

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI



**CRISPR/ CAS9 SİSTEMİ KULLANILARAK SOLANUM
LYCOPERSICUM'DA YAĞ ASİDİ SENTEZ YOLAĞINDA YER
ALAN GENLERİN SUSTURULMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Sibel BAHADIR

Danışman

Doç. Dr. Musa KAVAS

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.ZRT.1904.22.007 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Sibel BAHADIR tarafından, Doç. Dr. Musa KAVAS danışmanlığında hazırlanan “CRISPR/ CAS9 SİSTEMİ KULLANILARAK SOLANUM LYCOPERSICUM'DA YAĞ ASİDİ SENTEZ YOLAĞINDA YER ALAN GENLERİN SUSTURULMASI ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 10.5.2022 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Musa KAVAS Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

04 /01 / 2023
Sibel BAHADIR

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : CRISPR/ CAS9 SİSTEMİ KULLANILARAK SOLANUM LYCOPERSICUM'DA YAĞ ASİDİ SENTEZ YOLAĞINDA YER ALAN GENLERİN SUSTURULMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 04/01/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 10

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

04 /01 / 2023
Doç. Dr. Musa KAVAS

ÖZET

CRISPR/ CAS9 SİSTEMİ KULLANILARAK *SOLANUM LYCOPERSICUM*’DA YAĞ ASİDİ SENTEZ YOLAĞINDA YER ALAN GENLERİN SUSTURULMASI

Sibel BAHADIR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Şubat/2022

Danışman: Doç. Dr. Musa KAVAS

Domates (*Solanum lycopersicum*) dünya çapında en çok üretilen ve tüketilen gıda maddeleri arasında yer almaktadır. Domatesin sağlık yönünden zengin besin içeriğine sahip olması tüketicilerin ilgisini çeken bir gıda maddesi olmasını sağlamaktadır. Çeşitli genom düzenleme sistemleri kullanarak gıda maddelerinin besin içeriğinin artırılması, raf ömrünün uzatılması, biyotik/abiyotik stres faktörlerine dayanıklılığın artırılması gibi pek çok çalışma yapılmaktadır. Hem sağlık hem de ekonomik yönden önemli bir gıda maddesi olan domates dikotil bitkiler arasında genom düzenleme çalışmalarının model organizması olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada domates bitkisinde yağ asidi sentez yolağında yer alan genlerin CRISPR/Cas9 sistemi ile susturulması ve bu sayede de bu genlerin domates bitkisindeki önemini belirlemek hedeflenmiştir. *Fatty acyl-ACP thioesterase B (FATB)* ve *Palmitoyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase (Solyc12g006930 ve Solyc03g097390)* genleri yağ asidi sentezi sırasında zincir uzunluğunun belirlenmesinde ve bitkilerde iki lipid biyosentez yolu arasındaki karbon akışında önemli rol oynamaktadırlar. Hedef genlerdeki mutasyon için Cas9 ve gRNA’ları taşıyan vektör (pHSE401) *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi aracılığı ile domates bitkisine atılmıştır. Elde edilen mutant domates bitkilerinin yaprakları elektron mikroskobu ile incelendiğinde geliştirilen transgenik domatesin trikoma sayısı yabancı tipe göre azalmış olduğu görülmüştür. Elektron mikroskobunda incelenen kesitlerde yabancı tipe oranla mutant hatlarda 9.7 mm’lik bir yaprak kesitinde 300 kat büyütmede hat 6 da %62.5, hat 8 de %66.7, hat 11 de %70.8’lik bir oranında azalma kaydedilmiştir, ayrıca kütikula yapısı da incelendiğinde yabancı tipe göre kütin matrisinin üst yüzeyinde yapısal bozukluk şeklinde farklılaşma meydana geldiği gözlenmiştir. Mutant bitkiler bir domates zararlısı olan *Tuta absoluta* tarafından enfekte olmuşlar ve yabancı tip bitkilere kıyasla daha fazla hassasiyet göstermişlerdir. Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, domates bitkisinde *Fatty acyl-ACP thioesterase B (FATB)* ve *Palmitoyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase* genlerinde meydana getirilen mutasyonların verdiği çıktılara bakarak biyotik stres koşullarında bitkinin daha hassas olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu farklılıklar sayesinde söz konusu domatesin, biyotik faktörlere daha hassas hale gelmesi ve dolayısıyla biyotik strese toleranslı bitkilerin geliştirilmesinde model olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Sözcükler: CRISPR/Cas9, Domates, *FATB*

ABSTRACT

SILENCING OF GENES INVOLVED IN FATTY ACID SYNTHESIS PATHWAY IN SOLANUM LYCOPERSICUM USING CRISPR/CAS9 SYSTEM

Sibel BAHADIR

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Agricultural Biotechnology

Master, February/2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Musa KAVAS

Tomatoes (*Solanum lycopersicum*) are among the most consumed foodstuffs worldwide. Tomatoes, which have a rich content in terms of health, attract the attention of consumers. Many studies such as increasing the nutritional content of foodstuffs, extending the shelf life, increasing the resistance to biotic/abiotic stress factors are carried out by using various genome editing systems. Tomato, which is an important foodstuff both in health and economic terms, is used as a model organism for genome editing studies among dicot plants. In this study, it was aimed to silence the genes involved in the fatty acid synthesis pathway in the tomato plant with the CRISPR/Cas9 system and thus to determine the characterization of these genes in the tomato plant. *Fatty acyl-ACP thioesterase B (FATB)* and *Palmitoyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase* genes play an important role in determining the chain length during fatty acid synthesis and in carbon flow between two lipid biosynthesis pathways in plants. The vector (pHSE401) carrying Cas9 and gRNAs for the mutation in the target genes was introduced into the plant by *Agrobacterium tumefaciens*. When the leaves of the obtained mutant tomato plants were examined with electron microscopy, it was observed that the number of trichomes of the transgenic tomato developed decreased compared to the wild species. In the sections examined under the electron microscope, a decrease of 62.5% in plant 6, 66.7% in plant 8 and 70.8% in plant 11 were observed at 300 times magnification compared to wild type in the 9.7 mm leaf section of mutant plants. In addition, when the cuticle structure was also examined, it was observed that differentiation occurred on the upper surface of the cutin matrix in the form of structural disorders according to the wild type. Mutant plants were infected by *Tuta absoluta*, a tomato pest, and showed greater sensitivity compared to wild-type plants. Considering all these results, by looking at the results of mutations in the *Fatty acyl-ACP thioesterase B (FATB)* and *Palmitoyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase* genes in the tomato plant, it was concluded that the plant is more sensitive under biotic stress conditions. Thanks to these differences, the tomato in question becomes more sensitive to biotic factors and therefore it is expected that it can be used as a model for the development of biotic stress-tolerant plants.

Keywords: CRISPR/Cas9, *FATB*, Tomato

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, her zaman sevgi ile yaklaşan değerli hocam Doç. Dr. Musa KAVAS'a, her koşulda yanımda olan ve her zaman desteklerini hissettiğim canım aileme ve varlıkları ile bana mutluluk veren sevgili dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Sibel BAHADIR

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜRLER.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amacı.....	3
2. DOMATES BİTKİSİ.....	4
2.1. Domatesin Ekonomik Önemi	5
2.2. Domatesin Sağlık Açısından Önemi	6
2.3. Domates Bitkisinin Doku Kültüründe Kullanımı	7
3. GENOM DÜZENLEME TEKNİKLERİ.....	9
3.1. DNA Çift Zincir Kırıklarının Tamir Mekanizması	10
3.2. Crispr	10
3.3. Crispr/Cas9'un Kısa Tarihçesi	11
3.4. Crispr/Cas Sisteminin Genom Düzenleme Mekanizması	11
3.5. Bitkilerde Crispr/Cas Aracılı Genom Düzenleme Çalışmaları	14
3.6. Crispr/Cas Sisteminin Güncel Kullanımları	16
4. YAĞ ASİTLERİ.....	17
4.1. Bitkilerde Yağ Asidi Sentezi.....	18
4.2. <i>Acyl- Acyl Carrier Protein (ACP) Tiyoesterase</i>	20
5. MATERYAL METHOD.....	22
5.1. İn Siliko Analizler.....	22
5.1.1. <i>FATB</i> Gen Ailesinin Filogenetik Analizi, İntron Ekzon Yapısı Ve Motif Analizi	22
5.1.2. <i>FAT</i> Genlerinin Bitkilerde Hücrel Lokasyonu.....	22
5.1.3. <i>FAT</i> Genlerinin Kromozomlar Üzerindeki Lokasyonu.....	22
5.1.4. miRNA Analizi	23
5.1.5. Domateste Bulunan <i>FAT</i> GProtein Protein Etkileşimleri	23
5.2. Bitki Materyali ve Doku Kültürü Ortamı.....	23
5.3. Kullanılan Bakteri Suşları Ve Besi Ortamları.....	24
5.4. Crispr/Cas9 Bitki İfade Vektörünün (<i>Phse401</i>) Oluşturulması Ve Bitkiye Transferi	24
5.4.1. gRNA'ların Dizayn Edilmesi.....	24
5.4.2. Golden Gate Reaksiyonu	28
5.4.3. Kompetan <i>E. Coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması	31
5.4.4. Vektörün <i>DH5α</i> (<i>E. Coli</i>) Bakterisine Isı Şoku Yöntemi İle Transferi.....	31
5.4.5. Koloni PCR.....	32
5.4.6. Plazmit İzolasyonu.....	33
5.4.7. Restriksiyon Enzimi İle Kesim (<i>Hind III</i>).....	33
5.4.8. Hazırlanan Vektörün Sanger Dizileme İle Doğrulanması	33
5.5. <i>pHSE401</i> Vektörünün <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e (<i>GV3101</i>) Transformasyonu... ..	34
5.5.1. Kompetan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Bakterisinin Hazırlanması	34
5.5.2. Vektörün Elektroporasyon ile <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Bakterisine Transformasyonu	34
5.5.3. Koloni PCR.....	35
5.5.4. Domates Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu	35
5.5.5. Bitki Kotiledonlarının Hazırlanması	35
5.5.6. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Bakterisinin Transformasyona Hazırlanması.....	36
5.5.7. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> İle Domates Yapraklarının İnokülasyonu	36
5.6. Elde Edilen Bitkilerin Sera Koşullarına Alıştırılması	38

5.6.1. Hoagland Besin Solüsyonu İçeriği.....	38
5.7. T0 Aday Bitkilerin Moleküler Karakterizasyonu	39
5.7.1. Sanger Dizileme İle Mutasyon Analizi	39
5.8. Mutant Hatlarda Yapılan Analizler.....	40
5.8.1. Mutant Bitkilerin Morfolojik Karakterizasyonu	400
5.8.2. Mutant Hatların Elektron Mikroskobu İle İncelenmesi	411
6. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	422
6.1. <i>FATB</i> Genlerinin Domates Bitkisinde Tanımlanması.....	422
6.1.1. <i>FATB</i> Gen Ailesinin Flogenetik Analizi, İntron Ekzon Yapısı ve Motif Analizi	422
6.1.2. <i>FAT</i> Genlerinin Domates Bitkisindeki Hücrel Lokasyonu.....	433
6.1.3. <i>FAT</i> Genlerinin Kromozomlar Üzerindeki Lokasyonu.....	455
6.1.4. <i>Solyc03g097390</i> , <i>Solyc12g006930</i> Genlerini Hedef Alan miRNA Analizi	455
6.1.5. Domateste Bulunan <i>FAT</i> Genlerinin Protein-Protein Etkileşimleri	466
6.1.6. gRNA'ların Dizayn Edilmesi.....	466
6.2. Genomü Düzenlenmiş Bitkilerin Morfolojik Olarak Tanımlanması	488
6.3. Mutant Hatların Elektron Mikroskobu İle İncelenmesi	511
7. SONUÇ	566
KAYNAKLAR	577
ÖZGEÇMİŞ.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
LB	: Luria-Bertani Besiyeri
MS	: Murashige ve Skoog Besiyeri
ACP	: <i>Acyl Carrier Protein</i>
DSB	: Çift Zincir Kırıkları
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme
HDR	: Homolojiye Yönelik Onarım
FAT	: Yağ Asitleri
μl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
M	: Molar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Domates meyve yapısı	4
Şekil 2. 2. Domates meyvesinin olgunlaşma aşamaları	5
Şekil 3. 1. DNA çift zincir kırıklarının onarılmasında kullanılan hücresel tamir mekanizmaları olan NHEJ ve HDR'nin şematik gösterimi.....	10
Şekil 3. 2. gRNA'nın PAM dizini tanıdıktan sonra Cas9 enzimini bölgeye yönlendirilmesi. gRNA ve Cas9 enzimi bağlandıklarında meydana gelen konformasyonel değişiklik ile Cas9 enzimin kesimden sorumlu domeinlerinin aktifleşmesi ve hedef DNA'yı kesmesi	13
Şekil 3. 3. gRNA ve Cas9 enziminin üç boyutlu yapısı. Cas9 enziminin 6 adet domeini; REC ₁ , RuvC, REC ₂ , HNH, Bridge Helix, P ₁	13
Şekil 4. 1. Yağ asitlerinin hücredeki lokasyonu.....	19
Şekil 4. 2. Bitkilerde yağ asidi sentez yolağı (Fatiha, 2019).....	19
Şekil 4. 3. Bitkilerde yağ asitlerinin plastidden sitozole geçişinin şematik gösterimi. ACC (asetil CoA karboksilaz), ACP (acyl taşıyıcı protein), FA (yağ asidi), CoA (koenzim A), FAS (yağ asidi sentazı), FATA/B (yağlı acyl-ACP tioesteraz A/B), LACS (uzun zincirli acyl CoA sentaz), PAE (palmitoil-ACP uzama), SAD (stearoil-ACP desatüraz) (Fatiha, 2019).....	21
Şekil 5. 1. <i>Solyc12g006930</i> ve <i>Solyc03g097390</i> genlerine dizayn edilen gRNA'ların bulunduğu ekzonlar	25
Şekil 5. 2. DT1-T2, DT2-T3 ve DT3-T4 fragmentlerinin agaroz jel görüntüsü.....	28
Şekil 5. 3. A; Golden gate klonlama ile gRNA'ların pHSE401 vektöründe birleştirilmesinden sonra vektörün son hali, B; Golden gate klonlama ile gRNA'ların pHSE401 vektöründe birleştirilmesinin şematik gösterimi	30
Şekil 5. 4. U6-29p-F, U6-1t-R primerleri kullanılarak yapılan PCR'in agaroz jel görüntüsü	32
Şekil 5. 5. Hind III ile kesim reaksiyonunun agaroz jel görüntüsü. P2 ve P4 kesilmemiş plazmit, FATB2 ve FATB4 Hind III ile kesilen plazmitler.....	33
Şekil 5. 6. Domates yapraklarının <i>agroacterium tumefaciens</i> ile inokülasyonundan 12-18 saat önce kesilip ön kültür ortamında bekletilmesi.....	36
Şekil 5. 7. Eksplantların etrafında bakterilerin oluşturduğu zonlar	37
Şekil 5. 8. A. seleksiyon ortamında elde edilen bitkicikler, B. bitkiciğin köklendirme ortamında kök oluşturması	37
Şekil 5. 9. Dış ortam koşullarına alıştırılan domates bitkisi	38
Şekil 6. 1. Domateste bulunan <i>FAT</i> genlerinin filogenetik analizi	42
Şekil 6. 2. Soya fasülyesi, patates, domates ve <i>araidopsis</i> de bulunan <i>FATB</i> genlerinin filogenetik ağacı, (A) korunmuş motif (B) korunmuş domain analizi. (C) korunmuş motifler farklı renklerle gösterilmiştir. <i>Glycine max</i> (<i>Glyma.04G151600</i> , <i>Glyma.06G211300</i>), <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AT1G08510</i>), <i>Solanum lycopersicum</i> (<i>Solyc03g097390</i> , <i>Solyc06g083380</i> , <i>Solyc05g008570</i> , <i>Solyc12g006930</i>), <i>Solanum tuberosum</i> (<i>Soltu.DM.03G020290</i> , <i>Soltu.DM.05G004350</i>)	43
Şekil 6. 3. <i>Solyc03g097390</i> geninin domatesteki hücresel lokasyonu.....	44
Şekil 6. 4. <i>Solyc12g006930</i> geninin domatesteki hücresel lokasyonu.....	44

Şekil 6. 5. <i>Solyc05g008570</i> , <i>Solyc06g083380</i> , <i>Solyc12g006930</i> ve <i>Solyc03g097390</i> genlerinin kromozomlar üzerindeki lokasyonu	45
Şekil 6. 6. <i>Solyc05g008570</i> , <i>Solyc12g006930</i> , <i>Solyc06g083380</i> ve <i>Solyc03g097390</i> genlerinin protein protein etkileşimleri	46
Şekil 6. 7. <i>Solyc12g006930</i> genini hedefleyen gRNA5 ve gRNA13.....	47
Şekil 6. 8. <i>Solyc03g097390</i> genini hedefleyen gRNA16 ve gRNA19.....	47
Şekil 6. 9. Yabani tip (sol) ve mutant (sağ) domates bitkileri.....	48
Şekil 6. 10. Yabani tip domates meyvesi (solda) ve mutant domates meyvesi (sağda).....	48
Şekil 6. 11. Solda yabani tip bitkinin kökü, sağda mutant bitkinin kökü	49
Şekil 6. 12. Soldaki gördel yabani tip, sağdaki görsel mutant bitki. Yabani tipte çiçekler (kare içerisinde gösterilmiştir) bulunurken mutant hatta çiçekler <i>Tuta absoluta</i> tarafından zarara uğratılmıştır	50
Şekil 6. 13. Solda içerisinde <i>Tuta absoluta</i> bulunan mutant bitkinin çiçeği, sağda <i>tuta</i> tarafından içerisinde galeriler oluşturulmuş mutant bitkinin yaprağı.....	50
Şekil 6. 14. <i>Tuta absoluta</i> 'nın çiçeğine verdiği zarar solda, sağda <i>Tuta absoluta</i> 'nın zarar vermediği normal çiçek	51
Şekil 6. 15. <i>Tuta absoluta</i> tarafından zarar görmüş meyve.....	51
Şekil 6. 16. Kontrol ve mutant hatların yaprakların alt ve üst yüzeylerinden alınan kesitin elektron mikroskobu görüntüsü. K1: yabani tip domates yaprağının alt dokusu (100x), M1: mutant domates yaprağının alt dokusu (100x), K2: yabani tip domates yaprağının alt dokusu (300x), M2: mutant domates yaprağının alt dokusu (300x), K3: yabani tip domates yaprağının alt dokusu (1000x), M3: mutant domates yaprağının alt dokusu (1000x), K4: yabani tip domates yaprağının üst dokusu (300x), M4: mutant domates yaprağının üst dokusu (300x), K5: yabani tip domates yaprağının üst dokusu (1000x), M5: mutant domates yaprağının üst dokusu (1000x)	53
Şekil 6. 17. Solda bir kenarı <i>tuta</i> tarafından zarara uğratılmış bir tarafı sağlam yaprak, sağda bu yaprağın elektron mikroskobu görüntüsü	53

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2. 1. Meganükleaz, ZFN, TALEN ve CRISPR geneom düzenleme tekniklerinin birbirlerine göre karşılaştırılmaları.....	9
Tablo 5. 1. Crocker çeşidinin doku kültüründe kullanılan besin ortamı ve içeriği.....	23
Tablo 5. 2. Deney boyunca kullanılan bakteri suşları ve dirençli oldukları antibiyotikler	24
Tablo 5. 3. Klonlamada kullanılmak üzere seçilen gRNA'lar	25
Tablo 5. 4. pHSE401 vektörüne klonlanmak üzere yapılacak olan üç ayrı PCR için sentezlenen diziler	26
Tablo 5. 5. DT1-PCR Reaksiyon İçeriği.....	27
Tablo 5. 6. DT2-PCR Reaksiyon İçeriği.....	27
Tablo 5. 7. DT3T4-PCR Reaksiyon İçeriği	27
Tablo 5. 8. PCR reaksiyon koşulları	28
Tablo 5. 9. Golden gate klonlamanın PCR bileşenleri.....	29
Tablo 5. 10. PCR koşulları.....	29
Tablo 5. 11. Kompetan <i>E.coli</i> hücrelerinin hazırlanmasında kullanılan ilk tampon.....	31
Tablo 5. 12. Kompetan <i>E.coli</i> hücrelerinin hazırlanmasında kullanılan ikinci tampon.....	31
Tablo 5. 13. Koloni PCR bileşenleri	32
Tablo 5. 14. Koloni PCR koşulları.....	32
Tablo 5. 15. Hind III ile kesimin PCR bileşenleri.....	33
Tablo 5. 16. Hind III ile kesimin PCR koşulları	33
Tablo 5. 17. Elektroporasyondan sonra yapılan koloni PCR'ın bileşenleri	35
Tablo 5. 18. Elektroporasyondan sonra yapılan koloni PCR'ın koşulları.....	35
Tablo 5. 19. Hoagland besin solüsyonu hazırlanışı.....	38
Tablo 5. 20. Mikronütrient hazırlanışı	39
Tablo 5. 21. FeEDTA hazırlanışı	39
Tablo 5. 22. T-DNA insersiyonu içerip içermediğini kanıtlamak için dizayn edilen primerler	39
Tablo 5. 23. Transgenik T0 bitkilerinin PCR ile doğrulanmasında yapılan PCR'ın bileşenleri	39
Tablo 5. 24. Transgenik T0 bitkilerinin PCR ile doğrulanmasında yapılan PCR'ın koşulları	39
Tablo 5. 25. Mutasyon analizi için dizayn edilen primerler	40
Tablo 5. 26. Sanger Dizileme İçin Yapılan PCR'ın Bileşenleri	40
Tablo 5. 27. Solyc12g006930 geninde Sanger Dizileme İçin yapılan PCR'ın koşulları	40
Tablo 5. 28. Solyc03g097390 geninde Sanger Dizileme İçin yapılan PCR'ın koşulları.....	40
Tablo 6. 1. Domateste bulunan Solyc12g006930 ve Solyc03g097390 genlerini hedefleyen miRNA'lar.....	45
Tablo 6. 2. Hangi bitkide hangi gRNA'nın çalıştığı gösterilmiştir.....	48

1. GİRİŞ

Nüfus artışı sanayi devriminden sonra yükselen bir grafik göstermiş ve nüfus artışına paralel olarak gıda maddelerinin tüketimi hızla artmıştır. Ancak artan nüfusla birlikte çevresel kirliliğinde artması iklim değişikliklerinde beraberinde getirmiştir. İklim değişikliği; tarımı, temiz su kaynaklarını, insan sağlığını, biyolojik çeşitliği ve pek çoğu üzerinde olumsuz etkiler bırakmıştır. Artan nüfusun ihtiyacını karşılayacak tarımsal gıdaların üretimi azalmış ve gıda güvenliğinde tehdit oluşmuştur. Gıda üretimindeki azalmalar daha az insanın gıdaya erişimi anlamına gelmektedir.

Genel olarak bitkiler yaşamları boyunca pek çok stres faktörüne maruz kalmaktadır. Bakteri, virüs ve fungusların oluşturduğu biyotik stresler, su, sıcaklık, çeşitli kimyasallar, ışık vb. etmenlerin oluşturduğu abiyotik faktörler bitkileri yaşamları boyunca etkilemektedir. Biyotik ve abiyotik faktörlerin neden olduğu olumsuz çevre koşullarının organizmalardaki genlerin ekspresyonunu değiştirdiği bilinmektedir. Stres koşulları altında transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel adımlar etkilenmekte ve sonuç olarak bitki kalitesinde, veriminde ve biyokütle üretiminde düşüşler gerçekleşmektedir. Sağlıklı gıda maddelerine erişimde ekonomik faktörlerin yanı sıra bitkileri etkileyen çeşitli hastalıklar, biyotik ve abiyotik stres koşullarında gıdaya erişimde önemli derecede engel oluşturmaktadır. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında tarımsal açıdan yapılacak her çalışma, atılacak her adım altın niteliği taşımaktadır. Biyotik ve abiyotik zarara bağlı tarımsal üretimde meydana gelen ürün kayıplarının engellenmesi veya en aza indirilmesi yönünde alınacak önlemlerin değeri oldukça önemlidir. Günümüzde biyotik stresle mücadelede genom düzenleme araçları etkili ve verimli bir şekilde kullanılmaktadır. Bitki genom düzenleme çalışmaları ile gıda maddelerinin besin kalitesinin iyileştirilmesi, geliştirilmesi ve çevresel koşullara adaptasyonu yönünde yapılan çalışmalar mevcuttur.

Gıda birincil ihtiyaçtır bu nedenle gıda ve tarım endüstrisi sürekli gelişen araştırma ve geliştirme alanı olmuştur. Beslenmenin merkezinde yer alan gıda, tüm araştırma alanlarında tanımlanmış disiplinleri işgal etmeye başlamıştır. Gıda maddelerinin besin değerlerinin iyileştirilmesi araştırmacıların gündeminde olan konulardan birisidir. Biyomühendislik alanlarında geliştirilen yeni teknikler ile yapılan çalışmalar sevilen ve sağlık açısından önemli olan gıdaların besin değerlerinin iyileştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Gıda maddelerini iyileştirilmesi ile

ürünlerden maksimum düzeyde verim almak günümüz şartlarında önemli hale gelmiştir.

Popüler bir araştırma alanı olan genom düzenleme teknikleri ile istenilen genlerde mutasyon oluşturma, epigenetik markörlerin programlanması gibi pek çok işleve sahiptir. Diziye özgü endonükleazların kullanımıyla hedeflenen gen bölgesinde çift zincir DNA kırılması genom düzenleme tekniklerinin hedefidir. Kullanılan nükleazlar; transkripsiyon aktivatörü benzeri nükleazlar (TALEN), çinko parmak nükleazlar (ZFN) ve kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar ilişkili endonükleazlar (CRISPR)'dır. Bu nükleazlar arasında kolay tasarımı ile CRISPR bir adım öne çıkmaktadır. Tarımsal üretimin iyileştirilmesi amacı ile CRISPR tekniğinin kullanımı bitki genom düzenleme çalışmalarında önemli veriler sunmaktadır. Günümüzde geline nokta pek çok bitki türünde CRISPR tekniğinin başarılı bir şekilde uygulanabilirliğini ve verimli çıktılarının olduğunu kanıtlar niteliktedir.

24 kromozomlu diploid bir bitki olan domates (*Solanum lycopersicum*) yaklaşık olarak 3000'den fazla türü içeren *Solanaceae* ailesine aittir (Bai and Lindhout, 2007). Domates, 1753 yılında Linnaeus tarafından *Solanum lycopersicum* özel adı ile *Solanum* cinsine dahil edilmiştir. Yapılan çalışmalar ile kökeni Peru olarak belirlenmiş olmasına rağmen günümüzde dünyanın hemen hemen her bölseinde üretimi yapılan bu bitkinin Türkiye'ye gelişi ise 15. yüzyılda Suriye üzerinden olmuştur (Bai and Lindhout, 2007; Al-Remi et al., 2018). Domatesin yaş meyvesinin hemen hemen her mevsimde kullanımının yanında, konserve, sos, ketçap, salça gibi kullanım şekillerinin olması domates meyvesini önemli bir gıda maddesi yapmaktadır (Skolik et al., 2019).

Bitki lipidlerinin insan beslenmesi ve dünya ekonomisi üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Beslenmede kullanılan yağların çoğu tohumlardan veya meyvelerden elde edilmektedir. Ancak bitkilerde yağ asidi sentezi karmaşık bir süreçten geçmektedir. Bitkilerde istenilen işlevsellikleri ve beslenme özelliklerini sağlamak için, lipid metabolizmasında yer alan anahtar genleri manipüle ederek yağ asidi bileşimini geliştirmek için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Endüstriyel yağ bitkilerinde doymuş yağ asitleri, beslenme ve bazı endüstriyel uygulamalar açısından genellikle arzu edilmemektedir. *FATB* sınıfı tiyoesterazlar, doymuş yağlı açıl zincirleri ile *Acyl- Acyl Carrier Protein*'leri (ACP) hidrolize ettiklerinden bu gende oluşturulacak mutasyonlar ile doymuş yağ oranında düşüş meydana gelmektedir.

Bu çalışmada CRISPR/Cas9 aracılığı ile domateste yağ asidi sentez yolağında yer alan *Fatty acyl-ACP thioesterase B (FATB)* ve *Palmitoyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase* genlerinde (*Solyc03g097390* ve *Solyc12g006930*) mutasyon hedeflenmektedir.

1.1. Çalışmanın Amacı

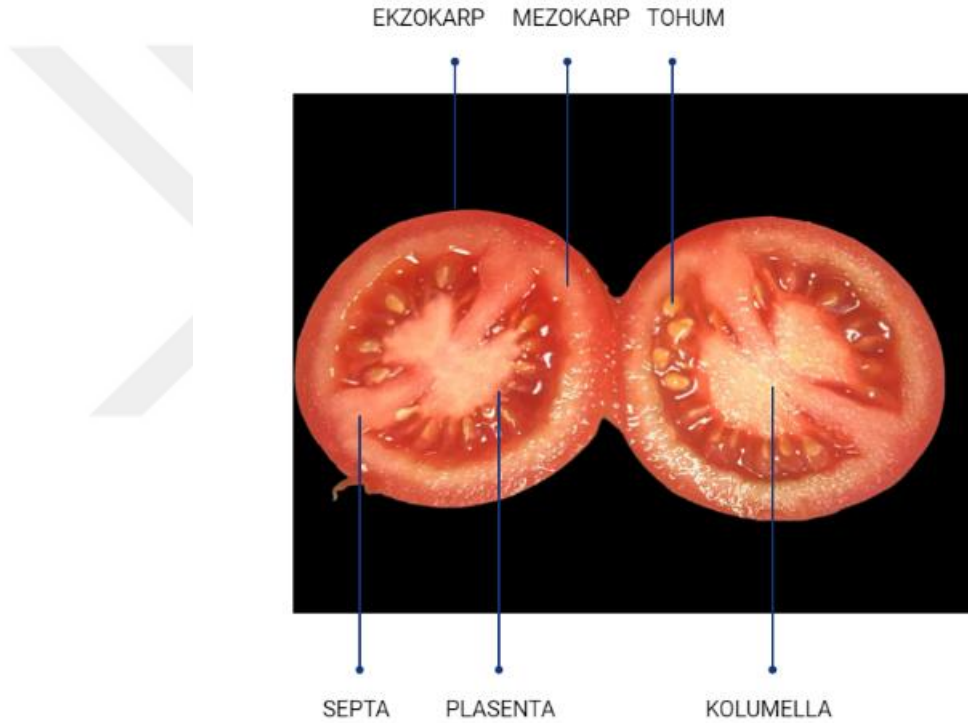
(I): İlgili genlerde oluşturulacak olan mutasyonlar sonucunda bitkide fizyolojik ve morfolojik olarak ne tür değişiklikler meydana geleceği belirlenecektir.

(II): Genin işlevini yitirmesi kaynaklı oluşabilecek değişikliklerden, bu genin domates bitkisi için önemi aydınlatılacaktır.

(III): Kütin monomerleri, C16 (palmitik asit) ve C18 (stearik asit) yağ asitlerini ve bunların türevlerini içerir (Heredia, 2003). *Fatty acyl-ACP thioesterase B (FATB)*, *Palmitoyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase* genlerinde meydana gelecek olan mutasyonlar ile genlerin işlevlerini kaybetmesi sonucunda kütikula tabakasında meydana getireceği değişimler rapor edilerek, domatesteki *FATB* genlerinin kütikula tabakası ile ne kadar ilişkili olduğu belirlenerek ileride yapılacak olan biyotik stres çalışmalarına kaynaklık edecektir.

2. DOMATES BİTKİSİ

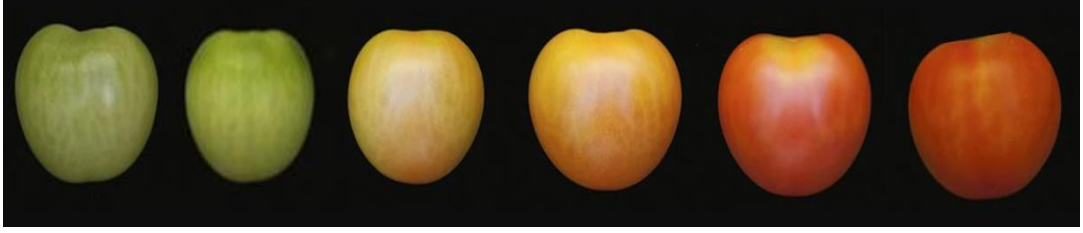
Domates meyvesi yumurtalıkların döllenmesinden sonra yumurtalıktan gelişmektedir. Yumurtalığın duvarları perikarp haline gelmektedir. Perikarp, plesentayı ve tohumları içeren lokülleri çevrelemektedir. Domates bitkisi beş sepals, beş petal, beş ercik ve iki lokül içeren çiçekler üretmektedir (Monforte et al., 2013). Ovüllerin döllenmesinden sonra, perikarp, kolumella ve plesanta dokuları, tozlaşmadan sonraki 5 ila 10 gün boyunca hücre bölünmeleri ile genişlemektedir ve bu aşamayı meyve kütlesindeki artışla sonuçlanan hücre büyümesi takip etmektedir (Gillaspy et al., 1993).



Şekil 2. 1. Domates meyve yapısı

Meyveler olgunlaşma mekanizmalarına göre ikiye ayırlırmaktadırlar. Olgunlaşma aşamasında etilen biyosetozinde büyük artışlar meydana gelen meyveler klimakterik meyveler olarak adlandırılırken, etilen üretiminin çok düşük seviyede kaldığı meyvelere klimakterik olmayan meyveler denilmektedir. Domateste olgunlaşma aşamasında etilen biysentezinde bir patlama meydana gelmesi nedeni ile klimakterik meyveler sınıfına girmektedir (Oeller et al., 1991; Theologis et al., 1993; Ayub et al., 1996; Alexander and Grierson, 2002; Saini et al., 2017).

Domates meyvesi yeşil, kırıcı, dönüş, pembe, açık kırmızı ve kırmızı olgun evrelerinden geçerek olgunlaşma sürecini tamamlarlar (Skolik et al., 2019).



Şekil 2. 2. Domates meyvesinin olgunlaşma aşamaları

2.1. Domatesin Ekonomik Önemi

Gıda maddelerinin tüketimi nüfus artışına paralel olarak hızla artmaktadır. Bu nedenle besin içeriği yüksek, sağlıklı, kolay elde edilebilir ve çeşitli tüketim şekilleri sağlayan gıdalar daha çok tercih edilmektedir. Domates (*Solanum lycopersicum*) antioksidan, fitokimyasallar ve temel besin maddelerinin yüksekliği nedeniyle dünya çapında en çok tüketilen sebzeler arasında yer bulmaktadır. Gerek taze gerek ise işlenmiş olarak bir çok farklı şekilde kullanılabilir. Büyük bir ekonomik öneme sahip olan domates, bahçe bitkileri içerisinde en çok tüketilen bitkiler arasında yer almaktadır.

Ülkemiz iklim koşullarının domatesin yetiştirilmesi için oldukça uygun olması, domatesi işleyecek sanayinin ülkemizde kurulmuş olması domatesin tercih edilmesini sağlamış ve üretiminde önemli ülkeler arasına girmiştir (Engindeniz, 2010).

Gıda mevcudiyeti ile ilgili bilgiler genellikle ulusal, bölgesel ve alt-bölgesel gıda bilançolarından gelir. Bu, her bir ülke ve bölge için FAO gıda bilançosu veri tabanından elde edilir. 2020 FAO verilerine göre domates tüketimi tüm dünyada 186 milyon tona ulaşmıştır. Ülkeler bazında bakıldığında Çin’de 64 milyon ton, Hindistan’da 20 milyon ton, Amerika’da 12 milyon ton tüketim kaydedilirken Türkiye’deki tüketim miktarı ise 13 milyon ton civarlarında olduğu bildirilmiştir . Domatesin besin kalitesinin oldukça yüksek olması, dolayısıyla insan beslenmesindeki faydalı rolünün göz önünde bulundurulması ve bunların yanında farklı çeşitlerde tüketim kolaylığı sağlaması gibi artılar domatesi en çok tüketilen gıda maddeleri arasında yer almasını sağlamaktadır. Doku kültürü çalışmalarında tam bir bitkicik elde etme oranının yüksek olması ve yetiştirme kolaylığı bakımından gen aktarım

alışmalarında deneysel avantaj sağlaması domatesin model bir bitki olmasını sağlamaktadır.

2.2. Domatesin Sağlık Açısından Önemi

Sağlık açısından faydaları kanıtlanmış olan domates beslenmede önemli bir yer bulmaktadır (Salehi et al., 2019). Araştırmacılar tarafından meyveler ve sebzelerin sağlıkta potansiyel yararları olan bileşikler içerdikleri bulunmuştur ve bu gıdaları “nutrasötik” gıdalar olarak adlandırılmıştır. Domateste birçok gıda gibi “nutrasötik” gıda olarak tanımlanmıştır (Jack, 1995; Canene et al., 2005). Nutrasötik gıdalar, gıda ya da gıdanın bir parçasının hastalıkları önlemesi ve tedavisinde dahil sağlık yararları sağlayan herhangi bir madde olarak tanımlanmaktadır (Jack, 1995).

Mineraller doğal olarak oluşan inorganik maddelerdir. Metabolik yolların düzenlenmesi, pH dengesinin düzenlenmesi, kas kasılması, sıvı dengesi, enerji üretimi, kan basıncı ve bedensel işlevlerin korunması gibi birçok önemli görevi üstlenmektedirler (Baer et al., 1970; Kumar et al., 2014; Paul et al., 2017). Domates iyi bir mineral kaynağıdır ve bunlardan bazıları kalsiyum, potasyum, sodyum, fosfor, magnezyum, demir, iyot ve çinkodur (Navarro et al., 2011; Abdullahi et al., 2016;) Domates içerdiği mineraller bakımından incelendiğinde A, E ve K başlıcalarını oluştururken C vitaminin en fazla olduğu bildirilmiştir. C vitamini, kardiyovasküler hastalıklar ve kanserde dahil olmak üzere birçok hastalığın önlenmesinde yararlı antioksidan aktiviteler sergilemektedir (Sies et al., 1992; Giovannucci, 1999; Agarwal and Rao, 2000; Canene et al., 2005). Vitaminler kırmızı kan hücrelerinin üretilmesi, sinir sisteminin korunması ve enzimatik işlevleri yerine getirmektedirler (Sure, 1933).

Domates birçok yağ asidi içermektedir. Esansiyel yağ asitleri insanlar ve hayvanlar tarafından sentezlenemediğinden beslenme ile alınmaları gerekmektedir ve domateste esansiyel yağ asitleri için önemli bir kaynak sağlamaktadır. Çoklu doymamış yağ asitleri vücut için önemlidir, çünkü doymamış yağ asitleri hücre büyümesi, plazma zarının bütünlüğünün korunması, ve hastalıkların önlenmesi için gereklidirler (Zárate et al., 2017; Freitas et al., 2018). Amino asitler yara iyileşmesi, hasarlı dokuların onarılması, besinlerin taşınması, hücresel yapının korunması da dahil olmak üzere önemli vücut fonksiyonlarını yürüten proteinlerin yapı taşlarını oluşturmaktadır (Elango and Laviano, 2017). Domateste 17 amino asit tanımlanmıştır. Domatesteeki toplam proteinlerin %39.75’ini esansiyel amino asitlerin oluşturduğu tahmin edilmektedir. Domatesteeki çeşitli esansiyel amino asitlerden lösin en yüksek

konsantrasyonlarda, metionin ise en düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Ali et al., 2020).

Fitokimyasallar, hastalık önleyici özelliklere sahip bitki kimyasallarıdır. Domates ve domates ürünlerinde likopen, akriptoksantin, neoksantin, violaksantin, zeaksantin, b-kriptoksantin, b-karoten, g- karoten, z- karoten, a-karoten, lutein, fitoen, fitofluen, nörosporensiklon içermektedir (Fraser et al., 1994; Paetau et al., 1998; Khachik et al., 2002; Burns et al., 2003). Domates mükemmel bir sterol içeriğine sahiptir. Steroller bağırsakta kolesterol emilim bölgelerini bloke ederek koleterol emilimini azaltarak LDL-C'nin azalmasına ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesine yardımcı olmaktadır (Ostlund et al., 2003; Ali et al., 2020). Domateste bulunan antioksidanlar, serbest radikal oksidasyonunu geciktirebilir ve önleyebilir. Böylece karalı radikaller oluşturabilir. ROS'un neden olduğu oksidatif stresi en aza indiren antioksidanlar, kanser, diyabet ve nörolojik hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların önlenmesinde çok büyük roller üstlenmektedir (Liu et al., 2018; Abdel et al., 2019). Özetle domatesin içerdiği vitaminler, mineraller, karotenoidler, esansiyel yağ asitleri, antioksidanlar ve diğer bileşikler sağlık açısından önemli bir besin olmasını sağlamaktadır.

2.3. Domates Bitkisinin Doku Kültüründe Kullanımı

Bitkinin herhangi bir yerinden alınan doku (eksplant) parçaları ile yapay besin ortamında yeni ve tam bir bitkicik elde edilmesi çalışmalarına doku kültürü çalışmaları denilmektedir. Eksplant kaynağı bitkiden bitkiye değişmekle birlikte genellikle kullanılan dokular yaprak, anter, embriyo, tomurcuk, kök ve meristemlerdir. Bitki doku kültürü kullanılarak herhangi bir bitki türünden fazla sayıda yeni nesillerin üretilmesi amacı ile yapılan çalışmalara mikroçoğaltım denilmektedir. Mikroçoğaltım, tohumdan çoğaltılması uygun olmayan ya da çelikle çoğaltılması uygun olmayan bitkilerin çoğaltılmasında kullanılmaktadır. Doku kültürü teknikleri kullanılarak, nesli tükenmekte olan bitkilerin çoğaltılması, virüslerden ari bitkilerin eldesi , haploid bitkilerin eldesi, somoklonal varyasyonların oluşturulması, üstün özellik gösteren çeşitlerin muhafazasında kullanılmaktadır (Dağüstü, 2018).

Direkt ve indirekt organogenesis in vitro çalışmalarda kullanılan iki rejenerasyon tipidir. Direkt organogenesisite eksplant üzerinde herhangi bir kallus fazı olmaksızın direkt sürgün ve kök oluşturulmaktadır. İndirekt organogenesisite ise kallus oluşumu uyarılarak daha sonra dokuların oluşturulmasıdır.

Günümüzde gelişmekte olan genom düzenleme teknikleri ile birlikte bir çok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaların doku kültürü aşamalarında kullanılacak model organizmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bitki genom düzenleme çalışmalarında kullanılan model organizmalardan birisi de domatestir. Domates, ekonomik açıdan önemli bir yerde olması, etli meyvelerin gelişimi ve olgunlaşması üzerine yapılan çalışmalarda kolaylık sağlaması, sağlık yönünden değerlendirildiğinde zengin değerlere sahip olması gibi nedenlerle dikotil bitkiler arasında model organizma olarak yerini almaktadır.



3. GENOM DÜZENLEME TEKNİKLERİ

Geçmişten günümüze çeşitli organizmaların genomunda istenilen değişiklikleri yapılabilirliği merak edilen ve araştırılan bir konu olmuştur. Ancak bu alanda yapılacak çalışmalar için verimli ve güvenilir araçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Hedeflenen genom düzenleme tekniklerinin keşfedilmesi aranan cevaplara ulaşmak için önemli bir adım olmuştur. Genom düzenleme için kullanılan başlıca tekniklerde nükleazlar modifiye edilerek hedef DNA'ya bağlanması ve istenilen manipülasyonu gerçekleştirmesi beklenmektedir. Bu kimerik nükleazlar ile hataya meyilli homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve homolojiye yönelik onarım (HDR) dahil olmak üzere hücresel DNA onarım mekanizmalarını uyarır ve hedeflenen DNA çift zincir kırıklarını (DSB) indükleyerek verimli ve kesin genetik modifikasyonlar gerçekleştirilir (Gaj et al., 2013). Yapılarına göre dört tane genom düzenleyici nükleaz grubu vardır. Bunlar; meganükleazlar (MN), Çinko parmak nükleazları (ZFN), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALEN) ve kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) genom düzenlemede kullanılan başlıca sistemleri oluşturmaktadır.

Tablo 2. 1. Meganükleaz, ZFN, TALEN ve CRISPR genom düzenleme tekniklerinin birirlerine göre karşılaştırılmaları

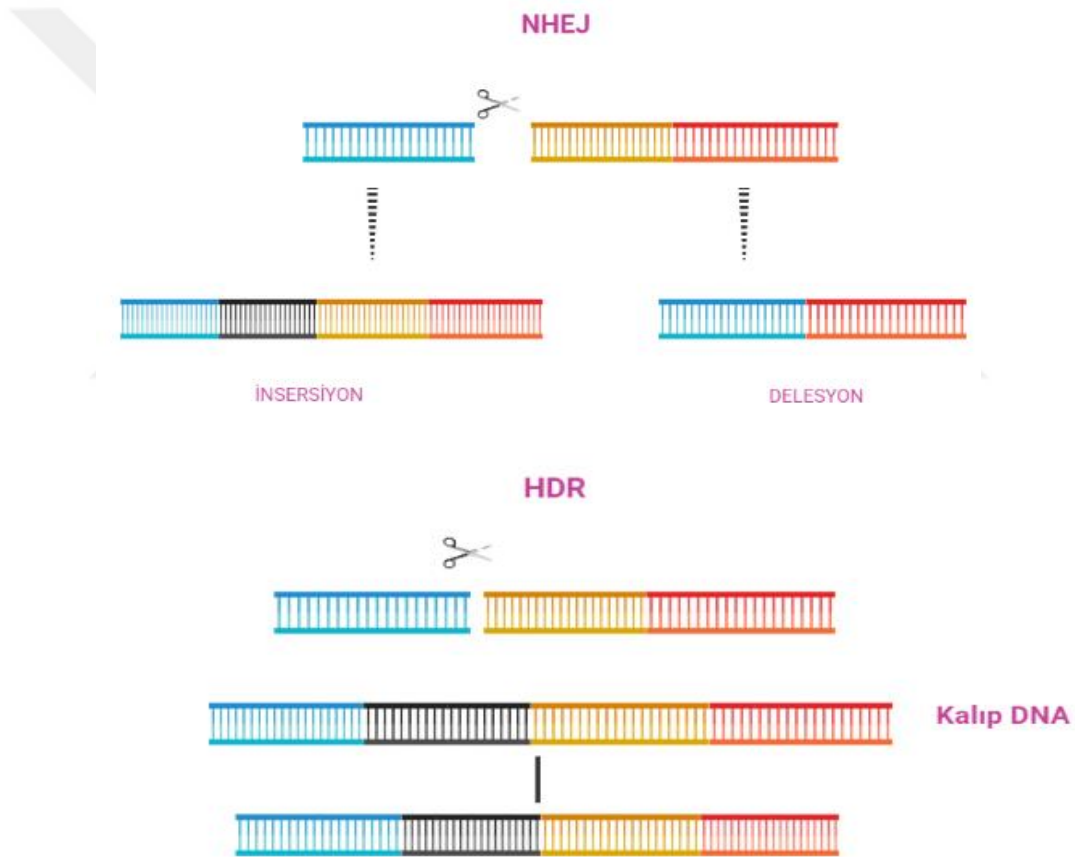
	MG	ZFN	TALEN	Cas9
Hedef dizi (bp)	14-40	9-18	14-20	~23
Boyut (kb)	~1	~1	~3	~3.5-4.5
Enzim mühendisliği	zor	zor	kolay	Çok kolay
Hedef tanıma	Protein-DNA	Protein-DNA	Protein-DNA	RNA-DNA baz eşleşmesi ve protein-DNA

(Zhang et al., 2019)

Bunlar arasında CRISPR, çeşitli organizmalarda ilgili genlerin manipülasyonu, endojen gen ekspresyonunu düzenleme (Crispri-Crispra) gibi amaçlarla etkili bir şekilde kullanılabilir. Prokaryotik, bitki ve memeli sistemlerinde etkili bir şekilde kullanılabilirliği keşfedilen Crispr sisteminin, gen terapisi için kullanılan ilaçlardan mahsul veriminin iyileştirilmesine kadar pek çok alanda geniş bir uygulama alanına sahip olduğu görülmektedir. Bunlara ek olarak CRISPR sisteminin genom düzenleme için diğer sistemlere nazaran spesifik mutasyonlara olanak tanınması, verimli olması, bunların hızlı ve kolay yapılması bu tekniğin öne çıkmasını sağlamaktadır.

3.1. DNA Çift Zincir Kırıklarının Tamir Mekanizması

DNA çift sarmalındaki her iki ipliğin de koptuğu çift sarmal kopmaları (DSB) en tehlikeli DNA hasarlarıdır. Çift zincir kırıkları iki temel mekanizma ile onarılmaktadır. Bunlar; homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ)'dir. Homolog rekombinasyon tamir mekanizmasında kırılmayı onarmak için kardeş kromatit ya da homolog kromozom üzerinde hasarsız bir DNA şablonu kullanır ve orijinal dizinin yeniden oluşturulmasını sağlar. Homolog olmayan uç birleştirmede kırık DNA uçlarını homoloji olmadan birbirine bağlar. Bu sırada inserisyon ve delesyonlar meydana gelmektedir (Mao et al., 2008). NHEJ ve HDR'nin onarım mekanizmaları şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 1. DNA çift zincir kırıklarının onarılmasında kullanılan hücresel tamir mekanizmaları olan NHEJ ve HDR'nin şematik gösterimi

3.2. Crispr

Son yıllarda bitki genom düzenleme çalışmaları hızla büyüyen bir alana dönüşmüştür. Bölgeye özgü CRISPR/Cas nükleazlarının keşfi ve bu bakteri savunma sisteminin gen ifadelerinin düzenlenmesi çalışmalarına uyarlanması önemli bir devrim

niteliğindedir. CRISPR/Cas sisteminin güçlü aktivitesi, kolay tasarımı ve neredeyse her DNA ve RNA bölgesini hedefleyebilmesi CRISPR/Cas'ı gen düzenleme tekniklerinin en başına yerleştirmektedir. Günümüzde sağlık, endüstri ve tarım gibi alanlarda CRISPR/Cas sistemi etkili bir şekilde kullanılmakta ve bu sistem sayesinde insanlık yararına önemli keşifler yapılmaktadır.

3.3. Crispr/Cas9'un Kısa Tarihçesi

İlk olarak CRISPR 1987 yılında Ishino tarafından *E.coli*'de alkalin fosfatazin izozim dönüşümünden sorumlu geninin analiz çalışmalarında bulunmuştur ancak o zamanlar CRISPR'ın biyolojik işlevleri henüz bilinmediğinden bu keşfin değeri o yıllarda bilinmemekteydi (Ishino et al., 1987). Daha sonra CRISPR'lar 1993 yılında arkelerde gözlemlendi (Mojica et al., 1993). 2000'li yılların başlarına gelindiğinde CRISPR'ın bağışıklık sistemi olarak işlevine dair ilk keşifler yapıldı (Mojica et al., 2005). Daha sonraları Cas genlerinin CRISPR ile ilişkileri belirlendi ve aslında CRISPR ve Cas proteinlerinin birlikte çalıştığı, prokaryotik hücreleri istilacı genetik materyallere karşı korumak için varolan bir bağışıklık sistemi olduğu ileri sürüldü (Makarova et al., 2006). CRISPR/Cas sisteminin kazanılmış bir bağışıklık sistemi olduğunun kanıtı ise 2007 yılında yapılan deneylerle ortaya çıkarılmıştır (Barrangou et al., 2007). 2012 yılına gelindiğinde *Streptococcus pyogenes* bakterisinin Cas9 proteinin gen mühendisliği için uyarlanabileceği keşfedilmiştir (Jinek et al., 2012). Bu sistemin genetik çalışmalarda kullanılabileceğinin keşfinden itibaren bir çok farklı organizmada çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalara her geçen günde yenileri eklenmekte ve CRISPR/Cas sistemi etkili bir genom düzenleme aracı olarak kullanılmaya devam edilmektedir.

3.4. Crispr/Cas Sisteminin Genom Düzenleme Mekanizması

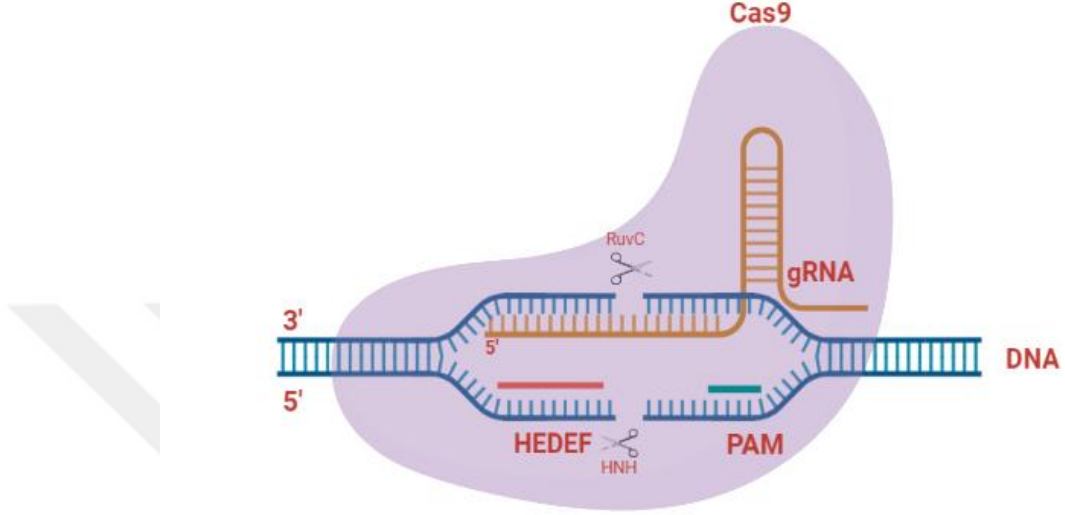
Bakteriler ve arkelerin fajlar, transpozonlar ve plazmidler gibi genetik unsurlara karşı çeşitli savunma sistemleri mevcuttur. Bu sistemler arasından son zamanlarda tamamen farklı bir prensipte çalışan yeni bir savunma sistemi olan CRISPR (düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar) keşfedilmiştir (Koonin and Makarova, 2009). Arkeal genomların yaklaşık %90'ı ve bakteri genomlarının %40'ı bu savunma sistemini barındırmaktadır (Rani et al., 2016).

CRISPR/Cas9 sistemi prokaryotlarda CRISPR RNA'nın (crRNA), trans aktive edici (tracrRNA) RNA ile birlikte Cas9'un kompleks oluşturarak DNA'ya

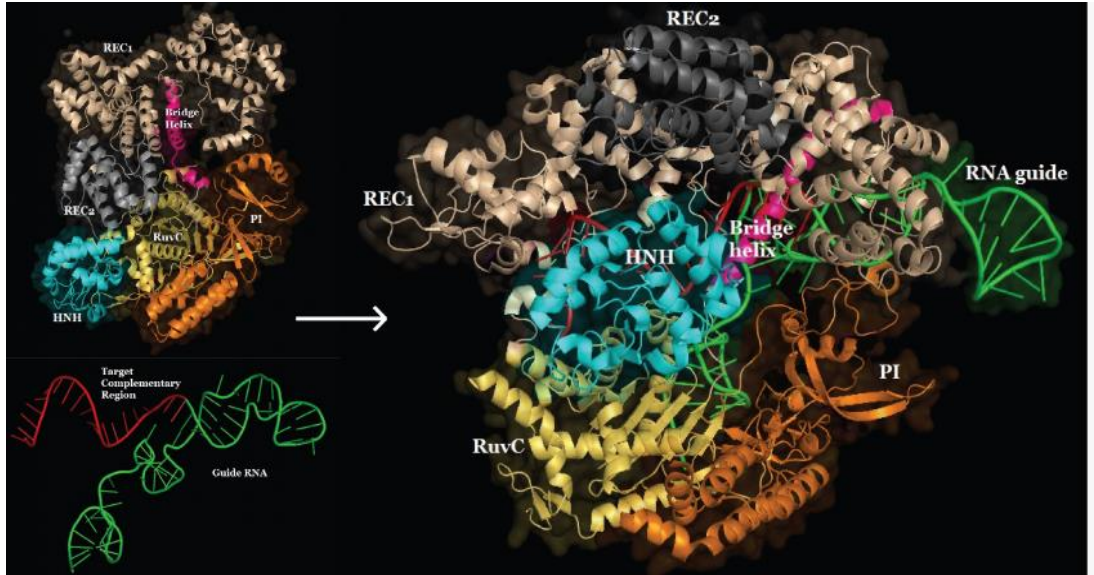
bağlanması ve nükleaz aktivitesi ile yabancı genetik materyallere karşı bağışıklık sistemi olarak işlev görmesidir (Grissa et al., 2007; Ceasar et al., 2016). Bu savunma sistemi yabancı genetik materyalin tespiti ve susturulması için küçük RNA'lara dayanmaktadır. Bakteri ve arke, viral ya da plazmit tehdidine, kısa yabancı dizi fragmanlarını (protospacer) CRISPR dizisinin proksimal ucundaki konak kromozomuna entegre ederek yanıt verir (Terns and Terns, 2011; Jinek et al., 2012; Wiedenheft et al., 2012). Repeat-spacer elemanın öncü CRISPR RNA (pre-crRNA) moleküllerine transkripsiyonu ve ardından enzimatik bölünme ve istilacı genetik materyal hedeflerin tamamlayıcı protospacer dizileriyle eşleşebilen kısa crRNA'ları verir (Deltcheva et al., 2011; Sashital et al., 2011). Bağışıklık sistemindeki işleyişini özetlemek gerekirse; bakteriler örneğin bir virüsle enfekte olduğunda, virüsün genetik materyalinden kısa dizileri kendi genomuna eklemesi ve daha sonra aynı virüsle tekrar karşılaştığında onu tanıyıp etkisiz hale getirmesi olarak açıklanabilmektedir.

2012 yılında Emanuelle CHARPENTIER ve Jennifer DOUDNA öncülüğündeki bir ekip, doğada var olan bu sisteme benzer bir sistem ile canlıların DNA'sını kesebilecek ve düzenleyebilecek bir uygulama geliştirmişlerdir. Buna karşılık 2020 yılında Nobel kimya ödülü almışlardır. CRISPR Cas sisteminin bu değiştirilmiş versiyonu, hedef DNA dizisinde çift zincir kırıkları oluşturmak için gRNA (rehber RNA) tarafından yönlendirilen Cas proteinlerini kullanmaktadır. gRNA, tracrRNA ve crRNA'nın füzyonuyla oluşturulan tek bir kimerik RNA'dır. CRISPR/Cas sisteminde çift zincir kırıklarını oluşturmak için gRNA ve Cas proteinine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca protospacer bitişik motif (PAM) olarak bilinen tamamlayıcı diziye bitişik kısa bir DNA dizisi de gerekmektedir (Chaudhari et al., 2020). gRNA, Cas9 ile bağlanır, konformasyonel değişikliği indükler ve protein aktif hale gelir (şekil 3.3). Cas9 etkinleştirildiğinde, PAM dizisiyle eşleşen bir diziyle bağlanarak hedef DNA'yı tarar. Cas9 proteini bir hedef dizi bulduğunda, protein, PAM sekansının 3' yönündeki bazıları eritir ve gRNA'nın tamamlayıcı bölgesi ile eşleşir. Tamamlayıcı bölge ve hedef bölge düzgün bir şekilde eşleşirse, Ruv C ve HNH (cas9 proteininin iki nükleaz domaini) domainleri hedef DNA'yı keser (Jinek et al., 2012). Cas9, PAM dizisinin 3' ucunda DSB'ye (çift zincir kırıkları) neden olur. DNA bölündükten sonra, hücresel onarım mekanizmaları çift zincir kırıklarını onarmak için devreye girer. Bu hücresel onarım mekanizmaları; homolojiye yönelik onarım (HDR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ)'dir. HDR, DNA hasarını onarmak için homolog donör DNA'yı kullanan kesin bir onarım mekanizmasıdır. NHEJ ise DNA'nın kırık uçlarının bir araya

getirildiği ve genellikle ekleme ve silmelere neden olan hataya açık, "hızlı düzeltme" mekanizması olarak da bilinen bir hücrel onarım mekanizmadır (Miyaoaka et al., 2016). Onarım sırasında meydana gelen insersiyon ve delesyonlar istenilen bölgede mutasyona neden olmakta ve CRISPR sistemi ile hedeflenen manipülasyonlar oluşturulmaktadır.



Şekil 3. 2. gRNA'nın PAM dizini tanıdıktan sonra Cas9 enzimini bölgeye yönlendirilmesi. gRNA ve Cas9 enzimi bağlandıklarında meydana gelen konformasyonel değişiklik ile Cas9 enzimin kesimden sorumlu domeinlerinin aktifleşmesi ve hedef DNA'yı kesmesi



Şekil 3. 3. gRNA ve Cas9 enziminin üç boyutlu yapısı. Cas9 enziminin 6 adet domeini; REC₁, RuvC, REC₂, HNH, Bridge Helix, P₁

CRISPR-Cas sistemi, sekans, filogeni, lokus organizasyonu ve içeriğine göre tip I, tip II ve tip III olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır (Makarova et al., 2011).

Çalışma mekanizması en iyi aydınlatılmış olan, en çok çalışılan, ökaryot organizmalara uyarlanması en mümkün görünen ve çift zincir kırılmalarını indüklemeye kabiliyeti nedeni ile diğerlerine oranla daha fazla ilgi gören tip II sistemidir. Tip II CRISPR-Cas sisteminde görev yapan endonükleaz Cas9'dur (Barrangou et al., 2007; Deltcheva et al., 2011; Sapranaukas et al., 2011; Jinek et al., 2012).

3.5. Bitkilerde Crispr/Cas Aracılı Genom Düzenleme Çalışmaları

CRISPR-Cas9'un bitki bilim araştırmalarında kullanımı diğer genom düzenleme yaklaşımlarından farklı olarak daha az emek istemektedir. Bitkilerde hedeflenen gen manipülasyonu için CRISPR-Cas kullanıcı dostu olmuştur. Keşfinden günümüze kadar birçok bitki türünde başarılı bir şekilde kullanılması etkinliğini kanıtlar niteliktedir (Osakabe and Osakabe, 2015; Ceasar et al., 2016).

Bitkilerde CRISPR-Cas9 tekniği kullanılarak yapılan ilk çalışmalardan biri 2013 yılında arabidopsis thaliana ve tütün (*Nicotiana bentamiana*) bitkileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma iki model bitkide CRISPR/Cas9 tabanlı genom düzenleme teknolojisinin uygulanabilirliği ve etkinliği üzerine yapılmış bir çalışmadır. Arabidopsiste hedefledikleri *AtRACK1b* ve *AtRACK1c* genlerinde %2.5-2.7'lik mutasyon, tütünde hedefledikleri *NbPDS* geninde %37.7'lik bir mutasyon gördüklerini belirtmişlerdir (J.-F. Li et al., 2013). Gıdalarda CRISPR-Cas9 tekniğinin kullanımına ilişkin ilk rapor 2013 yılında pirinç ve buğdayda yayınlanmıştır. Prinçte *PDS* geni iki sgRNA ile hedeflenerek %15'lik bir mutasyon sağlandığı bildirilmiştir (Shan et al., 2013). Aynı grup yine aynı bitkilerde sgRNA'yı kullanarak HDR elde etmek için geliştirdikleri protokolü yayınlamışlardır. Jiang ve arkadaşlarının raporuna göre CRISPR-Cas9'un hem dikot hemde monokot bitkilerde genom düzenleme çalışmalarında etkili bir şekilde kullanılabilineceğini göstermişlerdir (Jiang et al., 2013). 2014 yılında yapılan ir çalışmada *Arabidopsis*'de bulunan *ARGONAUTE7* geninin domatestte bulunan homologunun ikinci ekzonuna gRNA tasarlamışlardır. *ARGONAUTE7* geninde meydana gelen fonksiyon kaybının iğne benzeri düz yapraklar oluşturacağı bilgisi CRISPR-Cas9 sisteminin etkinliğini denemek için bu geni seçmelerini sağlamıştır. *Agrobacterium tumefaciens* aracılı transformasyon ile elde ettikleri sekiz bitkiden altısının mutasyonlu olduğunu bildirmişlerdir (Brooks et al., 2014). 2015 yılında Ito ve arkadaşları meyve olgunlaşmasında önemli olan MADS-Box transkripsiyon faktörü gen ailesi içinde yer alan *RIN* geninde mutasyon hedeflemişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonucunda CRISPR-Cas9 ile hedefledikleri

RIN geni mutant hatlarda meyvenin olgunlaşmadığı bildirmişlerdir (Ito et al., 2015). CRISPR-Cas9 sistemi kullanılarak domateste bulunan *SIPDS* ve *SIPIF4* genlerinde mutasyon hedeflemişlerdir. *SIPDS* geni karotenoid biyosentezinde anahtar enzim olan fitoen desatürazı kodlar ge genin baskılanması sonucunda albino bitkiler meydana gelir. Sonuç olarak *SIPDS* ve *SIPIF4* genleri için DSB indüklenmiş ve meydana gelen mutasyonların T1 ve T2 nesillerine stabil bir şekilde aktarıldığını kaydetmişlerdir. *Agrobacterium tumefaciens* aracılı transformasyon ile elde ettikleri mutant hatların bazılarında düşük bazılarında yüksek albinoluk gözlemlediklerini, çok yüksek albinoluk görülenlerin çiçek ve meyve üretme aşamalarına gelemediklerini bildirmişlerdir (Pan et al., 2016). Ueta ve arkadaşları CRISPR-Cas9 tekniğini kullanarak 2017 yılında yaptıkları çalışmada çekirdeksiz domates üretmek için *IAA9* genini hedeflemişler, genin susturulması sonucunda meydana gelen mutasyonların sonraki nesillerde aktarıldığını bildirmişlerdir (Ueta et al., 2017). Deng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *SLMYB12* genini hedefleyerek dizayn ettikleri gRNA ile oluşturdukları mutasyon sonucunda pembe meyveli domates bitkileri elde etmişlerdir (Deng et al., 2018). Cai Ve arkadaşları soya fasülyesinde çiçeklenme yolunda bir entegratör olan *GmFT2a*'nın hedeflenen manipülasyonu için CRISPR/Cas9 kullanılmış ve mutant olan bitkilerde geç çiçeklenme görüldüğü bildirilmiştir. Mutasyonun T2 nesli soya fasülyesi bitkilerinde de görüldüğü kaydedilmiş (Cai et al., 2018). Patatesler insana acı bir tat veren steroidal glikoalkaloidler, a-solanin ve a-kakonin biriktirir. Nakayasu ve arkadaşları patatesteki bu acılığı önlemek için *SGA* biyosentezinde görevli *St16DOX* genininde CRISPR/Cas9 ile meydana getirdikleri mutasyon ile patatesin tüylü köklerinde *SGA* birikiminin tamamen ortadan kalktığını bildirmişlerdir (Nakayasu et al., 2018). Jung ve arkadaşları *bHLH* transkripsiyon faktörünü kodlayan *SIMS10* geninin susturulmasıyla elde edilen hatların erkek kısırlığına neden olduğunu belirtmişlerdir. Elde edilen hatlardaki mutasyonların sonraki nesillere aktarıldığı çalışmalarında sunulmuştur (Jung et al., 2020). 2022 yılında Seçgin ve arkadaşlarının CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak yaptıkları çalışmada domateste *Acotinase* gen ailesi içerisinde yer alan *SIACO2* genini iki farklı gRNA ile hedeflemişlerdir. Mutant hatları vahşi tip ile kıyasladıklarında polen canlılıklarının düşük olduğunu ve tohum sayısında beş katlık bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında bitkilere uygulanan tuz ve mannitol aracılı kuraklık stresinde mutant hatların stres koşulları altında yüksek toleransa sahip olduklarını bildirmişlerdir (Seçgin et al., 2022).

Yapılan tüm bu çalışmalara bakıldığında CRISPR/Cas9'un bitki genom düzenleme çalışmalarda etkili bir şekilde kullanıldığı görülmektedir.

3.6. Crispr/Cas Sisteminin Güncel Kullanımları

CRISPR Act3: Bu sistemde kullanılan enzim dCas (ölü Cas)'dır. Cas'ın iki nükleaz domeini olan RUVC ve HNH'nin aktiviteleri mutasyon ile yitirilmiş ve bu şekilde kesim yeteneği giderilmiş enzime dCas denilmektedir (Qi et al., 2013). dCas bir geni ifadesini arttırmak (CRISPRa) ya da baskılamak (CRISPRi) için geliştirilmiş ve kullanılmıştır (Ceasar et al., 2016). CRISPR aktivasyon sisteminde, ilgilenilen genlerin ifadelerini arttırmak için transkripsiyonel aktivatörler dCas9'a kaynaştırılmakta ve bu şekilde genin ifadesi artmaktadır (Konermann et al., 2015). CRISPR interferansda ise (CRISPRi), dCas9 proteinleri transkripsiyon başlangıç dizisine yakın promotör bölgesine bağlanarak, RNA polimerazı ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını bloke ederek, transkripsiyonun başlamasına veya uzamasına müdahale etmekte ve bu şekilde gen ifadesini baskılamaktadır (Qi et al., 2013).

CRISPR-Combo: gRNA dizisindeki değişiklik ile CRISPR sistemine yeni bir bakış açısı getirmiştir. Yaklaşık 20 nükleotitlik gRNA'nın PAM dizini tanıyıp bağlandığı Cas9'u oraya yönlendirip DNA'da çift zincir kırığı oluşturduğu geleneksel CRISPR sisteminden ayrı olarak gRNA yalnızca 14-16 nükleotitten oluşmaktadır. gRNA'nın kısa olması durumunda Cas9 enzimi yinede hedefe gider ancak DNA'yı kesemez. Bu yöntem ile transkripsiyonel aktivatörler hedef bölgeye yönlendirilebilir ve gen aktivasyonu sağlanabilir (Debernardi and Rowan, 2022). 2021 yılında Pan ve arkadaşları bu sistemin hem tek hemde çift çenekli bitkilerde uygulanabileceğini makalelerinde yayınlamışlardır (Pan et al., 2021).

4. YAĞ ASİTLERİ

Lipitler, insanlar için temel besinlerden biri olarak kabul edilmektedir. Lipid metabolizması, çoklu sinyal yollarının birincil araçları olan aynı zamanda hücre zarlarının vazgeçilmez bileşikleri olan pek çok biyoaktif lipid molekülü üretmektedir (Orsavova et al., 2015). Lipitler, çift bağların varlığına veya yokluğuna göre doymuş (örneğin; stearik ve palmitik asit), tekli doymamış (örneğin; oleik asit) ve çoklu doymamış yağ asitleri (örneğin; α -linolenik asit ve linoleik asit) olarak sınıflandırılmaktadır. İnsan vücudu, metil ucunda C3 ve C6'da ilk çift bağı olan çoklu doymamış yağ asitlerini sentezleyemez, bu nedenle bu yağ asitleri esansiyeldir ve besinlerle alınması gerekmektedir. Temel çoklu doymamış yağ asitleri alfa-linolenik (18:3) ve linoleik asittir (18:2) (Brown, 2000).

Doymuş yağ asitlerinin karbon bağlarının tamamı hidrojene doyurulduğundan oldukça kararlı bir yapıları bulunmaktadır. Genel olarak doymuş yağ asitlerinin büyük çoğunluğu oda sıcaklığında katı formda bulunmaktadır. Gıdalarda en çok bulunan bazı doymuş yağ asitleri stearik ve palmitik asitlerdir (Semma, 2002). Doymuş ve doymamış yağ asitleri ile alınan kalori aynı olmasına rağmen, doymuş yağ asitleri vücutta yağ birikimi ve kilo alımı gibi sorunlara neden olmaktadır (Altunkaynak and Özbek, 2006). Kalp ve damar hastalıkları ile mücadelede doymuş yağların tüketiminin azaltılması gerekmektedir (Samur, 2006). Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kandan temizlenmesi doymuş yağ asitleri tarafından engellenmektedir.

Doymamış yağ asitleri bir ya da birden fazla çift bağ bulundurmaktadır. Yağ asitleri zincirleri farklı uzunlukda, sayıda ve yapıda bağ içermektedir. Tek çift bağ içerenlere tekli doymamış, birden çok çift bağ içerenlere çoklu doymamış yağ asitleri denilmektedir. Tekli doymamış yağ asidine örnek olarak oleik, çoklu doymamış yağ asidine örnek olarak linoleik verilmektedir (Semma, 2002). Tekli doymamış yağ asitleri vücudumuz tarafından sentezlenirken, çoklu doymamış yağ asitleri sentezlenememektedir.

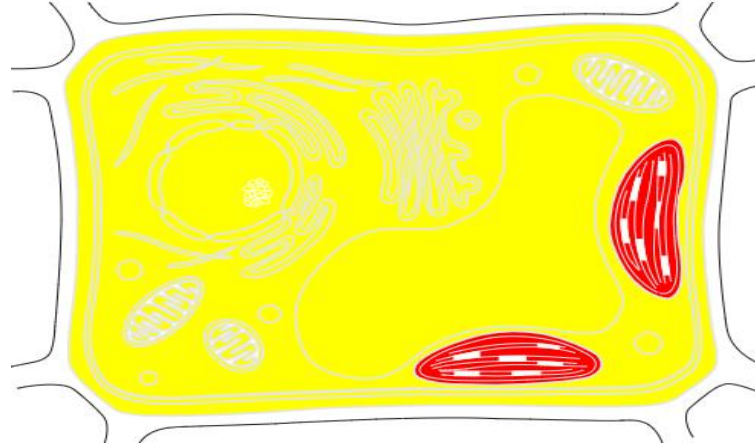
Esansiyel yağ asitleri son zamanlarda fonksiyonel gıda ve nutrasötikler olarak kabul edilmektedir. Yapılan birçok çalışmada, antitrombotik, antiaterojenik, antiinflamatuvar, antiaritmik etkileri nedeni ile kardiyoprotektif etki ile sonuçlanan birçok biyokimyasal yolda önemli rolleri kaydedilmiştir. Bu çalışmalarda esansiyel asitlerin, kardiyovasküler hastalıkların riskini azaltma potansiyeline sahip olduğu, kan basıncının düzenlenmesinde ve minerallerin metabolizmasında yer aldığını

bildirmişlerdir (Hu et al., 2001; Flachs et al., 2005; Weiss et al., 2005; Mišurcová et al., 2011; Mobraten et al., 2013).

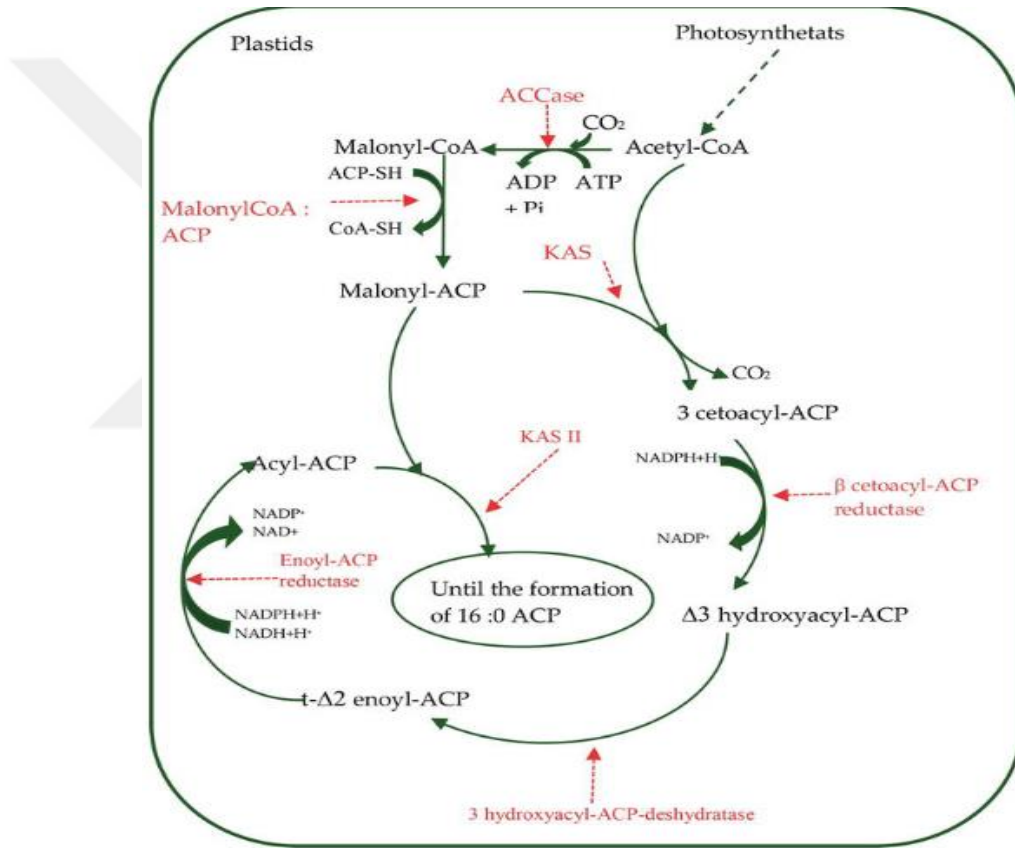
4.1. Bitkilerde Yağ Asidi Sentezi

Lipidlerin birçoğu bitkiler tarafından üretilmektedir. Bunlar arasından palmitik, oleik, linoleik ve linolenik asitler başlıca yağ asitleri arasında yer almaktadır (Fatiha, 2019; Taylor et al., 2009). Bitkilerde yağ asidi biyosentezi kloroplastlarda ve fotosentetik olmayan dokuların plastidlerinde meydana gelmektedir. Dünya ekonomisinde bitki lipidlerinin yeri oldukça önemlidir. İnsanlar tarafından kullanılan yağların çoğu tohumlardan ve meyvelerden elde edilen triağılglicerollerdir.

Bitkilerde yağ asidi sentezi fotosentezin ürünü olan asetil CoA'dan plastidlerde gerçekleşmektedir. Bitkilerde iki formu tanımlanmış olan asetil CoA karboksilaz ve bir multienzim kompleksi olan kloroplastların stomalarında yer alan yağ asidi sentazı yağ asidi oluşumu için gerekli iki enzim sistemini oluşturmaktadır (Roughan and Ohlrogge, 1996). Bu iki enzimden yağ asidi sentaz incelendiğinde; bitkilerde *acyl carrier protein (ACP)*, yağ asitlerinin asil CoA formunda olduğu diğer ökaryotik hücrelerden farklı olarak, yağ asidi sentazı için çeşitli ara maddeler için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (Guschina et al., 2014). Yağ asidi biyosentezi için ilk substratlar asetil CoA ve *malonil-ACP*'lerdir. Malonil parçasının CoA'dan ACP'ye transferi malonil CoA:ACP *transasilaz* tarafından katalize edilmektedir. Asetil CoA ve *malonil-ACP*'nin ilk yoğunlaştırılmasından sonra yağ asidi biyosentetik yolunun her aşaması için tüm ara ürünler *acyl-ACP*'lerdir. Yoğunlaşma reaksiyonu ile birlikte *B-ketoasil-ACP* sırası ile *B-ketoasil-ACP redüktaz*, *B hidroksiasil-ACP dehidrataz* ile indirgenme reaksiyonuna girmektedir. İki oksidasyon-redüksiyon reaksiyonun koenzimi *NADPH*'dir. Oluşan *bütiril-ACP*, *malonil-ACP* ile yoğuşmadan sonra iki C₂ daha uzatılacaktır. *B-ketoasil-ACP sentaz 1* bu reaksiyonu katalize etmektedir. Yedi tur döngü sonucunda *palmitoil-ACP* oluşur. Yağ asidi sentazının ürünü palmitik asit olmasına rağmen, kloroplastın stomalarında yaygın olan stearik ve oleik yağ asitleride sentezlenmektedir (Harwood, 1996).



Şekil 4. 1. Yağ asitlerinin hücredeki lokasyonu



Şekil 4. 2. Bitkilerde yağ asidi sentez yolağı (Fatiha, 2019)

Bitki bazlı yağlar, ürün türüne bağlı olarak palmitik asit (C16:0), stearik asit (C18:0), oleik asit (C18:1), linoleik asit (C18:2) ve linolenik olmak üzere beş yaygın yağ asidinden oluşur (Lambert, 2001). Doymuş yağ asitlerinin fazla alımı kan kolesterolünün yükselmesine neden olabilmektedir ve bu da kronik kalp hastalıkları riskinin artmasına neden olmaktadır (Ma et al., 2021). Bunun yanında doymamış yağ asitleri insan sağlığı için yararlıdır ve oleik asit kolesterol problemlerini azaltırken

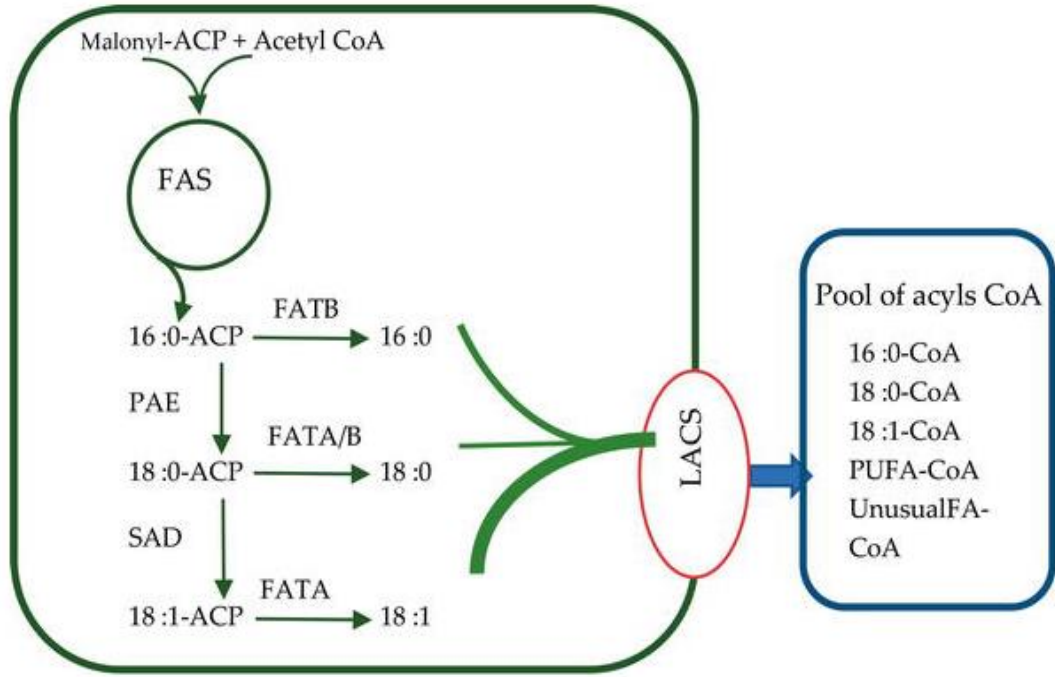
linoleik asit kanser önleyici özelliklere sahiptir (Li et al., 2011). Bunun için bitkilerde yağ asidi konsantrasyonu ve bileşimini belirleyen anahtar enzim tiyoesterazlar oldukça önemlidirler (Voelker, 1996).

Bitki kütikülü tüm epidermal hücrelerin yüzeylerini kaplayan lipofilik bir tabakadır (Holloway, 1982; Jeffree, 1996; Kunst et al., 2020). Kara bitkilerinin gelişimlerinin ilk aşamalarında hava yüzeyleri üzerinde hidrofobik bir bariyer oluştururken, stoma dışı su kaybını ve gaz alışverişini sınırlar, lipofilik bileşiklerin emilimini kontrol eder, viskoelastik özellik yanında mekanik dayanıklılık sağlar (Baker et al., 1982; Hoffmann et al., 1994; Riederer and Schreiber, 2001). Tüm bu özelliklerin yanında en önemli görevlerinden bir tanesi de bitkilere çevreden gelen biyotik ve abiyotik stres etkenlerinden korumasıdır (Schweizer et al., 1996). Kütin matrisi esasen stearik (C16) ve linoleik (C18) hidroksi ve epoksi yağ asidi monomerlerinden oluşurlarken küçük miktarlarda aromatik bileşiklerde bulundurulur (Heredia, 2003; Kolattukudy, 1980).

4.2. Acyl- Acyl Carrier Protein (ACP) Tiyoesterase

Bitki *Acyl- Acyl Carrier Protein (ACP) tiyoesterazları (TE)*, *acyl-ACP tiyoester* bağlarını hidrolize eden serbest yağ asitlerini ve *ACP*'yi serbest bırakan 8 ila 18 karbon arasında farklılık gösteren zincir uzunluğuna sahip proteinlerdir. Aktiviteleri plastidyal yağ asidi biyosentezi yolundaki son adımı oluşturmaktadır (Mayer and Shanklin, 2005).

Yağ asidi *TE*'ları amino asit sekanslarına ve substrat tercihlerine göre *FATA* ve *FATB* olarak ikiye ayrılmaktadır (Voelker, 1997; Bonaventure et al., 2003; Moreno et al., 2011). Substrat spesifikliğı *acyl* zincirlerinin ne zaman salındığını belirlemede önemli rol oynamaktadır (Aznar et al., 2018). Ayrıca depolama lipidlerinin bileşimlerinin belirlenmesinde *TE*'ların substrat tercihlerinin rolü olduğu bildirilmiştir (Voelker et al., 1992; Hills, 1999; Mayer and Shanklin, 2005; Voelker, 1996). *FATA* sınıfı tiyoesterazları uzun zincirli *acyl-ACP*'ler (C18:1-*ACP*) üzerinde en yüksek aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. *FATB* sınıfı tiyoesterazlar, doymuş yağlı *acyl* (C16:0-*ACP*) zincirleri ile *acyl-ACP*'leri hidrolize etmektedirler. Ayrıca *FATB* C18:1-*ACP*, ardından C18:0-*ACP* ve C16:1-*ACP* ile önemli ölçüde aktiviteye sahiptirler (Dormann et al., 1995; Voelker et al., 1997; Salas and Ohlrogge, 2002).



Şekil 4. 3. Bitkilerde yağ asitlerinin plastiddan sitozole geçişinin şematik gösterimi. ACC (asetil CoA karboksilaz), ACP (acyl taşıyıcı protein), FA (yağ asidi), CoA (koenzim A), FAS (yağ asidi sentazı), FATA/B (yağlı acyl-ACP tioesteraz A/B), LACS (uzun zincirli acyl CoA sentaz), PAE (palmitoil-ACP uzama), SAD (stearoil-ACP desatüraz) (Fatiha, 2019)

5. MATERYAL METHOD

FATB genlerinin domates bitkisinde tanımlanması amacı ile ilk olarak in siliko analizler yapılmış daha sonrasında moleküler çalışmalara ve ardından da doku kültürü çalışmalarına geçilmiştir.

5.1. İn Siliko Analizler

5.1.1. *FATB* Gen Ailesinin Filogenetik Analizi, İntron Ekzon Yapısı Ve Motif Analizi

Domates bitkisinde bulunan *FAT* (*Solyc05g008570*, *Solyc12g006930*, *Solyc06g083380* ve *Solyc03g097390*) genleri arasındaki evrimsel ilişkileri karakterize etmek için filogenetik analizler yapılmıştır. Filogenetik analiz için gerekli olan *FAT* genlerinin protein dizilerini bulmak için Phytozome V13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) veri tabanından yararlanılmıştır. MEGAX yazılımında yer alan ClustalW2 kullanılarak amino asit dizileri hizalanmıştır.

Domates ve diğer model bitkilerde *FATB* genlerinin benzerliklerini karşılaştırmak amacı ile *Arabidopsis thaliana*, *Glycne max* ve *Solanum tuberosum* bitkilerine ait *FAT* genlerinin protein dizileri Phytozome V13 veri tabanından alınmıştır. MEGAX yazılımında yer alan ClustalW2 kullanılarak amino ait dizileri hizalanmıştır. MEME Suite, *FAT* genlerinde korunan motifleri bulmak için kullanılmıştır. Son olarak bulunan intron-ekson yapıları, korunmuş motifleri ve domeinleri TbTools (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) yazılımında yer alan “Gene Structure View” ile şematize edilmiştir.

5.1.2. *FAT* Genlerinin Bitkilerde Hücresel Lokasyonu

Solyc03g097390 ve *Solyc12g006930* genlerinin domatesteki ifadelerinin bitkinin en çok hangi dokusunda olduğunu belirlemek amacı ile “Plant Electronic Fluorescent Pictograph” (<https://bar.utoronto.ca/>) proramından yararlanılmıştır.

5.1.3. *FAT* Genlerinin Kromozomlar Üzerindeki Lokasyonu

Solyc05g008570, *Solyc12g006930*, *Solyc06g083380* ve *Solyc03g097390* genlerinin kromozomlar üzerindeki lokalizasyonları “Plant Electronic Fluorescent Pictograph” ile şematize edilmiştir.

5.1.4. miRNA Analizi

Domateste *Solyc12g006930* ve *Solyc03g097390* genlerinin promotör bölgelerini hedefleyen miRNA'ları bulmak için psRNATarget (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/home>) programı kullanılmıştır. Bu iki genin sekansları psRNATarget programına yüklenerek bu proteinleri hedef alan miRNA'lar saptanmıştır.

5.1.5. Domateste Bulunan FAT GProtein Protein Etkileşimleri

Domateste bulunan tüm *FAT* (*Solyc05g008570*, *Solyc12g006930*, *Solyc06g083380* ve *Solyc03g097390*) genlerinin protein sekansları phytozome veri tabanından indirilerek “STRING” (<https://string-db.org/>) veri tabanına yüklenmiş ve protein-protein etkileşimleri incelenmiştir. Analiz sırasında güvenilirlik skoru 0.7 olarak seçilmiştir.

5.2. Bitki Materyali ve Doku Kültürü Ortamı

Bu deneyde domatesin crocker çeşidi kullanılmıştır. Domates tohumları Syngenta tohum firmasından temin edilmiştir. Eksplant kaynağı olarak kotiledonlar kullanılmıştır. Tohumlar ilk olarak çimlendirme ortamında çimlendirilmiş, kotiledonları kesildikten sonra ön kültür ortamına alınmış, transformasyondan sonra ise kokültüvasyon besin ortamına alınmıştır. Daha sonra transgenik bitkilerin eldesi için seleksiyon ortamı kullanılmıştır. Son olarak elde edilen bitkicikler köklendirme ortamına alınmıştır. Çalışma boyunca kullanılan tüm besi ortamı içerikleri tabloda verilmiştir.

Tablo 5. 1. Crocker çeşidinin doku kültüründe kullanılan besin ortamı ve içeriği.

Kimyasallar	ÇO	ÖK	KKO	SO	KO
Murashige and Skoog media (g/L)	2.2	4.4	4.4	4.4	4.4
Sükroz (g/L)	20	30	30	30	20
Phytigel (g/L)	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
Benzil adenin (g/ml)	-	3	3	3	-
İndol asetik asit (g/ml)	-	0.1	0.5	0.5	0.1
Higromisin (g/ml)	-	-	-	15	15
Timentin (g/ml)	-	-	-	160	160
Asetoşiringon (mM)	-	-	100	-	-

ÇO (çimlendirme ortamı), ÖK (ön kültür ortamı), KKO (kokültüvasyon ortamı), SO (seleksiyon ortamı), KO (köklendirme ortamı)

5.3. Kullanılan Bakteri Suşları Ve Besi Ortamları

Bu çalışmada gen klonlama uygulamalarında *Escherichia coli* (*E. coli*) ve gen aktarım uygulamalarında da *Agrobacterium tumefaciens* bakterileri kullanılmıştır. *E. coli* bakterisinin suşu *DH5α* iken, *A. tumefaciens* bakterisinin suşu *GV3101*'dir. Kullanılan besin ortamları tabloda verimiştir.

Tablo 5. 2. Deney boyunca kullanılan bakteri suşları ve dirençli oldukları antibiyotikler

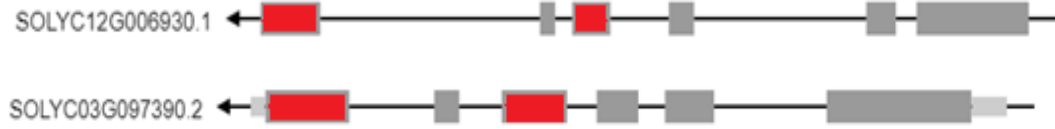
Kimyasallar	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Agar (g/L)	15	15
Luria broth (LB) (g/L)	20	20
Gentamisin (g/ml)	-	30
Rifamisin (g/ml)	-	10
Kanamisin (g/ml)	50	50

5.4. Crispr/Cas9 Bitki İfade Vektörünün (Phse401) Oluşturulması Ve Bitkiye Transferi

CRISPR/Cas9 aralı hedef genlerde oluşturulacak mutasyon için vektör olarak pHSE401 plazmiti kullanılmıştır. Plazmit Addgene'den (<https://www.addgene.org/>) spariş verilmiştir.

5.4.1. gRNA'ların Dizayn Edilmesi

Lipid karbon zinciri uzunluğunun belirlenmesinde görev alan *fatty acyl-ACP thioesterase B* (*FATB- Solyc03g097390.3.1*), *Palmitoyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase* (*Solyc12g006930.2.1*) genlerinin CRISPR/Cas9 ile susturulmasında ilk olarak CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>) kullanılarak her iki gen için 4 ayrı gRNA (gRNA5, gRNA13, gRNA16 ve gRNA19) tasarlanmıştır. *Solyc12g006930* ve *Solyc03g097390* genlerinin her ikisinde altı ekzonu bulunmaktadır. *Solyc12g006930* geninde mutasyon oluşturmak üzere dizayn edilen gRNA'lardan gRNA5 1. ekzona, gRNA13 3. ekzona dizayn edilmiştir. *Solyc03g097390* genine dizayn edilen gRNA'lardan gRNA16 1. ekzona, gRNA19 3. ekzona dizayn edilmiştir (Şekil 5.1). Tasarlanan gRNA'lar tabloda verilmiştir. gRNA'ların hedefe yönelik mutasyon etkinliği gRNA5'de 0.773, gRNA13'de 0.662, gRNA16'da 0.505 ve gRNA19'da 0.485'dir. Seçilen gRNA'ların GC içerikleri ise gRNA5'de %45, gRNA13'de %50, gRNA16 ve RNA19'da %35 dir. gRNA'ların ikincil yapısının literatürde belirtildiği şekilde olmasına dikkat edilmiştir.



Şekil 5. 1. *Solyc12g006930* ve *Solyc03g097390* genlerine dizayn edilen gRNA'ların bulunduğu ekzonlar

Tablo 5. 3. Klonlamada kullanılmak üzere seçilen gRNA'lar

Gen	gRNA
Solyc12g006930.2.	gRNA 5: CTGGAAGTATAGATACACGG gRNA 13: CCTCCGCGATAGTAATACTG
Solyc03g097390.3.1	gRNA 16: GGAAATGTAGTAATTGAACC gRNA 19: ACATCATCACAAAAGCAACA

Tabloda verildiği şekilde senteze gönderilen gRNA'lar arasından gRNA 19'un reverse komplementeri (TGTTGCTTTTGTGATGATGT) alınarak senteze gönderilmiştir.

Tablo 5. 4. pHSE401 vektörüne klonlanmak üzere yapılacak olan üç ayrı PCR için sentezlenen diziler

Primer adı	Sekans	PCR
DT1-BsF: g5FATB(...6930.1)	5'- aataatggctctctattgctggaagtatagatacacgggtt-3'	DT1-PCR PCR 1 gRNA1
DT1-F0: g5FATB(...6930.1)	5'- tgctggaagtatagatacacgggttttagagctagaaatagc -3'	DT1-PCR PCR 1 gRNA1
DT2-BsF2: g13FATB(...6930.1)	5' aataatggctctctagattgcctccgcgtagtaatactggtt 3'	DT2-PCR PCR2 gRNA2
DT2-F0: g13FATB(...6930.1)	5'- tgcctccgcgtagtaatactggttttagagctagaaatagc -3'	DT2-PCR PCR2 gRNA2
DT3-BsF3: g16FATB(...7390)	5'- aataatggctctctgtgattgggaaatgtagtaattgaaccgtt -3'	DT2T3-PCR3 gRNA3 gRNA4
DT3-F0: g16FATB(...7390)	5'- tg ggaatgtagtaattgaaccgttttagagctagaaatagc -3'	DT2T3-PCR3 gRNA3 gRNA4
DT4-R0: g19FATB(...7390)	5': 5'- aac tgttgcttttgtgatgatgtcaatcactacttcgactctagctgtat -3'	DT2T3-PCR3 gRNA3 gRNA4
DT4-BsR: g19FATB(...7390)	5'- attattggctctctaaac tgttgcttttgtgatgatgt-3'	DT2T3-PCR3 gRNA3 gRNA4

Seçilen gRNA'lar Xing'in (Xing et al., 2014) çalışma protokolüne göre T1T2- T2T3- T3T4 vektörlerinden promotör, gRNA skaffold ve terminatörü PCR'da çoğaltacak şekilde gRNA'ların başına ve sonuna birkaç baz eklenerek (tablo) senteze gönderilmiştir. Sentezden gelen diziler ilk olarak sentez protokolünde belirtildiği şekilde sulandırılmıştır. DT1T2 (10 ng) vektörü, DT1-BsF (20 µM) ve DT1-F0 (1 µM) dizileri kullanılarak yapılan ilk PCR'da; gRNA5, gRNA skaffold, terminatör (U6-26t) ve promotörden (U6-29p) oluşan bir fragment elde edilmiştir. DT2T3 (10 ng) vektörü, DT2-BsF2 (20 µM) ve DT2-F0 (1 µM) dizileri kullanılarak yapılan ikinci PCR'da; gRNA13, gRNA skaffold, terminatör (U6-29t) ve promotörden (U6-1p) oluşan bir fragment elde edilmiştir. DT3T4 (10 ng) vektörü DT3-BsF3 (20 µM), DT3-F0 (1 µM), DT4-R0 (1 µM) ve DT4-BsR (20 µM) dizileri kullanılarak yapılan üçüncü PCR'da

gRNA16, gRNA skaffold, terminatör (U6-1t), promotör (U6-26p), gRNA19 ve gRNA skaffolddan oluşan bir fragment elde edilmiştir. PCR’da “Iproof High-Fidelity DNA Polymerase” kullanılmıştır.

Tablo 5. 5. DT1-PCR Reaksiyon İçeriği

Bileşenler	50 µl reaksiyon
5X Iproof Reaction Buffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
DT1-BsF: guide5 <i>FATB</i> (20 µM)	1 µl
DT1-F0: guide5 <i>FATB</i> (1 µM)	1 µl
BsR2	1 µl
DT1T2 (10 ng)	0.5 µl
Iproof High-Fidelity DNA Polymerase	0.5 µl
Nükleazsız Su	35 µl

Tablo 5. 6. DT2-PCR Reaksiyon İçeriği

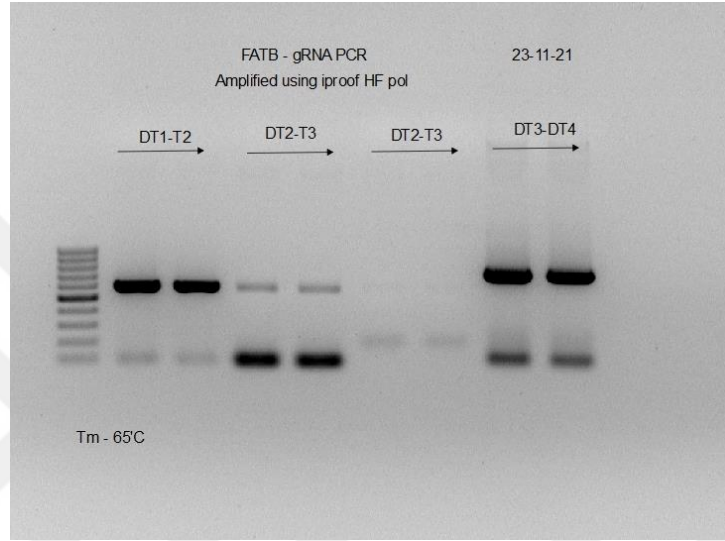
Bileşenler	50 µl reaksiyon
5X Iproof Reaction Buffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
DT2-BsF2: guide13 <i>FATB</i> (20 µM)	1 µl
DT2-F0: guide13 <i>FATB</i>	1 µl
BsR2	1 µl
DT2T3 (10 ng)	0.5 µl
Iproof High-Fidelity DNA Polymerase	0.5µl
Nükleazsız Su	35 µl

Tablo 5. 7. DT3T4-PCR Reaksiyon İçeriği

Bileşenler	50 µl reaksiyon
5X Iproof Reaction Buffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
DT3-BsF3: guide16 <i>FATB</i> (20 µM)	1 µl
DT3-F0: guide16 <i>FATB</i> (1 µM)	1 µl
DT4-R0: 5': guide19 <i>FATB</i> (1 µM)	1 µl
DT4-BsR: guide19 <i>FATB</i> (20 µM)	1 µl
R0	1 µl
DT3T4 (10 ng)	0.5 µl
Iproof High-Fidelity DNA Polymerase	0.5 µl
Nükleazsız Su	34 µl

Tablo 5. 8. PCR reaksiyon koşulları

Adımlar	Sıcaklık	Süre
İlk denaturasyon	98°C	2 dakika
Denaturasyon	98°C	10 saniye
Bağlanma	65 °C	30 saniye
Uzama	72°C	1 dakika
Son uzama	72°C	7 dakika
Sıcaklık	4°C	∞



Şekil 5. 2. DT1-T2, DT2-T3 ve DT3-T4 fragmentlerinin agaroz jel görüntüsü

DT1-PCR - DT2-PCR - DT3T4-PCR2 fragmentleri %0.6'lık jelde yürütülmüştür. Daha sonra golden gate klonlamada kullanılmak üzere jelden alınarak “FavorPrep GEL/PCR purification kit” protokolüne göre ekstrakte edilmiştir.

5.4.2. Golden Gate Reaksiyonu

Birden fazla gRNA'yı pHSE401 vektörüne klonlamak için palindromik olmayan yapışkan uçlar oluşturan BSA 1 kesim enzimi kullanılmıştır. Yukarıda verildiği şekilde PCR'da oluşturulan üç ayrı fragmentin jelden ekstraksiyonu yapıldıktan sonra pHSE401 vektörüne klonlanması için yapılan PCR tabloda verilmiştir. PCR ürünleri, BSA 1 kesim enzimi ve ligazın bir tüpe koyularak üç fragmentin pHSE401 vektöründe birleşmesi sağlanmıştır.

Tablo 5. 9. Golden gate klonlamanın PCR bileşenleri

Bileşenler	Hacim 20 µl
PCR Ürünü jel 1 (30 ng)	2 µl
PCR Ürünü jel 2 (30 ng)	7 µl
PCR Ürünü jel 3 (30 ng)	2 µl
pHSE401 plazmit 100 ng	2 µl
10X BSA	1.5 µl
10X T4 DNA Ligaz Buffer	1.5 µl
BsaI Enzim	1 µl
T4 DNA Ligaz	2.5 µl
Nükleazsız Su	0.5 µl

Tablo 5. 10. PCR koşulları

Temperature	Time
37°C	5 dk 30x
16°C	5 dk 30x
55°C	5 dk
80°C	5 dk
4°C	∞
Kapak sıcaklığı 90 °C	

Golden gate klonlama sonucunda pHSE401 vektöründe her bir gRNA için promotör, skaffold ve terminatör mevcut olmuştur. Gen kaseti (U6-26p)-(gRNA1)-(gRNA-Skafold)-(U6-26t)-(U6-29p)-(gRNA2)-(gRNA-Skafold)-(U6-29t)-(U6-1p)-(gRNA3)-(gRNA-Skafold)-(U6-1t)-(U6-26p)-(gRNA4)-(gRNA-Skafold)-(U6-26t) şeklindedir.

5.4.3. Kompetan *E. Coli* Hücrlerinin Hazırlanması

Escherichia coli (*E. coli*)'nin *DH5α* suşundan 10 µl alınarak çizgi ekim tekniği ile LA besi ortamına ekilmiştir. Bir gece inkübatörde büyümeye bırakılmıştır. Ertesi gün tek kolonilerden alınarak 10 ml sıvı LB içerisine ekimi yapılmıştır. Bir gece 37 °C 200 rpm'de büyümeye bırakılmıştır. Ertesi gün bakteriden 1 ml alınarak 100 ml LB içerisine eklenmiştir. OD₆₀₀ 0,6 olunca bakteri buzun üzerine alınarak 15 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra bakteri falkonlara alınarak +4°C'de 3500 rpm'de 5 dakika sanrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra falkonlardaki üst faz dökülür ve daha önceden hazırlanıp buzda bekletilmiş olan tampon 1'den 5 ml alınarak her bir falkon üzerine eklenir ve bakteri iyice çözdürülmüştür. Tekrar +4°C'de 3500 rpm'de 5 dakika sanrifüj yapılır, üst faz atılır ve tampon 2'den her bir falkona 2 ml eklenmiştir. Bakteri iyice çözdürüldükten sonra daha önceden buz üzerinde bekletilen 1.5 ml'lik tüplere 100 ml olacak şekilde dağıtılır. 15-30 dakika buz üzerinde bekletilir ve sıvı nitrojenle dondurulduktan sonra -80°C'de depolanmıştır.

Tablo 5. 11. Kompetan *E.coli* hücrelerinin hazırlanmasında kullanılan ilk tampon

Tampon 1	
Potasyum asetat	10 mM
RuCl ₂	100 mM
CaCl ₂	10 mM
Gliserol	8.6 ml
dH ₂ O	50 ml'ye tamamlanmıştır

Tablo 5. 12. Kompetan *E.coli* hücrelerinin hazırlanmasında kullanılan ikinci tampon

Tampon 2	
MOPS	10 mM
RuCl ₂	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Gliserol	8.6 ml
dH ₂ O	50 ml'ye tamamlanmıştır

Tampon 2'nin pH'sı 6.5'e ayarlanmıştır. Tamponların her ikisinde de filtre sterilizasyonu yapılarak kullanıma kadar +4°C'de bekletilmiştir. Kullanım sırasında tamponların buz içerisinde tutulması gerekmektedir.

5.4.4. Vektörün *DH5α* (*E. Coli*) Bakterisine Isı Şoku Yöntemi İle Transferi

Golden gate klonlama aşaması tamamlandıktan sonra elde edilen Phse401 vektörü *E. coli*'nin bir suşu olan *DH5α* bakterisine ısı-şoku yöntemi ile transformasyonu yapılmıştır. Transformasyon için ilk olarak -80'de stok olarak bulunan kompetan *E. coli* çıkarılarak buz üzerinde 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra

bakterinin içerisine 2 µl vektör koyularak 42°C su banyosunda 45 saniye bekletilmiştir. 42°C'den hızla alınan bakteri 5 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. 5 dakikanın ardından içerisine 300 µl SOC besin ortamı eklenerek 37°C'lik inkübatörde 2 saat büyütülmüştür. Transformasyon sonrasında bakteriler 50 mg/L kanamisin içeren katı LB besiyerine yayılarak 1 gece 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

SOC besin ortamında %2 tryptone, %5 yeast extract, 10 mM NaCl, 25 mM KCl hazırlanarak 121°C'de 20 dakika otoklavda sterilizasyonu yapılmıştır. 10 mM MgCl₂ ve 20 mM glukoz stok olarak hazırlandıktan sonra filtre sterilizasyonu yapılmıştır. Otoklavda çıkan otamın üzerine 10 mM MgCl₂ ve 20 mM glukozdan eklenmiştir. Kullanıma kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

5.4.5. Koloni PCR

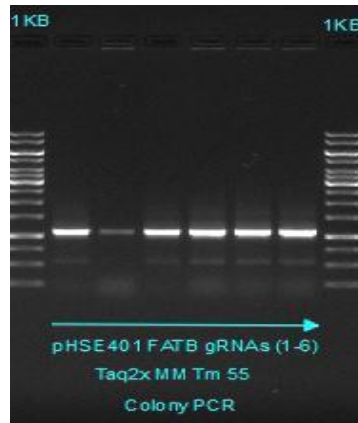
Isı şokundan sonra besi ortamında çıkan kolonilerden seçilerek U6-29p-F, U6-1t-R primerleri ile koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR bileşenleri tabloda verilmiştir.

Tablo 5. 13. Koloni PCR bileşenleri

Koloni PCR Bileşenleri	
Taq 2 MM	12.5 µl
U6-29p-F	1 µl
U6-1t-R	1 µl
Koloni	2 µl
Su	8.5 µl

Tablo 5. 14. Koloni PCR koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre
İlk denatürasyon	95	2.00 dakika
Denatürasyon	95	30 saniye
Bağlanma	55	30 saniye
Uzama	68	70 saniye
Son uzama	68	5 dakika



Şekil 5. 4. U6-29p-F, U6-1t-R primerleri kullanılarak yapılan PCR'ın agaroz jel görüntüsü

5.4.6. Plazmit İzolasyonu

Koloni PCR sonucu pozitif çıkan kolonilerden alınarak içerisinde 50 mg/L kanamisin bulunan sıvı LB içerisine ekimi yapılmıştır. Bir gece 37°C 200 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır OD₆₀₀ 0.6-0.8 aralığında olan bakteriden alınarak “Favorgen Plasmid DNA Extraction Mini Kit” protokolü takip edilerek plazmid izolasyonu yapılmıştır.

5.4.7. Restriksiyon Enzimi İle Kesim (Hind III)

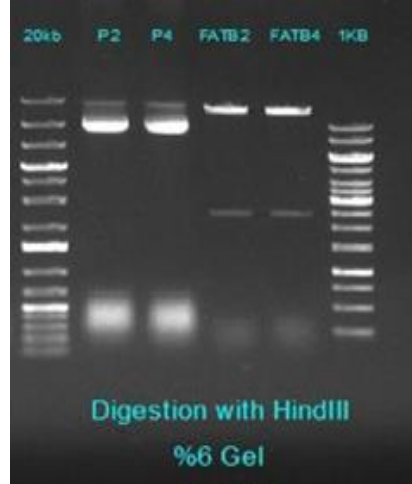
Plazmit izolasyonundan sonra doğrulama yapmak için Hind III kesim enzimi ile plazmit kesilmiştir. Hind III kesim enziminin PCR koşulları tabloda verilmiştir.

Tablo 5. 15. Hind III ile kesimin PCR bileşenleri

PCR bileşenleri	
10X Buffer R	2 µl
Hind III	2 µl
Plazmit (50 ng)	11.5 µl
Su	4.5 µl

Tablo 5. 16. Hind III ile kesimin PCR koşulları

Sıcaklık	Süre
37°C	2 saat
80°C	20 dakika
4°C	∞



Şekil 5. 5. Hind III ile kesim reaksiyonunun agaroz jel görüntüsü. P2 ve P4 kesilmemiş plazmit, FATB2 ve FATB4 Hind III ile kesilen plazmitler

5.4.8. Hazırlanan Vektörün Sanger Dizileme İle Doğrulanması

Hind III kesim enzimi ile doğrulanmış olan plazmidler dizilemeye gönderilmiştir. Dizileme U6-1t-Rv (AACGGACCAATCACTTTGTCTTAGC), U6-

29p-Rv (AGCCCTCTTCTTTTCGATCCATCAAC) ve U6-1t-Fw (GCTAAGACAAAGTGATTGGTCCGTT) primerleri ile tek yönlü yapılmıştır. Dizileme sonucunda plazmit doğrulanmıştır.

5.5. pHSE401 Vektörünün *Agrobacterium tumefaciens*'e (GV3101) Transformasyonu

5.5.1. Kompetan *Agrobacterium tumefaciens* Bakterisinin Hazırlanması

Boş GV3101'den 10 ml alınarak sıvı LB besin ortamına eklenmiş ve 1 gece 28°C'de 200 rpm'de büyütülmüştür. Ertesi gün büyüyen bakteriden alınarak 500 ml LB besin ortamına ekimi yapılmıştır. 28°C'de 200 rpm'de OD₆₀₀ 0.6-0.8 olana kadar büyütülmüştür. Büyüyen bakteri buz üzerine alınarak büyümeleri durdurulmuştur. 4000 g de 4°C'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Üst faz atılarak pellet üzerine 10 ml steril soğuk su eklenmiştir. Pellet pipetaj yapılarak yavaş yavaş çözdürülmüştür. Üzerine 500 ml soğuk steril su eklenerek tekrar 4000 g de 4°C'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Bu aşama iki kez daha tekrarlanmıştır. Üst faz dökülerek pellet üzerine 50 ml steril soğuk su eklenip çözdürülmüştür ve 4000 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Üst faz uzaklaştırılıp pelletin üzerine 5 ml %10'luk steril soğuk gliserol eklenerek pipetaj yapılmıştır. Daha önceden buz üzerinde bekletilen 1.5 ml'lik tüplere bakteri 50 ml olacak şekilde koyulmuştur. Tüpler sıvı nitrojen ile dondurulduktan sonra -80'de depolanmıştır.

5.5.2. Vektörün Elektroporasyon ile *Agrobacterium tumefaciens* Bakterisine Transformasyonu

Sekans sonucu doğru olan plazmid elektroporasyon ile *Agrobacterium tumefaciens* bakterisine atılmıştır. Elektroporasyon için ilk olarak -80'de stok olarak bulunan bakteri çıkarılarak 10 dakika buz içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra bakterinin üzerine 2 µl (500-600 ng) plazmid koyulmuştur. Parmakla yavaşça birkaç kere vurduktan sonra pipet ile çekilerek elektroporator küvetinin içerisine koyularak elektroporator cihazına yerleştirilmiş ve akım verilmiştir. Akım verilmesinin hemen ardından üzerine 900 µl soğuk LB eklenmiştir. 2 saat boyuca 28°C'de büyütüldükten sonra 10 mg/L rifamisin, 30 mg/L gentamisin ve 50 mg/L kanamisin içeren katı LB besiyerine koyularak 28°C'de 2 gün büyütülmüştür.

5.5.3. Koloni PCR

Elektroporasyondan sonra 10 mg/L rifamisin, 30 mg/L gentamisin ve 50 mg/L kanamisin içeren katı LB besin ortamında iki gün boyunca 28°C’de büyütülen bakteriden çıkan koloniler alınarak koloni PCR yapılmıştır.

Tablo 5. 17. Elektroporasyondan sonra yapılan koloni PCR’ın bileşenleri

Koloni PCR Bileşenleri	Miktar (µl)
Taq 2 MM	12.5
U6-29p-F	1
U6-1t-R	1
Koloni	2
Su	8.5

Tablo 5. 18. Elektroporasyondan sonra yapılan koloni PCR’ın koşulları

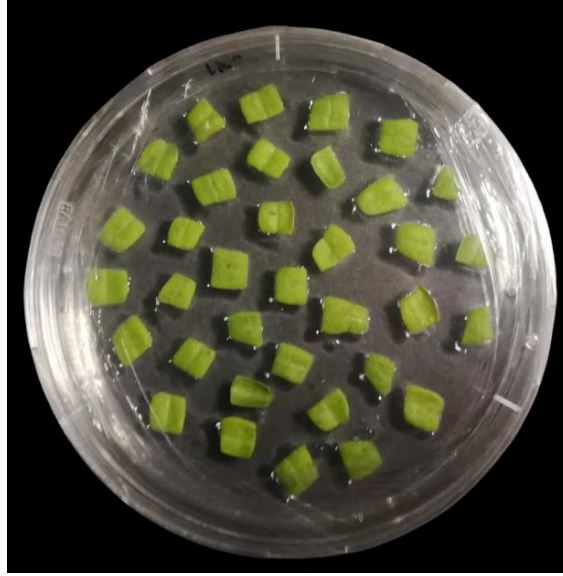
	Sıcaklık (°C)	Süre
İlk denatürasyon	95	5.00 dakika
Denatürasyon	95	30 saniye
Bağlanma	55	30 saniye
Uzama	68	70 saniye
Son uzama	68°C	5 dakika

5.5.4. Domates Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu

Steril kabin içerisinde tohumlar ilk olarak çeşme suyu ile birkaç defa yıkanmıştır, %70’lik alkol içerisinde 20 saniye boyunca bekletilmiştir. Ardından %20 çamaşır suyu içeren steril saf suda 18 dakika boyunca çalkalanmıştır. Çamaşır suyundan arındırmak için beş kez saf su ile durulama yapılmıştır. Sterilizasyonu biten tohumlar bir kurutma kağıdı üzerinde bekletilerek kurumaları sağlanmıştır. Kuruyan tohumlar daha önceden hazırlanmış half ms ve half şekerden oluşan ortama ekilmiştir.

5.5.5. Bitki Kotiledonlarının Hazırlanması

Yaklaşık 8-10 gün sonra bitkinin kotiledonları uygun boyuta ulaştıklarında 0.5 cm çapında kesilerek 3 mg/L benzil adenin, 0,1 mg/L indol asetik asit ve 100 mM asetoşiringondan oluşan ön kültür ortamına alınmıştır. Yapraklar besin ortamına düz bir şekilde koyulmuş ve ortam ile her yerinin temas halinde olması sağlanmıştır. Eksplantlar yaklaşık olarak 12-18 saat arasında ön kültür ortamında bekletilmiştir. Ön kültür ortamında bekletilen eksplantlar şekil 5.6’da verilmiştir.



Şekil 5. 6. Domates yapraklarının *Agrobacterium tumefaciens* ile inokülasyonundan 12-18 saat önce kesilip ön kültür ortamında bekletilmesi

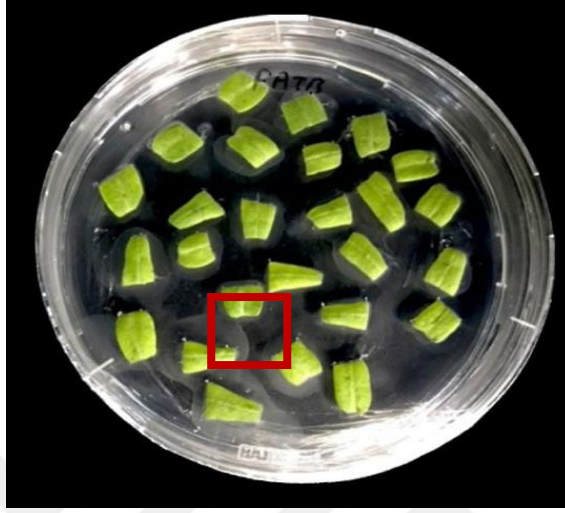
5.5.6. *Agrobacterium tumefaciens* Bakterisinin Transformasyona Hazırlanması

Bakteri, 10 mg/L rifamisin, 30 mg/L gentamisin ve 50 mg/L kanamisin içeren sıvı LB besiyerinde bitki eksplantlarına transformasyonu yapılmak üzere bir gece büyütülmüştür. OD₆₀₀ 1 olan bakteriden 10 ml alınarak içerisine 10 mg/L rifamisin, 30 mg/L gentamisin, 50 mg/L kanamisin ve 100 mM asetoşirington eklenerek OD₆₀₀ 0.6 olana kadar büyütülmüştür. OD₆₀₀ 0,6 olunca 3000 g'de 5 dakika çöktürülmüştür. Süpernatant atılmış peletin üzerine 1 ml LB koyularak iyice çözündürülmüştür. Bu aşama ile bakteri explantlar ile muamele için hazır hale getirilmiştir.

5.5.7. *Agrobacterium tumefaciens* İle Domates Yapraklarının İnokülasyonu

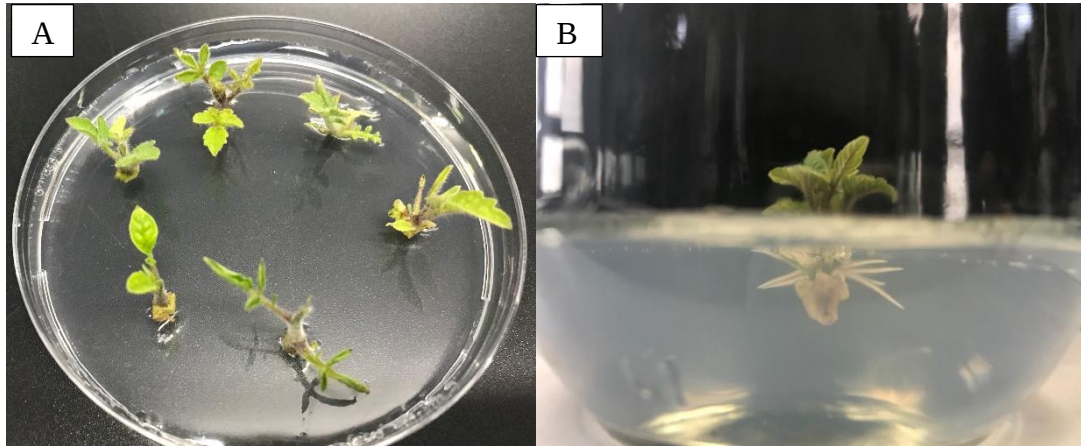
Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan bakteri 50 ml sıvı MS üzerine dökülür ve bir gece önceden kesilerek ön kültür ortamında bekletilen explantlar ile bir beher içerisinde birleştirilerek muamele sağlanmıştır. *Agrobacterium*'un bitki ile iyice temas etmesi için 10 dakika boyunca sürekli çalkalama yapılmıştır. Çalkalama işlemi bittikten sonra explantlar 3 mg/L benzil adenin, 0,5 mg/L indol asetik asit ve 100 mM asetoşirington içeren ko-kültivasyon ortamına alınmış ve 2 gün boyunca karanlıkta bekletilmiştir. İki gün sonra bakterinin ölmesi için 100 ml sıvı MS içerisine 320 mg/L timentin eklenmiş ve bitkiler MS içerisine alınarak 10 dakika boyunca çalkalanmıştır. İkinci olarak 50 ml sıvı MS içerisine sefotaksin eklenmiş ve timentinli ortamdan alınan explantlar 10 dakikada bu ortamda çalkalanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra

explantlar kurutma kağıdı üzerine alınarak kurutulmuştur. Önceden hazırlanmış 3 mg/L benzil adenin, 0,5 mg/L indol asetik asit, 100 mg/L askorbik asit, 10 mg/L higromisin, 160 mg/L timentin, 125 mg/L sefotaksin içeren seleksiyon ortamına eksplantlar alınmıştır.



Şekil 5. 7. Eksplantların etrafında bakterilerin oluşturduğu zonlar

Explantlar ilk 3 hafta boyunca 3 mg/L benzil adenin, 0,5 mg/L indol asetik asit, 100 mg/L askorbik asit, 10 mg/L higromisin, 160 mg/L timentin, 125 mg/L sefotaksin içeren seleksiyon ortamında tutulmuştur. Oluşan kallusların büyüklüğüne göre bu süre uzatılabilir ya da azaltılabilir. Bitkicik oluşmasını uyarmak için benzil adenin 2 mg/L 'ye düşürülürken indol asetik asit 0,1 mg/L'ye düşürülmüştür. Kalluslar ve oluşan kararmalar sürekli temizlenerek bitkicikğin oluşması sağlanmıştır. Bitkicik oluşuktan sonra kallustan tamamen temizlenmiş 0,5 mg/L indol asetik asit, 15 mg/L higromisin ve 160 mg/L timentinden oluşan köklendirme ortamına alınmıştır.



Şekil 5. 8. A. seleksiyon ortamında elde edilen bitkicikler, B. bitkicikğin köklendirme ortamında kök oluşturması

5.6. Elde Edilen Bitkilerin Sera Koşullarına Alıştırılması

Bitki köklenip yeterli büyüklüğe ulaştıktan sonra köklerine zarar vermeden dikkatlice torf ve toprağın eşit oranda karıştırılarak hazırlandığı saksıya alınmıştır. İlk sulama yaptıktan sonra bitkinin saksıda dış koşullara alışmasını sağlamak için saksı üzerine poşet geçirilerek nemi tutması sağlanmıştır. Her gün on dakikalık bir havalandırma yapmak üzere bitki üzerindeki poşet açılmıştır. Dış ortam koşullarına alıştığından emin olduğumuz bitkinin üzerinden poşet tamamen kaldırılmıştır.



Şekil 5. 9. Dış ortam koşullarına alıştırılan domates bitkisi

5.6.1. Hoagland Besin Solüsyonu İçeriği

Hoagland tabloda belirtildiği şekilde hazırlanmış, sonra pH 5.8'e ayarlanmış ve 121°C'de 20 dakika otoklavda sterilizasyonu sağlanmıştır. Otoklavdan çıkarılıp soğutulduktan sonra içerisine FeEDTA eklenmiştir. Serada yetiştirilen bitkilere haftada bir hoagland besin eriyiğinden 50 ml verilmiştir. Bitki üzerinde meyveler oluşmaya başlayınca hoagland miktarı 100 ml'ye çıkarılmıştır.

Tablo 5. 19. Hoagland besin solüsyonu hazırlanışı

Kompozisyon	Stok solüsyon	Kullanılan (ml/L)
MgSO ₄ 7H ₂ O	24.6 g/100 ml	1 ml
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	23.6 g/100 ml	2.3 ml
KH ₂ PO ₄	13.6 g/100 ml	0.5 ml
KNO ₃	10.1 g/100 ml	2.5 ml
Mikronütrient	Tablo	0.5 ml
FeEDTA	Tablo	20.0 ml

Tablo 5. 20. Mikronütrient hazırlanışı

Mikronütrient	Stok solüsyon
H ₃ BO ₃	2.86 g/L
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.82 g/L
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.22 g/L
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.09 g/L
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.09 g/L

Tablo 5. 21. FeEDTA hazırlanışı

FeEDTA	Stok solüsyon
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.121 g/250 ml
EDTA	0.375 g/250 ml

5.7. T0 Aday Bitkilerin Moleküler Karakterizasyonu

Bu çalışmada kullanılan pHSE401 vektöründe *HPTII* geni bulunmaktadır. Elde edilen bitkiciklerden transgenik olanların belirlenmesi için ilk aşamada “Favorgen Genomic DNA Extraction” kitinin protokolü takip edilerek genomik DNA izolasyonu yapılmış daha sonra HPTII-Fw ve HPTII-Rv primerleri ile PCR yapılmıştır. HPTII-Fw ve HPTII-Rv primerlerinin sekansları tabloda verilmiştir.

Tablo 5. 22. T-DNA insersiyonu içerip içermediğini kanıtlamak için dizayn edilen primerler

Gen	Primerler
HPTII-Fw	CTATTCCTTTGCCCTCGGAC
HPTII-Rv	CCTGACCTATTGCATCTCCC

Tablo 5. 23. Transgenik T0 bitkilerinin PCR ile doğrulanmasında yapılan PCR’ın bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
2x Taq DNA Master Mix	12.5
Primer (HptII-Fw)	0.5
Primer (HptII-Rv)	0.5
Genomik DNA	1
Nükleaz Free su	10.5

Tablo 5. 24. Transgenik T0 bitkilerinin PCR ile doğrulanmasında yapılan PCR’ın koşulları

	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95°C	
Denatürasyon	95°C	
Bağlanma		
Uzama	68°C	
Son uzama	68°C	

5.7.1. Sanger Dizileme İle Mutasyon Analizi

HPTII-Fw ve HPTII-Rv primerleri ile doğrulama yapıldıktan sonra gRNA’ların hedeflenen bölgede mutasyon oluşturup oluşturmadığını tesbit etmek için sanger dizileme yapılmıştır. Bunun için *Solyc12g006930.1* ve *Solyc03g097390.2* genlerinde

gRNA hedef bölgelerini kapsayacak şekilde “Primer3 Plus” ile primer dizayn edilmiştir. Dizayn edilen primerler tablo 5.25’de verilmiştir. Bu primerler ile “Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR bileşenleri ve koşulları tablo 5.26’da verilmiştir. PCR ürünleri dizilenmeye gönderilmiştir.

Tablo 5. 25. Mutasyon analizi için dizayn edilen primerler

Gen	Primerler
Solyc12g006930.1 (gRNA5 ve gRNA13)	Fw: CGGGTTTGGTGTTCGTTGTCGT Rv: AGCGCTTCATGTTTGGCTAC
Solyc03g097390.2 (gRNA16 ve gRNA19)	Fw: TCGAACACAGAGCTTCAGGT Rv: TTCTGCTTTGACCTGCTCCG

Tablo 5. 26. Sanger Dizileme İçin Yapılan PCR’ın Bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
5x Phusion HF Buffer	10
10 Mm dNTPs	1
Primer (Fw)	2.5
Primer (Rv)	2.5
Genomik DNA	2.5
DMSO	1.5
Phusion HF DNA Polimeraz	0.5
Nükleaz Free su	29.5

Tablo 5. 27. Solyc12g006930 geninde Sanger Dizileme İçin yapılan PCR’ın koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
İlk denatürasyon	98	0:30
Denatürasyon	98	0:10
Bağlanma	64	0:30
Uzama	72	0:59
Son uzama	72	8:00

Tablo 5. 28. Solyc03g097390 geninde Sanger Dizileme İçin yapılan PCR’ın koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
İlk denatürasyon	98	0:30
Denatürasyon	98	0:10
Bağlanma	64	0:30
Uzama	72	0:57
Son uzama	72	8:00

5.8. Mutant Hatlarda Yapılan Analizler

5.8.1. Mutant Bitkilerin Morfolojik Karakterizasyonu

Bitki gelişiminin incelenmesi: serada aynı koşullarda büyütülen transgenik hatlar ile yabani tip domates bitkisinin gelişimsel olarak herhangi bir farklılık olup olmadığını gözlemlemek amacı ile kıyasama yapılmıştır.

Meyvelerin morfolojik incelemesi: Yeterince olgunlaşan transgenik meyveler toplanmış ve yabani tip bitkilerin meyvelerine göre kıyaslama yapmak üzere ortadan ikiye kesilmiştir. Yabani tip ve transgenik hatların meyvelerinin iç yapıları karşılaştırılmıştır.

Kök morfolojilerinin incelenmesi: Transgenik hatların kökleri ile yabani tip hatların kökleri arasında gelişim farklılığı olup olmadığını gözlemlemek amacı ile kıyaslama yapılmıştır. İlk olarak kökler dikkatlice saksıdan çıkarılmış ve toprağı su ile yıkanmıştır. Daha sonra kökler 30 dakika bir kova içerisinde suda bekletilmiş ve topraktan iyice ayrışması sağlanmıştır.

5.8.2. Mutant Hatların Elektron Mikroskobu İle İncelenmesi

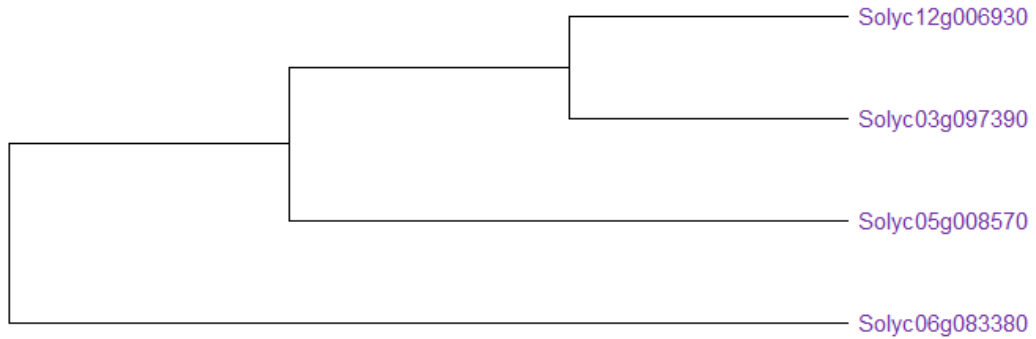
Mutant domates bitkisinin normal domates bitkisine göre stoma ve kütikula yapılarındaki farklılıklar gözlemlemek amacı ile elektron mikroskobu ile görüntüleme yapılmıştır. Görüntüleme JEOL JSM-700F taramalı elektron mikroskobu ile yapılmıştır. İlk olarak her hattan alınan yaprak örnekleri kesilerek çift taraflı karbon bantları ile stuplara tutturulmuştur. Örneklerin iletken olup görüntü verebilmesi için 15 nm kalınlığında altın paladyum ile kaplama yapılmıştır. Daha sonra örnekler elektron mikroskobuna yerleştirilmiştir. Yaprak kesitleri 100 kat, 300 kat ve 1000 kat büyütülerek yaprağın üstü ve altından görüntüler kaydedilmiştir.

6. BULGULAR VE TARTIŞMA

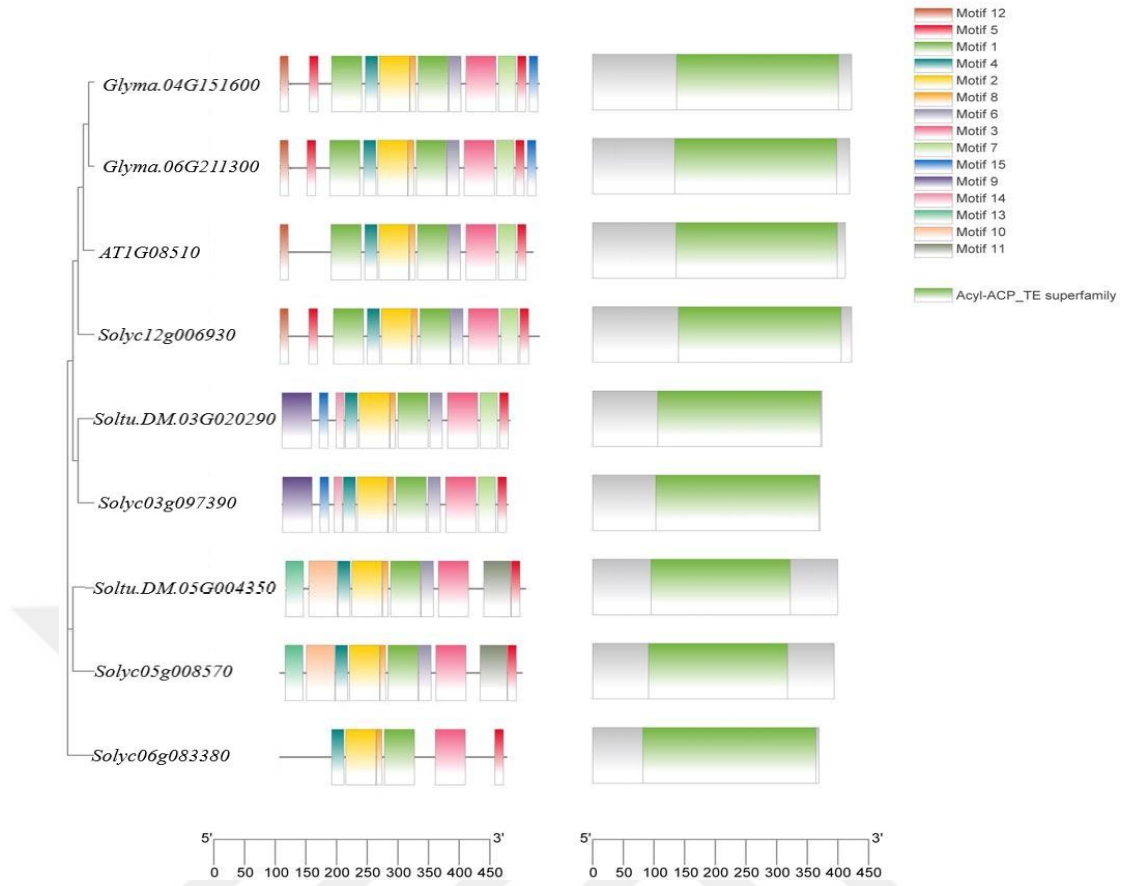
6.1. *FATB* Genlerinin Domates Bitkisinde Tanımlanması

6.1.1. *FATB* Gen Ailesinin Flogenetik Analizi, İntron Ekzon Yapısı ve Motif Analizi

Domateste bulunan *Solyc05g008570*, *Solyc12g006930*, *Solyc06g083380* ve *Solyc03g097390* genlerinin kendi aralarında hizalanması sonucunda yapılan filogenetik analiz şeki 6.1’de verilmiştir. Buna göre; Soya fasülyesi, patates, domates ve araidopsisde bulunan *FATB* genlerinin türler arasında karşılaştırmasını yapmak için filogenetik ağaç, korunmuş motif ve domeinleri şekil 6.2’verilmiştir. Dört farklı bitkide bulunan *FAT* genlerinin protein hizalamalarına göre 4 gruba ayrıldığı görülmüştür. Bu 4 gruba göre, *Solyc06g083380* geni birinci grubu oluşturmaktadır. *Solyc05g008570* ve *Soltu.DM.05G004350* geni ikinci grubu oluşturmaktadır. *AT1G08510* ve *Solyc12g006930*’un genleri üçüncü grubu oluştururken *Glyma.04G151600*, *Glyma.06G211300*, *Soltu.DM.03G020290*, *Solyc03g097390* genleri dördüncü grubu oluşturmaktadır.



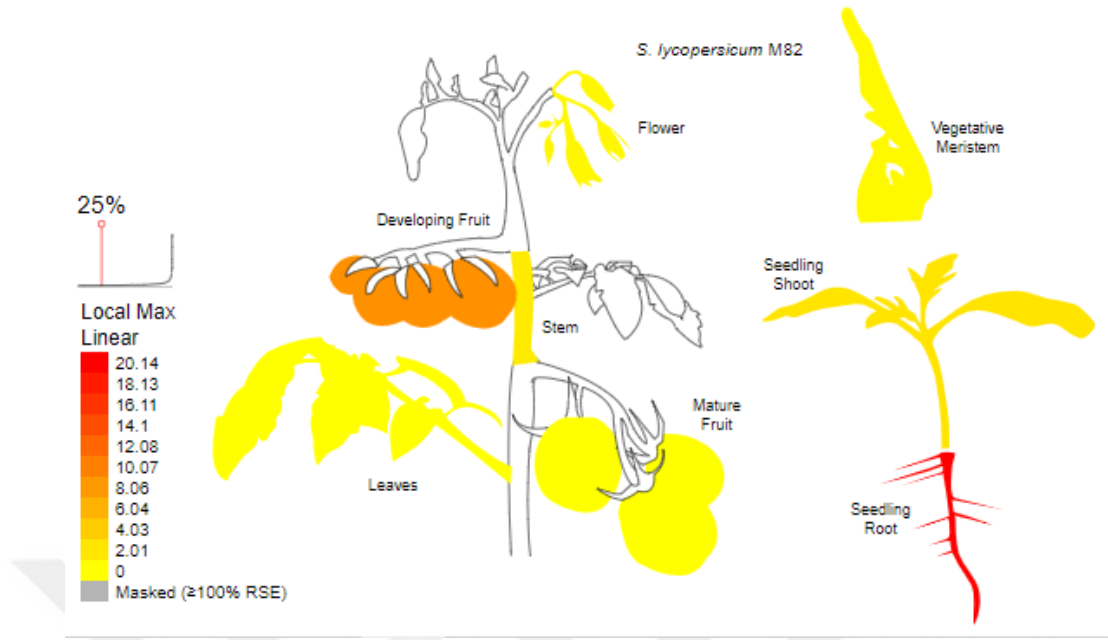
Şekil 6. 1. Domateste bulunan *FAT* genlerinin filogenetik analizi



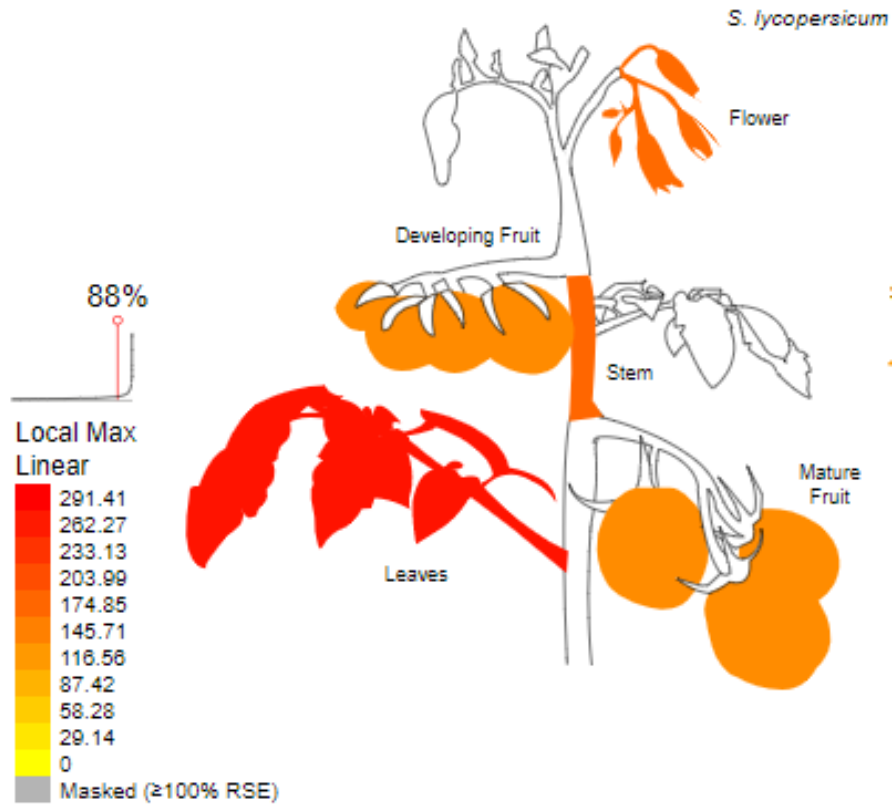
Şekil 6. 2. Soya fasülyesi, patates, domates ve araidopsisde bulunan *FATB* genlerinin filogenetik ağacı, (A) korunmuş motif (B) korunmuş domain analizi. (C) korunmuş motifler farklı renkler ile gösterilmiştir. *Glycne max* (Glyma.04G151600, Glyma.06G211300), *Arabidopsis thaliana* (AT1G08510), *Solanum lycopersicum* (Solyc03g097390, Solyc06g083380, Solyc05g008570, Solyc12g006930), *Solanum tuberosum* (Soltu.DM.03G020290, Soltu.DM.05G004350)

6.1.2. *FAT* Genlerinin Domates Bitkisindeki Hücresel Lokasyonu

Solyc12g006930 ve *Solyc03g097390* genlerinin bitki dokularında en çok nerede ifade olduğunu görmek için yapılan analizde; *Solyc03g097390* geninin daha çok kökte (şekil 6.3), *Solyc12g006930* geninin daha çok yapraklarda ifade edildiği görülmüştür (şekil 6.4).



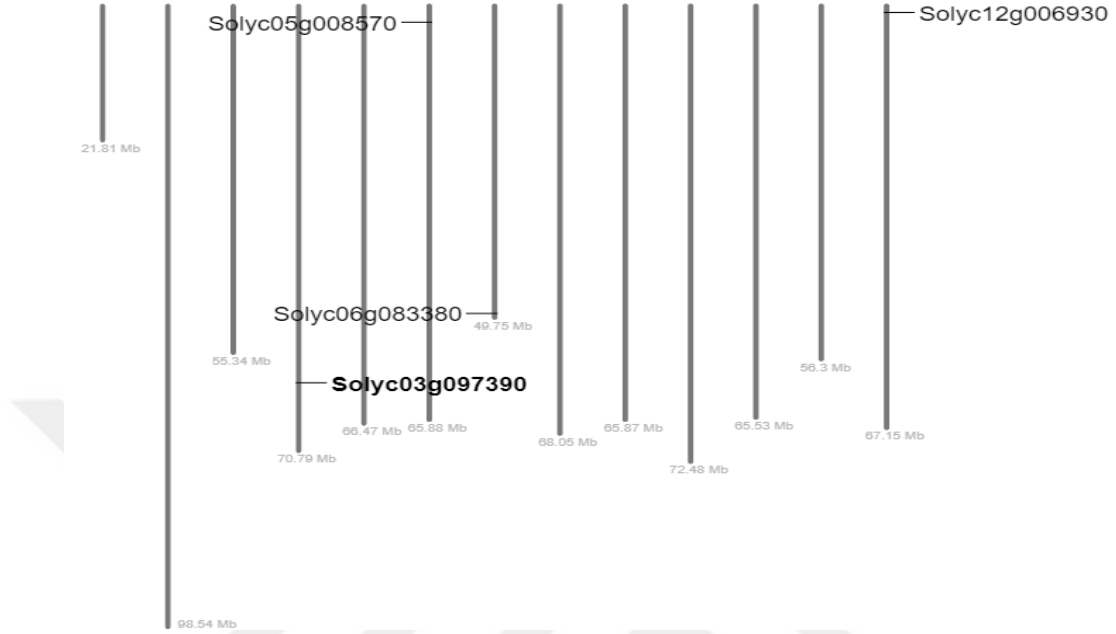
Şekil 6. 3. *Solyc03g097390* geninin domatesteki hücresel lokasyonu



Şekil 6. 4. *Solyc12g006930* geninin domatesteki hücresel lokasyonu

6.1.3. FAT Genlerinin Kromozomlar Üzerindeki Lokasyonu

Solyc12g006930 ve *Solyc03g097390* genlerinin kromozomlar üzerindeki yerleri şekil 6.5’de verilmiştir.



Şekil 6. 5. *Solyc05g008570*, *Solyc06g083380*, *Solyc12g006930* ve *Solyc03g097390* genlerinin kromozomlar üzerindeki lokasyonu

6.1.4. *Solyc03g097390*, *Solyc12g006930* Genlerini Hedef Alan miRNA Analizi

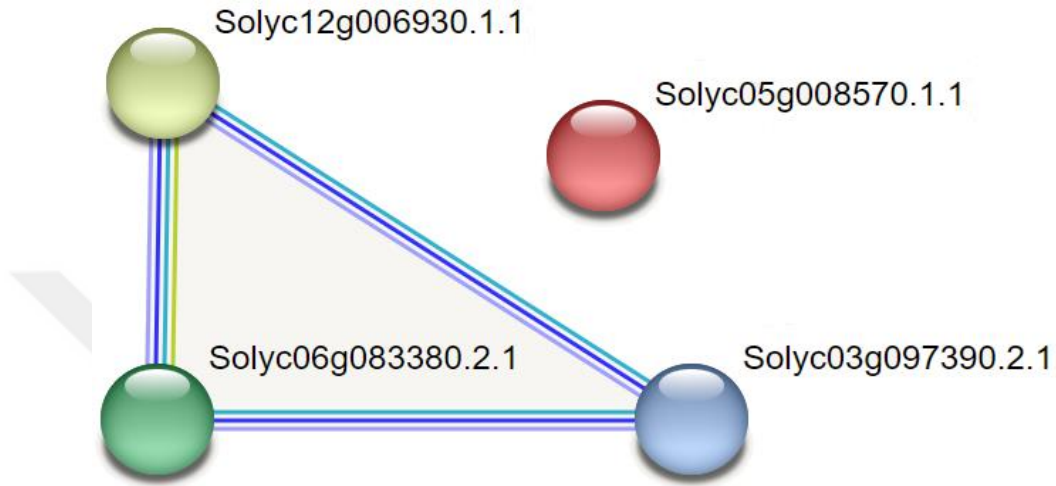
PsRNATarget programına genlerin sekansları yüklenerek bu genleri hedef alan miRNA’lar belirlenmiştir. PsRNATarget programında toplam 110 domates miRNA’sından toplam 6 miRNA’nın *Solyc03g097390*, *Solyc12g006930* genlerini hedef aldığı bulunmuştur. Buna göre; *Solyc03g097390* genini 1 ve *Solyc12g006930* genini 5 adet miRNA hedeflemektedir. Genleri hedefleyen miRNA’lar tabloda verilmiştir.

Tablo 6. 1. Domateste bulunan *Solyc12g006930* ve *Solyc03g097390* genlerini hedefleyen miRNA’lar

Mirna	Beklenen Değeri	Hizalama	İnhibisyon	Hedef Gen.
sly-miR159	4	::: ::::: :::::	C	<i>Solyc12g006930</i>
sly-miR1917	4.5	::: : ::::: :::::	C	<i>Solyc12g006930</i>
sly-miR390a-5p	4.5	: : ::::: :::::	C	<i>Solyc12g006930</i>
sly-miR9473-5p	4.5	::: : ::::: :::::	C	<i>Solyc12g006930</i>
sly-miR1916	5	::: ::::: :::::	T	<i>Solyc12g006930</i>
sly-miR6022	5	::: ::::: :::::	C	<i>Solyc03g097390</i>

6.1.5. Domateste Bulunan *FAT* Genlerinin Protein-Protein Etkileşimleri

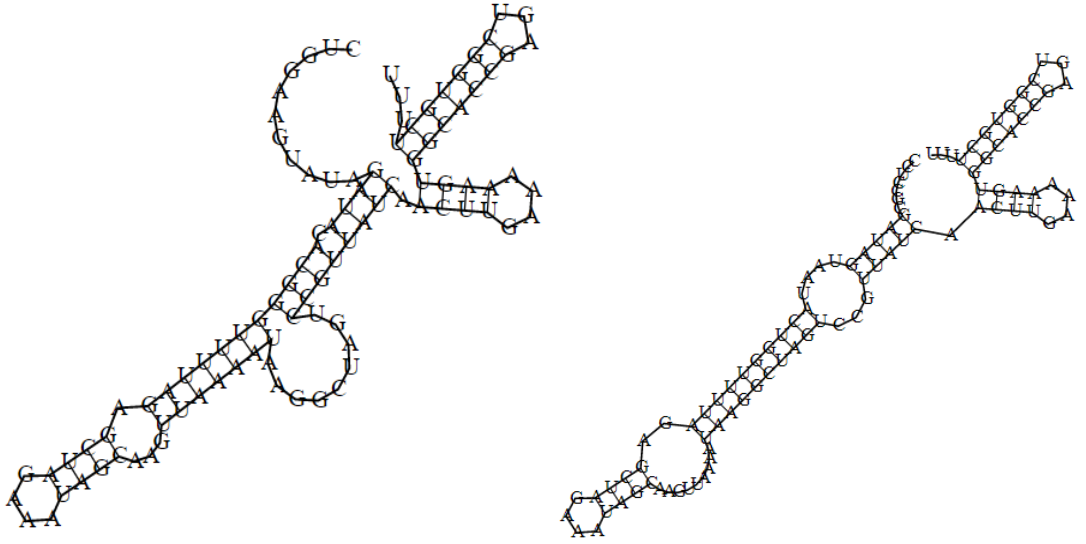
Protein-protein etkileşimlerinde domateste bulunan dört *FAT* geninden üçünde 0.7 güvenirlik skorunda etkileşim bulunmuştur. *Solyc06g083380*, *Solyc12g006930* ve *Solyc03g097390* genleri arasında etkileşim bulunurken *Solyc05g008570* geni ile diğer üç gen arasında etkileşim gözlenmemiştir.



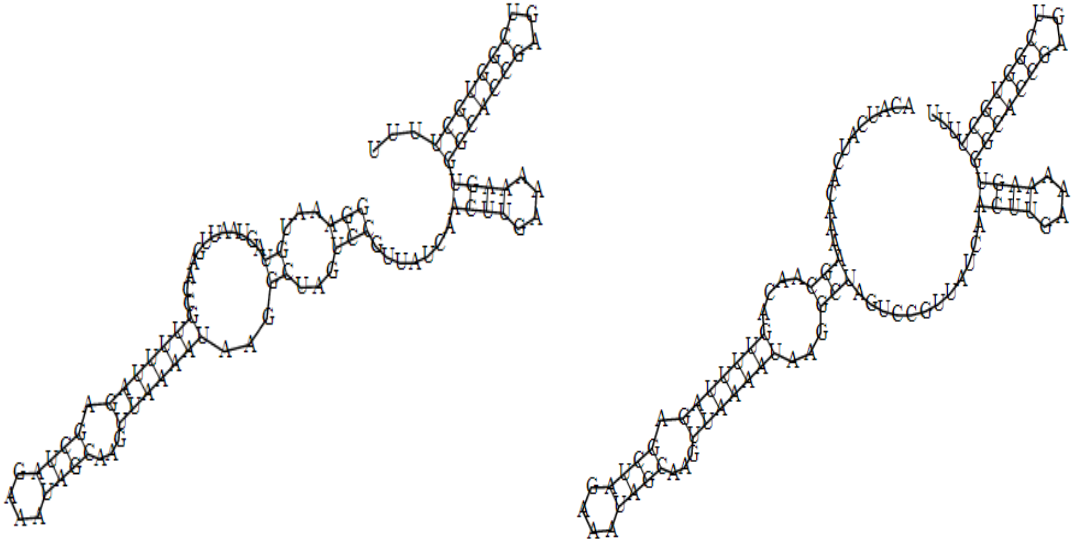
Şekil 6. 6. *Solyc05g008570*, *Solyc12g006930*, *Solyc06g083380* ve *Solyc03g097390* genlerinin protein protein etkileşimleri

6.1.6. gRNA'ların Dizayn Edilmesi

Genom düzenleme CRISPR/Cas sistemi kullanımlarının en büyük zorluğu etkili bir gRNA tasarlamaktır. Bunun için CRISPR-P 2.0 gibi programlar kullanılarak hedefe yönelik mutasyon etkinliği (on-target) ve hedef dışı mutasyon oluşturma ihtimalini (off-target) belirleyerek en uygun gRNA'yı seçmek bu adımda oldukça önemlidir. Bu çalışmada kullanılan gRNA'ların hedefe yönelik mutasyon etkinliği 0.4 üzerinde seçilirken, hedef dışı mutasyon oluşturma ihtimali olan genlerin kodlanmayan bölgelerde olmasına özen gösterilmiştir. Dizayn edilen gRNA'ların ikincil yapıları şekil 6.7 ve 6.8'de verilmiştir.



Şekil 6. 7. *Solyc12g006930* genini hedefleyen gRNA5 ve gRNA13



Şekil 6. 8. *Solyc03g097390* genini hedefleyen gRNA16 ve gRNA19

Elde edilen 11 mutant hatta hangi gRNA'nın mutasyon oluşturduğu tabloda verilmiştir. Buna göre gRNA19'un bütün hatlarda mutasyon oluşturduğu, gRNA16'nın yalnızca bir hatta mutasyon oluşturduğu görülmüştür. Dizayn edilen dört gRNA arasında mutasyon oluşturmeyen gRNA bulunmamaktadır.

Tablo 6. 2. Hangi bitkide hangi gRNA'nın çalıştığı gösterilmiştir

	<i>Solyc03g097390</i>		<i>Solyc03g097390</i>	
	gRNA5	gRNA13	gRNA16	gRNA19
Hat 1	+	-	-	+
Hat 2	Örnek yok	Örnek yok	-	+
Hat 3	+	-	-	+
Hat 4	+	-	-	+
Hat 5	+	+	-	+
Hat 6	+	+	-	+
Hat 7	-	+	-	+
Hat 8	+	+	-	+
Hat 9	+	+	+	+
Hat 10	-	+	-	+
Hat 11	+	+	-	+

6.2. Genomü Düzenlenmiş Bitkilerin Morfolojik Olarak Tanımlanması



Şekil 6. 9. Yabani tip (sol) ve mutant (sağ) domates bitkileri



Şekil 6. 10. Yabani tip domates meyvesi (solda) ve mutant domates meyvesi (sağda)



Şekil 6. 11. Solda yabani tip bitkinin kökü, sağda mutant bitkinin kökü

Mutant hatlar seraya götürüldükten yaklaşık bir ay sonra domates zararlısı olan *Tuta absoluta* tarafından kontrolsüz bir şekilde enfekte olmuşlardır. *Tuta absoluta*'nın serada bulunan yabani tip hatlar ile *FATB* mutant hatlara verdikleri zararın aynı olmadığı görülmüştür. Şekil 6.10'da *Tuta absoluta* tarafından enfekte olmamış yabani tip ve mutant domates hatlarının görüntüsü verilmiştir. Şekil 6.13'de ise *Tuta absoluta*'nın bitkiye verdiği zararlar görülmektedir.



Şekil 6. 12. Soldaki gördel yabani tip, sağdaki görsel mutant bitki. Yabani tipte çiçekler (kare içerisinde gösterilmiştir) bulunurken mutant hatta çiçekler *Tuta absoluta* tarafından zarara uğratılmıştır



Şekil 6. 13. Solda içerisinde *Tuta absoluta* bulunan mutant bitkinin çiçeği, sağda *tuta* tarafından içerisinde galeriler oluşturulmuş mutant bitkinin yaprağı



Şekil 6. 14. *Tuta absoluta*'nın çiçeğine verdiği zarar solda, sağda *Tuta absoluta*'nın zarar vermediği normal çiçek



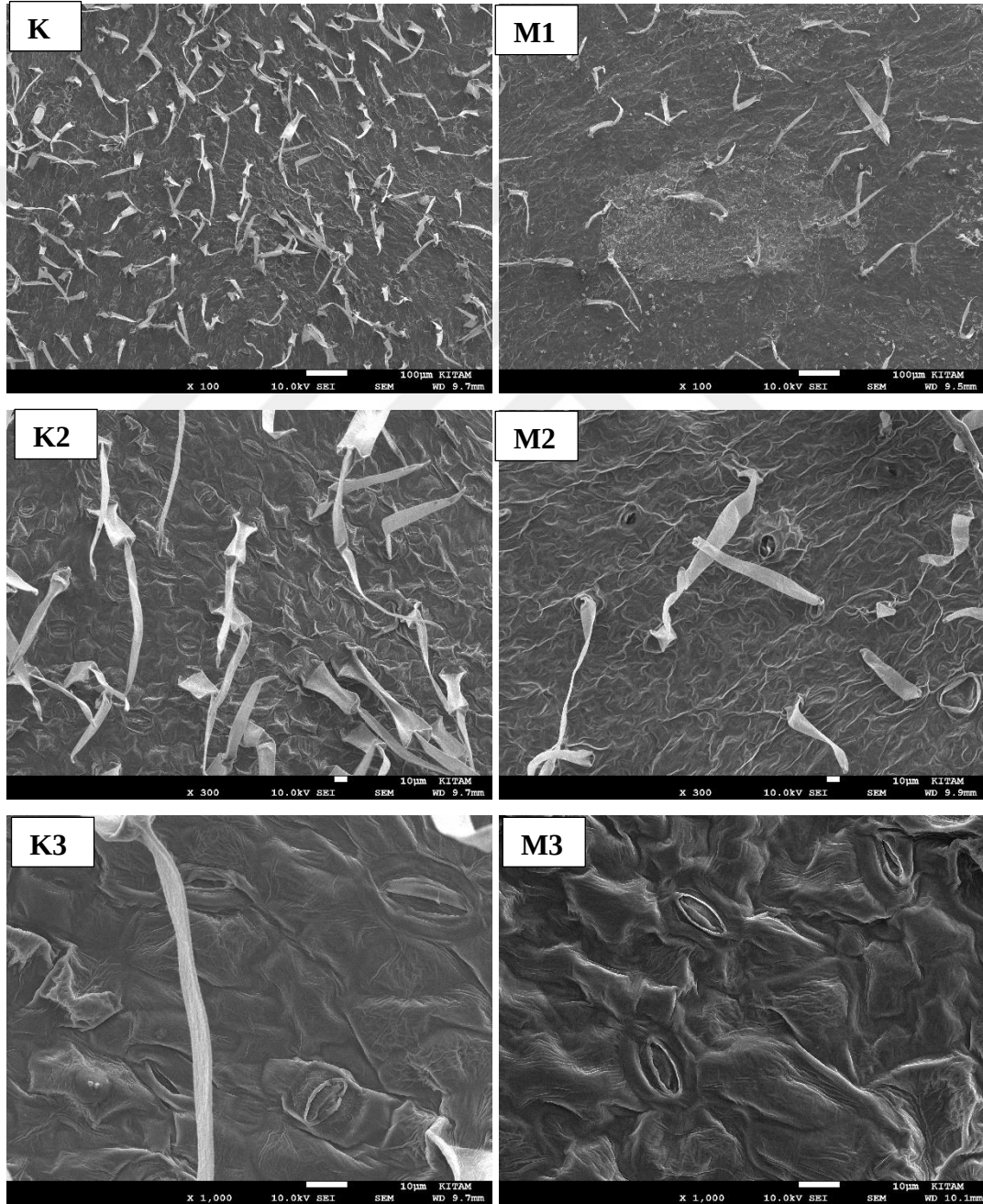
Şekil 6. 15. *Tuta absoluta* tarafından zarar görmüş meyve

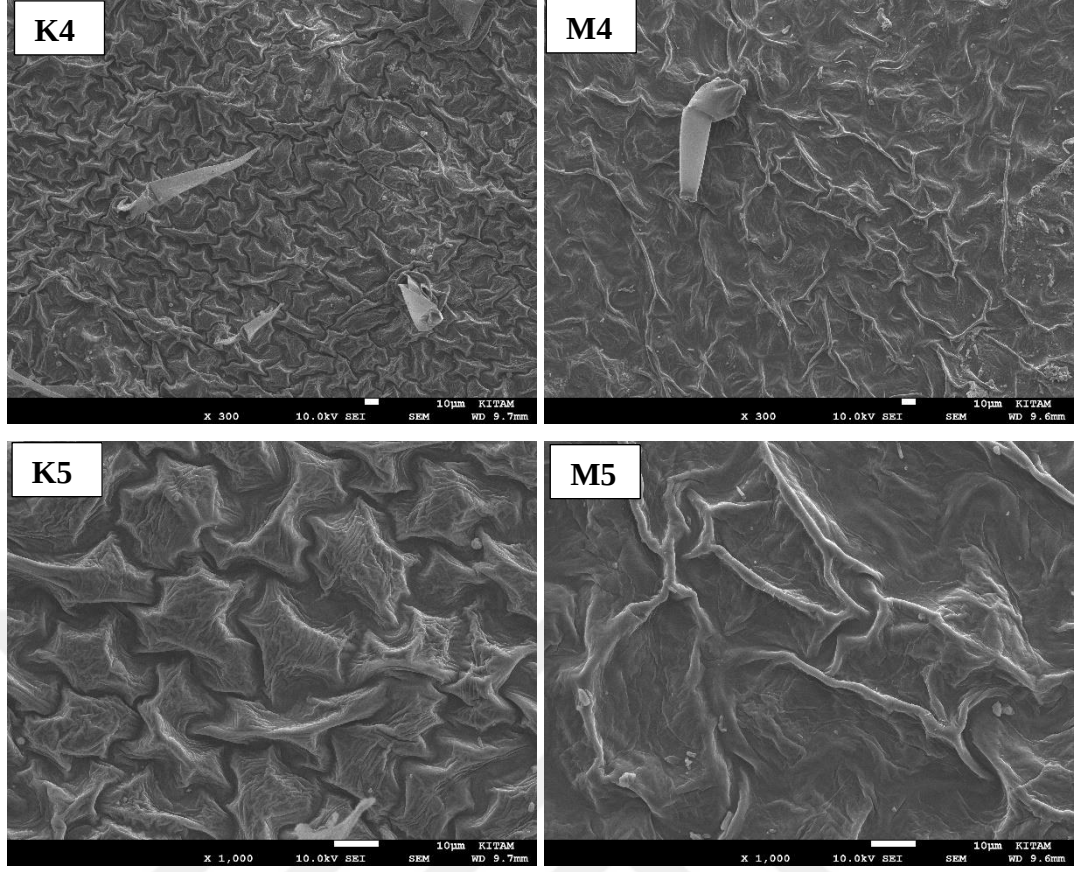
6.3. Mutant Hatların Elektron Mikroskobu İle İncelenmesi

Bitki kütikulu tüm epidermal hücrelerin yüzeylerini kaplayan lipofilik bir tabakadır ve stearik (C16), linoleik (C18) asitlerden oluşmaktadır. *Solyc03g097390* ve *Solyc12g00693* genlerinde birlikte meydana getirilen mutasyonun kütikula tabakasını etkileyeceği düşünülmüştür. Bunun kütikula üzerindeki olası etkilerini incelemek için rastgele seçilen bazı hatlarda elektron mikroskobu ile görüntüleme

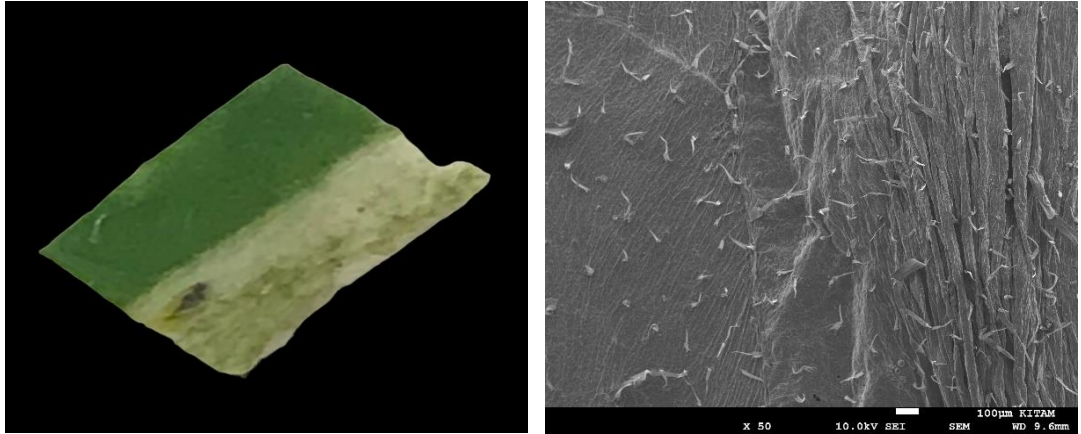
yapılmıştır. Yaprakta bulunan trikomlar, stoma ve kütikula tabakasının görüntüsü şekil 6.16'da verilmiştir.

Elektron mikroskobunda incelenen kesitlerde yabancı tipe oranla mutant hatlarda 9.7 mm'lik bir yaprak kesitinde 300 kat büyütmede hat 6 da %62.5, hat 8 de %66.7, hat 11 de %70.8'lik bir oranında azalma kaydedilmiştir, ayrıca kütikula yapısı da incelendiğinde yabancı tipe göre kütin matrisinin üst yüzeyinde yapısal bozukluk şeklinde farklılaşma meydana geldiği gözlenmiştir.





Şekil 6. 16. Kontrol ve mutant hatların yaprakların alt ve üst yüzeylerinden alınan kesitin elektron mikroskobu görüntüsü. K1: yabani tip domates yaprağının alt dokusu (100x), M1: mutant domates yaprağının alt dokusu (100x), K2: yabani tip domates yaprağının alt dokusu (300x), M2: mutant domates yaprağının alt dokusu (300x), K3: yabani tip domates yaprağının alt dokusu (1000x), M3: mutant domates yaprağının alt dokusu (1000x), K4: yabani tip domates yaprağının üst dokusu (300x), M4: mutant domates yaprağının üst dokusu (300x), K5: yabani tip domates yaprağının üst dokusu (1000x), M5: mutant domates yaprağının üst dokusu (1000x)



Şekil 6. 17. Solda bir kenarı *tuta* tarafından zarara uğratılmış bir tarafı sağlam yaprak, sağda bu yaprağın elektron mikroskobu görüntüsü

CRISPR/Cas sisteminde verimli ve verimsiz gRNA'ları ayırt etmek için kullanılabilecek kriterler ile, verimsiz gRNA'lardan kaynaklanan düzenlenmemiş transgenik bitkilerin üretilmesini önlemek için büyük yarar sağlamaktadır. 2014

yılında yapılan bir çalışmada 17 veya 19 baz uzunluğunda hedef tamamlayıcılığa sahip gRNA'lar, 20 baz uzunluğunda tamamlayıcılığa sahip tam uzunluktaki gRNA ile karşılaştırılabilir aktivite gösterdiği belirtilirken, 15 nükleotidlik tamamlayıcılık içeren bir gRNA'nın aktivite göstermediğini bildirmişlerdir (Fu et al., 2014). Bunun yanında bir gRNA'nın ikincil yapısının verimlilikle bağlantılı olduğu Ma ve arkadaşları tarafından öne sürülmüştür (X. Ma et al., 2015). Bu nedenle ikincil yapı ile gRNA'ların düzenleme becerisi arasında bağlantı olduğunu bilmek ve buna göre gRNA seçmek oldukça önemlidir. gRNA verimliliğini araştıran bir diğer çalışmada G/C içeriğinin %30 ila %80 arasında olması, klavuz sekans ile diğer sekans arasında en fazla 12 toplam baz çifti (TBP), en fazla 7 ardışık baz çifti (CBP) ve en fazla 6 dahili baz çiftleri olması gerektiğini belirtmişlerdir (Liang et al., 2016). Bu çalışmalar göz önüne alınarak CRISPR-P 2.0 programı kullanılarak seçilen en uygun gRNA'ların hedefe yönelik mutasyon etkinliği gRNA5'de 0.773, gRNA13'de 0.662, gRNA16'da 0.505 ve gRNA19'da 0.485'dir. gRNA'ların GC içerikleri ise gRNA5'de %45, gRNA13'de %50, gRNA16 ve RNA19'da %35 dir. TBP, CBP değerleri literatürde belirtilene en yakın şekilde seçilmiştir. Bunun sonucunda *Solyc12g006930* ve *Solyc03g097390* genleri için dizayn ettiğimiz gRNA'ların hepsi çalışmış ve domates bitkisinde mutasyon meydana getirmişlerdir.

Kütikula tabakası, bitkilerin odunsu olmayan gövdelerini, meyvelerini, yapraklarını ve çiçeklerini kaplayan en dış tabakasıdır. Bitkilere mekanik destek sağlamasının yanı sıra çeşitli patojen enfeksiyonlara, mekanik yaralanmalara, UV radyasyonuna ve kimyasallara karşı bariyer görevi görmektedir (Yeats and Rose, 2013). Kütin monomerleri, C16 (palmitik asit) ve C18 (stearik asit) yağ asitlerini ve bunların türevlerini içermektedir (Heredia, 2003). Domateste CRISPR/Cas sistemi ile yağ asiti sentez yolağında yer alan *Solyc12g006930* ve *Solyc03g097390* genlerinin susturulması sonucunda bitki kütikula tabakasında meydana gelen değişiklikler şekil 6.16'da verilmiştir. Yabani tip domates ile mutant domates hatlarının yaprakları karşılaştırıldığında bitkinin kütikula tabakası belirgin bir şekilde farklılaşmıştır. Aynı zamanda yaprak yüzeyinde bulunan trikomların mutant hatlarda yabani tipe göre azaldığı sonucu yapılan elektron mikroskobu incelemesi ile belirlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında mutant hatların kütikula tabakasında meydana gelen değişimler bitkinin çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı hassas olabileceğini düşündürmekle birlikte,

Tuta absoluta tarafından bitkiye verilen zarar göz önüne alındığında bu tez desteklenmiş olmaktadır.

Tuta absoluta'nın yabancı tip bitkilere oranla mutant hatlara daha fazla zarar verdiği şekillerde gösterilmiştir. *Tuta absoluta*'nın bitkinin çiçeklerine verdiği zarar meyve tutumunu engellemiş ve bitkilerde meyveler sınırlı sayıda oluşmuşken yabancı hatlar normal meyve tutumu göstermişlerdir. *Tuta absoluta*'nın en önemli sorunlarından bir tanesinde doğrudan bitkinin büyüme noktalarından beslenmesi ve bitki gelişiminin durdurmasıdır (Desneux et al., 2010). Bu nedenle mutant hatlardaki bitki boyu kısalığının *Tuta absoluta*'dan mı yoksa gen ifadesinin bastırılmasından mı kaynaklı olduğu belirlenememiştir. Tüm bu sonuçlar ele alındığında, *Solyc12g006930* ve *Solyc03g097390* genlerinin susturulması biyotik strese karşı bitkiyi hassaslaştırdığı sonucunu desteklemektedir.

7. SONUÇ

CRISPR/Cas sistemi ile domatesde yağ asiti sentez yolağında yer alan *Fatty acyl-ACP thioesterase B (FATB)* ve *Palmitoyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase (Solyc12g006930 ve Solyc03g097390)* genlerinin susturulması sonucunda bitkinin kütikula tabakasında farklılıklar trikom sayısında azalmalar kaydedilmiştir (şekil 6.16). Mutant bitkilerin biyotik stres koşulları altında yabancı tip bitkilere oranla daha fazla etkilendiği kaydedilmiştir (şekil 6.12 ve 6.14). Mutant bitkiler bir domates zararlısı olan *Tuta absoluta* tarafından enfekte olmuşlar ve yabancı tip bitkilere kıyasla daha fazla hassasiyet göstermişlerdir. Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, domates bitkisinde *Fatty acyl-ACP thioesterase B (FATB)* ve *Palmitoyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase* genlerinde meydana getirilen mutasyonların verdiği çıktılarına bakarak biyotik stres koşullarında bitkinin daha hassas olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu farklılıklar sayesinde söz konusu domates, biyotik faktörlere daha hassas hale gelmekte ve dolayısıyla biyotik strese toleranslı bitkilerin geliştirilmesinde model olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Daim, M. M., El-Tawil, O. S., Bungau, S. G., & Atanasov, A. G. (2019). Applications of antioxidants in metabolic disorders and degenerative diseases: Mechanistic approach. In (Vol. 2019): Hindawi.
- Abdullahi, I. I., Abdullahi, N., Abdu, A. M., & Ibrahim, A. S. (2016). Proximate, mineral and vitamin analysis of fresh and canned tomato. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13(2), 1163-1169.
- Al-Remi, F., Arvas, Y., Durmuş, M., & Kaya, Y. (2018). Domates bitkisi ve in vitro mikro çoğaltımı. *Journal of Engineering Technology and Applied Sciences*, 3(1), 57-73.
- Ali, M. Y., Sina, A. A. I., Khandker, S. S., Neesa, L., Tanvir, E., Kabir, A., Gan, S. H. (2020). Nutritional composition and bioactive compounds in tomatoes and their impact on human health and disease: A review. *Foods*, 10(1), 45.
- Altunkaynak, B. Z., & Özbek, E. (2006). Obezite: nedenleri ve tedavi seçenekleri. *Van Tıp Dergisi*, 13(4), 138-142.
- Aznar-Moreno, J. A., Sánchez, R., Gidda, S. K., Martínez-Force, E., Moreno-Pérez, A. J., Venegas Calerón, M., Salas, J. J. (2018). New insights into sunflower (*Helianthus annuus* L.) FatA and FatB thioesterases, their regulation, structure and distribution. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1496.
- Baer, L., Platman, S. R., & Fieve, R. R. (1970). The role of electrolytes in affective disorders: sodium, potassium, and lithium ions. *Archives of General Psychiatry*, 22(2), 108-113.
- Bai, Y., & Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of botany*, 100(5), 1085-1094.
- Baker, C. J., McCormick, S. L., & Bateman, D. F. (1982). Effects of Purified Cutin Esterase Upon the Permeability and Mechanical Strength of Cutin Membranes. *Phytopathology*, 72(4), 420-423.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712.
- Bonaventure, G., Salas, J. J., Pollard, M. R., & Ohlrogge, J. B. (2003). Disruption of the FATB gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *The Plant Cell*, 15(4), 1020-1033.
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant physiology*, 166(3), 1292-1297.
- Brown, A. (2000). *Understanding food. Fish and Shellfish*. Wadsworth/Thomson Learning, USA, 299.
- Burns, J., Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2003). Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry*, 62(6), 939-947.
- Cai, Y., Chen, L., Liu, X., Guo, C., Sun, S., Wu, C., Hou, W. (2018). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean. *Plant biotechnology journal*, 16(1), 176-185.
- Canene-Adams, K., Campbell, J. K., Zaripheh, S., Jeffery, E. H., & Erdman Jr, J. W. (2005). The tomato as a functional food. *The Journal of nutrition*, 135(5), 1226-1230.

- Ceasar, S. A., Rajan, V., Prykhozhiy, S. V., Berman, J. N., & Ignacimuthu, S. (2016). Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(9), 2333-2344.
- Chaudhari, H. G., Penterman, J., Whitton, H. J., Spencer, S. J., Flanagan, N., Lei Zhang, M. C., Shearer, C. A. (2020). Evaluation of homology-independent CRISPR-Cas9 off-target assessment methods. *The CRISPR journal*, 3(6), 440-453.
- Dağüstü, N. (2018). Bitki Doku Kültürü Uygulamalarının Islah Çalışmalarında Kullanılması. *Türktob Dergisi*, 25, 23-26.
- Debernardi, J. M., & Rowan, B. A. (2022). Make it a Combo. *Nature Plants*, 8(5), 457-458.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., . . . Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-607.
- Deng, L., Wang, H., Sun, C., Li, Q., Jiang, H., Du, M., Li, C. (2018). Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 system. *Journal of genetics and genomics= Yi chuan xue bao*, 45(1), 51-54.
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K. A., Burgio, G., Arpaia, S., Narváez-Vasquez, C. A., Frandon, J. (2010). Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of pest science*, 83(3), 197-215.
- Dormann, P., Voelker, T. A., & Ohlrogge, J. B. (1995). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a novel thioesterase from *Arabidopsis thaliana* specific for long-chain acyl-acyl carrier proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316(1), 612-618.
- Elango, R., & Laviano, A. (2017). Protein and amino acids: Key players in modulating health and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 20(1), 69-70.
- ENGİNDENİZ, S. (2010). İzmir’de domates üreticilerinin sulama ve kuraklıkla ilgili tutum ve davranışlarının analizi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 47(3), 321-330.
- Fatiha, A. (2019). Plant lipid metabolism. *Advances in Lipid Metabolism*, 1-16.
- Flachs, P., Horakova, O., Brauner, P., Rossmeisl, M., Pecina, P., Franssen-van Hal, N., Vlcek, C. (2005). Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce β -oxidation in white fat. *Diabetologia*, 48(11), 2365-2375.
- Fraser, P. D., Truesdale, M. R., Bird, C. R., Schuch, W., & Bramley, P. M. (1994). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (evidence for tissue-specific gene expression). *Plant physiology*, 105(1), 405-413.
- Freitas, H. R., Isaac, A. R., Malcher-Lopes, R., Diaz, B. L., Trevenzoli, I. H., & de Melo Reis, R. A. (2018). Polyunsaturated fatty acids and endocannabinoids in health and disease. *Nutritional neuroscience*, 21(10), 695-714.
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., & Joung, J. K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature biotechnology*, 32(3), 279-284.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas III, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*, 31(7), 397-405.
- Gillaspy, G., Ben-David, H., & Gruissem, W. (1993). Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell*, 5(10), 1439.

- Grissa, I., Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2007). The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC bioinformatics*, 8(1), 1-10.
- Guschina, I. A., Everard, J. D., Kinney, A. J., Quant, P. A., & Harwood, J. L. (2014). Studies on the regulation of lipid biosynthesis in plants: application of control analysis to soybean. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(6), 1488-1500.
- Harwood, J. L. (1996). Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1301(1-2), 7-56.
- Heredia, A. (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1620(1-3), 1-7.
- Hills, M. J. (1999). Improving oil functionality by tuning catalysis of thioesterase. *Trends in plant science*, 4(11), 421-422.
- Hoffmann-Benning, S., & Kende, H. (1994). Cuticle biosynthesis in rapidly growing internodes of deepwater rice. *Plant physiology*, 104(2), 719-723.
- Holloway, P. (1982). Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. *The plant cuticle*.
- Hu, F. B., Manson, J. E., & Willett, W. C. (2001). Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *Journal of the American college of Nutrition*, 20(1), 5-19.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429-5433.
- Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Mikami, M., & Toki, S. (2015). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochemical and biophysical research communications*, 467(1), 76-82.
- Jack, D. B. (1995). Keep taking the tomatoes—the exciting world of nutraceuticals. *Molecular Medicine Today*, 1(3), 118-121.
- Jeffree, C. (1996). Structure and ontogeny of plant cuticles. *Plant cuticles: an integrated functional approach*, 33-82.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., & Weeks, D. P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic acids research*, 41(20), e188-e188.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Jung, Y. J., Kim, D. H., Lee, H. J., Nam, K. H., Bae, S., Nou, I. S., Kang, K. K. (2020). Knockout of *SlMS10* Gene (*Solyc02g079810*) Encoding bHLH transcription factor using CRISPR/Cas9 System confers male sterility phenotype in tomato. *Plants*, 9(9), 1189.
- Khachik, F., Carvalho, L., Bernstein, P. S., Muir, G. J., Zhao, D.-Y., & Katz, N. B. (2002). Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Experimental biology and medicine*, 227(10), 845-851.
- Kolattukudy, P. (1980). Cutin, suberin, and waxes. In *Lipids: structure and function* (pp. 571-645): Elsevier.

- Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Joung, J., Abudayyeh, O. O., Barcena, C., . . . Nishimasu, H. (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517(7536), 583-588.
- Koonin, E. V., & Makarova, K. S. (2009). CRISPR-Cas: an adaptive immunity system in prokaryotes. *F1000 biology reports*, 1.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, J. C. (2014). Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book: Elsevier health sciences.
- Kunst, L., Samuels, A., & Jetter, R. (2020). The plant cuticle: formation and structure of epidermal surfaces. In *Plant lipids* (pp. 270-302): Blackwell.
- Lambert, R. (2001). High-oil corn hybrids In; Speciality corns. Hallauer AR Ed. In: CRC Press, Boca Raton, FL., USA.
- Li, J.-F., Norville, J. E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Sheen, J. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology*, 31(8), 688-691.
- Li, L., Li, H., Li, Q., Yang, X., Zheng, D., Warburton, M., Yan, J. (2011). An 11-bp insertion in *Zea mays* *fatb* reduces the palmitic acid content of fatty acids in maize grain. *PloS one*, 6(9), e24699.
- Liang, G., Zhang, H., Lou, D., & Yu, D. (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Scientific reports*, 6(1), 1-8.
- Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.-C., Kandaswamy, E., Zhou, T., & Zuo, L. (2018). Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Frontiers in physiology*, 9, 477.
- Ma, J., Sun, S., Whelan, J., & Shou, H. (2021). CRISPR/Cas9-mediated knockout of *GmFATB1* significantly reduced the amount of saturated fatty acids in soybean seeds. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 3877.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Lin, Y. (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular plant*, 8(8), 1274-1284.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct*, 1(1), 1-26.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., Yakunin, A. F. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467-477.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell cycle*, 7(18), 2902-2906.
- Mayer, K. M., & Shanklin, J. (2005). A structural model of the plant acyl-acyl carrier protein thioesterase *FatB* comprises two helix/4-stranded sheet domains, the N-terminal domain containing residues that affect specificity and the C-terminal domain containing catalytic residues. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3621-3627.
- Mišurcová, L., Ambrožová, J., & Samek, D. (2011). Seaweed lipids as nutraceuticals. *Advances in food and nutrition research*, 64, 339-355.

- Miyaoka, Y., Berman, J. R., Cooper, S. B., Mayerl, S. J., Chan, A. H., Zhang, B., Conklin, B. R. (2016). Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Mobraten, K., Haug, T. M., Kleiveland, C. R., & Lea, T. (2013). Omega-3 and omega-6 PUFAs induce the same GPR120-mediated signalling events, but with different kinetics and intensity in Caco-2 cells. *Lipids in health and disease*, 12(1), 1-7.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174-182.
- Mojica, F. J., Juez, G., & Rodríguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology*, 9(3), 613-621.
- Monforte, A. J., Diaz, A., Caño-Delgado, A., & Van Der Knaap, E. (2013). The genetic basis of fruit morphology in horticultural crops: lessons from tomato and melon. *Journal of experimental botany*, 65(16), 4625-4637.
- Moreno-Pérez, A. J., Sánchez-García, A., Salas, J. J., Garcés, R., & Martínez-Force, E. (2011). Acyl-ACP thioesterases from macadamia (*Macadamia tetraphylla*) nuts: Cloning, characterization and their impact on oil composition. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(1), 82-87.
- Nakayasu, M., Akiyama, R., Lee, H. J., Osakabe, K., Osakabe, Y., Watanabe, B., Muranaka, T. (2018). Generation of α -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. *Plant Physiology and Biochemistry*, 131, 70-77.
- Navarro-González, I., García-Valverde, V., García-Alonso, J., & Periago, M. J. (2011). Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Research International*, 44(5), 1528-1535.
- Orsavova, J., Misurcova, L., Vavra Ambrozova, J., Vicha, R., & Mlcek, J. (2015). Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12871-12890.
- Osakabe, Y., & Osakabe, K. (2015). Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant and Cell Physiology*, 56(3), 389-400.
- Ostlund Jr, R. E., Racette, S. B., & Stenson, W. F. (2003). Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ. *The American journal of clinical nutrition*, 77(6), 1385-1389.
- Ozseyhan, M. E., Li, P., Na, G., Li, Z., Wang, C., & Lu, C. (2018). Improved fatty acid profiles in seeds of *Camelina sativa* by artificial microRNA mediated FATB gene suppression. *Biochemical and biophysical research communications*, 503(2), 621-624.
- Paetau, I., Khachik, F., Brown, E. D., Beecher, G. R., Kramer, T. R., Chittams, J., & Clevidence, B. A. (1998). Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 68(6), 1187-1195.
- Pan, C., Wu, X., Markel, K., Malzahn, A. A., Kundagrami, N., Sretenovic, S., Qi, Y. (2021). CRISPR-Act3. 0 for highly efficient multiplexed gene activation in plants. *Nature Plants*, 7(7), 942-953.

- Pan, C., Ye, L., Qin, L., Liu, X., He, Y., Wang, J., . . . Lu, G. (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Paul, S., Ali, M., Rumpa, N.-E., Tanvir, E., Hossen, M., Saha, M., Khalil, M. (2017). Assessment of toxicity and beneficiary effects of *garcinia pedunculata* on the hematological, biochemical, and histological homeostasis in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173-1183.
- Rani, R., Yadav, P., Barbadikar, K. M., Baliyan, N., Malhotra, E. V., Singh, B. K., Singh, D. (2016). CRISPR/Cas9: a promising way to exploit genetic variation in plants. *Biotechnology letters*, 38(12), 1991-2006.
- Riederer, M., & Schreiber, L. (2001). Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of experimental botany*, 52(363), 2023-2032.
- Roughan, P. G., & Ohlrogge, J. B. (1996). Evidence that isolated chloroplasts contain an integrated lipid-synthesizing assembly that channels acetate into long-chain fatty acids. *Plant physiology*, 110(4), 1239-1247.
- Salas, J. n. J., & Ohlrogge, J. B. (2002). Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 403(1), 25-34.
- Salehi, B., Sharifi-Rad, R., Sharopov, F., Namiesnik, J., Roointan, A., Kamle, M., Sharifi-Rad, J. (2019). Beneficial effects and potential risks of tomato consumption for human health: An overview. *Nutrition*, 62, 201-208.
- SAMUR, F. (2006). Kalp damar hastalıklarında beslenme.
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 39(21), 9275-9282.
- Sashital, D. G., Jinek, M., & Doudna, J. A. (2011). An RNA-induced conformational change required for CRISPR RNA cleavage by the endoribonuclease Cse3. *Nature structural & molecular biology*, 18(6), 680-687.
- Schweizer, P., Felix, G., Buchala, A., Müller, C., & Métraux, J. P. (1996). Perception of free cutin monomers by plant cells. *The Plant Journal*, 10(2), 331-341.
- Seçgin, Z., Uluisik, S., Yıldırım, K., Abdulla, M. F., Mostafa, K., & Kavas, M. (2022). Genome-wide Identification of the Aconitase Gene Family in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and CRISPR-based Functional Characterization of SLACO2 on Male-sterility.
- Semma, M. (2002). Trans fatty acids: properties, benefits and risks. *Journal of health science*, 48(1), 7-13.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Qiu, J.-L. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(8), 686-688.
- Skolik, P., Morais, C. L., Martin, F. L., & McAinsh, M. R. (2019). Determination of developmental and ripening stages of whole tomato fruit using portable infrared spectroscopy and Chemometrics. *BMC plant biology*, 19(1), 1-15.
- Sure, B. (1933). The vitamins in health and disease. *The vitamins in health and disease*.

- Taylor, D. C., Zhang, Y., Kumar, A., Francis, T., Giblin, E. M., Barton, D. L. Zhu, W. (2009). Molecular modification of triacylglycerol accumulation by over-expression of DGAT1 to produce canola with increased seed oil content under field conditions. *Botany*, 87(6), 533-543.
- Terns, M. P., & Terns, R. M. (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Current opinion in microbiology*, 14(3), 321-327.
- Ueta, R., Abe, C., Watanabe, T., Sugano, S. S., Ishihara, R., Ezura, H., Osakabe, K. (2017). Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
- Voelker, T. (1996). Plant acyl-ACP thioesterases: chain-length determining enzymes in plant fatty acid biosynthesis. *Genetic engineering*, 111-133.
- Voelker, T. A., Jones, A., Cranmer, A. M., Davies, H. M., & Knutzon, D. S. (1997). Broad-range and binary-range acyl-acyl-carrier-protein thioesterases suggest an alternative mechanism for medium-chain production in seeds. *Plant physiology*, 114(2), 669-677.
- Voelker, T. A., Worrell, A. C., Anderson, L., Bleibaum, J., Fan, C., Hawkins, D. J., Davies, H. M. (1992). Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants. *Science*, 257(5066), 72-74.
- Weiss, L. A., Barrett-Connor, E., & von Mühlen, D. (2005). Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study. *The American journal of clinical nutrition*, 81(4), 934-938.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), 331-338.
- Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., Chen, Q.-J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC plant biology*, 14(1), 1-12.
- Yeats, T. H., & Rose, J. K. (2013). The formation and function of plant cuticles. *Plant physiology*, 163(1), 5-20.
- YILMAZ, E., & Bürün, B. (2014). *İn vitro* koşullarda domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bitkisinde hipokotil ve kotiledon eksplantlarından kallus ve sürgün oluşumu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 18(3), 104-113.
- Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and translational medicine*, 6(1), 1-19.
- Zhang, H.-X., Zhang, Y., & Yin, H. (2019). Genome editing with mRNA encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Molecular Therapy*, 27(4), 735-746.

ÖZ GEÇMİŞ

Kilimli Lisesi’ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji bölümünden 28.06.2020 tarihinde mezun oldu. 2020 yılında OMÜ LEE Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. Karanfil yetiştiriciliği, gül yetiştiriciliği, tıbbi aromatik bitki yetiştiriciliği kurslarına katıldı.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : ORCID 0000-0001-5887-6054

Yayınlar:

Ulusal Kongre Bildirileri ve Makaleler:

1. Bahadır vd., 2022. Domates (*Solanum Lycopersicum L.*) Bitkisinde *FATB* Geninin Meyve Olgunlaşması Üzerine Etkisi. 11. Ulusal Moleküler Biyoloji Ve Biyoteknoloji Kongresi
2. Çevik, B., Bahadır, S., & Ekinci, D. Partial Purification Of Catalase Enzyme From Muscle Tissue Of Dusky Spinefoot (*Siganus Luridus*). Black Sea Journal Of Agriculture, 5-6.

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. 121O463 no’lu TÜBİTAK projejesi bursiyeri