




KANNABİNOİDLERİN BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ

Zeynep Akyol^{1,a}, Tugay Türkyılmaz^{1,b}, Hülya Akdemir^{1,c*}

¹Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kocaeli, Türkiye

* Corresponding Author:
E-mail: hakdemir@gtu.edu.tr

(Received 9th August 2024; accepted 31st October 2024)

a:  ORCID 0009-0001-1095-0195, b:  ORCID 0009-0004-6221-292X, 1:  ORCID 0000-0001-7923-3031

ÖZET. *Cannabis sativa L.*, içerdiği farmasötik öneme sahip psikoaktif kimyasal bileşikler olan kannabinoidler nedeniyle günümüzde milyarlarca dolarlık uluslararası pazara sahip bir bitkidir. Tıbbi amaçlarla kullanımının henüz son zamanlarda yasallaştırılmış olması, bu bitkinin ve içerdiği önemli bileşenlerin üretimi ile ilgili çalışmaların başlamasını sağlamıştır. Biyoteknoloji temelli kannabinoid üretimi; öncül izoprenoid birimlerinin hücresel teminini sağlayacak biyolojik bir sistemi, istenen kannabinoidlerin tüm biosentetik yolağındaki enzimleri kodlayan genlerin uyumlu ifadesini ve özgün başlangıç moleküllerini kullanabilmek için enzim mühendisliği stratejilerini gerektiren bir süreçtir. Kannabinoidlerin üretimi için bitkilerde hücre ve doku kültürü çalışmaları, genetik transformasyon gibi çalışmalar, bitkilerde geleneksel üretime göre bu bileşenlerin üretimi için alternatif yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Yine kannabinoidlerin üretimi için transgenik bitkilerin yanı sıra bakteri ve maya gibi başka heterolog konakçıların araştırılması hem kannabinoid profilini değiştirmek hem de optimize etmek için kullanılmaktadır. Bu çalışmada; günümüze değin genetik mühendisliği, biyoteknoloji, metabolizma mühendisliği/sentetik biyoloji alanında kenevir üretimi, kenevir ıslahı, kannabinoid içeriğinin değiştirilmesi ve mevcut yolların aydınlatılması için yapılan çalışmalar derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kenevir, Kannabinoid, Doku Kültürü, Mikrobiyal Üretim

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF CANNABINOIDS

ABSTRACT. *Cannabis sativa L.* is a plant with a multibillion-dollar international market due to its pharmacologically significant psychoactive chemical compounds known as cannabinoids. Its use for medical purposes has only recently been legalized and has led to the start of studies on the production of this plant and its important components. Biotechnology-based cannabinoid production is a process that requires a biological system to provide the precursors of isoprenoid units, coordinated expression of genes encoding enzymes in the entire biosynthetic pathway of the desired cannabinoids, and enzyme engineering strategies to utilize specific starting molecules. For cannabinoid production, plant cell and tissue culture studies as well as genetic transformation are the alternative methods compared to traditional production in plants. Furthermore, in addition to transgenic plants, other heterologous hosts such as bacteria and yeast has been explored for the production of cannabinoids to modify and optimize the cannabinoid profile. This study compiles studies conducted to date in the fields of genetic engineering, biotechnology, metabolic engineering/synthetic biology for *Cannabis* production and its breeding, modification of cannabinoid content, and elucidation of existing pathways.

Key Words: *Cannabis*, *Cannabinoids*, *Tissue culture*, *Microbial Production*

GİRİŞ

Cannabis sativa L., Cannabaceae ailesine ait olan tek bitki türüdür, ancak yaygın olarak tanımlanan birkaç alt kategorisi vardır. Bunlardan genetik analizlerle desteklenen iki ana grup belirlenmiştir [1–4]. Bunlar, Amerika Birleşik Devletleri’nde yasal olarak Δ^9 -tetrahidrokannabinol (THC) içeriği %0,3’ten düşük olarak kabul edilen “kenevir” ya da “endüstriyel kenevir” türü [1] ve THC içeriği %0,3’ten fazla olan uyuşturucu tür olarak kabul edilen türlerdir [2]. THC konsantrasyonu %0,3’ten fazla olan ikinci tür, “*marihuana*” veya “uyuşturucu tipi kenevir” olarak adlandırılmaktadır [5]. Kenevir ve uyuşturucu türleri arasında THC içeriği yüzdesi temel alınıp, öte yandan endüstriyel alanda kullanılan kenevirin daha yüksek CBD (kannabidiol) konsantrasyonlarına sahip olduğu bilinmektedir [6]. Yüksek THC içerikli uyuşturucu türlerinin THC içeriği %12’den fazladır ve ortalama %10-23 THC içeriğine sahip olabilmektedirler [7,8]. Yüksek THC içerikli “uyuşturucu tipi kenevir” farklı sarhoş edici yan etkilere sebep olduğu düşünülen “*Sativa*”, “*Indica*” ve “*Hybrid*” alt türleri olarak ticari pazarda yer almaktadır [9,10]. Genetik analizler; THC içeriği yüksek olan üç “uyuşturucu tipi” tür arasında net ve anlamlı bir farklılaşma olmadığını ortaya çıkarsa da [1,2]; rekreasyonel (eğlence) ve tıbbi amaçla kullanılan *Cannabis*’in “*Sativa*” ve “*Indica*” türleri arasında CBD oranlarında belirgin farklılıklar olduğunu göstermiştir. [11,12].

C. sativa’dan izole edilerek başlayan kannabinoidlerin keşif süreci daha sonra tetrahidrokannabinol (THC), kannabigerol (CBG), kannabidivarin (CBDV) ve Δ^9 -tetrahidrokannabidivarin (THCV) gibi diğer türevlerinin bulunması ile devam etmiştir [5].

Fitokannabinoidler (bitki kannabinoidleri), kannabinoid reseptörleriyle doğrudan etkileşime girebilen veya kannabinoidlerle kimyasal benzerlik paylaşan ya da her ikisini birden yapabilen bitki kaynaklı doğal ürünlerdir [13]. Şimdiye kadar, *C. sativa*’dan izole edilen yaklaşık 565 kimyasal bileşiğin 120’sinin fitokannabinoid olduğu bilinmektedir [14,15]. Yağda çözünen bu bileşenler genellikle tipik bisiklik veya trisiklik yapıya sahiptir ve bunların çoğu, en yaygın olarak bulunan asidik fitokannabinoidlerden türetilir, bunlar arasında Δ^9 -tetrahidrokannabinolik asit-A (THCA), kannabigerolik asit (CBGA), kannabinolik asit (CBNA), kannabikromenik asit (CBCA) ve kannabidiolik asit (CBDA) yer alır [16,17]. Ana fitokannabinoidler, n-pentil yan zincirlerinden dolayı C5-fitokannabinoidlerdir [5].

Kenevir bitkisinde kannabinoid üretimini arttırmaya yönelik günümüze değin farklı metotlar uygulanmıştır. Temelde kannabinoidlerin üretimi için yaklaşımlar; ıslah çalışmaları, kimyasal sentez ve biyoteknoloji temelinde gelişmektedir. Kimyasal sentezin, karmaşık ve çok adımlı sentez yolağının düşük verimliliğe yol açması ve yüksek üretim maliyetlerine sahip olması, ayrıca çevre dostu bir alternatif olmaması nedeniyle biyoteknoloji temelli üretim yöntemlerinin geliştirilmesi öncelikli amaç olarak görülmektedir [18]. Bu derlemede temel olarak, kenevir bitkisi ve değerli metabolitlerinin üretiminde kullanılan biyoteknolojik yöntemler, bitki doku kültürü ve bitki transformasyon çalışmaları ve genetik mühendisliği ile kannabinoidlerin farklı mikroorganizmalarda heterolog üretimi üzerinden açıklanmıştır. Ayrıca sentetik biyoloji ve metabolizma mühendisliği ile ilgili yapılan çalışmalar da bu bölümde derlenmiştir.

Kannabinoidlerin Biosentezi ve Biyoteknolojik Üretimi

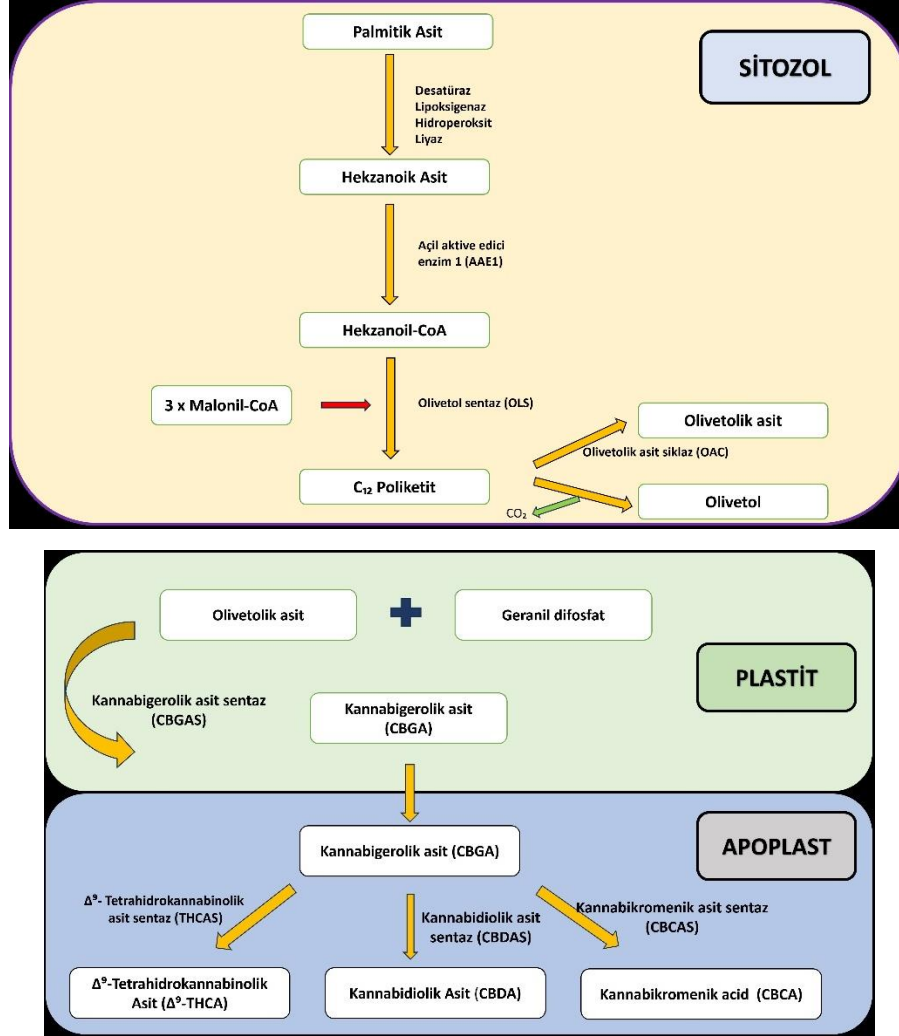
Kannabinoidler, dişi çiçeklerin glandüler trikomlarında (marihuana tomurcuğunda) sentezlenirken, trikom açısından fakir erkek çiçeklerde kannabinoidler genellikle çok düşük oranda bulunur [19]. Dişi kenevir çiçeklerinde glandüler trikomlar saplı, sapsız ve soğanlı olmak üzere üçe ayrılıp soğanlı trikomlar sınırlı sayıda kannabinoid üretip, boyut olarak en küçüğüdür. Diğer iki morfoloji neredeyse tüm kannabinoid üretiminden sorumludur. Kısa bir sap tarafından desteklenen sapsız trikomlar, subkutiküler metabolit depolama boşluğuna sahip çok hücreli salgı hücreleri diskinden oluşan küresel bir kafaya sahiptir [20].

Fitokannabinoidler, izoprenoid ve yağ asidi öncüllerinden türetilen prenillenmiş poliketidler olan terpenofenolik bileşiklerdir. Fitokannabinoid biosentezi farklı hücresel bölümlerde meydana gelmektedir. Bunlar glandüler hücrelerin sitozolü, plastidler ve hücre dışı depolama boşluğu olarak sıralanabilir. Sitozolde palmitik asit gibi yağ asitlerinin oksidatif parçalanması, hekzanoik asit oluşmasına ve ayrıca olivetolik asidin (OA) sentezlenmesine yol açar. Bir sonraki adım fenolik kısmın (poliketid türevleri, 5-pentenil resorsinolik asit ve OA) terpenoid geranil pirofosfat (GPP) ile prenilyasyonudur. Bu adım, plastidlerdeki metileritritol-4-fosfat (MEP) yolağı ile sağlanır. Siklizasyon (oksidatif) ve son ürünlerin depolanması, glandüler hücrelerin dışında gerçekleşir. Taşıma proteinleri ve vezikül trafiği, glandüler hücreleri ile depolama boşluğu arasındaki morfolojik olarak oldukça özelleşmiş arayüz boyunca ara maddelerin harekete geçirilmesine katılır [21,22].

C. sativa'da olivetolik asidin biosentez yolağı hekzanoik asidin bir açıl aktivasyon enzimi tarafından aktive edilmesiyle başlar [23]. Ardından, üç malonil-CoA ve heksanoil-CoA, olivetol sentaz (OLS) tarafından olivetole dönüştürülür ve daha sonra olivetolik asit siklaz (OAC) tarafından olivetolik aside dönüştürülür [24]. CBD biosentezinin ana yolu, malonil koenzim A ve heksanoil koenzim A gibi öncü moleküllerin mevalonat (MVA) yolunda yer almasıyla başlar ve geranil pirofosfat (GPP) kullanılarak olivetolik asit (OA) üretilir. Bu iki temel bileşen (OA ve GPP) değiştirilir, metile edilir ve daha sonra *C. sativa*'da geranilpirofosfat-olivetolat geraniltransferaz (CsPT4) tarafından açillenerek kanabigerolik asit (CBGA) oluşturulur [25].

C. sativa'da fitokannabinoid biosentezi üç önemli yola ayrılır: bunlar sitozol (poliketid yolu için), plastidler (prenilyasyon için MEP yolağı) ve apoplastik boşluklardır (oksidosiklizasyon ve depolama) [26]. Sitozol içinde fitokannabinoidlerin biosentezi, poliketid ve izoprenoid metabolizmasındaki ana adımların birleşimine katılır [26]. Yağ asitleri (C18) sırasıyla desatüre edilir, peroksijenlenir ve sırasıyla enzim desatüröz, lipoksigenaz (LOX) ve hidroperoksit liyazlar yoluyla hekzanoik asit (C6) ve C12 ürününe parçalanır. Hekzanoik asit, tioester heksanoil-CoA'ya dönüştürülür; bu reaksiyon açıl ile aktifleştirilen enzim 1 (AAE1) tarafından katalize edilir. Daha sonra heksanoil-CoA ve malonil-CoA (C2 donörü), olivetol sentaz (OLS) ve olivetolik asit siklaz (OAC) ile birlikte olivetolik asiti (OA) sentezler. Hekzanoik asitten OA üretimi sitozolde gerçekleşir. Plastitlerde MEP yolu tarafından GPP sentezlenir. Kannabigerolik asit sentaz (CBGAS) tarafından GPP ile OA prenillenerek ilk gerçek kannabinoid olan kannabigerolik asit (CBGA) sentezlenir. CBGA önemli bir kannabinoiddir çünkü alkillik pentil yan zincire sahip birçok kannabinoidin öncüsü olarak görev yapar. Buna karşılık CBGAS, plastid sinyallerini aktaran bir transmembran aromatik prenilytransferazdır (aPT)

[26]. Daha sonra CBGA, CBDAS ve Δ^9 - tetrahidrokannabinolik asit sentaz (Δ^9 -THCAS) olmak üzere iki enzimin yardımıyla Δ^9 -THCA ve kannabidiolik asit (CBDA)'e dönüştürülür [26]. Bu dönüşüm, oksidatif siklizasyon reaksiyonları yoluyla oksijenin (O_2) hidrojen perokside (H_2O_2) indirgenmesiyle devam eder. Ek olarak, CBDAS ve Δ^9 -THCAS, O_2 'ye (elektron alıcısı) bağımlı olan, biyosentez yolağında gerekli olan flavoprotein enzimleridir [21,27,28]. Δ^9 -THCA, CBDA ve CBCA, pentil yan zincirine sahip kannabinoidlerin enzimatik biyosentezinin son ürünleridir. Daha az rastlanan alkil yan zincirlere (C1-C4) sahip kannabinoidler de aynı enzimler tarafından ancak kısa zincirli yağ açıl-CoA'lardan ve daha düşük afinite ile üretilir.



Şekil 1. Kannabinoidlerin biyosentezi (Kosalková vd. 2023'ten [29] modifiye edilmiştir).

Kannabinoidlerin Biyoteknolojik Üretim Stratejileri

Biyoteknolojik üretim yöntemlerinin geliştirilmesi, hem endokannabinoid sistemde insan vücudunda farklı mekanizmalar üzerindeki etkisi nedeniyle ilaç tedavisinde kullanılabilecek metabolitlerin üretimi hem de lifli bir bitki olmasından ötürü tekstil sektöründe kullanım alanına sahip kenevirin yüksek verimde üretimi için önem taşımaktadır. Kenevir bitkisinde biyoteknolojik olarak üretime, doku kültürü ve bitki transformasyonu, genetik mühendisliği ile değiştirilmiş mikroorganizmalarda kenevir metabolitlerinin üretimi örnek olarak verilebilir.

Kenevir üretiminin hızla büyüyen bir pazar haline gelmesinde CBD üretimi ve tıbbi kenevir endüstrisi önemli rol oynamaktadır [30]. Kenevir üretimi için *in vitro* mikroçoğaltım gibi doku kültürü temelli yaklaşımlar, sağlıklı ve yüksek kaliteli kenevir çeşitliliği sunması ve daha düşük maliyette üretim potansiyelinden ötürü tercih edilmektedir [30]. Doku kültürüne yaklaşımda, ilaç ve terapötik ihtiyaçları karşılamak için spesifik, tutarlı THC ve kannabinoid içeriğine sahip ve geleneksel tarımla eşdeğer çeşitlerin oluşturulması, karakterize edilmesi ve üretim maliyetlerinin düşürülerek yüksek verimde bitki üretimi sağlayacak yöntemlerin geliştirilmesi ön plandadır [30].

Öte yandan, kannabinoidlerin başka bir organizmada üretilmesi ile ilgili yöntemlerin geliştirilmesi, dünya kannabinoid pazarının artan talebi için önem arz etmektedir. Bitkideki biosentez yolağının uygun mikroorganizmaya aktarılması ile kannabinoidler bu organizmalarda heterolog olarak üretilebilir. Ancak kenevir bitkisi, antimikrobiyal ve antifungal etkiye sahip olduğu için biyoteknolojik üretimde kullanılan her yaygın organizma kannabinoid üretimi için uygun olmamaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalarda *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipopolitica*, *Pichia pastoris* kannabinoid üretimde en çok kullanılan mikroorganizmalardır [31–36]. Yapılan farklı genetik düzenlemeler ile bu organizmalarda ürün verimi artırılabilmiştir. Kenevir metaboliti olan kannabinoid bileşiği sentezlendikten sonra, bitki içerisinde asidik bir ortamda (vakuolde) bulunmaktadır. Bu sebeple yapılan çalışmalardan bir kısmında, bu asidik ortamın sağlanmasının kannabinoid etkinliğini de değiştirdiğini göstermektedir [25].

Bitkilerden kannabinoid üretimine kıyasla heterolog bir ana sistem kullanarak yapılan üretim, görece daha fazla avantaja sahiptir. Bu sistem hem yüksek kontrol ve standardizasyon sağlayan hem de düşük maliyetli iyi üretim uygulamalarını ve tedarik yönetimini içeren bir süreç ölçeklenebilirliği sunmaktadır. Ayrıca bu yöntem ile yasa dışı kullanım veya üretim riskinin azaltılması sağlanmaktadır. Bununla birlikte THCAS, CBDAS ve CBCAS enzimleri aynı substratı (CBGA) kullanarak dönüşüm yaptığından, CBGA üreten bir uygun suş geliştirildiğinde bu suşta hangi yolak genlerinin eksprese edildiğine bağlı olarak farklı kannabinoidlerin veya kannabinoid bileşimlerinin özel olarak üretimi gerçekleştirilebilir [35].

Doku Kültürü Yöntemi

Bitki hücre ve doku kültürü; bitki hücrelerinin, dokularının ve organlarının büyümesi için besleyici kültür ortamları ve kontrollü steril koşullar kullanılarak uygulanan bir yöntemdir [37]. Günümüzdeki farmasötik ürünlerin birçoğu, bitkilerin dışarıdan bir uyarı almaksızın doğal olarak ürettikleri metabolitleri olup her geçen gün bu alanda yeni ürünler keşfedilmektedir [37]. Bu nedenle *in vitro* doku kültürü, coğrafi ve çevresel koşullardan bağımsız olarak kontrollü şartlarda görece küçük bir alanda çok sayıda bitki üretimine olanak sağladığından ilaç ham maddesi gibi bu önemli bitki bileşenlerinin yüksek verimde üretilmesi için kullanılabilir [37].

Son yıllarda, yüksek THC (psikoaktif) ve düşük THC (endüstriyel kenevir) türü *Cannabis sativa L.* (kenevir), tıbbi, gıdasal ve birçok tüketici ürünü pazarında büyük ilgi görmektedir. Bitki materyali olarak doku kültürü hatlarının kullanılması, tıbbi kenevir üretiminin “iyi üretim uygulaması” (GMP) düzeyinde güvenliğini artırma potansiyeline sahiptir [30]. Doku kültürü yöntemi, hastaliksız bitki üretimini sağlarken genetik manipülasyona da olanak tanır. Yine bu yöntem, kenevir ile ilgili temel araştırmalarda yeni özelliklerin geliştirilmesinde ve ticari ölçekte bitki üretimi açısından da geleneksel yöntemle üretime görece avantajlıdır [30]. Dahası birçok elit kenevir çeşidinin doku kültürü temelli klonal üretimi, kenevir bitkisinin heterozigot, yabancı döllenmiş yapısı nedeniyle, genetik bütünlüğünün korunması açısından elzemdir.

Cannabis spp.'nin doku kültürü çalışmalarının, birkaç kenevir çeşidi üzerinde yapılan *in vitro* rejenerasyonuna rağmen oldukça zorlayıcı olduğu görülmektedir [30]. 1970'lerin başında, geleneksel çoğaltım sistemlerinin yanı sıra kenevirin *in vitro* kültür çalışmalarına da başlanmış ve bu *in vitro* çalışmaların büyük kısmında kannabinoid üretimi için kenevirin kallus kültürüne odaklanılmıştır [38,39]. Mikroçoğaltım yoluyla sürgün proliferasyonu hakkında çok sayıda rapor olmasına rağmen *de novo* rejenerasyon yoluyla tam bir bitkinin rejenerasyonunu gösteren az sayıda bilimsel çalışma yayınlanmıştır [40]. Tek bir hücreden bir kenevir bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu halen başarısızdır [30]. Bu nedenle günümüzde hem endüstriyel hem de tıbbi kullanımını için yüksek oranda talep edilen kenevirin üretimi için optimize edilmiş bir rejenerasyon protokolüne gereksinim duyulmaktadır [30]. Kenevirin mikroçoğaltım optimizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar; genotipin, besiyeri bileşen içeriğinin ve bitki büyüme düzenleyicilerinin eklenmesi gibi birçok faktörün hem niteliksel hem de niceliksel olarak bitki üretiminde önemli bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir. Kenevir mikroçoğaltımında başarıya ulaşmak için: *i.* Doku kültüründe altkültürleme zamanının azaltılması, *ii.* Hayatta kalma oranını %95'ten daha yükseğe çıkarmak için daha iyi kök sistemlerinin nasıl teşvik edileceğinin optimize edilmesi, *iii.* Bitki büyüme düzenleyicilerinin (PGR'ler), ışık şiddeti ve sıcaklık gibi büyüme koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir.

Sentetik Tohum Teknolojisi

Sentetik tohum yöntemi, bitkilerin ticari olarak çoğaltımında kullanılan, hastaliksız sertifikalı temiz bitki üretimi ve germplazma korunmasına yol açan bir doku kültürü yöntemidir [30]. Sentetik tohumlar; bitkilerin somatik embriyo [41], nodal tomurcuklar, aksiller sürgün tomurcukları ve apikal meristemler gibi çeşitli mikropropagüllerinin

optimize edilen koşullarda, genellikle aljinat jel içinde kapsüllenmesiyle oluşturulur [30]. Melezleme yolu ile ıslah edilen kenevirin tohumdan üretiminde genetik dağılım görüleceğinden dolayı, sentetik tohum teknolojisi ile *in vitro* çoğaltım, büyük ölçekli klonal çoğaltım ve germplazmanın korunmasını sağladığı için tercih edilmektedir [30]. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada, *in vitro* veya *in vivo* kaynaklı kenevir nodlarından üretilen sentetik tohumlarla ilgili bir protokol geliştirilmiş ve elde edilen sentetik tohumların 150 gün *in vitro* koşullar altında saklandıktan sonra dahi, tüm tohumlardan çimlenme gerçekleştiği belirlenmiştir [42]. Bu bağlamda, sentetik tohum teknolojisi kenevir çeşitlerinin doku kültürü temelli bitki üretiminden bağımsız, ticari ölçekte toplu olarak çoğaltımı için de alternatif yol olarak karşımıza çıkmaktadır [42].

Protoplast Kültürü

Bitkilerde yıllardır genetik transformasyon, hücre füzyonu ve somatik mutasyon için, günümüzde de özellikle genom düzenleme çalışmalarında bitki protoplastları kullanılmaktadır [43,44].

Bitki materyali olarak mezofil protoplastlarının geçici ekspresyonda kullanımı, bitkilerde gen işlev analizi ve etkili genom düzenlemeleri için ideal bir kaynak olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak kenevir bitkisinin uzun süre yasal olarak kullanılamamasına bağlı olarak bu alandaki çalışmaların görece yeni olması hem de kenevirin doku kültürüne direnç göstermesi nedeniyle protoplast kültürü protokolü optimize edilmeye çalışılmaktadır [45]. Yapılan bir çalışmada, kenevir yaprağının mezofil protoplastları kullanılarak etkili bir protoplast izolasyonu ve geçici ekspresyon sistemi geliştirilmeye çalışılmıştır [45]. Canlı protoplastların yüksek verimde izole edilmesi için optimizasyon süreçleri ve floresan raportör genler kullanılarak protoplastların PEG aracılı transfeksiyonu literatürde ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Dahası ilgili yöntem heterojen bir genetik yapıya sahip olan kenevir bitkisinin 3 farklı çeşidine uygulanarak doğrulanmıştır ve kenevir protoplastlarında heterolog genlerin geçici olarak ifade edilebileceğini kanıtlamıştır. Bu yöntemin gelecekte CRISPR/Cas-9 kullanılarak geçici ekspresyon çalışmalarında, protein-protein etkileşim analizlerinde veya kenevir bitkisinde geçici bir gen ekspresyon sistemi gerektiren diğer araştırmalarda da kullanım potansiyeli vardır [45].

Genetik Transformasyon

Cannabis transformasyonu ile ilgili son 20 yılda yapılan çalışmalar temel olarak, *Agrobacterium rhizogenes* aracılığıyla saçak kök kültürü, *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla geçici transformasyon ve kararlı transformasyon olmak üzere 3 ana başlıkta toplanmaktadır.

Saçak kök kültürü

Bir fonksiyonel genomik araç olan *Agrobacterium rhizogenes*, bir genin işlevini belirlemek veya özellikle ikincil metabolit sentezini arttırmak üzere transgenik bitkiler

üretmek için uzun süredir bitkilerde kullanılmaktadır. Bu yolla bitkiler bir toprak bakterisi olan *Agrobacterium rhizogenes* ile enfekte edilerek enfekte olan bölgelerden saçak köklerin çıkması indüklenir. Saçak kök kültürü hormonsuz bir ortamda yüksek ve hızlı bir büyüme oranına sahip olup özellikle ikincil metabolit üretiminde avantajlıdır [46]. Yapılan çalışmalarda hem lif keneviri hem de ilaç tipi kenevirde saçak kök kültürü *A. rhizogenes* tarafından başarı ile uyarılmıştır [47,48]. Yapılan çalışmalarda, çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerini içeren farklı besiyeri tipleri kullanıldığında saçak kök kültürlerinden kallus elde edilse de gövde oluşumu gerçekleşmemiştir [49]. Kenevir saçak kök kültürlerinde kannabinoid üretimi görülmemiştir. Öte yandan başka bir çalışmada kannabinoid üretimi *A. rhizogenes* kullanılmadan kallustan üretilen saçak kök kültürlerinde az da olsa tespit edilmiştir [50]. Başka bir çalışmada, her ne kadar *C. sativa* saçak köklerinde kannabinoid profili incelenmese de [48], kolin ve atropin varlığı rapor edilmiştir. Elde edilecek kannabinoid verimi, bitki çeşidi ve/veya bitki çeşidi-bakteri soyu kombinasyonuna bağlı olabilir. Öte yandan, kannabinoidin yüksek seviyeleri bitki kültürleri için toksik olabilir. Kallus kültürlerinden köklenme oluşumu gözlenirse de [51] köklerden bitki rejenerasyonu zor olup henüz *Cannabis*'te rapor edilmemiştir [52].

Geçici ve Kalıcı Transformasyon

Agrobacterium tumefaciens aracılığıyla transformasyon, bitkilerde geçici ve kalıcı transformasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [53,54]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, *A. tumefaciens* aracılı genetik transformasyonun kenevirde de mümkün olduğunu göstermiştir. Ancak yapılan çalışmalarda kullanılan kenevir çeşidine göre *A. tumefaciens*'e karşı duyarlılıkta farklılıklar gözlemlenmiştir. *Agrobacterium* ile muamele, bitki tarafından bir patojen saldırısı olarak algılandığı ve ikincil metabolitlerin de keneviri patojenlere karşı koruduğu bilindiği için [55] kenevir çeşidine göre görülen bu duyarlılık farklılığının, kenevir çeşitlerindeki ikincil metabolit profili farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir [56]. Karşılaşılan bu durum ise *Cannabis*'te yapılan tüm kalıcı transformasyon çalışmalarının neden sadece lif keneviri çeşitlerinde yapıldığını kısmen açıklamaktadır.

Bir bitki sisteminde sabitlendikten sonra kalıtsal olması nedeniyle kararlı genetik transformasyonların, fonksiyonel genomik gibi pek çok uygulama için tercih edildiği görülmektedir [30]. Kalıcı genetik transformasyon çalışmalarının kenevirde gerçekleştirilebilmesi, ekonomik açıdan önemli bu bitki türünü geliştirmek için çok önemli konuma sahiptir. Kenevirin başarılı kararlı transformasyonu ile ilgili yapılan ilk denemede [57], transformasyon yöntemi ve etkinliği ile ilgili çok az bilgi verilmiştir. Diğer bir çalışmada, kenevir hücre süspansiyonlarında %55 oranında transformasyon oranı gösterilmişse de başarılı bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmemiştir [51]. Günümüzde hala kenevirin başarılı kararlı transformasyonu ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu durumun ise elde edilen transformantların başarılı bir şekilde rejenere olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kararlı transformasyon *Cannabis*'in genom düzenleme çalışmaları için de geliştirilmesi gerekli bir protokoldür. Birçok bitki türünde başarılı CRISPR-Cas9 aracılı gen düzenlemesine dair çok sayıda rapor olduğu bilinmektedir ve CRISPR'ın, bir genin genomdaki işlevini tam olarak değiştirebildiği kanıtlanmıştır [51]. Bu yöntem hem temel hem de uygulamalı bitki biyolojisini araştırmada ve geliştirmede büyük katkı sağlama potansiyeline sahiptir. Bundan dolayı kenevir bitkisinde bu teknolojinin gerçekleştirilmesi, bilinmeyen binlerce

genin fonksiyonel çalışmalarının gerçekleştirilmesi ve yeni çeşitlerin geliştirilmesine olanak tanıyacaktır [30].

Bitkilerde geçici genetik transformasyonun gerçekleştirilmesinde uygulanan moleküler yöntemlerden birisi, Virüs Kaynaklı Gen Susturma (VIGS) yöntemidir. RNA aracılı transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) tekniği olan VIGS, görece kısa bir süre içinde gen işlevlerinin araştırılması için uygulanabilmektedir [58–60]. Bir bitki türünde incelenen genin *in vivo* işlev kaybını fenotipik düzeyde görmek için uygulanan VIGS protokolü optimize edildikten sonra bu etkinin fenotipte kendisini göstermesi 3-6 hafta kadar sürmektedir [58]. Bu nedenle bu yöntem bitkilerde kararlı transformasyon çalışmaları öncesinde hedef genin işlevinin kanıtlanması için uygulanabilecek ideal bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır [30]. Diğer bir geçici transformasyon yöntemi olarak RNAi (RNA interference) ekspresyonu, hedeflenen genlerin baskılanmasına yol açan iyi karakterize edilmiş bir yöntemdir ve ihpRNA (intron içeren hairpin RNA) gibi RNA'ların kullanımı ile genlerin susturulmasını tetikleyebilir. RNAi mekanizmaları siRNA üretilmesi ve bu siRNA'ların hedeflenen mRNA'yı tanıyan bir RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) bağlanması yoluyla çalışmaktadır. Bu sayede hedeflenen genlerin ifadesi downregüle edilir [61].

C. sativa'da VIGS yöntemi, henüz işlevi bilinmeyen gen fonksiyonlarını tanımlamak amacıyla reverse genetik çalışmalarda kullanılabilecek bir tekniktir. Bu yöntem ile açığa kavuşturulmamış olan biyosentez yollarının ayrıntılarına inilerek *C. sativa* gibi ticari ve tıbbi öneme sahip bitkilerin mevcut genomik verileri ile biyokimyasal veriler arasındaki bilinmeyen verilerin açığa çıkarılması sağlanabilir. VIGS vektörleri çeşitli virüs/konakçı kombinasyonlarından geliştirilebilir. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada, *C. sativa*'da VIGS protokolünün uygulanmasında Pamuk yaprak kıvrılma virüsü (CLCrV) kullanılmıştır. CLCrV, DNA-A ve DNA-B olarak adlandırılan tek iplikli iki adet halkasal DNA molekülünden oluşan, iki parçalı DNA'ya sahip begomovirüslere ait bir virüstür [62]. VIGS'in çalışma prensibinde, bitkilerde virüs enfeksiyonlarına karşı doğuştan gelen savunma sisteminden yararlanılmaktadır. Begomovirüsler çekirdekte genomlarını kopyaladıktan sonra dsRNA (çift iplikli RNA), RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RDR) tarafından sitozolde sentezlenir. Sonrasında dsRNA, transkripsiyon sonrası gen susturmayı (PTGS) tetikler. Bu dsRNA'nın parçalanmasına ve RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) tarafından tanınan siRNA moleküllerinin üretilmesine yol açar. Daha sonra çift sarmallı siRNA'lar tek sarmallı (ssRNA) hale dönüştürülüp RISC tarafından tamamlayıcı dizileri taramak için kullanılır [63]. Sonuçta ortaya çıkan dsRNA molekülleri yani siRNA ve virüs-ssRNA kompleksleri daha sonra parçalanacak ve virüsün replikasyonu yavaşlayacaktır [63]. Bu, bitki boyunca taşınmayı mümkün kılan siRNA'nın artmasıyla sonuçlanır. Bu nedenle uzaktaki hücrelerde ve hatta bitkinin farklı birçok yerinde susturma gözlemlenebilir. Yapılan çalışmada, VIGS vektörlerini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 suşu ile geçici olarak transforme edilen bitkilerin, istenen fenotipleri gösterdiği ve yapraklarda lekeli beyazlamanın gerçekleştiği belirlenmiştir [63]. Genlerin başarılı şekilde susturulması kantitatif PCR ile doğrulanmış ve transkripsiyon ifadelerinin *Chl1* ve *PDS* için sırasıyla %70 ve %73 oranında azalmasıyla sonuçlanmıştır [63]. Bu, biyosentetik yolların ve bitki gelişiminin düzenlenmesinin daha iyi anlaşılması için gen fonksiyonlarını açıklama ve değişen transkripsiyon seviyelerinin düzenleyici ağını ortaya çıkarmasını sağlamaktadır [63].

Başka bir çalışmada, agroinfiltrasyon yoluyla RNAi kullanarak kannabinoid biyosentez genlerinin ilk kez modüle edildiği bildirilmiştir [64]. Bu çalışma, *C. sativa* suşu Cannbio-2'nin *THCAS*, *CBDAS* ve *CBCAS* gen dizilerine karşılık gelen farklı RNAi yapıları ile transfekte edilmiş yaprak bölümleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu transfekte edilmiş bitkilerin tüm kannabinoid biyosentez genlerinde pRNAi-GG-CBDAS UNIVERSAL kullanılarak belirgin ve anlamlı şekilde sırasıyla; *THCAS* (%92), *CBDAS* (%97) ve *CBCAS* (%70)'nın downregüle olduğu RT-qPCR kullanılarak doğrulanmıştır [64]. Ancak bazı genlerin gösterdiği regülasyonlar (*CBCAS*'nin (%76) anlamlı upregülasyonu ve *THCAS*'nin (%13) anlamlı olmayan upregülasyonu), bu genlerin kannabinoid biyosentezinde birden fazla aşamada rol oynayabileceğini göstermiştir [64]. Kenevir bitkisinde RNAi kullanarak kannabinoid biyosentez genlerinin modülasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği bu çalışma, gelecekte daha ileri araştırmalarda bu yöntemin başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Son dönemde nanopartiküller aracılığıyla bitki transformasyonu ile ilgili olarak yapılan çalışmalar, çift sarmallı RNA veya plazmit DNA'sının, sağlam bitki doku hücrelerine *Agrobacterium tumefaciens* ile aktarıma alternatif olarak etkili bir şekilde aktarılabileceğini göstermiştir. Bu çalışmalar, kil nano tabakaları veya tek tabakalı karbon nanotüpler gibi nanomateryallerin, DNA'nın pasif difüzyon yoluyla hücre çekirdeğine taşınmasını sağlayan taşıyıcı moleküller olarak işlev görme potansiyeli olduğunu göstermiştir [65–67]. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada, silikon dioksit kaplı altın nanopartiküller üzerine aktarılan soya fasulyesi transkripsiyon faktörünü içeren DNA'lar infiltrasyon yolu ile kenevir yaprağına transfer edildikten sonra hem soya fasulyesi genlerinin transkripsiyonu ile sonuçlanmış hem de kannabinoid ve terpen gibi değerli metabolitlerin üretildiği trikomlar dahil kenevir yaprak hücrelerinin çekirdeklerinde floresan işaretli transkripsiyon faktörü proteinlerinin lokalizasyonu gösterilmiştir [67]. Bu çalışma, kenevir bitkisinde çoklu transgen ekspresyonunun etkilerini incelemek için kullanılabilecek etkili bir geçici transformasyon yöntemidir [67].

Transformasyon protokollerinin geliştirilmesi ile daha fazla nadir kannabinoid içeriğine sahip bitkilerin üretimi ve dahası kannabinoid profilinden ayrı olarak farklı terpenlerin içeriğini değiştirmek önemlidir. Kendine özgü tıbbi özelliklere sahip bir bileşik olarak CBG, genellikle oldukça düşük seviyelerde bulunduğundan genom düzenleme yoluyla hem *THCA* hem de *CBDA sentaz* gibi önemli kannabinoid biyosentez genlerin silinmesi, hem bu genlere ait mutantları geliştirme hem de daha yüksek CBG seviyelerine sahip bir bitki elde edilmesi potansiyeline sahiptir.

Heterolog Olarak Kenevir Metabolitlerinin Mikrobiyal Sentezi

İnsan sağlığı açısından fitokannabinoidlerin farklı etkinlikleri olduğu bilinmekte ve eski çağlardan beri kenevirde elde edilen hammaddeler ilaçlarda kullanılmaktadır [68]. Kenevirin bazı bakteri ve mantar türlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve bu nedenle insanlarda çeşitli bulaşıcı hastalıklara karşı etkili antibiyotik olarak kullanılmaktadır [69]. Kenevir özütlerinin, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* gibi bazı gram pozitif bakterilere karşı ve gram negatif bakterilerden *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal aktivite sergilerken *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* gibi mantarlara karşı herhangi bir antifungal aktivite göstermediği

belirlenmiştir [70]. Öte yandan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı fitokannabinoidlerin (örneğin Δ 9-THC, CBG, CBN, CBD ve CBC) antibiyotik aktivite gösterdiği saptanmıştır [71]. Δ 9-THC ve CBD, streptokoklara ve stafilokoklara karşı bakterisidal aktivite gösterirken, gram-negatif bakterilere karşı etkili değildirler [72]. Kenevir metabolitlerinin farmakolojik potansiyelleri sebebiyle, birçok ülke fitokannabinoidlerle ilgili olan yasalarını giderek daha fazla esnetmekte ve dünya çapında kenevir türevi ürünlerle ilgili endüstriyel üretim hızla büyümektedir [29].

Biyoteknoloji temelli kannabinoid üretimi; öncül izoprenoid birimlerinin hücresel teminini sağlayacak biyolojik bir sistem, istenen kannabinoidlerin tüm biosentetik yolağındaki enzimleri kodlayan genlerin uyumlu ifadesini ve özgün başlangıç moleküllerini kullanabilmek için enzim mühendisliği stratejileri gerektiren bir süreçtir. Kannabinoid sentezi için farklı bitki türlerinden, bu biosentetik yolağına ait genler elde edilmektedir. Öte yandan bitki türünden bağımsız olarak optimal katalitik özelliklere sahip biosentez enzimlerini kodlayan genlerin kombinasyonel kullanımı ise sentetik biyoloji yaklaşımı ile mümkün görülmektedir.

Biyoteknolojik olarak kannabinoid üretiminin farklı mikroorganizmalarda gerçekleştirilmesi için genetik mühendisliği temelli tekniklerden yararlanılmaktadır. İlerleyen bölümlerde, farklı organizmalarda kenevir metabolitlerinin biyoteknolojik üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Kannabinoidlerin Biosentetik Üretimi için Fungal Platformların Kullanılması

Mantarlar çeşitli birincil ve ikincil metabolitleri üretebilen farklı biyoaktivitelere sahip organizmalardır. *Saccharomyces cerevisiae* [73], *Yarrowia lipolytica* [34,74] ve *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) [75] gibi organizmalarla, yüksek değerli metabolitlerin üretimi için çeşitli biyoteknolojik üretim protokolleri geliştirilmiştir. Ayrıca filamentli mantarlar aracılığıyla da farklı biyoteknolojik uygulamalarla yüksek değerli metabolitlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda maya ve filamentli mantarların tam genom dizilerinin elde edilmesi üretim organizmalarını iyileştirme, metabolit verimini artırma ve doğal ürünler için yeni fungal üretim platformlarının tasarlanmasını amaçlayan yeni yaklaşımların geliştirilmesi için temel bilgiler sağlamıştır [29,76,77]. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans* ve *Corynebacterium glutamicum* gibi bakteriler genetik olarak daha kolay manipüle edilse de bu mikroorganizmalar her zaman ökaryotik canlıların proteinlerinin heterolog ifadesi için uygun değildir [29]. Bunun nedeni post-translasyonel değişikliklerin eksikliği ve heterolog proteinlerin salgılanması konusundaki sınırlı yetenekleridir [29]. Bunun aksine bazı mayalar ve filamentli mantarlara ait biyolojik olarak aktif proteinlerin, orijinal proteinlerdeki glikozilasyon derecesine benzer bir biosentezleme yaparak [83] farklı enzimler ve metabolitler için büyük bir salgılama kapasitesine sahip oldukları bilinmektedir. Günümüzde gıda endüstrisinde kullanılan ticari enzimlerin %82'sinin fungal konakçılar kullanılarak üretildiği göz önüne alındığında [78], bu mikroorganizmaların heterolog protein üretimi gibi benzer amaçlarla önemli metabolitlerin üretiminde hücre fabrikaları olarak kullanılma potansiyelini doğrulanmaktadır.

***Saccharomyces cerevisiae* ile Kannabinoid Üretimi**

S. cerevisiae'de kannabinoid üretimi için ilk olarak olivetolik asit sentezlenmesi hedeflenmiş sonrasında ise CBGA üretimini arttırmak için kültür koşulları optimize edilerek farklı suşlar elde edilmiş ve bunun sonucunda galaktozdan CBDA, Δ^9 -tetrahidrokannabivarinik asit ve kannabidivarinik asit biyosentezini gerçekleştirebilen suşlar tasarlanmıştır [27]. Bunu başarmak için, doğal mevalonat yolağı yüksek oranda geranil pirofosfat akışı sağlayacak şekilde tasarlanmış ve farklı organizmalardan elde edilen bir heterolog heksanoil-CoA biyosentetik yolu sisteme dahil edilmiştir. Ayrıca bu sisteme olivetolik asit biyosentezinde yer alan enzimleri kodlayan *Cannabis* genleri, geranilpirofosfat: olivetolat geraniltransferaz aktivitesine sahip daha önce keşfedilmemiş bir enzimin geni ve kannabinoid sentaz genleri de dahil edilmiştir. Ek olarak kannabinoid analogları üretmek için çeşitli yolak genlerinin çok yönlülüğünden yararlanan bir biyosentetik yaklaşım oluşturulmuştur. Tasarlanmış suşların farklı yağ asitleri ile beslenmesi, molekülün reseptör bağlanma afinitesini ve gücünü değiştirdiği bilinen kısmında modifikasyonlara sahip kannabinoid analoglarının üretimi ile sonuçlanmıştır. Bu çalışmada öncelikli olarak mayada kannabinoid üretimi için olivetolik asit üretimine odaklanılmış ve kenevirde bulunan iki enzimin, bir tetraketid sentazın (*C. sativa* TKS; CsTKS) [79] ve bir olivetolik asit siklazının (CsOAC) [24], heksanoil-CoA ve malonil-CoA'dan olivetolik asit ürettiği belirlenmiştir [27]. Mayada olivetolik asit üretmek için yCAN01 suşu oluşturmak üzere *S. cerevisiae*'ye bir CsTKS ve CsOAC ekspresyon kaseti yerleştirilmiş ve bunun sonucunda galaktozdan 0,2 mg/L olivetolik asit üretimi sağlanmıştır [27]. Heksanoil-CoA miktarını artırmak için yCAN01 suşu, endojen bir açıl aktive edici enzim (AAE) tarafından heksanoil-CoA'ya dönüştürülebilir 1 mM heksanoik asitle beslenmiştir ve bunun sonucunda olivetolik asit üretiminde altı kat artışla (1,3 mg/L) sonuçlandığı gözlemlenmiştir [27]. Bununla birlikte TKS'nin bir yan ürünü olan heksanoil triasetik asit lakton (HTAL) [24] oluşumu da gözlemlenmiştir [27]. Heksanoik asidin heksanoil-CoA'ya dönüşümünü düzenlemek için kenevirde bu adımı hızlandırdığı düşünülen ve kenevirde elde edilen bir AAE olan *CsAAE1* yCAN01 suşuna dahil edilmiştir [23]. 1 mM heksanoik asit ile beslendiğinde ortaya çıkan suşun (yCAN02), yCAN01'e kıyasla olivetolik asit titresinde (3,0 mg/L) iki kat artış gösterdiği görülmüştür. [27]. Galaktozdan heksanoil-CoA üretmek ve olivetolik asit yolağını tamamlamak için heksanoil-CoA yolu yCAN01 suşuna eklenmiştir [80] ve bunun sonucunda oluşan suşun (yCAN03), 1,6 mg/L olivetolik asit ürettiği gözlemlenmiştir [27]. Bir geranilpirofosfat: olivetolat geraniltransferaz (GOT) tarafından olivetolik asit ve mevalonat yolu ara ürünü olan geranil pirofosfattan (GPP) Δ^9 -tetrahidrokannabinolik asit (THCA), kannabidiolik asit (CBDA) ve çok sayıda diğer kannabinoidlerin öncüsü olan kannabigerolik asit (CBGA) üretilmiştir [27]. GPP üretimi aşırı olan tercihen FPP'ye [81] göre GPP üreten endojen farnesil pirofosfat sentaz ERG20'nin (ERG20 (F69W/N127W) mutant bir versiyonuna sahip), CsPT1'i *in vivo* test etmek için upregüle edilmiş bir mevalonat yoluna [82] sahip olan suş (yCAN10) oluşturulmuştur [27]. Oluşturulan bu yCAN10 suşunda *CsPT1* eksprese edildiğinde herhangi bir GOT aktivitesi gözlemlenmemiştir [27]. Mayada işlev gösterebilecek GOT aktivitesine sahip enzim bulabilmek için *Cannabis* ve yakın türlerde aday preniltransferaz enzimi araştırılmıştır. Mayada preniltransferazın fonksiyonel olabilmesi için altı *Cannabis* ve iki *Humulus lupulus* preniltransferazının, tahmin edilen N-terminal plastit hedefleme dizileri kaldırılmıştır (CsPT2-T–CsPT7-T, HIPT1L-T ve HIPT2-T) [83,84] ve sonrasında her bir GOT adayını yCAN10 suşuna aktararak bu suşlar (yCAN12–yCAN20) 1mM olivetolik

asit içerisinde kültürlenmiştir [27]. Bu dokuz suş arasından tespit edilebilir miktarda CBGA (136 mg L) üreten yani CsPT4-T'yi eksprese eden suşun yCAN14 olduğu belirlenmiştir [27]. CsPT4-T'nin sekiz transmembran sarmalına [85] sahip olup, maya içinde heterolog olarak eksprese edildiğinde saflaştırılmış mikrozomal fraksiyonda lokalize olduğu belirlenmiştir. Özetle ilgili çalışmada, basit şeker galaktozdan CBGA, Δ^9 -THCA, CBDA, Δ^9 -tetrahidrokannabivarinik asit ve kannabidivarinik asit gibi önemli kenevir metabolitlerinin tam biyosentezini gerçekleştirebilen *S. cerevisiae* suşları geliştirilmiştir [27].

Her ne kadar CBD dahil kannabinoidlerin *de novo* biyosentezi, genetik olarak değiştirilmiş maya kullanılarak başarılmış olsa da elde edilen CBD verimi ticari uygulamalar için yetersizdir. CBD'nin *de novo* biyosentez verimini sınırlayan ana faktörler arasında, GPP ve malonil koenzim A gibi öncül moleküllerin yetersiz eldesi ile substratlar (örneğin, CBGA) ve enzimleri (örneğin, CBDAS) ayıran fiziksel bariyer yer almaktadır. GPP ve malonil koenzim A öncüllerinin her ikisi de asetil koenzim A'dan türetildiği için yeterli miktarda asetil koenzim A'nın sağlanması CBD veriminin artırılmasında kritik öneme sahiptir. Substrata erişimi engelleyen fiziksel bir bariyerin varlığıyla ilişkili CBDAS'ın tamamlanmamış katalizi de düşük CBD verimi ile sonuçlanabilmektedir. CBGA esas olarak sitoplazmada lokalize iken CBDAS, çalışması için düşük pH'lı bir ortam gerektirdiğinden yalnızca vakuollerde lokalizedir.

Bu fiziksel engel nedeniyle yaşanan problemin, taşıyıcı proteinlerin eklenmesi ile aşılabileceği düşünülmüştür. Bu bağlamda yapılan başka bir çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae*'da CBD'nin *de novo* biyosentezi başarıyla gerçekleştirilmiştir. İki taşıyıcı protein kodlayan *AcrB* ve *TolC* genlerinin eklenmesi, amorfadien ve kaurene üretimini artırabileceği düşünülmüştür. Maya ATP bağlayıcı kaset (ABC) vakuolar taşıyıcıları, glisiretinik asit ve BPT1 üretimini artırabilir bu da glukozamilaz üretimini teşvik edebilir [25]. *PDR11*, rubusosidin taşınmasından sorumludur ve *PDR11*'nin yüksek oranda ifadesi rubusosidin konsantrasyonunu %129,8 artırabilir. Bu nedenle CBGA'nın sitoplazmadan vakuole taşınmasına arabuluculuk edebilecek taşıyıcıları tanımlamak, CBDA üretimini büyük ölçüde artırabilir [25]. (Bile) pigment taşıyıcı 1'in (BPT1), kannabigerolik asidin (CBGA) sitoplazmadan vakuole taşınması için en etkili taşıyıcı olduğu belirlenmiş ve CBGA ile katalitik enzimi arasındaki fiziksel engeli ortadan kaldırıldığı görülmüştür. CBGA-BPT1 kompleksi arasındaki en düşük bağ enerjisi, BPT1 ve CBGA arasındaki güçlü etkileşimi doğrulamış ve elde edilen CBD veriminin (6,92 mg/L) başlangıç suşu tarafından üretilen verimin 100 katı daha fazla olduğunu ortaya çıkartmıştır. Bu çalışma, yüksek düzeyde CBD üreten suşların yapısına dair ve CBD tedarikinin temelini oluşturacak bilgiler vermesi açısından önemlidir [25].

Farmasötik açıdan ilgili kannabinoidlerin üretimi genellikle, Δ^9 -tetrahidrokannabinol ve kannabidiol gibi ana bileşenleri üretmek için kenevir bitkilerinden ekstraksiyon ve saflaştırmaya dayanmaktadır. Bununla birlikte, *Nicotiana benthamiana* veya *S. cerevisiae* gibi organizmalardaki kannabinoidlerin heterolog biyosentezi hem ana hem de nadir kannabinoidlerin yanı sıra yeni türevlerin yüksek miktarda ve uygun maliyetle üretilmesi için geleceğin üretim platformlarına hızlı bir alternatif olarak düşünülmektedir [86].

Yapılan bir çalışmada, UbiA süper ailesinin aromatik preniltransferazları ve çalkon izomeraz benzeri (CHIL) proteinlerin genlerini tanımlamak için kenevirin meta-transkriptomik analizi yapılmıştır. CsaPT4 adı verilen bir aromatik preniltransferazın, hem *N. benthamiana* hem de *S. cerevisiae* organizmalarında CBGAS benzeri enzim

aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Ancak seçilen CsaPT çiftleri ve CsaPT4 ile kodlanan CHIL proteinlerinin birlikte ifade edilmesinin CBGAS katalitik verimliliğini etkilemediği gözlemlenmiştir. Farklı bitki UDP glikoziltransferazlardan oluşan bir taramada, *Stevia rebaudiana* SrUGT71E1 ve *Oryza sativa* OsUGT5'in olivetolik asit, kannabigerolik asit ve Δ 9-tetrahidrokannabinolik asidi glikozile ettiği bulunmuştur. Kannabinoidlerin üretimi için *N. benthamiana*'nın metabolik mühendisliği olivetolik asit ve kannabigerolik asidin hücrenel glikozilasyonunu ortaya çıkarmıştır. Aynı çalışmada, olivetolik asit glikozid ve kannabigerolik asit glikozid üretimi için *S. cerevisiae* metabolizma mühendisliği yoluyla tasarlanmıştır [86].

Yapılan en güncel çalışmada, aromatik preniltransferaz NphB'nin (*Streptomyces* sp suşu CL190'dan) kullanıldığı heterolog maya sisteminde, kannabigerolik asit ve kannabigerolün glukoz ve heksanoik asitten üretimi gösterilmiştir [31]. Bu üretimin, ERG20WW ve NphB'den oluşan bir füzyon proteini tanımlanarak önemli ölçüde artırıldığı görülmüştür. Ayrıca öncü madde olan olivetolik asidin üretimi 56 mg/L'lik hacme yükseltilmiştir [31]. Kannabinoid sentaz genlerinin dahil edilmesi, Δ 9-tetrahidrokannabinolik asit, kannabidiolik asit ve kannabikromenik asit üretimini mümkün kıldığı; burada, bir maya sisteminde kannabikromenik asidin heterolog biyosentezi ilk kez gösterildiği görülmüştür [31]. Ayrıca kannabinoid sentazlarının ürün spektrumunun maya hücrelerinin vakuollerine yerleştirildiği bulunmuş ve bu spektrumun dış ortam pH'sine yüksek derecede bağımlı olduğu tespit edilmiştir [31]. Son olarak fed-batch yaklaşımı kullanarak, sırasıyla 18,2 mg/L ve 117 mg/L olmak üzere kannabigerolik asit ve olivetolik asit hacimlerine ulaştığı gösterilmiştir [31]. Kannabinoid sentazlarının ürün spektrumu, maya hücrelerinin vakuollerinde bulunan kannabinoid sentazlarının pH'ye yüksek derecede bağımlı olduğunu göstermiştir [31]. Ayrıca sonuçlar, protein aktivitelerinin ve afinitelerinin başlıca sınırlayıcı faktörler olduğunu ve gelecekte biyokatalizörleri iyileştirmek için protein mühendisliğinin gerekliliğini vurgulamaktadır [31].

Pichia pastoris (Komagataella phaffi) ile Kannabinoid Üretimi

Çoğu ülkede *C. sativa* bitkisinin yetiştirilmesine yönelik yasal düzenlemeler, THC'nin düşük verimli veya pahalı, kiral öncüllerle kimyasal sentezinin dezavantajlarıyla sınırlanmaktadır. Bu nedenle THC'nin öncüsü olan Δ 9-tetrahidrokannabinolik asidin (THCA) bitki biyosentez yolağındaki genlerinin, mikrobiyal üretim sistemlerine aktarılmasını sağlayan biyoteknolojik bir yaklaşım, uygun bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır [87]. *Cannabis sativa*'dan elde edilen Δ 9-tetrahidrokannabinolik asit sentaz (THCAS) geni, Δ 9-tetrahidrokannabinolik asidin (THCA) biyoteknolojik üretiminin potansiyelini araştırmak için farklı organizmalarda hücre içinde eksprese edilmiştir. THCAS'ın fonksiyonel ekspresyonu, *S. cerevisiae* ve *P. pastoris*'te vakuolar proteaz olan, proteinaz A sinyali peptidi kullanılarak elde edilmiştir [87].

Δ 9-tetrahidrokannabinolik asit sentaz (THCAS) enzimi, THCA biyosentezinin son adımını kataliz eden, kannabigerolik asidin (CBGA) oksidatif siklizasyonunu gerçekleştirir ve bu enzim, rekombinant tütün saçak köklerinde, böcek hücre kültürlerinde ve salgılayıcı *Pichia pastoris* kültürlerinde düşük miktarlarda ifade edilmiştir [88]. *Cannabis sativa L.*'den gelen THCA sentaz geninin ekspresyonu hem prokaryotik hem de

ökaryotik ekspresyon sistemleri kullanılarak incelenmiştir. Fonksiyonel ekspresyon *E. coli*'de başarısız olmuş ancak en yüksek enzim aktivitesi *P. pastoris* kültürlerinde elde edilmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında, hacimsel THCAS aktivitesinin önceki raporlarla [88] karşılaştırıldığında %6350 arttığı gözlemlenmiştir. Biyoteknolojik THCA üretiminde karşılaşılan çözünürlük sorunları, *P. pastoris*'in izole enzimlerinin değil de tam hücre biyodönüşüm (whole-cell biotransformation) yöntemi kullanılmasıyla aşılabildiği öngörülmüştür. Bu yöntem sayesinde, 1 mM THCA üretilmiştir ki bu da farmasötik THC üretimi için gelecekte umut verici alternatif bir yöntem olarak düşünülmektedir [87].

Zirpel ve arkadaşlarının son yaptığı çalışmada *Pichia pastoris*'in, heterolog ifadesi için iyi bir konakçı olduğu ancak THCAS protein katlanması aşamalarında bazı sorunlar oluşturduğu bulunmuştur [36]. Bu katlanma sorunlarının, yardımcı protein genlerinin ko-ekspresyonu ile aşılabileceği ise kanıtlanmıştır [36]. Yapılan çalışmada glikoproteinle ilişkili şaperon CNE1p, şaperon Kar2p, foldaz ve protein disülfid izomeri PDI1p, UPR transkripsiyonel aktivatörü Hac1p, FAD sentetaz FAD1p'in birlikte üretimini, THCAS aktivite seviyelerini *Pichia pastoris* hücrelerinde arttırdığı belirlenmiştir. Bu şekilde optimize edilen koşullarda, CBGA'nın biyodönüşümü ile 8 saat içerisinde 3,05 g/L THCA üretildiği belirlenmiştir [36].

***Yarrowia lipolytica* ile kannabinoid üretimi**

Yarrowia lipolytica, uzun bir endüstriyel kullanım geçmişine sahip olan bir *Saccharomycetous* mayadır. Heterolog protein üretme yeteneği sayesinde son yıllarda ilgi çekmektedir. Geliştirilen bir dizi moleküler ve genetik araçlar sayesinde *Y. lipolytica* günümüzde heterolog genlerin ekspresyonu ve ilgili proteinlerin salgılanması için önemli bir sistem olarak karşımıza çıkmaktadır [74]. İlk olarak *Y. lipolytica* biyokütle üretimi (tek hücreli protein: SCP) veya değerli metabolitlerin (örneğin sitrik asit) üretimi amacıyla yabani tip veya geleneksel olarak geliştirilmiş suşların kullanımı öne çıkmıştır [74]. Ayrıca, *Y. lipolytica* lipid biriktirme kapasitesi ile dikkat çeken bir mayadır. Kuru hücre ağırlığının %40'ına kadar lipid biriktirebilir ve yağ asitlerinin %50'sinden fazlası linoleik asit içerir. Bu özellikler, lipid depolama kapasitesini daha da iyileştirmek için temel araştırma konusu olmuştur. INRA'da türetilen bir "oglandüler" suş, kuru hücre ağırlığının %75'ine kadar lipid biriktirme yeteneğine sahiptir ve başka bir suş (UT Austin'de türetilen Po1f) %90'a kadar lipid biriktirebilir [74]. Bu sebeple *Y. lipolytica*'da yenilenebilir kaynaklardan biyoyakıt veya yüksek değerli ürünler üretimi için mühendislik çalışmaları çok hızlı bir şekilde ilerlemektedir. DNA düzenlemesi ve genom düzenleme teknolojilerinin *Y. lipolytica*'da yapılan çalışmalara eklenmesi, karmaşık sentetik yolların hızlı kombinasyonel düzenlemesine olanak sağlayarak bu alanda ilerlemelere ivme kazandıracaktır [74]. 2022'de yapılan çalışmada *Y. lipolytica*'da olivetolik asit (OLA) kannabinoid öncüsünün üretimini arttırmak için genetik mühendislik çalışmaları yapılmıştır [33]. Bunun için OA üretimindeki sınırlayıcı basamaklar belirlenip iyileştirilerek süreç daha verimli hale getirilmiştir [33]. *Pseudomonas* türü bir bakteriden elde edilen bir enzim olan LvaE'nin, hekzanoik asidi hekzanoyl-CoA'ya verimli bir şekilde dönüştürebildiği bulunmuştur [33]. Asetil-CoA karboksilazın, piruvat dehidrojenaz alternatif yolağının, NADPH üreten malik enzimin birlikte ekspresyonu, ayrıca peroksizomal β -oksidasyon yolağının ve ATP iletim yolağının aktivasyonu, karbon akışını OA sentezine yönlendirmek için etkili stratejiler olduğu gösterilmiştir [33]. Bu

stratejilerin uygulanmasıyla, OA üretimi 83 kat artarak çalkalamalı flask kültürlerinde 9,18 mg/L'ye ulaşmıştır [33].

Dictyostelium discoideum ile kannabinoid üretimi

Amip *Dictyostelium discoideum*, son zamanlarda yeni doğal ürünlerin keşfi ve fitokimyasallar gibi biyoaktif bileşiklerin üretimi için kullanılan en güncel konakçılardan biridir [89]. Mantar ve bitkilere ek olarak amipler (*D. discoideum*), terpen sentaz genlerini eksprese edebilen az sayıda ökaryot arasında yer alır ve bu da ilgili konakçıda aktif bir geranil pirofosfat üreten yolun varlığını düşündürmektedir [90,91]. *D. discoideum* ayrıca birçoğunun enzimatik ürünleri henüz tanımlanmamış 45'e kadar potansiyel PKS (poliketid sentaz) genine sahiptir [89].

Yapılan bir çalışmada terapötik açıdan değerli kannabinoidlerin temel ara maddesi olan olivetolik asit (OA) üreten bir amip/bitki arası bir hibrit enzim tasarlandığı bilinmektedir [92]. Aromatik poliketidlerin üretimi için avantajlı bir konak olarak seçilen *D. discoideum*, doğal ve aynı kökenli bitki poliketid sentaz genlerini eksprese ederek kannabinoidlerin biyosentezinde merkezi ara madde olan florokaprofenon, metil-olivetol, resveratrol ve olivetolik asit üretiminde başarılı olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir [93]. Reimer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *D. discoideum* konakçı sistemini kullanarak sentetik kannabinoid yolunda bir kısayol sağlandığı ve iki enzimatik adımda birincil metabolitlerden OA üreten bir amip/bitki arası hibrit enzimini, OA sentezini kolaylaştırmak için tasarlandığı görülmektedir[93].

Başka bir çalışmada Kufs ve arkadaşları tarafından tasarlanan hibrit enzimin kannabinoidlerin üretimi için yeni bir biyosentetik yaklaşım sunduğu öngörülmektedir. Tasarlanmış amip, heksanoil-CoA parçasını herhangi bir yolak optimizasyonu veya öncül madde takviyesi olmadan zaten sağlamaktadır [89]. Ancak kannabinoid biyosentetik yolağından uyarlanan enzimlerin fonksiyonel ifadesi, örneğin aromatik preniltransferaz ve siklizan oksidoredüktazlar, amipler tarafından sağlanan ancak prokaryotik konakçılarda uygulanması zor olan translasyon sonrası modifikasyonları ve membran lokalizasyonunu gerektirmektedir [18,89]. Tasarlanan *D. discoideum* suşu tarafından üretilen OA konsantrasyonları, litre başına miligram aralığının çok altında olsa da doğal poliketidlerin konsantrasyonları bu aralığa ulaşabilmektedir, bu da bu konakçının heterolog üretim potansiyelini ve daha ileri optimizasyonlarla poliketid biyosentezinin artırılabilirliğini göstermektedir [89,93]. Dahası amip temelli biyoproseslerde, güvenilir bir yüksek ölçekli üretim stratejisinin geliştirilmesinde kannabinoid öncüsü olivetolik asit üretiminin değerlendirildiği çalışmada *D. discoideum* için tolere edilebilir maksimum hidromekanik stres seviyesini belirleyerek hücre parçalanmasından (cell shearing) kaynaklanan herhangi bir verim azalması olmadan ilgili proses çalkalamalı şişelerden 300 L karıştırmalı tank reaktörüne ölçeklendirilebilmiştir [89]. Bu bağlamda kimyasal sentez veya bitkilerden fitokimyasalların ekstraksiyonuna alternatif olarak amip bazlı üretim proseslerin ölçeklenebilirliğini ve biyoteknolojik kullanımı gösteren bu çalışma umut vadetmektedir.

Mikroalglerde üretim

Günümüzde mikroalgler, sağlık gıda takviyelerinde (nutrasötik), farmasötikte, kozmetikte, su ürünleri yetiştiriciliğindeki yemlerde, tarımda ve başka birçok uygulamada kullanılmaktadır. *Dunaliella salina*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* ve *Phaeodactylum* sp. gibi tam genom dizisi çıkarılmış mikroalgler, heterolog ürünlerin sentezinde ve biriktirilmesinde genetik modifikasyon için benzersiz özelliklere sahiptirler [94]. Şu ana kadar rekombinant mikroalglerde kannabinoidlerin veya öncüllerinin tam biyosentezi ve büyük ölçekli biyoreaktörlerde ekonomik üretimi kolaylaştırmak için nasıl bir endüstriyel sürecin tasarlanması gerektiği ile ilgili bir çalışma yayınlanmamıştır [94]. Ancak oleojenik mikroalgler, hücrelerinde toplam biyokütlelerinin %20'sine kadar yüksek miktarda yağ asidi biriktirebildikleri ve kannabinoid biyosentez yolağı yağ asitleri ile başladığı için, bu durum onları kannabinoid mühendisliği için çok iyi aday yapmaktadır [95]. Oleojenik mikroalglere *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp., *Phaeodactylum tricorutum*, *Tetraselmis* sp. örnek olarak verilebilir. İlk olarak yağ asidi hekzanoik asit, bir açıl aktivasyon enzimi tarafından CoA formuna dönüştürülür [23]. Ardından β -oksidasyon yoluyla yağ asitlerinin parçalanması ile CoA, asetil-CoA'ya asetillenir ve ardından mevalonat yolağına [96] girer.

Buradaki amaç, doğal mevalonat yolağını, mikroalglerin hücre sitozolünde majör kannabinoidlerin sentezi için ana öncü molekül olan geranil pirofosfatın yüksek akışını sağlayacak şekilde değiştirmektir. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda hücrelere toksik olduğundan [97] bu da sentez sırasında önemli bir zorluğa sebep olmaktadır. Ototoksisiteyi önlemek için bu ara ürünlerin işlevsel etkileşimi bir seçim parametresidir. Bu nedenle GPP'nin THC ve CBD'lerin ana monotermen öncülü olan kannabigerolik asite (CBGA) dönüştürülmesi için mikroalg genomuna geraniltransferaz enzimini eksprese eden genlerin aktarımı önerilmektedir. CBD sentezindeki diğer 2 anahtar enzim, THCAS ve CBDAS da genom düzenleme yöntemleri ile bu yolağı dahil edilmelidir. Alg hücrelerinde büyüme koşulları enzim üretimi ve aktivasyonunu doğrudan etkilediği için besiyeri içeriği, büyüme sıcaklığı, ışık şiddeti ve oksijen/karbondioksit parametrelerinin optimize edilmesi önemlidir.

Metabolizma Mühendisliği Stratejilerinin Endüstriyel Kenevir Üretiminde Kullanılması

Genomik, transkriptomik ve metabolomik çalışmalarla kenevirin ikincil metabolitlerinin sentetik yolaklarının açığa çıkarılmasına ve kenevir temelli tıbbi ürünlere olan talebin artmasına rağmen, kannabinoid yolak genlerinin, enzimlerin ve metabolit regülasyonunun metabolik mühendisliği üzerine yapılan çalışma sayısı azdır [98, 99]. Özellikle kenevirin başarılı bir şekilde metabolik mühendisliğinin yapılması için, transgenik ve transient gen aktarım sistemleri üzerine durulmaktadır [99]. Bunlarla birlikte CRISPR/Cas sistemleri gibi yeni sentetik biyolojik araçlar kenevirdeki THC gibi psikoaktif molekülleri saf dışı bırakarak istenen lif keneviri fitokimyasallarının eldesini arttırırken aynı zamanda çevre dostu bir metabolik mühendislik sunmaktadır [99].

SONUÇ

Bitki transformasyon protokollerinin geliştirilememesi, bitkilerde gen düzenleme çalışmalarının önündeki en büyük engellerden biridir. Kenevir, genom düzenlemeleri ve genetik transformasyon tekniklerinin uygulanması açısından kompleks ve zor bir tür olarak bilinmektedir [100]. Ancak yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, *Cannabis sativa*'nın doku kültürü yöntemi, gen düzenlemeleri ve mikrobiyal üretimi ile protokollerin geliştirilmeye başlandığı ve bu yolla kenevirin klonal üretimi ve değerli metabolitlerinin üretiminde endüstriyel talebi karşılayamasa da ilerleme kaydedildiği görülmektedir [100].

Bugüne kadar kenevir üretiminin genetik mühendislik yoluyla iyileştirilmesi, düşük çimlenme ve köklenme verimliliği nedeniyle sınırlı kalmıştır. Ancak yeni biyoteknolojik uygulamalar ile bu engellerin aşılması beklenmektedir. Son zamanlarda somatik embriyogenezin uyarılması için morfojenik düzenleyici (MR) genlerinin ekspresyonu kullanılmaktadır.

Kenevir genomuna gen transferi, saçak köklerin oluşturulması gibi sınırlayıcı bir yöntem olmasa da transforme edilen bu hücrelerden canlı bitkilerin oluşumu için bitki hücre gelişiminin kapsamlı bir şekilde yeniden programlanmasını gerektiren bir prosedüre ihtiyaç duyulmaktadır. Uygun yüzey aktif maddeler ve antioksidan reaktifler kullanılarak kenevir eksplantlarının vakum infiltrasyonu yoluyla *Agrobacterium* ile enfeksiyonu günümüzde başarı ile uygulanmaktadır [101]. Morfojenik düzenleyici genlerin zamansal ifadesini değiştirerek somatik embriyogenez elde edildiğinde, kenevir eksplantları yüksek oranlarda yenilenir ve katma değerli özelliklere sahip daha fazla genetik modifikasyon için kullanılabilir. Eğer yüksek düzeyde verimli somatik hücre transformasyonu elde edilebilirse bu teknolojik ilerlemeler aynı zamanda gelişmiş kenevir fenotiplerinin hızlı bir şekilde üretilmesi için de kullanılabilir. Benzer teknolojiler ise şu anda sentetik tohum üretimi için de geliştirilmektedir.

İlginç bir şekilde Maher ve arkadaşları, MR'ların çeşitli dikot bitki türlerinde CRISPR/Cas sistemi ile muamele yaptığını göstermiştir [102]. Son zamanlarda kenevir biyosentez yolağı, omik yaklaşımlar kullanılarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir [103–105]. Bununla birlikte biyosentez yolağındaki çoğu gen fonksiyonunun karakterizasyonu hala araştırılmayı beklemektedir. Moleküler biyoloji araçlarının geliştirilmesi ve kenevir transformasyon protokolünün oluşturulması, yalnızca fitokimyasal kalitesi ve/veya miktarı açısından iyileştirilmiş yeni kenevir çeşitlerini elde etmekle kalmayacak, aynı zamanda kenevir biyokimyasal üretim platformunun farmakolojik potansiyelini genişletmek için, temsili kannabinoid sentez genlerinin yanı sıra, diğer küçük kannabinoid ve terpen sentezi genlerinin de ayrıntılı bir şekilde araştırılmasına olanak verecektir.

Kenevir, CRISPR/Cas9 aracılı gen düzenleme gibi yeni bitki ıslah teknolojileri gibi tekniklerin uygulanması için ideal bir adaydır. Bu bağlamda yapılacak çalışmalarda odaklanılması gereken en açık hedef, THCA sentaz geni olarak görünmektedir. Bu genin işlevi baskılanarak THC üretiminin olmadığı, aksine alternatif kannabinoidlerin artmış üretiminin sağlandığı kenevir germplazmalarının geliştirilmesi sağlanabilir. Ancak kenevirde yeni ıslah tekniklerinin kullanımı, doku kültürüne dirençli doğası nedeniyle genetik olarak değiştirilecek yeni hatların doku kültürü yoluyla yeniden üretilmesini

önlenebilir [106]. Bitki rejenerasyonunda yaşanan ilerlemelerle, kenevir bitkisinde görülen bu kısıtlı yaklaşımların azalması sağlanabilir [107,108].

Bitki doku kültürü teknolojisi, endüstriyel kenevir kültüründe somatik embriyogenezin indüklenmesi için bir protokol geliştirme amacıyla kullanılabilir [51]. Somatik embriyogenez, normal bitki embriyolarının, bitki üzerinde genetik değişiklik yapmadan yeniden oluşturulabileceği bir yöntemdir [109]. Somatik embriyogenezin başarısında veya başarısızlığında etkili olan farklı faktörler; kullanılan kültür ortamının türü, büyüme düzenleyicilerinin türü ve miktarı, bitki eksplantının kaynağı ve büyüme koşullarıdır [110]. Morfojenik düzenleyici genlerinin aktivasyonu, hem monokot türlerde [111,112] hem de dikot türlerde [113] rejenerasyon oranını artırmıştır. Kenevirin MR genlerindeki gen ifadesinin değiştirilmesi, somatik embriyogenezini arttıracak, yenilenmiş ve dönüştürülmüş kenevir bitkilerinin elde edilmesini kolaylaştırıp ticarileşme için sentetik tohum teknolojisinin geliştirilmesine de olanak tanıyacaktır [99].

REFERANSLAR

- [1] Sawler, J., Stout, J.M., Gardner, K.M., Hudson, D., Vidmar, J., Butler, L. (2015): The genetic structure of marijuana and hemp. PLoS One, 10(8): e0133292.
- [2] Lynch, R.C., Vergara, D., Tittes, S., White, K., Schwartz, C.J., Gibbs, M.J., Travis C. Ruthenburg, T.C., deCesare K., Land, D.P., Kane, N.C. (2016): Genomic and Chemical Diversity in *Cannabis*. CRC Crit Rev Plant Sci 35:349–63.
- [3] Dufresnes, C., Jan, C., Bienert, F., Goudet, J., Fumagalli, L. (2017): Broad-scale genetic diversity of *cannabis* for forensic applications. PLoS One, 12.
- [4] Soler, S., Gramazio, P., Figàs, M.R., Vilanova, S., Rosa, E., Llosa, E.R., Borrás, D., Plazas, M., Prohens, J. (2017): Genetic structure of *Cannabis sativa* var. *indica* cultivars based on genomic SSR (gSSR) markers: Implications for breeding and germplasm management. Ind Crops Prod, 104:171–8.
- [5] Zirpel, B. (2018): Recombinant Expression and Functional Characterization of Cannabinoid Producing Enzymes in *Komagataella phaffii* Zur Erlangung des akademischen Grades eines. n.d.
- [6] de Meijer, E.P.M., Vanderkamp, H.J., Vaneeuwijk, F.A. (1992) : Characterisation of *Cannabis* accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters
- [7] Vergara, D., Bidwell, L.C., Gaudino, R., Torres, A., Du, G., Ruthenburg, T.C., deCesare, K., Land, D.P., Hutchison, K.E., Kane, N.C. (2017): Compromised External Validity: Federally Produced *Cannabis* Does Not Reflect Legal Markets. Sci Rep, 7.
- [8] Jikomes, N., Zoorob, M. (2018): The Cannabinoid Content of Legal *Cannabis* in Washington State Varies Systematically Across Testing Facilities and Popular Consumer Products. Sci Rep, 8.
- [9] Hazekamp, A., Fishedick, J.T. (2012): *Cannabis* - from cultivar to chemovar. Drug Test Anal, 4:660–7.
- [10] McPartland, J.M. (2018): *Cannabis* Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. Cannabis Cannabinoid Res, 3:203–12.
- [11] Schwabe, A.L., McGlaughlin, M.E. (2019): Genetic tools weed out misconceptions of strain reliability in *Cannabis sativa*: Implications for a budding industry. J Cannabis Res, 1.

- [12] Pennypacker, S.D., Cunnane, K., Cash, M.C., Romero-Sandoval, E.A. (2022) Potency and Therapeutic THC and CBD Ratios: U.S. *Cannabis* Markets Overshoot. *Front Pharmacol*, 13.
- [13] Gertsch, J., Pertwee, R.G., Di Marzo, V. (2010): Phytocannabinoids beyond the *Cannabis* plant- Do they exist? *Br J Pharmacol*, 160:523–9.
- [14] ElSohly, M.A., Mehmedic, Z., Foster, S., Gon, C., Chandra, S., Church, J.C. (2016): Changes in *cannabis* potency over the last 2 decades (1995-2014): Analysis of current data in the United States. *Biol Psychiatry*, 79:613–9.
- [15] Turner, S.E., Williams, C.M., Iversen, L., Whalley, B.J. (2017): *Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids*
- [16] Crombie, L., Ponsford, R., Shani, A., Yagnitinsky, B., Mechoulam, R. (1968): Hashish components. Photochemical production of cannabicyclol from cannabichromene.
- [17] Preedy, V.R. *Handbook of cannabis and related pathologies : biology, pharmacology, diagnosis, and treatment.* n.d.
- [18] Carvalho, Â., Hansen, E.H., Kayser, O., Carlsen, S., Stehle, F. (2017): Designing microorganisms for heterologous biosynthesis of cannabinoids. *FEMS Yeast Res*, 17.
- [19] Livingston, S.J., Quilichini, T.D., Booth, J.K., Wong, D.C.J., Rensing, K.H., Laflamme-Yonkman, J., Castellarin, S.D., Bohlmann, J., Page, J.E., Samuels, A.E. (2020): *Cannabis* glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation. *Plant Journal*, 101:37–56.
- [20] Hammond, C.T., Mahlberg, P.G. (1978): *Ultrastructural Development of Capitulate Glandular Hairs of Cannabis Sativa L. (Cannabaceae).* vol. 65.
- [21] Geissler, M., Volk, J., Stehle, F., Kayser, O., Warzecha, H. (2018): Subcellular localization defines modification and production of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase in transiently transformed *Nicotiana benthamiana*. *Biotechnol Lett*, 40:981–7.
- [22] Rodziewicz, P., Lorocho, S., Marczak, Ł., Sickmann, A., Kayser, O. (2019): Cannabinoid synthases and osmoprotective metabolites accumulate in the exudates of *Cannabis sativa* L. glandular trichomes. *Plant Science*, 284:108–16.
- [23] Stout, J.M., Boubakir, Z., Ambrose, S.J., Purves, R.W., Page, J.E. (2012): The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in *Cannabis sativa* trichomes. *Plant Journal*, 71:353–65.
- [24] Gagne, S.J., Stout, J.M., Liu, E., Boubakir, Z., Clark, S.M., Page, J.E. (2012): Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109:12811–6.
- [25] Qiu, J., Hou, K., Li, Q., Chen, J., Li, X., Hou, H., Wang, L., Liu, J., Xue, Q., Wang, C. (2022): Boosting the Cannabidiol Production in Engineered *Saccharomyces cerevisiae* by Harnessing the Vacuolar Transporter BPT1. *J Agric Food Chem*, 70:12055–64.
- [26] Arif, Y., Singh, P., Bajguz, A., Hayat, S. (2021): Phytocannabinoids biosynthesis in angiosperms, fungi, and liverworts and their versatile role. *Plants*, 10.
- [27] Luo, X., Reiter, M.A., d’Espaux, L., Wong, J., Denby, C.M., Lechner, A., Zhang, Y., Grzybowski, A.T., Hart, S., Lin, W., Lee, H., Yu, C., Shin, J., Deng, K., Benites, V.T., Wang, G., Baidoo, E.E.K., Chen, Y., Dev, I., Petzold, C.J., Keasling, J.D. (2019): Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature* 567:123–6.
- [28] Gülck, T., Møller, B.L. (2020): Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends Plant Sci*, 25:985–1004.
- [29] Kosalková, K., Barreiro, C., Sánchez-Orejas, I.C., Cueto, L., García-Estrada, C. (2023): Biotechnological Fungal Platforms for the Production of Biosynthetic Cannabinoids. *Journal of Fungi*, 9.

- [30] Adhikary, D., Kulkarni, M., El-Mezawy, A., Mobini, S., Elhiti, M., Gjuric, R., Ray, A., Polowick, P., Slaski, J.J., Jones, M.P., Bhowmik, P. (2021): Medical *Cannabis* and Industrial Hemp Tissue Culture: Present Status and Future Potential. *Front Plant Sci*, 12.
- [31] Schmidt, C., Aras, M., Kayser, O. (2024): Engineering cannabinoid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J*, 19.
- [32] Ferreira, C., Couceiro, J., Família, C., Jardim, C., Antas, P., Santos, C.N., Outeiro, T.F., Tenreiro, S., Quintas, A. (2019): The synthetic cannabinoid JWH-018 modulates *Saccharomyces cerevisiae* energetic metabolism. *FEMS Yeast Res*, 19.
- [33] Ma, J., Gu, Y., Xu, P. (2022): Biosynthesis of cannabinoid precursor olivetolic acid in genetically engineered *Yarrowia lipolytica*. *Commun Biol*, 5.
- [34] Madzak, C. (2015): *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99:4559–77.
- [35] Zirpel, B. (2018): Recombinant expression and functional characterization of cannabinoid producing enzymes in *Komagataella phaffii*. Dissertation, Dortmund, Technische Universität.
- [36] Zirpeli B, Degenhardt, F., Zammarelli, C., Wibberg, D., Kalinowski, J., Stehle, F., Kayser, O. (2018): Optimization of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase production in *Komagataella phaffii* via post-translational bottleneck identification. *J Biotechnol*, 272–273:40–7.
- [37] Espinosa-Leal, C.A., Puente-Garza, C.A., García-Lara, S. (2018): In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248.
- [38] Petri, G. *Cannabis sativa*: In Vitro Production of Cannabinoids. n.d.
- [39] Loh, W.H.T., Hartsel, S.C., Robertson, L.W. (1983): Tissue Culture of *Cannabis sativa L.* and in vitro Biotransformation of Phenolics.
- [40] Chaohua, C., Gonggu, Z., Lining, Z., Chunsheng, G., Qing, T., Jianhua, C., Xinbo, G., Dingxiang, P., Jianguang, S. (2016): A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa L.*). *Ind Crops Prod*, 83:61–5.
- [41] Bekheet, S.A. (2017): Encapsulation of date palm somatic embryos: synthetic seeds. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1638, Humana Press Inc., p. 71–8.
- [42] Zarei, A., Feyissa, B.A., Davis, B., Tavakouli Dinani, E. (2022): *Cannabis* Synthetic Seeds: An Alternative Approach for Commercial Scale of Clonal Propagation and Germplasm Conservation. *Plants*, 11.
- [43] Lei, R., Qiao, W., Hu, F., Jiang, H., Zhu, S. (2015): A simple and effective method to encapsulate tobacco mesophyll protoplasts to maintain cell viability. *MethodsX*, 2:24–32.
- [44] Beard, K.M., Boling, A.W.H., Bargmann, B.O.R. (2021): Protoplast isolation, transient transformation, and flow-cytometric analysis of reporter-gene activation in *Cannabis sativa L.* *Ind Crops Prod*, 164.
- [45] Matchett-Oates, L., Mohamaden, E., Spangenberg, G.C., Cogan, N.O.I. (2021): Development of a robust transient expression screening system in protoplasts of *Cannabis*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 57:1040–50.
- [46] Pistelli, L., Giardi, M.T., Rea, G., Berra, B., Giovannini, A., Ruffoni, B. (2010): Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors edited by Hairy Root Cultures for Secondary Metabolites Production.
- [47] Wahby, I., Caba, J.M., Ligeró, F. (2013): Agrobacterium infection of hemp (*Cannabis sativa L.*): establishment of hairy root cultures. *J Plant Interact*, 8:312–20.
- [48] Wahby, I., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Ligeró, F., Caba, J.M., Fernández-Gutiérrez, A. (2006): Analysis of choline and atropine in hairy root cultures of *Cannabis sativa L.* by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Electrophoresis*, 27:2208–15.

- [49] Wahby, I., Caba, J.M., Ligerio, F. (2017): Hairy root culture as a biotechnological tool in *C. sativa*. *Cannabis Sativa L-Botany and Biotechnology*, 299–317.
- [50] Farag, S., Kayser, O. (2015): Cannabinoids Production by Hairy Root Cultures of *Cannabis sativa* L. *Am J Plant Sci*, 06:1874–84.
- [51] Feeney, M., Punja, Z.K. (2003): Tissue culture and Agrobacterium-mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 39:578–85.
- [52] Ingvarsdson, C.R., Brinch-Pedersen, H. (2023): Challenges and potentials of new breeding techniques in *Cannabis sativa*. *Front Plant Sci*, 14.
- [53] Hawkesford, M.J. (2012): Transgenic Plants. Methods and Protocols. Edited by JM Dunwell and AC Wetten. *Methods in Molecular Biology Series, Volume 847*. Heidelberg, Germany, pp. 512
- [54] Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Dskocilova, A., Komis, G., Samaj, J. (2015) Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnol Adv*, 33:1024–42.
- [55] Wanas, A.S., Radwan, M.M., Mehmedic, Z., Jacob, M., Khan, I.A., Elsohly, M.A. (2016): Supporting Information Antifungal Activity of the Volatiles of High Potency *Cannabis sativa* L. Against *Cryptococcus neoformans*. vol. 10
- [56] Sorokin, A., Yadav, N.S., Gaudet, D., Kovalchuk, I. (2020): Transient expression of the β -glucuronidase gene in *Cannabis sativa* varieties. *Plant Signal Behav*, 15.
- [57] MacKinnon, L., McDougall, G., Aziz, N., Millam, S. (2001): Progress towards transformation of fibre hemp. *Annual Report of the Scottish Crop Research Institute*, 84–6.
- [58] Adhikary, D., Khatri-Chhetri, U., Tymm, F.J.M., Murch, S.J., Deyholos, M.K. (2019): A virus-induced gene-silencing system for functional genetics in a betalainic species, *Amaranthus tricolor* (*Amaranthaceae*). *Appl Plant Sci*, 7.
- [59] Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P. (2002): Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal*, 31:777–86.
- [60] Baulcombe, DC. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. n.d.
- [61] Majumdar, R., Rajasekaran, K., Cary, J.W. (2017): RNA interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: Concepts and considerations. *Front Plant Sci*, 8.
- [62] Bisaro, D.M. (2006): Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology*, 344:158–68.
- [63] Schachtsiek, J., Hussain, T., Azzouhri, K., Kayser, O., Stehle, F. (2019): Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Cannabis sativa* L. *Plant Methods*, 15.
- [64] Matchett-Oates, L., Spangenberg, G.C., Cogan, N.O.I. (2021): Manipulation of Cannabinoid Biosynthesis via Transient RNAi Expression. *Front Plant Sci*, 12.
- [65] Demirer, G.S., Zhang, H., Matos, J.L., Goh, N.S., Cunningham, F.J., Sung, Y., Chang, R., Aditham, A.J., Chio, L., Cho, M., Staskawicz, B., Landry, M.P. (2019): High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants. *Nat Nanotechnol*, 14:456–64.
- [66] Mitter, N., Worrall, E.A., Robinson, K.E., Li, P., Jain, R.G., Taochy, C., Fletcher, S.J., Carroll, B.J., Lu, G.Q., Xu, Z.P. (2017): Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat Plants*, 3.
- [67] Ahmed, S., Gao, X., Jahan, M.A., Adams, M., Wu, N., Kovicich, N. (2021): Nanoparticle-based genetic transformation of *Cannabis sativa*. *J Biotechnol*, 326:48–51.
- [68] Russo, E.B. (2011): Taming THC: potential *cannabis* synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol*, 163:1344–64.

- [69] Karas, J.A., Wong, L.J.M., Paulin, O.K.A., Mazeh, A.C., Hussein, M.H., Li, J., Velkov, T. (2020): The antimicrobial activity of cannabinoids. *Antibiotics*, 9:1–10.
- [70] Ali, E.M.M., Almagboul, A.Z.I., Khogali, S.M.E., Gergeir, U.M.A. (2012): Antimicrobial Activity of *Cannabis sativa* L. *Chin Med*, 03:61–4.
- [71] Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith, E., Rahman, M.M. (2008): Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: A structure-activity study. *J Nat Prod*, 71:1427–30.
- [72] Van Klingereren, B., Ten Ham, A.M. (1976): Antibacterial activity of A9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. vol. 42.
- [73] Thapa, S.B., Pandey, R.P., Il Park, Y., Sohng, J.K. (2019): Biotechnological advances in resveratrol production and its chemical diversity. *Molecules*, 24.
- [74] Madzak, C. (2018): Engineering *Yarrowia lipolytica* for Use in Biotechnological Applications: A Review of Major Achievements and Recent Innovations. *Mol Biotechnol*, 60:621–35.
- [75] Liu, C., Gong, J.S., Su, C., Li, H., Li, H., Rao, Z.M., Xu, Z.H., Shi, J.S. (2022): Pathway engineering facilitates efficient protein expression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 106:5893–912.
- [76] Clevenger, K.D., Bok, J.W., Ye, R., Miley, G.P., Verdan, M.H., Velk, T., Chen, C., Yang, K., Robey, M.T., Gao, P., Lamprecht, M., Thomas, P.M., Islam, N., Palmer, J.M., Wu, C.C., Keller, N.P., Kelleher, N.L. (2017): A scalable platform to identify fungal secondary metabolites and their gene clusters. *Nat Chem Biol*, 13:895–901.
- [77] Guzmán-Chávez, F., Zwahlen, R.D., Bovenberg, R.A.L., Driessen, A.J.M. (2018): Engineering of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* cell factory for natural products. *Front Microbiol*, 9.
- [78] Arnau, J., Yaver, D., Hjort, C.M. (2020): Strategies and Challenges for the Development of Industrial Enzymes Using Fungal Cell Factories. *Grand Challenges in Biology and Biotechnology*, Springer Science and Business Media B.V.; p. 179–210.
- [79] Taura, F., Tanaka, S., Taguchi, C., Fukamizu, T., Tanaka, H., Shoyama, Y., Morimoto, S. (2009): Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. *FEBS Lett*, 583:2061–6.
- [80] Dekishima, Y., Lan, E.I., Shen, C.R., Cho, K.M., Liao, J.C. (2011): Extending carbon chain length of 1-butanol pathway for 1-hexanol synthesis from glucose by engineered *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc*, 133:11399–401.
- [81] Ignea, C., Pontini, M., Maffei, M.E., Makris, A.M., Kampranis, S.C. (2014): Engineering monoterpene production in yeast using a synthetic dominant negative geranyl diphosphate synthase. *ACS Synth Biol*, 3:298–306
- [82] Apel, A.R., D’Espaux, L., Wehrs, M., Sachs, D., Li, R.A., Tong, G.J., Garber, M., Nnadi, O., Zhuang, W., Hillson, N.J., Keasling, J.D., Mukhopadhyay, A. (2017): A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 45:496–508.
- [83] Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2007): Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc*, 2:953–71.
- [84] Emanuelsson, O., Nielsen, H., Von Heijne, G. (1999): ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites.
- [85] Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.L. (2001): Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305:567–80.
- [86] Gülck, T., Booth, J.K., Carvalho, A., Khakimov, B., Crocoll, C., Motawia, M.S., Moller, B.L., Bohlman, J., Gallage, N.J. (2020): Synthetic Biology of Cannabinoids and

- Cannabinoid Glucosides in *Nicotiana benthamiana* and *Saccharomyces cerevisiae*. J Nat Prod, 83:2877–93.
- [87] Zirpel, B., Stehle, F., Kayser, O. (2015): Production of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid from cannabigerolic acid by whole cells of *Pichia (Komagataella) pastoris* expressing Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. Biotechnol Lett, 37:1869–75.
- [88] Taura, F., Dono, E., Sirikantaramas, S., Yoshimura, K., Shoyama, Y., Morimoto, S. (2007): Production of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid by the biosynthetic enzyme secreted from transgenic *Pichia pastoris*. Biochem Biophys Res Commun, 361:675–80.
- [89] Kufs, J.E., Reimer, C., Steyer, E., Valiante, V., Hillmann, F., Regestein, L. (2022): Scale-up of an amoeba-based process for the production of the cannabinoid precursor olivetolic acid. Microb Cell Fact, 21.
- [90] Chen, X., Köllner, T.G., Jia, Q., Norris, A., Santhanam, B., Rabe, P., Dickschat, J.S., Shaulsky, G., Gershenzon, J., Chen, F. (2016): Terpene synthase genes in eukaryotes beyond plants and fungi: Occurrence in social amoebae. Proc Natl Acad Sci U S A, 113:12132–7.
- [91] Barnett, R., Stallforth, P. (2018): Natural Products from Social Amoebae. Chemistry - A European Journal, 24:4202–14.
- [92] Reimer, C., Kufs, J.E., Rautschek, J., Regestein, L., Valiante, V., Hillmann, F. (2022): Engineering the amoeba *Dictyostelium discoideum* for biosynthesis of a cannabinoid precursor and other polyketides. Nat Biotechnol, 40:751–8.
- [93] Reimer, C., Herbst, R., Kufs, J.E., Rautschek, J., Ueberschaar, N., Zhang, S., Peschel, G., Reimer, L., Regestein, L., Valiante, V., Hillman, F., Stallforth, P. (2022): Yellow polyketide pigment suppresses premature hatching in social amoeba.
- [94] Abu-Ghosh, S., Dubinsky, Z., Verdelho, V., Iluz, D. (2021): Unconventional high-value products from microalgae: A review. Bioresour Technol, 329.
- [95] Thomas, F., Schmidt, C., Kayser, O. (2020): Bioengineering studies and pathway modeling of the heterologous biosynthesis of tetrahydrocannabinolic acid in yeast.
- [96] Shi, L., Tu, B.P. (2015): Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: Mechanisms and consequences. Curr Opin Cell Biol, 33:125–31.
- [97] Sarria, S., Wong, B., Martín, H.G., Keasling, J.D., Peralta-Yahya, P. (2014): Microbial synthesis of pinene. ACS Synth Biol, 3:466–75.
- [98] Bonini, S.A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., Mastinu, A. (2018): *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. J Ethnopharmacol, 227:300–15.
- [99] Deguchi, M., Kane, S., Potlakayala, S., George, H., Proano, R., Sheri, V., Curtis, W.R., Rutrabhatla, S. (2020): Metabolic Engineering Strategies of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.): A Brief Review of the Advances and Challenges. Front Plant Sci, 11.
- [100] Ingvarsdén, C.R., Brinch-Pedersen, H. (2023): Challenges and potentials of new breeding techniques in *Cannabis sativa*. Front Plant Sci, 14.
- [101] Deguchi, M., Bogush, D., Weeden, H., Spuhler, Z., Potlakayala, S., Kondo, T., Zhang, Z.J., Rutrabhatla, S. (2020): Establishment and optimization of a hemp (*Cannabis sativa* L.) agroinfiltration system for gene expression and silencing studies. Sci Rep, 10.
- [102] Maher, M.F., Nasti, R.A., Vollbrecht, M., Starker, C.G., Clark, M.D., Voytas, D.F. (2020): Plant gene editing through de novo induction of meristems. Nat Biotechnol, 38:84–9.
- [103] Braich, S., Baillie, R.C., Jewell, L.S., Spangenberg, G.C., Cogan, N.O.I. (2019): Generation of a Comprehensive Transcriptome Atlas and Transcriptome Dynamics in Medicinal *Cannabis*. Sci Rep, 9.

- [104] Gao, S., Wang, B., Xie, S., Xu, X., Zhang, J., Pei, L., Yu, Y., Yang, W., Zhang, Y. (2020): A high-quality reference genome of wild *Cannabis sativa*. *Hortic Res*, 7.
- [105] Vincent, D., Binos, S., Rochfort, S., Spangenberg, G. (2019): Top-down proteomics of medicinal *cannabis*. *Proteomes*, 7.
- [106] Monthony, A.S., Page, S.R., Hesami, M., Jones, A.M.P. (2021): The past, present and future of *Cannabis sativa* tissue culture. *Plants*, 10:185.
- [107] Gordon-Kamm, B., Sardesai, N., Arling, M., Lowe, K., Hoerster, G., Betts, S., Jones, A.T. (2019): Using morphogenic genes to improve recovery and regeneration of transgenic plants. *Plants*, 8:38.
- [108] Debernardi, J.M., Tricoli, D.M., Ercoli, M.F., Hayta, S., Ronald, P., Palatnik, J.F., Dubcovsky, J., (2020): A GRF–GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nat Biotechnol*, 38:1274–9.
- [109] Patel, P. (2019): Inducing Somatic Embryogenesis in Industrial Hemp (*Cannabis sativa*) Tissue Callus.
- [110] Nic-Can, G.I., Galaz-Ávalos, R.M., De-la-Peña, C., Alcazar-Magaña, A., Wrobel, K., Loyola-Vargas, V.M. (2015): Somatic embryogenesis: Identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. *PLoS One*, 10.
- [111] Mookkan, M., Nelson-Vasilchik, K., Hague, J., Zhang, Z.J., Kausch, A.P. (2017): Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators BABY BOOM and WUSCHEL2. *Plant Cell Rep*, 36:1477–91.
- [112] Hoerster, G., Wang, N., Ryan, L., Wu, E., Anand, A., McBride, K., Lowe, K., Jones, T., Kamm, B.G. (2020): Use of non-integrating Zm-Wus2 vectors to enhance maize transformation: Non-integrating WUS2 enhances transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 56:265–79.
- [113] Florez, S.L., Erwin, R.L., Maximova, S.N., Gultinan, M.J., Curtis, W.R. (2015): Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor. *BMC Plant Biol*, 15.