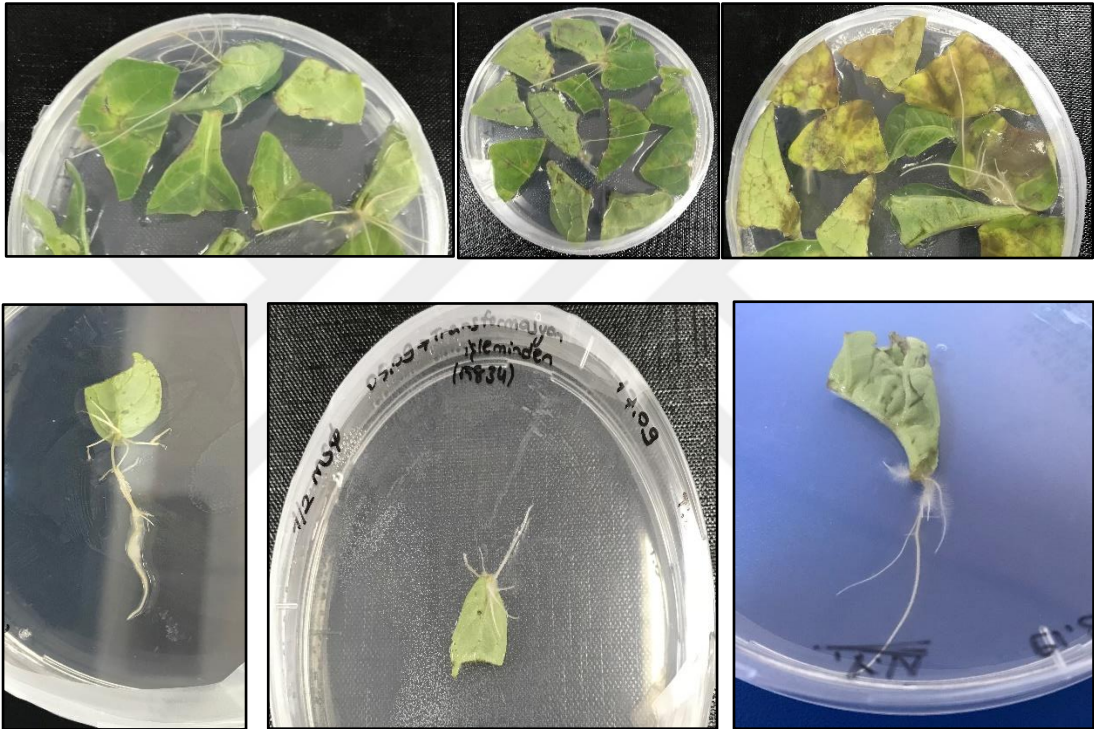
Denklem 2: $TF = (\text{Saçak Kök Oluşumunun Görüldüğü Eksplant Sayısı} / \text{Toplam Eksplant Sayısı}) \times 100$

Tablo 4.3.a: Uygulanan transformasyon yöntemleri ile elde edilen saçak kök oranları.

Transformasyon Yöntemi	Transformasyon Frekansı (%)
1. Yöntem	0
2. Yöntem	0
3. Yöntem	0
4. Yöntem	0
5. Yöntem	0

Tablo 4.3.a: Devam.

Transformasyon Yöntemi	Transformasyon Frekansı (%)
6. Yöntem	0
7. Yöntem	0
8. Yöntem	0
9. Yöntem	0
10. Yöntem	23.7



Şekil 4.3.a: 10. Yöntem transformasyonu ile *Atropa belladonna* yapraklarından elde edilen saçak kökler.

Elde edilen saçak köklerden kurulan kurulan sıvı kültürlerin 30 günlük sonuçları Tablo 4.3.b’de verilmiştir. Büyüme yüzdesi (Şekil 4.3.b) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. En yüksek büyüme yüzdesi %2750 oranla 4. kök hattından elde edilmiştir. DNA1, DNA2, DNA3, DNA4, DNA5 ve DNA6 olarak kodlanan 6 kök hattı transformasyon işleminin doğrulanması için PCR çalışmalarında kullanılmıştır. İTK ve HPLC işlemleri için ekstrahelerin hazırlanmasında ise kuru ağırlığı en yüksek olan iki kök hattı (DNA1 ve DNA4) kullanılmıştır.

Denklem 3: Büyüme Yüzdesi = [(Hasat sonrası yaş ağırlık – Başlangıç ağırlığı) / Başlangıç ağırlığı] x 100

Tablo 4.3.b: Transformasyon sonrasında elde edilen köklerin ağırlık ve büyüme yüzdesi sonuçları.

Örnek	Başlangıç Ağırlığı (g)	Hasat Sonrası Yaş Ağırlık (g)	Kuru Ağırlık (g)	Büyüme Yüzdesi (%)
DNA1	0,2	2,35	0,44	1075
DNA2	0,2	1,3	0,12	550
DNA3	0,2	1,29	0,15	545
DNA4	0,2	5,7	0,49	2750
DNA5	0,2	3,75	0,37	1775
DNA6	0,2	3,5	0,33	1650

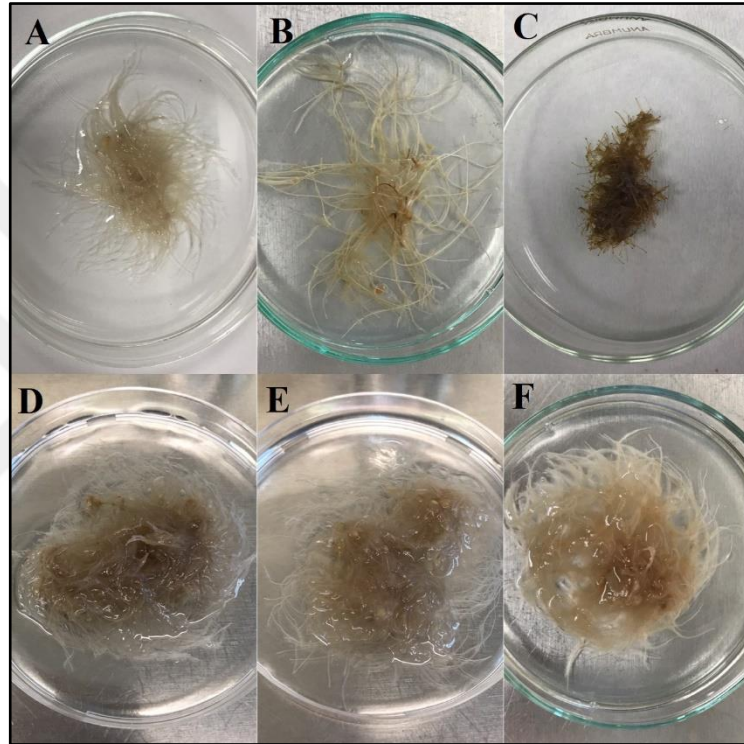


Şekil 4.3.b: Transformasyon sonucunda elde edilen kök örneklerinin büyüme yüzdeslerinin karşılaştırılması.

4.4. Saçak Köklerden DNA İzolasyonu Bulguları

Transformasyon işlemi sonrasında elde edilen kökler çoğaltım için sıvı besi ortamlarında kültüre alınmışlardır. Besi ortamı olarak 30 g/L sükroz içeren ½ MS sıvı besi ortamı kullanılmıştır. 50 ml'lik erlenlerde 10 ml besi ortamı ile 100 rpm, 25 °C, karanlık koşullardaki çalkalayıcıda büyütülen kökler daha sonra 250 ml'lik

erlenlerdeki 25 ml besi ortamında çoğaltılmak için alt kültüre alınmışlardır. 30 günlük kültürler sonucunda elde edilen potansiyel transgenik kökler (Şekil 4.4.a) 40 °C'lik etüvde 48 saat süre ile kurutulduktan sonra transformasyonun doğrulanması işlemi için gerçekleştirilecek olan PCR işlemine hazırlık olarak steril seramik havanlarda sıvı azot ile öğütüldükten sonra 6 farklı kök hattından DNA izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'ların nanodrop cihazında okumaları (Tablo 4.4) gerçekleştirildikten sonra agaroz jelde görüntüleri kaydedilmiştir (Şekil 4.4.b).



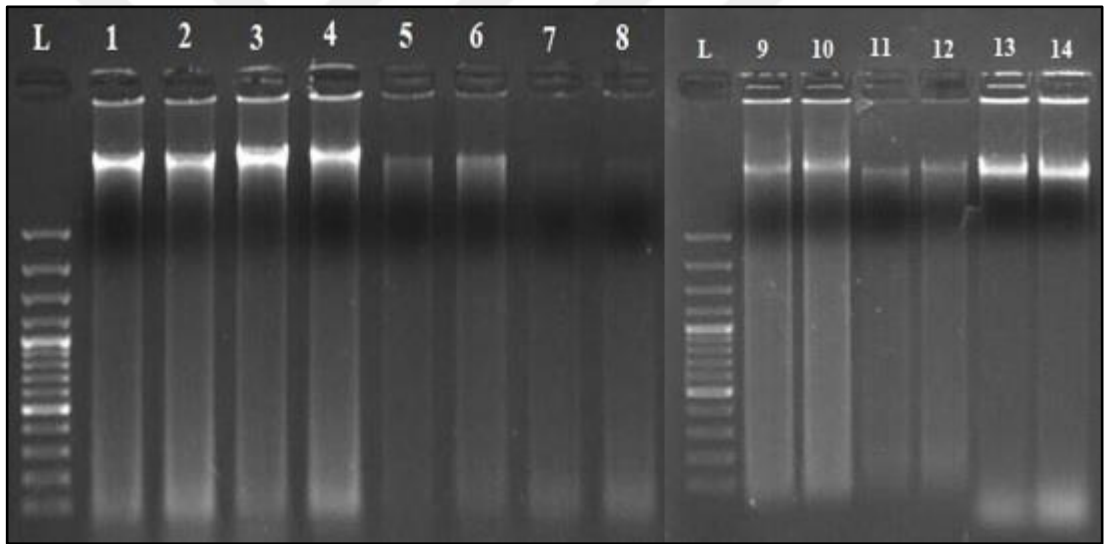
Şekil 4.4.a: 30 günlük kültür sonrasında elde edilen potansiyel transgenik kökler (A: DNA1, B: DNA2, C: DNA3, D: DNA4, E: DNA5, F: DNA6).

Tablo 4.4: Saçak köklerden elde edilen DNA'ların nanodrop sonuçları.

DNA Örneği	DNA Yoğunluğu (ng/μl)
DNA1A	521,9
DNA1B	572,3
DNA1C	580,9
DNA1D	591,3
DNA2A	154,3

Tablo 4.4: Devam.

DNA Örneği	DNA Yoğunluğu (ng/μl)
DNA2B	279,1
DNA3A	163,2
DNA3B	206,0
DNA4A	271,0
DNA4B	452,9
DNA5A	189,8
DNA5B	252,8
DNA6A	2470,5
DNA 6B	994,0

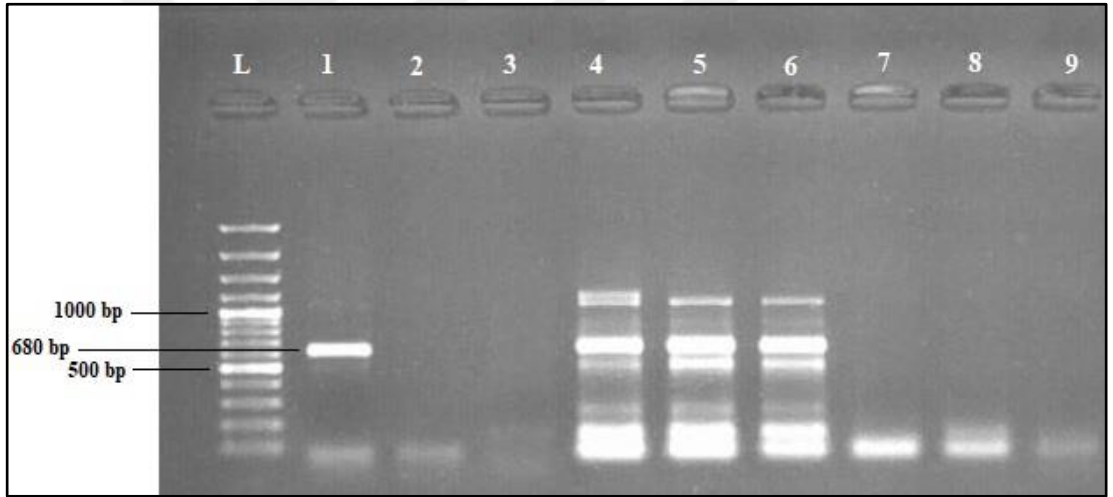


Şekil 4.4.b: *Atropa belladonna* köklerinden izole edilen DNA'ların agaroz jeldeki görüntüsü (L: Thermo Fisher Scientific 100 bp Plus DNA Ladder, 1: DNA1A, 2: DNA1B, 3: DNA1C, 4: DNA1D, 5: DNA2A, 6: DNA2B, 7: DNA3A, 8: DNA3B, 9: DNA4A, 10: DNA4B, 11: DNA5A, 12: DNA5B, 13: DNA6A, 14: DNA6B).

Nanodrop ve jel görüntüleri sonuçlarına göre PCR işlemi için en verimli olan DNA örnekleri DNA1D, DNA2B, DNA3B, DNA4B, DNA5B ve DNA6A'dır. Bu nedenle PCR çalışmalarında bu DNA örnekleri kullanılmıştır.

4.5. Transformasyonun PCR Yöntemi ile Doğrulanmasına İlişkin Bulgular

Atropa belladonna yapraklarına uygulanan *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 transformasyonu sonrasında elde edilen köklerde *rolB* geninin varlığının ispatlanması için bakteriden izole edilen plazmit pozitif kontrol olarak kullanılarak, transgenik olduğu düşünülen 6 kök hattından izole edilen DNA'lar ile PCR reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon sonucunda agaroz jelde görüntülenen (Şekil 4.5) örneklerden DNA4B, DNA5B ve DNA6A'da transformasyon pozitif bant görülürken DNA1D, DNA2B ve DNA3B'de transformasyon pozitif bant görülmemiştir. Sonuç olarak *rolB* genlerinin varlığı ispatlanan DNA4B, DNA5B ve DNA6A'nın transgenik oldukları tespit edilmiştir.

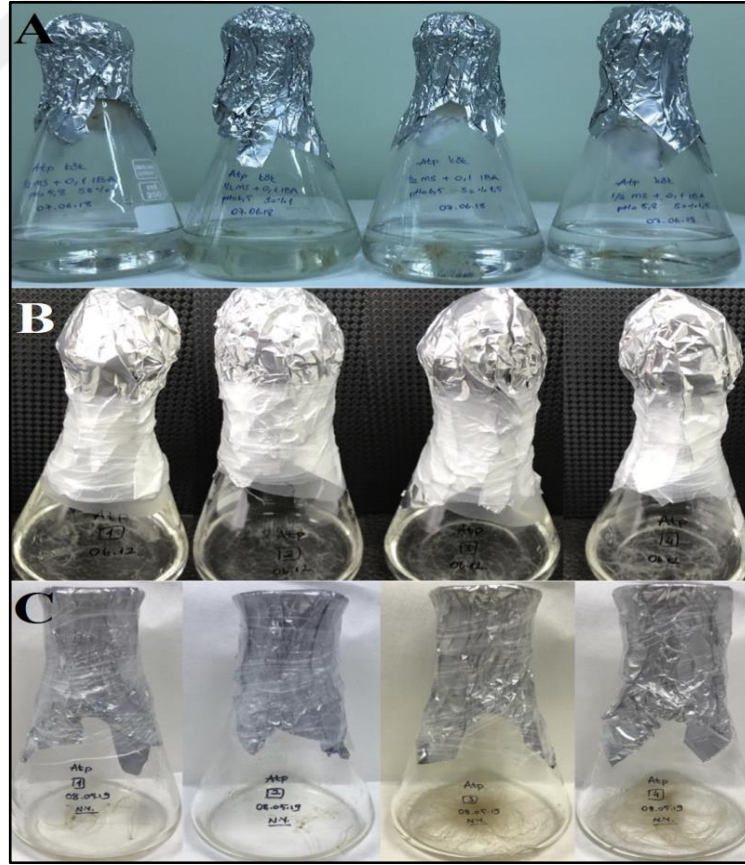


Şekil 4.5: Transformasyon Doğrulaması İçin PCR İşlemi Uygulanan Örneklerin Agaroz Jeldeki Görüntüsü [L: Thermo Fisher Scientific 100 bp Plus DNA Ladder, 1: Plazmit DNA (PCR Pozitif Kontrol), 2: PCR Negatif Kontrol, 3: Transforme Olmayan Kök DNA'sı, 4: DNA4B, 5: DNA5B, 6: DNA6A, 7: DNA1D, 8: DNA2B, 9: DNA3B].

4.6. IBA Bitki Büyüme Düzenleyicisi ile Saçak Kök Kültürlerinin Kurulmasına İlişkin Bulgular

Atropa belladonna köklerinden ½ MS besisi ortamında 0,1 mg/L IBA kullanılarak kurulan kültürler (Şekil 4.6) 30 gün sonunda sonlandırılmış ve yaş ağırlıkları (Hasat sonrası yaş ağırlık) belirlenmiştir. Köklerin başlangıç ağırlıklarının ve hasat sonrası yaş ağırlıklarının ortalamaları kullanılarak büyüme yüzdesi aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır (Tablo 4.6). En yüksek büyüme oranı % 635 oranla 3. Grup kültüründen elde edilmiştir. Kuru ağırlık olarak da en fazla materyalin elde edildiği 3. Grup kökleri, sekonder metabolit miktarının karşılaştırılması için HPLC işleminde kullanılmıştır. Kök dokuları 40 °C’de 48 saat boyunca etüv içerisinde kurutulmuş ve kuru ağırlıklar da Tablo 4.6’da gösterilmiştir.

Denklem 4: Büyüme Yüzdesi = [(Hasat sonrası yaş ağırlık – Başlangıç ağırlığı) / Başlangıç ağırlığı] x 100



Şekil 4.6: 30 günlük IBA’lı *Atropa belladonna* kök kültürleri (A: 1. Grup, B: 2. Grup, C: 3. Grup).

Tablo 4.6: 30 günlük IBA'lı kültürlerin köklerin ağırlık ortalamaları ve büyüme yüzdesi sonuçları.

Örnek	Başlangıç Ağırlığı (g)	Hasat Sonrası Yaş Ağırlık (g)	Kuru Ağırlık (g)	Büyüme Yüzdesi (%)
1. Grup	0,2	1,33	0,23	565
2. Grup	0,2	1,38	0,26	590
3. Grup	0,2	1,47	0,32	635

4.7. *Atropa belladonna* Kök Ekstraktlarının Hazırlanmasına İlişkin Bulgular

PCR işlemi sonucuna göre PCR negatif olan DNA1 (E1), IBA bitki büyüme düzenleyicisi ile kurulan saçak kök kültürlerinden elde edilen kökler (3. Grup kökleri, E2), PCR pozitif olan DNA4 (E3) ve doğadan toplanan kök örneği (E4) kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonrasında örneklerin kloroform ekstreleri, darası alınmış viallere aktarılmıştır ve kloroform uçurulmuştur. Vialler tartıldıktan sonra dara ağırlıkları çıkarılarak ekstrelerin ağırlıkları hesaplanmıştır. Ekstre ağırlıkları (tropan alkaloid ekstresi) Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

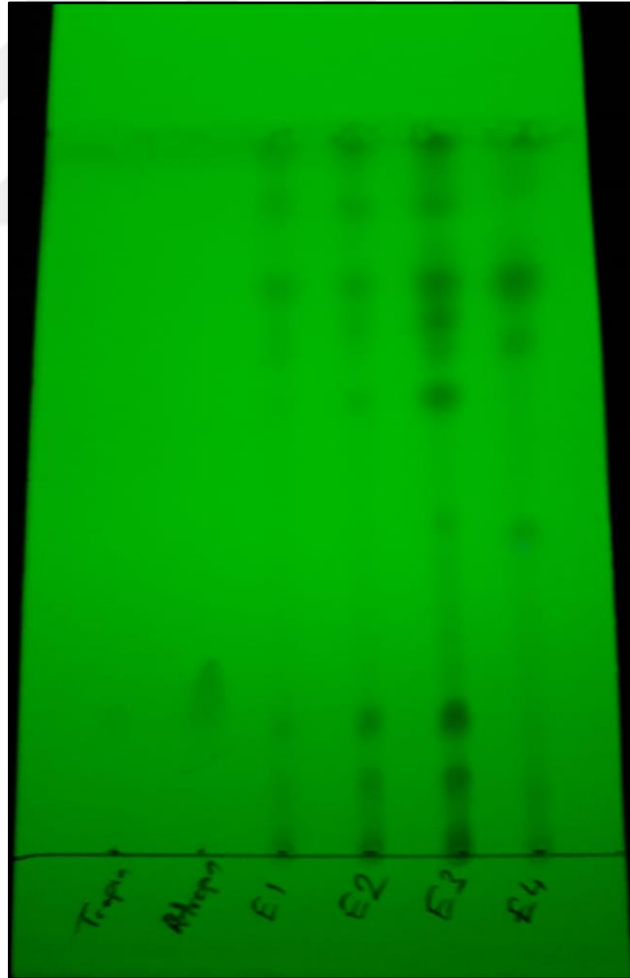
Tablo 4.7: Tropan alkaloid ekstrelerinin ağırlıkları.

Örnek	Ağırlık (mg)
E1 (PCR negatif)	1,6
E2 (IBA'lı)	1,6
E3 (PCR pozitif)	3,1
E4 (Doğadan)	2,2

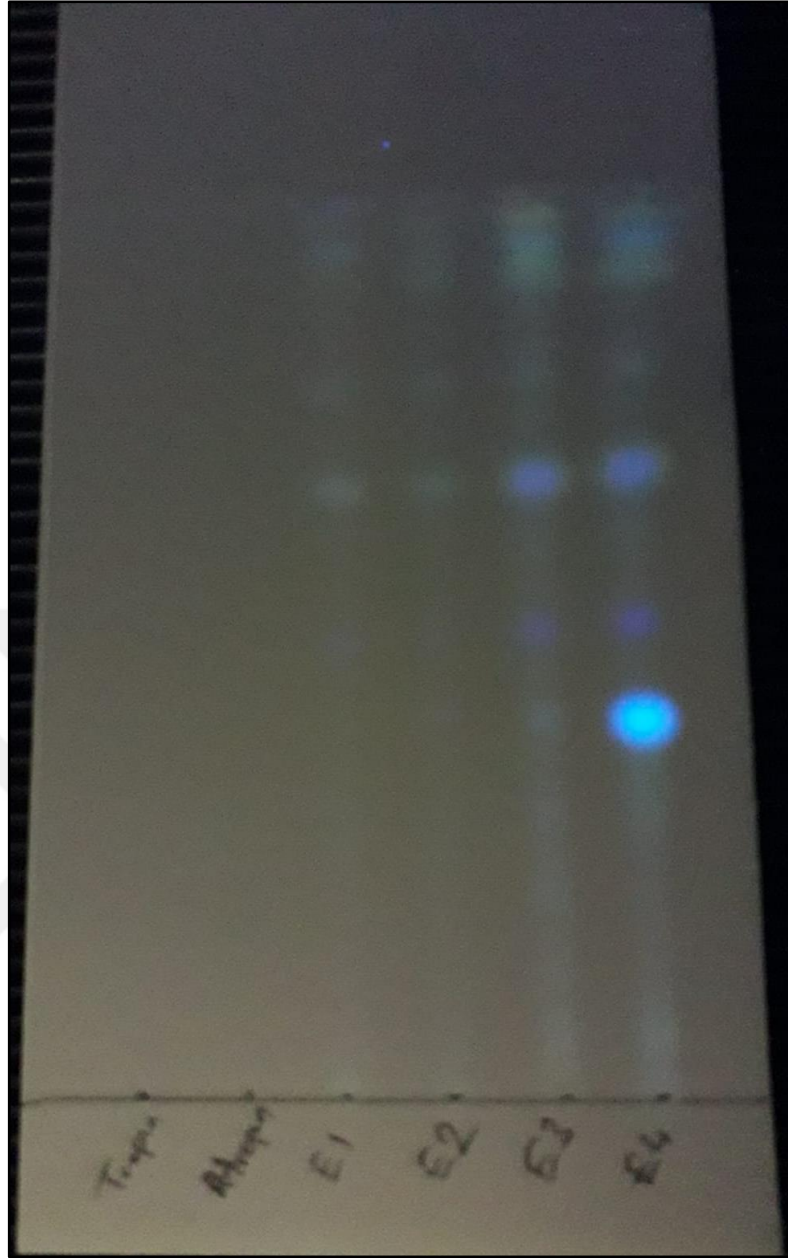
Toplam tropan alkaloidlerinin ağırlıkları hesaplanan E1, E2, E3 ve E4 örneklerinden en yüksek ağırlık PCR pozitif olan E3 örneğinde görülmüştür.

4.8. İnce Tabaka Kromatografisine (İTK) İlişkin Bulgular

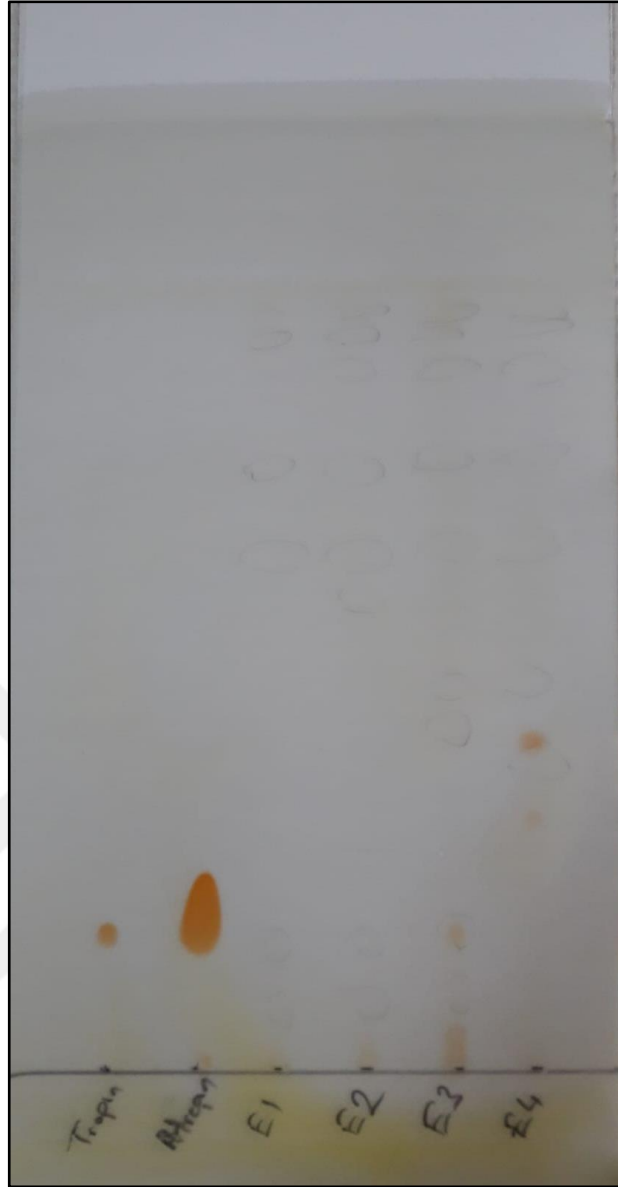
Atropa belladonna köklerinden hazırlanan ekstraktlara (E1, E2, E3 ve E4) alkaloidlerin varlığının veya yokluğunun tespiti için İTK işlemi uygulandıktan sonra UV görüntüleme cihazında 254 nm (Şekil 4.8.a) ve 366 nm (Şekil 4.8.b) dalga boylarında silika plakanın görüntüleri kaydedilmiştir. Daha sonra silika plakaya dragendorff çözeltisinin püskürtülmüştür ve Şekil 4.8.c’de gösterilmiştir. Standartlar (*tropin* ve *atropin*) ve ekstraktların (E1, E2, E3 ve E4) içerdiği sekonder metabolitler silika plakada görülmektedir. Bu görüntülere bakılarak E3 örneğinde diğer E1, E2 ve E4 örneğine göre daha parlak lekeler görülmüştür. Özellikle dragendorff püskürtülmüş olan silika plakada E1, E2, E3 ve E4 örneklerinde *tropin* ve *atropin* varlığı net bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.8.a: İTK işlemi sonrasında silika plakanın UV cihazında 254 nm dalga boyundaki görüntüsü.



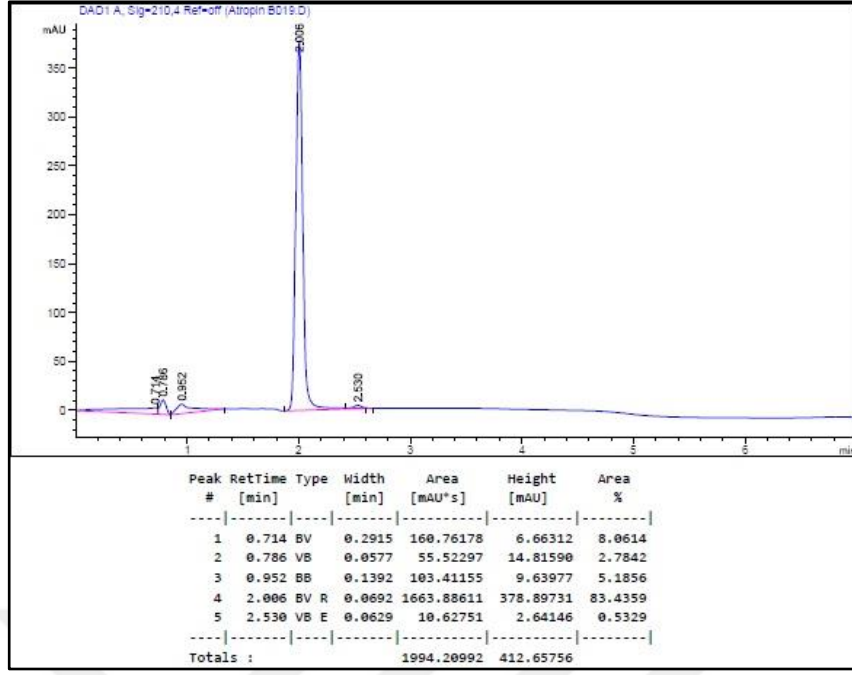
Şekil 4.8.b: İTK işlemi sonrasında silika plakanın UV cihazında 366 nm dalga boyundaki görüntüsü.



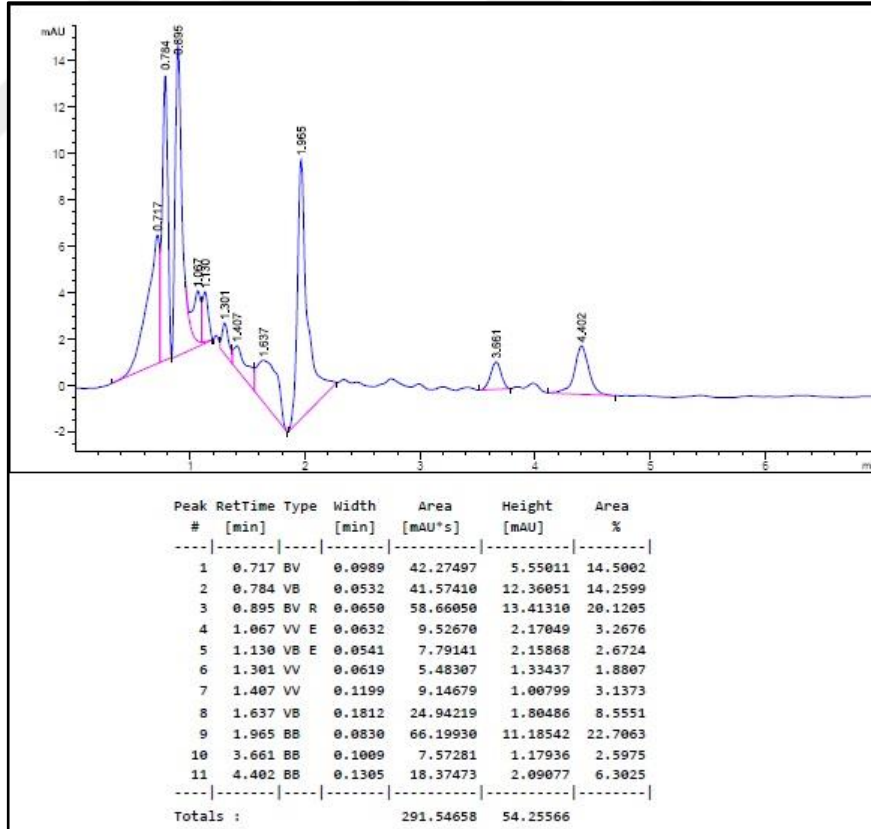
Şekil 4.8.c: İTK işlemi sonrasında silika plakanın dragendorf püskürtülmüş görüntüsü.

4.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisine (HPLC) İlişkin Bulgular

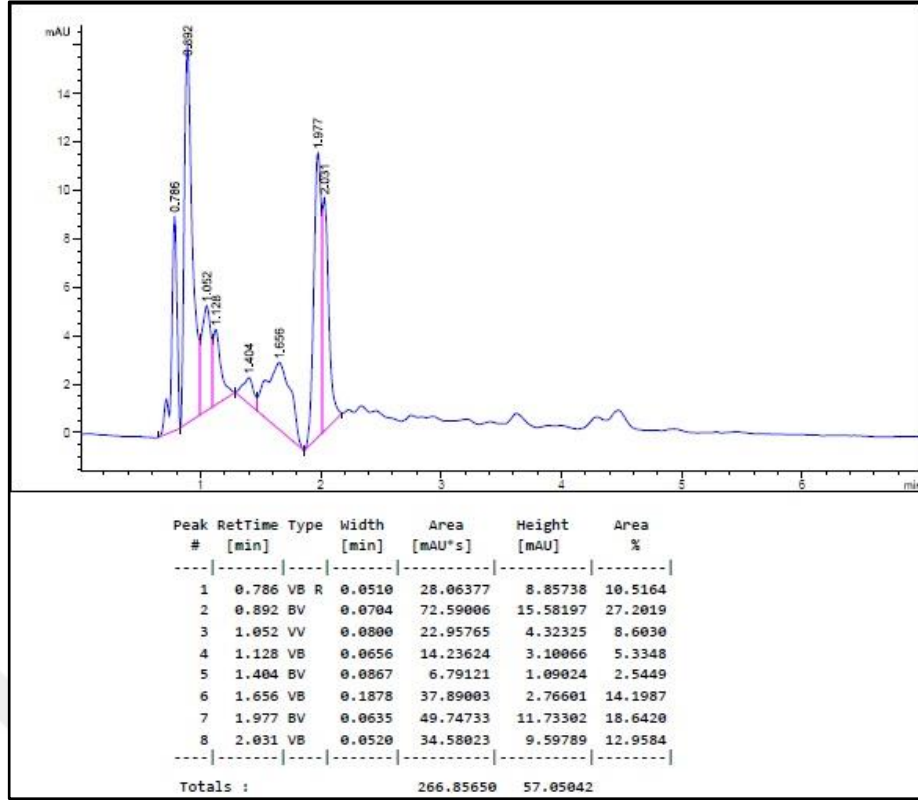
İTK işlemi sonrasında Standart *atropin* (Şekil 4.9.a), E1 (Şekil 4.9.b), E2 (Şekil 4.9.c) E3 (Şekil 4.9.d) ve E4 (Şekil 4.9.e) örneklerinde bulunan *atropin* saflığının doğrulanması amacı ile HPLC işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar aşağıda sunulmuştur. Standart atropin 2.006. dakika işlenme zamanında pik vermiştir. E1, E2, E3 ve E4 örneklerinde ~2. dakikada pik görülmüştür.



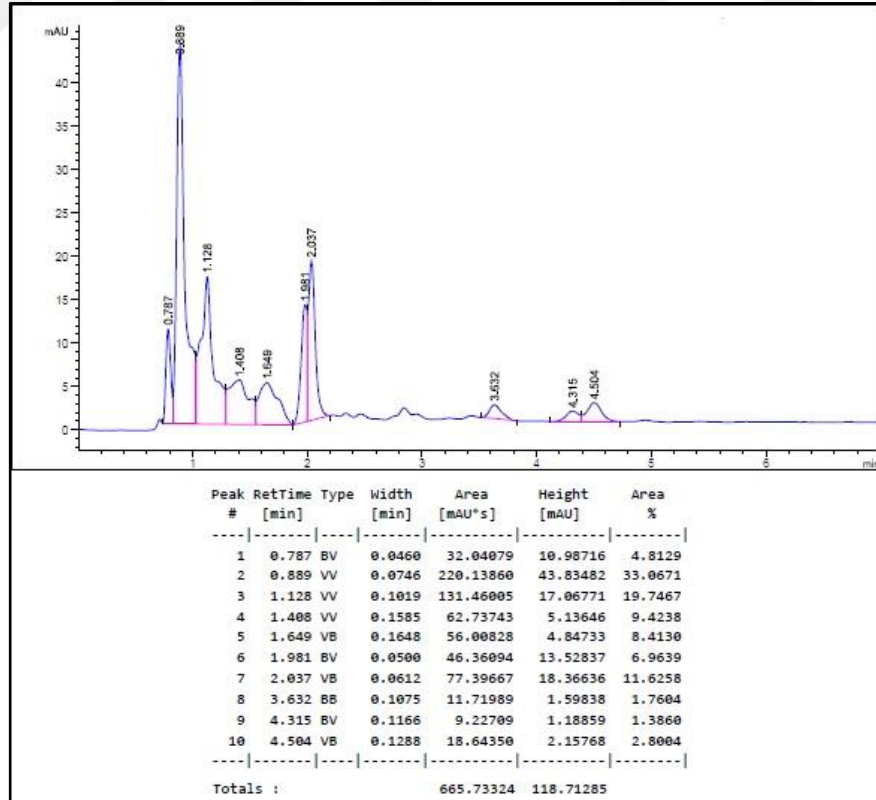
Şekil 4.9.a: Standart *atropinin* HPLC kromatogramı.



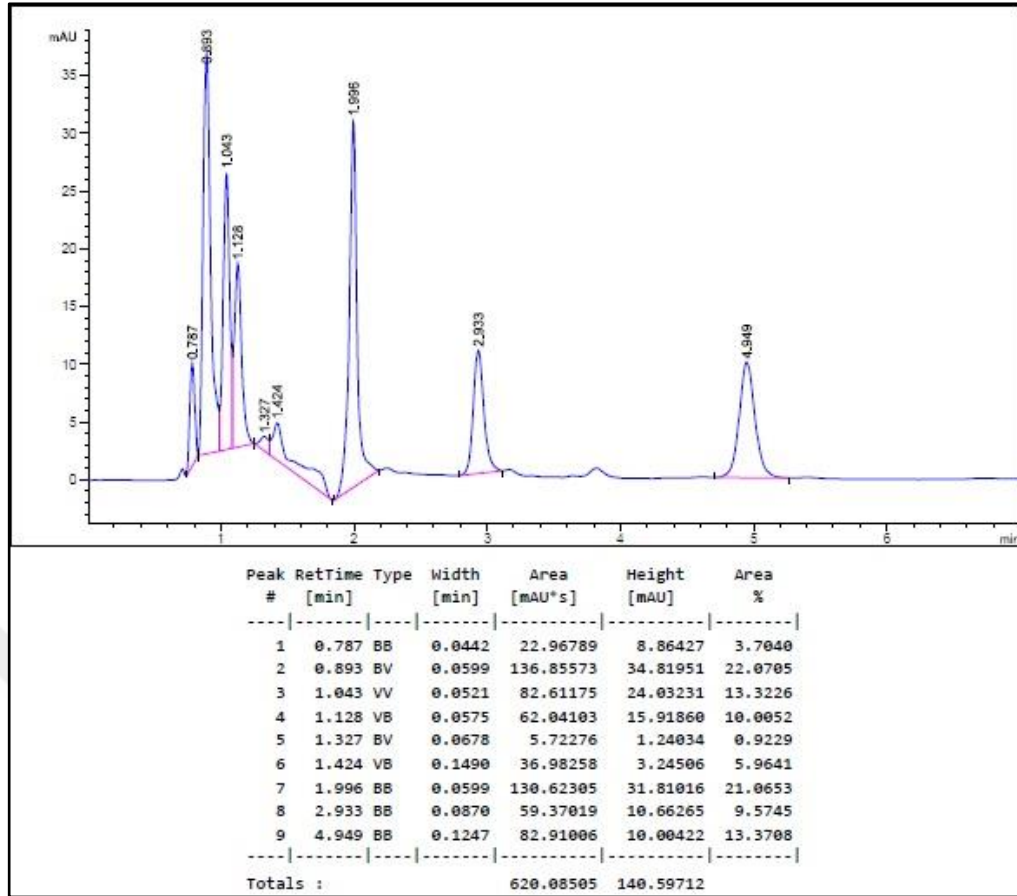
Şekil 4.9.b: E1 örneğinin HPLC kromatogramı.



Şekil 4.9.c: E2 örneğinin HPLC kromatogramı.



Şekil 4.9.d: E3 örneğinin HPLC kromatogramı.



Şekil 4.9.e: E4 örneğinin HPLC kromatogramı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışması *in vitro* koşullarda elde edilen *Atropa belladonna* bitkisine ait yaprak eksplantlarına *Agrobacterium rhizogenes* transformasyonu uygulanması sonucunda meydana gelen saçak köklerdeki sekonder metabolit miktarının transforme olmayan ve doğadaki bitki köklerinin sekonder metabolit miktarı ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla *in vitro* yöntemler ile *Atropa belladonna* bitkilerinin elde edilmesi için etkin yüzey sterilizasyonu yöntemleri, uygun çimlendirme ortamlarının belirlenmesi, bu ortamların tohumların çimlenme yüzdeleri üzerine etkisi ve en verimli *Agrobacterium rhizogenes* transformasyonu yönteminin belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Transformasyon işlemi ile saçak kök üretimini sağlayan *rol* genlerinin bitki genomuna aktarılması sağlanmıştır. Diğer yandan saçak kök elde etme yöntemlerinden biri olan IBA büyüme düzenleyicisi kullanılarak da kültürler kurulmuştur. Meydana gelen transgenik kökler, transgenik olmayan kökler, doku kültürü ile elde edilen kökler ve doğadan toplanan köklerdeki sekonder metabolit miktarları, ekstraksiyon işlemi sonrasında, HPLC yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Tez çalışmasında steril koşullarda gerçekleştirilen basamaklar laminar akımlı kabin içinde gerçekleştirilmiştir. Kabin içi her çalışma öncesinde etil alkol ile temizlenerek UV lambası ile steril hale getirilmiştir.

Atropa belladonna bitkisine ait saçak köklerin meydana getirilmesi için *in vitro* koşullarda gelişmiş bitkilerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Ayrıca *Agrobacterium rhizogenes* ile transformasyonda inokülasyon işleminde steril bitki eksplantları, seradan veya doğadan toplanan eksplantlara göre daha güvenilir ve sorunsuz olduğu bildirilmektedir [Hu & Du, 2006]. Bu nedenle tez çalışmasında öncelikli olarak, *in vitro* koşullarda fazla sayıda *Atropa belladonna* bitkisinin elde edilmesi için, yüzey sterilizasyonu ve çimlendirme ortamı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Uygulanan sterilizasyon yöntemleri ve kullanılan çimlendirme ortamları sonucunda kontaminasyonun görülmediği yüzey sterilizasyonu yöntemi ve en yüksek çimlenme oranının görüldüğü çimlendirme ortamı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda kontaminasyonun görülmediği ve %90.5 oranında tohum çimlenmesinin görüldüğü yöntem en uygun sterilizasyon yöntemi olarak belirlenmiştir. Bu yöntemde zımpara kağıdı (Atlas Brand-P180C) kullanılarak kabukları tamamen uzaklaştırılan *Atropa belladonna* tohumları % 70'lik etil alkol ile 1 dk yıkanmıştır. Steril distile su

ile 1 defa yıkanmanın ardından % 50'lik sodyum hipoklorit ile 10 dk yıkanmıştır. Daha sonra steril distile su ile 5 defa durulandıktan sonra steril filtre kağıdı üzerinde kurutularak, 30 g/L süktroz ve 6 g/L agar içeren ½ MS ortamına aktarılmışlardır.

Kökler gibi farklılaştırılmış dokuların kültürleri, *in vitro* olarak sürdürülen hücre süspansiyon kültürlerinde sıkça görülen sekonder metabolitlerin miktarındaki azalmayı çözmek için uygun bir alternatif sunar [Makhzoum, Bernards, & Tremouillaux-Guiller, 2013]. *Agrobacterium rhizogenes* ile gerçekleştirilen transformasyon çalışmalarında yaprak eksplantlarının en uygun eksplant kaynağı olduğu yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir [Abbasi, Saxena, Murch, & Liu, 2007; C.-Z. Liu, Abbasi, Gao, Murch, & Saxena, 2006; Wang, Zhang, Zhu, Chen, & Zhang, 2006]. *Agrobacterium rhizogenes* ile transformasyonda başarıyı etkileyen birçok faktör olması nedeni ile transformasyon frekansı düşüktür. *Atropa belladonna* bitkisine *Agrobacterium rhizogenes* transformasyonunda karşılaşılan en büyük güçlük yaprak eksplantlarının transformasyon işlemi sonrasında zamanla canlılığını kaybetmesidir. Bu sorunun çözülmesi amacı ile *Atropa belladonna* yaprak eksplantlarına 10 farklı transformasyon yöntemi uygulanmıştır. Çalışmalar sonucunda kök oluşumunun görüldüğü tek yöntemin % 23.7 transformasyon frekansı oranı ile, sıvı YMB besi ortamında büyütülen bakterilerin yaprak eksplantlarına bulaştırıldığı ve kokültüre alındığı yöntem olduğu tespit edilmiştir. Literatür çalışmalarında da bu yöntem kullanılarak gerçekleştirilen transformasyon çalışmalarından başarılı sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir [Kamada ve ark., 1986; C.-Z. Liu ve ark., 2006; Panda ve ark., 2017].

Sunulan bu tez çalışmasında transformasyon sonucu meydana gelen köklerin transgenik olup olmadıklarını belirlemek amacı ile PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu amaç ile öncelikle NucleoSpin Plasmid DNA Purification kiti kullanılarak *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 bakterisinden plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmit izolasyonu aşamasında, saçak köklerin oluşumunu sağlayan *rolB* gen bölgesine ait primer çifti kullanılmıştır. Daha sonra transgenik oldukları düşünülen 6 kök dokusundan DNA izolasyonu Aksoy, Ataşlar ve Keskin'in [Aksoy ve ark., 2018] protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örneklerinden saflığı ve yoğunluğu en yüksek olan DNA örnekleri (DNA1D, DNA2B, DNA3B, DNA4B, DNA5B ve DNA6A) kullanılmıştır. Bioline MyTaq PCR kiti kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda agaroz jelde görüntülenen örneklerden DNA4B, DNA5B ve DNA6A'da transformasyon pozitif bant görülürken

DNA1D, DNA2B, DNA3B’de transformasyon pozitif bant görülmemiştir. Bu sonuçlara göre *rolB* gen bölgesinin varlığı ispatlanan 4. (DNA4B), 5. (DNA5B) ve 6. (DNA6A) kök hatlarının transgenik oldukları doğrulanmıştır. Böylece *Agrobacterium rhizogenes* transformasyonu ile elde edilen saçak köklerde transformasyonu doğrulamak için *rolB* genine ait primer çiftlerinin başarı ile kullanılabildiği gösterilmiştir. Pozitif bant görülmeyen 1. (DNA1D), 2. (DNA2B) ve 3. (DNA3B) kök hatlarının transgenik olmadığı tespit edilmiştir. Buna göre 1., 2. ve 3. kök hatlarının yaprak eksplantlarından gelişen normal kök dokuları olduğu sonucuna varılmıştır.

Transformasyon işlemi sonucunda meydana gelen saçak köklerdeki sekonder metabolit miktarı ile karşılaştırma yapılması amacı ile saçak köklerin oluşmasını sağlayan diğer bir yöntem olan IBA bitki büyüme düzenleyicisi ile kök kültürleri kurulmuştur. Kùltürler kurulurken en verimli sonuçların elde edildiği, 0,1 mg/L IBA ve 30 g/L süzkroz içeren ½ MS besi ortamı kullanılmıştır. Çalışma 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. 30 gün sonunda kùltürler sonlandırılarak hasat sonrası yaş ağırlıkları belirlenmiştir ve başlangıç ağırlıkları da kullanılarak büyüme yüzdeleri hesaplanmıştır. En yüksek büyüme oranı % 635 oranla 3. Grup kök kùltüründen elde edilmiştir. Aynı ortamlarda ve aynı koşullarda geliştirilen köklerin büyüme oranları (% 635, % 565 ve % 590) arasındaki farklılık, doku kùltürü ile meydana getirilen bitki köklerinin gelişim aşamasındaki morfolojik yapı farklılıklarından kaynaklandığı düşünölmektedir.

Aslında, değeri terapötik özelliklere sahip çok sayıda sekonder bileşik normal bitki köklerinde birikir. Ancak kök hasadı yıkıcıdır ve doku kaybına neden olur. Üretken büyümeleri ve sürekli kùltür için uygun olmaları nedeniyle transgenik saçak kökler, terpenoidler, alkaloitler ve fenolikler dahil olmak üzere [Ono & Tian, 2011] istenen sekonder metabolitlerin üretimi için potansiyel bir kaynaktır [Hu & Du, 2006]. Çalışmalar sonucunda meydana gelen *Atropa belladonna* köklerine (transgenik olmayan E1, IBA ile meydana gelen E2, transgenik E3 ve doğadan toplanan E4) ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. İşlem sonrasında her bir kökteki toplam tropan alkaloit miktarı mg cinsinden hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre en yüksek miktar 3,1 mg ile transgenik kökten elde edilen E3 ekstresinden alınmıştır. Böylece bu tez çalışması ile transgenik köklerin transgenik olmayan, IBA ile elde edilen ve doğadaki köklere oranla daha yüksek tropan alkaloitleri içerdiğini gösterilmiştir. Park ve Facchini (2000) de sekonder metabolitlerin miktarının, plazmit taşıyan *Agrobacterium*

rhizogenes suşları ile transformasyonla pozitif yönde değiştirilebileceğini bildirmişlerdir.

Ekstraksiyon işlemi sonrasında uygulanan İTK işleminde *tropin* ve *atropin* standartları hizasında en parlak leke E3 örneğinde görülmektedir. Bu durum, toplam tropan alkaloid miktarında olduğu gibi *tropin* ve *atropin* miktarlarının da *Agrobacterium rhizogenes* transformasyonu ile arttığını göstermektedir. Bunun yanında E1 ve E2 örneklerinde lekelerin daha az parlak olması, ekstraksiyon işlemi sırasında alkaloid kaybı olabileceğini düşündürmektedir. E4 (doğa) örneğinde *tropin* ve *atropin* hizasında leke görülmemesinin nedeni olarak, bitkinin çiçeklenme döneminde toplanmasından dolayı sekonder metabolit birikiminin köklerde azalması düşünülmektedir.

E1, E2, E3 ve E4 örnekleri ile gerçekleştirilen HPLC analizi sonucunda örneklerde, standart *atropin* ile aynı dakikada pik görülmüştür. Böylece E1, E2, E3 ve E4 örneklerinde *atropinin* bulunduğu doğrulanmıştır. Şekillerde görülen diğer kirlilikler, ekstraksiyon işleminin yeterli saflıkta gerçekleştirilememiş olmasından veya HPLC işlemi sırasında kolonun tam olarak temizlenememiş olmasından kaynaklanabilir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, *Atropa belladonna* bitkisine *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 transformasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonrasında saçak kök varlığının *rolB* gen bölgesine ait primer çifti ile belirlenebildiği gösterilmiştir. *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 ile transforme edilmiş *Atropa belladonna* bitkisine ait saçak kök kültürlerinde sekonder metabolit üretiminin transgenik olmayan köklere, IBA büyüme düzenleyicisi ile oluşturulan saçak köklere ve doğadaki köklere göre daha yüksek miktarda olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abbasi, B. H., Saxena, P. K., Murch, S. J., & Liu, C.-Z. (2007), "Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities", In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 43, 481–492.
- Ackermann, C. (1977), "Pflanzen aus *Agrobacterium rhizogenes*-tumoren an *Nicotiana tabacum*" Plant Science Letters, 8(1), 23–30.
- Aghaei, P., Bahramnejad, B., & Mozafari, A. A. (2013), "Effect of different plant growth regulators on callus induction of stem explants in *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*", Knowledge Creation Diffusion Utilization, 2(3), 108–112.
- Aksoy, N., Ataşlar, E., & Keskin, B. C. (2018), "Morphological and molecular data reveal a new species of *Jurinea* (Asteraceae) from Western Black Sea Region, Turkey", Phytologia Balcanica, 24, 351–359.
- Amselem, J., & Tepfer, M. (1992), "Molecular basis for novel root phenotypes induced by *Agrobacterium rhizogenes* A4 on cucumber", Plant Molecular Biology, 19(3), 421–432.
- Asha, N. ., & M.P, P. (2014), "Studies on the optimization conditions of root and callus initiation in *Atropa belladonna* in *in-vitro* conditions", International Journal of Scientific Research, 3(5), 25–26.
- Avci, M. (2016), "Türkiyenin Bitki Çeşitliliği ve Coğrafi Açından Değerlendirmesi", Türkiye'nin Doğal-Egzotik Ağaç ve Çalıları, I. Orman Genel Müdürlüğü Yayınları, 621-626.
- Aytac, S. (2019), "Güzelavrat otu (*Atropa belladonna* L .) Genel Özellikleri", International Journal of Life Science and Biotechnology, 2(2), 50–57.
- Balandrin, M. F., Klocke, J. A., Wurtele, E. S., & Bollinger, W. H. (1985), "Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials", Science, 228(4704), 1154–1160.
- Banerjee, S., Shang, T. Q., Wilson, A. M., Moore, A. L., Strand, S. E., Gordon, M. P., & Doty, S. L. (2001), "Expression of functional mammalian P450 2E1 in hairy root cultures", Biotechnology and Bioengineering, 77(4), 462–466.
- Banerjee, S., Singh, S., & Rahman, L. U. (2012), "Biotransformation studies using hairy root cultures", Biotechnology Advances, 30(3), 461–468.
- Bektaş, M., Aktar, F., Güneş, A., Uluca, Ü., Gülşen, S., & Karaman, K. (2016), "*Atropa Belladonna* (Deadly Nightshade) Poisoning in Childhood", West Indian Medical Journal, 22, 665-668.
- Bensaddek, L., Villarreal, M. L., & Fliniaux, M. (2008), "Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds", Electronic Journal of Integrative Biosciences, 3(1, Special Issue on Hairy Roots (A. Lorence and F. Medina-Bolivar, co-editors)), 2–9.

- Bhandry, S. B. R., Collin, H. A., Thomas, E., & Street, H. E. (2017), "Root, Callus, and Cell Suspension Cultures, from *Atropa belladonna*, L. and *Atropa belladonna*, Cultivar lutea Döll", *Annals of Botany*, 33(4), 647–656.
- Biondi, S., Lenzi, C., Baraldi, R., & Bagni, N. (1997), "Hormonal effects on growth and morphology of normal and hairy roots of *Hyoscyamus muticus*", *Journal of Plant Growth Regulation*, 16(3), 159–167.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001), "Production of plant secondary metabolites: A historical perspective", *Plant Science*, 161(5), 839–851.
- Çaksen, H., Odabaş, D., Akbayram, S., Cesur Yasar, Y., Arslan, Ş., Ünler, A., & Öner, A. F. (2003), "Deadly nightshade (*Atropa belladonna*) intoxication: An analysis of 49 children", *Human and Experimental Toxicology*, 22(12), 665–668.
- Cardarelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., Spanò, L., Capone, I., & Costantino, P. (1987), "Agrobacterium rhizogenes T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype", *MGG Molecular & General Genetics*, 209(3), 475–480.
- Cardarelli, M., Spanò, L., De Paolis, A., Mauro, M. L., Vitali, G., & Costantino, P. (1985), "Identification of the genetic locus responsible for non-polar root induction by *Agrobacterium rhizogenes* 1855", *Plant Molecular Biology*, 5(6), 385–391.
- Casanova, E., Valdés, A. E., Zuker, A., Fernández, B., Vainstein, A., Trillas, M. I., & Moysset, L. (2004), "rolC-transgenic carnation plants: Adventitious organogenesis and levels of endogenous auxin and cytokinins", *Plant Science*, 167(3), 551–560.
- Chandra, S. (2012), "Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: Role of T-DNA in plant secondary metabolism", *Biotechnology Letters*, 34(3), 407–415.
- Cikla, U., Turkmen, S., Karaca, Y., Ayaz, A. F., Turedi, S., & Gunduz, A. (2011), "An *Atropa belladonna* L. poisoning with acute subdural hematoma", *Human and Experimental Toxicology*, 30(12), 1998–2001.
- Cooper, W. C. (1935), "Hormones in Relation To Root Formation on Stem Cuttings", *Plant Physiology*, 10, 789–794.
- Costantino, P., Capone, I., Cardarelli, M., De Paolis, A., Mauro, M. L., & Trovato, M. (1994), "Bacterial plant oncogenes: The rol genes saga", *Genetica*, 94(2–3), 203–211.
- Danphitsanuparn, P., Boonsongcheep, P., Boriboonkaset, T., Chintapakorn, Y., & Prathanurug, S. (2012), "Effects of *Agrobacterium rhizogenes* strains and other parameters on production of isoflavonoids in hairy roots of *Pueraria candollei*", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111(3), 315–322.
- Davies, J. F. T., Davis, T. D., & Kester, D. E. (1994), "Commercial Importance of Adventitious Rooting to Horticulture", *Biology of Adventitious Root Formation* (pp. 53–59).
- Demirci, T. (2017), "*Echinacea purpurea* (L.) Moench'da *Agrobacterium rhizogenes* Kullanımı ve Bazı Dışsal Uygulamalarla Sekonder Metabolit Üretimini Artırılması", Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi.
- Erkoyuncu, M. T., & Yorgancılar, M. (2015), "Bitki Doku Kültürü Yöntemleri İle Sekonder Metabolitlerin Üretimi", *Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi*, 2(1), 66–76.

- Erwin, F. S., & Townsend, C. O. (1907), "A Plant-Tumor of Bacterial Origin", *Science*, 25(643), 671–673.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.-E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Sánchez, F. (2006), "*Agrobacterium rhizogenes* Transformation of the *Phaseolus* spp.: A Tool for Functional Genomics", *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12), 1385–1393.
- Fatemeh Ashtiania. (2011), "Tropane alkaloids of *Atropa belladonna* L. and *Atropa acuminata* Royle ex Miers plants", *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(29), 6515–6522.
- Filetici, P., Spano, L., & Costantino, P. (1987), "Conserved regions in the T-DNA of different *Agrobacterium rhizogenes*", *Plant Molecular Biology*, 26, 19–26.
- Flores, H. E., Vivanco, J. M., & Loyola-vargas, V. M. (1999), "Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism", Elsevier Science, 1385(99).
- Gelvin, S. B. (2009), "*Agrobacterium* in the Genomics Age", *Plant Physiology*, 150(4), 1665–1676.
- Gelvin, Stanton B. (2003), "Improving plant genetic engineering by manipulating the host", *Trends in Biotechnology*, 21(3), 95–98.
- Georgiev, M. I., Georgiev, V., Weber, J., & Pavlov, A. (2008), "*Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformations: A powerful tool for the production of metabolites", *Genetically Modified Plants*.
- Giri, A., & Narasu, M. L. (2000), "Transgenic hairy roots: Recent trends and applications", *Biotechnology Advances*, 18(1), 1–22.
- Godara, R., Katoch, M., Katoch, R., Yadav, A., Parveen, S., Vij, B., Singh, N. K. (2014), "*In vitro* acaricidal activity of *Atropa belladonna* and its components, scopolamine and atropine, against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*", *The Scientific World Journal*, 2014, 1-6.
- Griffin, W. J., & Lin, G. D. (2000), "Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids", *Phytochemistry*, 53(6), 623–637.
- Gryniewicz, G., & Gadzikowska, M. (2008), "Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs", *Pharmacological Reports*, 60(4), 439–463.
- Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P. K., Rideau, M., & Gantet, P. (2006), "Hairy root research: recent scenario and exciting prospects", *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 341–346.
- Hansen, G., Das, A., & Chilton, M.-D. (1994), "Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*", *Plant Biology*, 91, 7603–7607.
- Hu, Z.-B., & Du, M. (2006), "Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering", *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(2), 121–127.
- Hussain, M. S., Rahman, M. A., Fareed, S., Ansari, S., Ahmad, I. Z., & Mohd. Saeed. (2012), "Current approaches toward production of secondary plant metabolites", *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(1), 10.

- Jia, Z., & Tian, C. (2009), "Quantitative determination of polyethylene glycol with modified Dragendorff reagent method", *Desalination*, 247(1–3), 423–429.
- Joshi, P., Wicks, A. C., & Munshi, S. K. (2003), "Case Report: Recurrent autumnal psychosis", *Postgraduate Medical Journal*, 79(box 1), 239–240.
- Jouanin, L., Vilaine, F., Tourneur, J., Tourneur, C., Pautot, V., Muller, J. F., & Caboche, M. (1987), "Transfer of A 4.3-kb Fragment of the TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* Strain A4 Confers the pRi Transformed Phenotype to Regenerated Tobacco Plants", *Plant Science*, 53, 53–63.
- Kabera J. (2014), "Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(7), 377–392.
- Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H., & Shimomura, K. (1986), "Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*", *Plant Cell Reports*, 5(4), 239–242.
- Karuppusamy, S. (2009), "A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures", *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222–1239.
- Kazeem, M. I., Ogunwande, I. A., Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Chemistry, P. (2010), "Alkaloids", *Phytochemistry* (3).
- Kumar, V., Sharma, A., Prasad, B. C. N., Gururaj, H. B., & Ravishankar, G. A. (2006), *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment", *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4), 1–9.
- Lee, M. (2007), "*Solanaceae* IV", *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 37, 77–84.
- Lee, S. H., Blackhall, N. W., Power, J. B., Cocking, E. C., Tepfer, D., & Davey, M. R. (2001), "Genetic and morphological transformation of rice with the *rolA* gene from the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*", *Plant Science*, 161(5), 917–925.
- Liu, C.-Z., Abbasi, B. H., Gao, M., Murch, S. J., & Saxena, P. K. (2006), "Caffeic Acid Derivatives Production by Hairy Root Cultures of *Echinacea purpurea*", *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 54, 8456–8460.
- Liu, C., Zhu, J., Liu, Z., Li, L., Pan, R., & Jin, L. (2002), "Exogenous auxin effects on growth and phenotype of normal and hairy roots of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi.", *Plant Growth Regulation*, 38(1), 37–43.
- Ludwig-Müller, J., Vertocnik, A., & Town, C. D. (2005), "Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments", *Journal of Experimental Botany*, 56(418), 2095–2105.
- Makhzoum, A., Bernards, M. A., & Tremouillaux-Guiller, J. (2013), "Hairy Roots: An Ideal Platform for Transgenic Plant Production and Other Promising Applications", *Phytochemicals, Plant Growth, and the Environment*, 42(May 2014), 1–171.
- Matveeva, T. V., & Sokornova, S. V. (2016), "Bioprocessing of Plant *In Vitro* Systems", *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*, 1-18.

- Mehrotra, S., Kukreja, A. K., Khanuja, S. P. S., & Mishra, B. N. (2008), "Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor", *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(2).
- Michael, A. J., Furze, J. M., Rhodes, M. J. C., & Burtin, D. (2015), "Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA", *Biochemical Journal*, 314(1), 241–248.
- Misawa, M., & DiCosmo, F. (1995), "Plant Cell and Tissue Culture: Alternatives for Metabolite Production", *Biotechnology Advances*, 13(3), 425–453.
- Moyano, E., Fornalé, S., Palazón, J., Cusidó, R. M., Bonfill, M., Morales, C., & Piñol, M. T. (1999), "Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in *Solanaceae* plants", *Phytochemistry*, 52(7), 1287–1292.
- N.S, A. R., & Prasad, M. . (2014), "*In-Vitro* Studies on the Germination of *Atropa belladonna* Seeds under Different Conditions", *International Journal of Science and Research*, 3(10), 2012–2015.
- Nakamura, T., Handa, T., Oono, Y., Kanaya, K., Michikawa, M., & Uchimiya, H. (1988), "Organ-Specific mRNA in Transgenic Tobacco Plants Possesing T-DNA of Ri Plasmid", *Plant Science*, 56, 213–218.
- Nilsson, O., & Olsson, O. (1997), "Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots", *Physiologia Plantarum*, 100, 463–473.
- Nisar, A., Malik, A. H., & Zargar, M. A. (2013), "*Atropa acuminata* Royle Ex Lindl. blunts production of pro-inflammatory mediators eicosanoids.; leukotrienes, cytokines in vitro and in vivo models of acute inflammatory responses", *Journal of Ethnopharmacology*, 147(3), 584–594.
- Ono, N. N., & Tian, L. (2011), "The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities", *Plant Science*, 180(3), 439–446.
- Özgüven, M., Kırıcı, S., & Şener, B. (1986), "Toroslar'da (Pozantı) Farklı *Atropa* Türlerinin Yetiştirilme Olanakları ve Alkaloit İçerikleri", 4. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı.
- Özgüven, M., Sener, B., & Kirici, S. (1984), "Çukurova Koşullarında Bazı *Atropa* Türlerinin Drog Verimleri ve Alkaloit İçerikleri Üzerinde Bir Araştırma", 5. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı. (November).
- Ozyigit, İ. İ. (2012), "*Agrobacterium tumefaciens* and its Use in Plant Biotechnology", *Crop Production for Agricultural Improvement*, 9789400741(June), 1–796.
- Ozyigit, İ. İ., Dogan, İ., & Artam Tarhan, E. (2013), "*Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation and Its Biotechnological Applications in Crops", *Crop Improvement*, 1-48.
- Panda, B. M., Mehta, U. J., & Hazra, S. (2017), "Optimizing culture conditions for establishment of hairy root culture of *Semecarpus anacardium* L.", *Biotech*, 7(21), 1–10.

- Pellegrineschi, A., Damon, J. P., Valtorta, N., Paillard, N., & Tepfer, D. (1994), "Improvement of ornamental characters and fragrance production in lemon-scented geranium through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*", *Bio/Technology*, 12(1), 64–68.
- Petersen, S. G., Stummann, B. M., Olesen, P., & Henningsen, K. W. (1989), "Structure and function of root-inducing (Ri) plasmids and their relation to tumor-inducing (Ti) plasmids", *Physiologia Plantarum*, 77(3), 427–435.
- Petit, A., David, C., Dahl, G. A., Ellis, J. G., Guyon, P., Casse-Delbart, F., & Tempé, J. (1983), "Further extension of the opine concept: Plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation", *MGG Molecular & General Genetics*, 190(2), 204–214.
- Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A. (2002), "Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites", *Biotechnology Advances*, 20(2), 101–153.
- Renner, U. D., Oertel, R., & Kirch, W. (2005), "Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine", *Therapeutic Drug Monitoring*, 27(5), 655–665.
- Rita, P., & Animesh, D. K. (2011), "An Updated Overview on *Atropa Belladonna* L.", *International Research Journal of Pharmacy*, 2(11), 11–17.
- Ryder, M. H., Tate, M. E., & Kerr, A. (1985), "Virulence Properties of Strains of *Agrobacterium* on the Apical and Basal Surfaces of Carrot Root Discs", *Plant Physiology*, 77(1), 215–221.
- Savka, M. A., Ravillion, B., Noel, G. R., & Farrand, S. K. (1990), "Induction of Hairy Roots on Cultivated Soybean Genotypes and Their Use to Propagate the Soybean Cyst Nematode", *Phytopathology*, 80, 503–508.
- Schmülling, T., Schell, J., & Spena, A. (1988), "Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development", *The EMBO Journal*, 7(9), 2621–2629.
- Sevon, N., & Caldentey, K. (2002), "*Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation: Root Cultures as a Source of Alkaloids", *Planta Medica*, 68, 859–868.
- Sharp, J. M., & Doran, P. M. (1990), "Characteristics of growth and tropane alkaloid synthesis in *Atropa belladonna* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*", *Journal of Biotechnology*, 16(3–4), 171–186.
- Sinkar, V. P., Pythoud, F., White, F. F., Nester, E. W., & Gordon, M. P. (1988), "*rolA* locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic tobacco plants", *Genes & Development*, 2(6), 688–697.
- Slightom, J. L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L., & Tepfer, D. (1986), "Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid", *Journal of Biological Chemistry*, 261(1), 108–121.
- Smulders, M. J. M., Croes, A. F., Kemp, A., Hese, K. M., Harren, F., & Wullems, G. J. (1991), "Inhibition by Ethylene of Auxin-Promotion of Flower Bud Formation in Tobacco Explants Is Absent in Plants Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*", *Plant Physiology*, 96(4), 1131–1135.

- Southgate, H. J., Egerton, M., & Dauncey, E. A. (2000), "Lessons to be learned: A case study approach: Unseasonal severe poisoning of two adults by deadly nightshade (*Atropa belladonna*)", *Journal of The Royal Society for the Promotion of Health*, 120(2), 127–130.
- Spena, A., Schmülling, T., Koncz, C., & Schell, J. S. (1987), "Independent and synergistic activity of *rol A*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants", *The EMBO Journal*, 6(13), 3891–3899.
- Tabata, M., Yamamoto, H., Hiraoka, N., & Konoshima, M. (1972), "Organization and Alkaloid Production in Tissue Cultures of *Hyoscyamus niger*", *Phytochemistry*, 11, 949–955.
- Taylor, B. H., Amasino, R. M., White, F. F., Nester, E. W., & Gordon, M. P. (1985), "T-DNA analysis of plants regenerated from hairy root tumors", *MGG Molecular & General Genetics*, 201(3), 554–557.
- Tempé, J., Petit, A., & Farrand, S. K. (1984), "Induction of Cell Proliferation by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes*: A Parasite's Point of View", *Springer-Verlag/Wien*, 271–286.
- Tepfer, D. (1983), "The Potential uses of *Agrobacterium rhizogenes* in the Genetic Engineering of Higher Plants: Nature Got There First", *Genetic Engineering in Eukaryotes*, 153–164.
- Tepfer, D. (1984), "Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, 37(3), 959–967.
- Townsend, C. C., & Davis, P. H. (2007), "Flora of Turkey and the East Aegean Islands", *Kew Bulletin*, 28(2), 328.
- Veena, V., & Taylor, C. G. (2007), "*Agrobacterium rhizogenes*: Recent developments and promising applications", *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 43(5), 383–403.
- Wang, B., Zhang, G., Zhu, L., Chen, L., & Zhang, Y. (2006), "Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53, 101–104.
- Weller, S. A., & Stead, D. E. (2002), "Detection of root mat associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR", *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), 118–126.
- Weller, S. A., Stead, D. E., & Young, J. P. W. (2005), "Induction of root-mat symptoms on cucumber plants by *Rhizobium*, but not by *Ochrobactrum* or *Sinorhizobium*, harbouring a cucumopine Ri plasmid", *Plant Pathology*, 54(6), 799–805.
- White, F. F., Ghidossi, G., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1982), "Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(10), 3193–3197.

White, Frank F., Taylor, B. H., Huffman, G. A., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1985), "Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*", *Journal of Bacteriology*, 164(1), 33–44.

Wink, M. (1988), "Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores", *Theoretical and Applied Genetics*, 75(2), 225–233.

Zimmerman, P. W., & Wilcoxon, F. (1935), "Several Chemical Growth Substances Which Cause Initiation of Roots and Other Responses in Plants", *Contributions From Boyce Thompson Institute*, 7, 209–229.



ÖZGEÇMİŞ

Naciye YAĞIZ, 15.09.1994 tarihinde Gebze’de doğdu. Orta öğretimini Darıca Ülkün Yalçın Anadolu Lisesi’nde 2012 yılında tamamladı. Aynı yıl girdiği Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden 2016 yılında mezun oldu. 2017 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı’nda Dr. Öğr. Üyesi Fatma İnci ÖZDEMİR danışmanlığında yüksek lisans eğitime başladı. Tez çalışmalarını 2017 – 2019 yılları arasında TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvarı’nda Doç. Dr. Tijen TALAS OĞRAŞ eş danışmanlığında tamamladı.

EKLER

YAĞIZ, N., ERDEM E., TALAS OĞRAŞ T., ÖZDEMİR F. İ., ÖZTÜRK S. (2019) *Atropa belladonna* (Güzelavrat otu) Bitkisinde *In Vitro* Koşullarda Çeşitli Değişkenlerin Kallus Gelişimine Etkisi. Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu ve Tanıtım Günleri, Gebze Teknik Üniversitesi

ERDEM E., YAĞIZ, N., TALAS OĞRAŞ T., ÖZDEN ÇİFTÇİ, Y., ÖZTÜRK S. (2019) Büyüme Düzenleyicilerinin *Hyoscyamus niger* (Banotu) Bitkisinde Kallus Gelişimine Etkisi. Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu ve Tanıtım Günleri, Gebze Teknik Üniversitesi

