



**CRISPR/CAS9-SİTİDİN BAZ DÜZENLEME TEKNİĞİ
KULLANILARAK HERBİSİTE TOLERANSLI HAVUÇ
GENOTİPLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Deniz Zahide ALTINŞEKER ACUN



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CRISPR/CAS9-SİTİDİN BAZ DÜZENLEME TEKNIĞI KULLANILARAK
HERBİSİTE TOLERANSLI HAVUÇ GENOTİPLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Deniz Zahide ALTINŞEKER ACUN
0000-0002-9716-3900

Prof. Dr. Meryem İPEK
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

CRISPR/CAS9-SİTİDİN BAZ DÜZENLEME TEKNİĞİ KULLANILARAK HERBİSİTE TOLERANSLI HAVUÇ GENOTİPLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Deniz Zahide ALTINŞEKER ACUN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Meryem İPEK

Geçtiğimiz son 10 yılda bitki biyoteknolojisinde çok önemli değişimler yaşanmıştır. Genom düzenleme tekniklerinin keşfi ve bitki genomlarına uyarlanması, bitki biyolojisi çalışmalarını da oldukça hızlandırmıştır. Bugün modern ıslah teknikleri içerisinde en güvenilir, merak edilen ve en çok uygulanan genom düzenleme teknolojisi CRISPR/Cas9'dur. Yabancı otlar tüm dünyada tarım arazilerinin en büyük sorunları arasındadırlar. Yabancı otlar güneşin sağladığı ışık, toprakta bulunan besin elementleri hatta arazilerde kullanılan gübreler için bile tarım bitkileri ile rekabet halindedirler. Yabancı otlarla mücadelede en sık kullanılan yöntem herbisit uygulamalarıdır. Herbisit kullanımının yabancı ot kontrolü, ürün veriminde artış, zararlı bitki hastalıklarının kontrolü gibi olumlu etkilerinin yanı sıra toprakta yaşayan mikroorganizmaları öldürerek toprak kalitesini düşürmesi, toprakta aşırı birikimi ve sularda kirlenme, yabancı ot popülasyonunda kullanılan herbisitlere direnç gelişiminin oluşması gibi olumsuz yönleri de vardır. Herbisite toleranslı tarım bitkilerinin arazilerde yetiştirilmesinin yabancı otlarla mücadele kolaylığı, arazi temizliği, ürün veriminde artış, tarım ekonomisine katkı gibi önemli etkileri vardır. Herbisite toleranslı tarım bitkilerinin geliştirilmesine yönelik araştırmalarda genom düzenleme teknolojilerinden CRISPR/Cas9 sistemi sıklıkla kullanılmaktadır. ALS enzimi bitkilerde valin, lösin, izölösün amino asitlerinin sentezinden sorumludur. Bu amino asitler bitkilerde protein sentezi, enerji üretimi gibi metabolik süreçlerde çeşitli görevler almaktadırlar. Bu tez çalışmasında CRISPR/Cas9-Sitidin Baz Düzenleme teknolojisi kullanılarak, havuç (*Daucus carota* L.) genomunda bulunan ALS gen bölgeleri hedeflenmiştir. Bitki eksplantlarına *Agrobacterium*-aracılı transformasyon yapılmıştır. 187 hipokotil eksplantının *Agrobacterium* ile inokülasyonun ardından 10 adet transgenik havuç bitkisi elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen transformasyon etkinliği %5,35'dir. Yapılan bu tez çalışmasında, çalışmanın amacı olan ALS inhibitörü herbisitlerden sulfonylurea sınıfı herbisitlere toleranslı havuç genotipleri elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: CRISPR/Cas9, sitidin baz editörü, ALS geni, havuç, *Agrobacterium*-aracılı transformasyon

2024, xv + 130 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

GENERATING HERBICIDE TOLERANT CARROT GENOTYPES USING CRISPR/CAS9-CYTIDINE BASE EDITOR TOOL

Deniz Zahide ALTINŞEKER ACUN

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticultural

Supervisor: Prof. Dr. Meryem İPEK

In the past decade, significant changes have occurred in plant biotechnology. The discovery of genome editing techniques and their adaptation to plant genomes have accelerated studies in plant biology. Today, within modern breeding techniques, the most reliable, intriguing, and widely applied genome editing technology is CRISPR/Cas9. Weeds are big problems in agricultural fields worldwide. They compete with crops for sunlight, soil nutrients, and even fertilizers used in the fields. The most commonly used method in combating foreign weeds is herbicide applications. The use of herbicides has both positive effects, such as controlling weeds, increasing crop yield, and managing harmful plant diseases, and negative aspects, including the depletion of soil quality by killing soil-dwelling microorganisms, accumulation in soil leading to contamination of water and the development of resistance in weed populations to these chemicals. The cultivation of herbicide-tolerant crops has significant benefits in agricultural fields, including ease of weed control, land cleanliness, increased crop yield, and contributions to agricultural economy. Genomic editing technologies, particularly the CRISPR/Cas9 system, are commonly employed in research aimed at the development of herbicide-tolerant crops. ALS enzyme is responsible for the synthesis of valine, leucine, and isoleucine amino acids in plants. These amino acids play various roles in metabolic processes such as protein synthesis and energy production in plants. In this thesis, the CRISPR/Cas9-Cytidine Base Editing technology was employed to target the *ALS* gene regions in the carrot (*Daucus carota* L.) genome. Plant explants were subjected to *Agrobacterium*-mediated transformation. After inoculation with *Agrobacterium*, 10 transgenic carrot plants were obtained from 187 hypocotyl explants. The transformation efficiency was 5.35% in this study. In this thesis, carrot genotypes tolerant to sulfonylurea herbicides, which are ALS inhibitor herbicides, were obtained.

Key words: CRISPR/Cas9, cytidine base editor, *ALS* gene, carrot, *Agrobacterium*-mediated transformation

2024, xv + 130 pages.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca benden tecrübesini, hoşgörüsünü, ilgisini esirgemeyen ve en önemlisi bana bu süreçte bazen kendimden çok güvenerek bugün bu satırları yazmamda çok büyük katkısı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Meryem İPEK'e teşekkürü borç bilirim.

Tecrübesini, sabrını ve zamanını benden hiç esirgemeyerek beni bu süreçte pozitif düşünceleri ile her zaman rahatlatan ve yalnız bırakmayan değerli hocam Prof. Dr. Ahmet İPEK'e ve her ihtiyaç duyduğumda bana yol göstererek her süreçte kendisini yanımda hissettiren hocam Doç. Dr. Asuman CANSEV'e teşekkürlerimi sunarım. Lisans eğitimimden itibaren benden akademik tecrübelerini ve yardımlarını esirgemeyen, doktora eğitimim boyunca Tez İzleme Komitesi Üyesi ve aynı zamanda Tez Savunma Sınavı Jüri Üyelerinden olarak tezime katkılarda bulunan kıymetli hocam Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ'a teşekkür ederim. Tez Savunma Sınavı Jüri Üyelerinden hocalarım, Prof. Dr. Ahmet Naci ONUS ve Prof. Dr. Murat ŞEKER'e tezime yaptıkları katkılardan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmaları sırasında manevi desteklerini ve yardımlarını benden hiç esirgemeyen, her birini tanımaktan büyük mutluluk duyduğum sevgili çalışma arkadaşlarım; Özge ÇAVUŞOĞLU, Osman Yaşar USLU, Fadime ÖZTÜRK, Şeydanur KUZHEY ve Naime ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Doktora eğitimimin ilk yıllarına yol arkadaşım olarak eşlik eden sevgili eşim Yasin ACUN'a, beni bu süreçte gerçekten çok büyük özveri ile desteklediği, pozitif yaklaşımı ile beni her zaman rahatlattığı ve elimi hiç bırakmadığı için sonsuz teşekkür ederim.

Varlığını öğrendiğim andan itibaren hayatımı daha da anlamlı kılan, doğumu ile bana hayatımın en güzel hediyesini veren, bu süreçteki en büyük motivasyon kaynağım, canım kızım Mona ACUN'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan ve olmasına da ihtiyaç duyduğum, en yakın arkadaşım, sevgili kardeşim Feray ALTINŞEKER'e, teşekkürü borç bilirim. Bana her zaman güvenerek, beni büyük sevgi ve hoşgörü ile büyüten babam, ilk öğretmenim, Necdet ALTINŞEKER'i ve bugünlere gelmemde çok büyük desteği olan, hayattaki duruşunu hep örnek aldığım annem Güner ALTINŞEKER'i çok büyük özlem ve minnetle anıyorum. Bu çalışmayı annem Güner ALTINŞEKER'e ithaf ediyorum.

Bu doktora tez çalışması, Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Genel Amaçlı Projeler kapsamında FGA-2021-201 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Deniz Zahide ALTINŞEKER ACUN
1/03/2024

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Havuç Taksonomisi, Orijini, Genetik ve Fizyolojik Özellikleri	5
2.2. Herbisitler	7
2.2.1. ALS inhibitörü herbisitler	9
2.2.2. Bitkilerde dallanmış amino asitler ve biyosentezleri	11
2.3. CRISPR/Cas Sistemlerinin Tarihi ve Biyolojisi	11
2.3.1. Fonksiyonel olarak CRISPR/Cas9 sistemi	18
2.3.2. Bir bağışıklık yanıtı olarak CRISPR/Cas9 sistemi ve genom düzenleme aracı olma yolculuğu	20
2.3.3. Cas9 Proteinini	21
2.3.4. DNA onarım mekanizmaları	23
2.3.5. Bitkilerde genom düzenleme teknolojisinin uygulanması ve genetiği değiştirilmiş organizmalarla ilişkisi	24
2.3.6. CRISPR/Cas9 bileşenlerinin bitki dokularına transformasyonları	30
2.4. Bitkilerde <i>Agrobacterium</i> -aracılı Gen Transferi	31
2.4.1. <i>Agrobacterium</i> biyolojisi	31
2.4.2. <i>Agrobacterium</i> -aracılı transformasyon	34
2.5. Sitidin Baz Editörleri	38
2.6. Literatürde CRISPR/Cas9 ve Sitidin Baz Editörünün Bitki Islahında Kullanımı	39
3. MATERYAL ve YÖNTEM	48
3.1. Bitki Materyeli	48
3.2. Steril Kabin ve Diğer Malzemelerin Sterilizasyonu	48
3.3. Gen Kasetinin Dizayn Edilmesi	49
3.4. Havuç DNA'larının İzolasyonu	51
3.5. NCBI Veri Bankasında Belirlenen gRNA Dizilerinin Çalışmada Kullanılacak Havuç Genotipinin ALS Gen Bölgelerinde Varlıklarının Kontrol Edilmesi	53
3.6. Gen Kasetinin Genetik Transformasyona Hazırlanması	54
3.6.1. Vektör seçimi	55
3.6.2. Gen kasetinin sentezi	55
3.6.3. pUC-GW-Amp plazmitinin çoğaltılması ve plazmit izolasyonu	56
3.6.4. Genetik transformasyonda kullanılan pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della plazmitinin temini ve klonlamaya hazırlanması	57
3.6.5. pUC-GW-Amp ve pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmeleri	58
3.6.6. Gen kasetinin pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitine ligasyonu ve çoğaltılması	59
3.6.7. pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitinin NEB 10 Beta <i>E. coli</i> hücrelerinden LBA4404 <i>Agrobacterium</i> ırkına transformasyonu	

ve transformasyonun PZR ile kontrolü	61
3.7. <i>Agrobacterium</i> -aracılı Transformasyonda Kullanılacak Havuç Eksplantlarının Yetiştirilmesi	63
3.7.1. Havuç tohumlarının sterilizasyonu	63
3.7.2. Havuç fidelerinin kallus başlangıç ortamlarına alınması	64
3.8. Kallus ve Hipokotillere <i>Agrobacterium</i> -aracılı Transformasyon	65
3.8.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ırklarından LBA4404 bakteri hücrelerinin transformasyona hazırlanmaları	66
3.8.2. Kallus dokularına <i>Agrobacterium</i> -aracılı transformasyon	67
3.8.3. Hipokotillere <i>Agrobacterium</i> -aracılı transformasyon	68
3.9. Transgenik Kallusların Taşıdıkları Mutasyonun PZR ve Sekans Analizi ile Değerlendirilmesi	69
3.10. Somatik Embriyoların Oluşumu	70
3.11. Somatik Embriyoların Köklendirme Ortamlarına Alınmaları	71
3.12. Köklenen Transforme Havuç Fidelerinin Klorosülfon Toleranslarının Klorosülfon İçeren Kallus Başlangıç Ortamlarında Kontrolü	71
3.13. Köklenen Havuç Bitkilerinin Dış Ortama Alıştırılmaları	71
4. BULGULAR	74
4.1. Genetik Transformasyona Hazırlık Aşamalarında Elde Edilen Bulgular	74
4.1.1. Gen kasetinin dizayn edilmesi	74
4.1.2. pUC-GW-Amp plazmitinin çoğaltılması ve plazmit izolasyonu	81
4.1.3. Genetik transformasyonda kullanılan pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della plazmitinin klonlamaya hazırlanması	81
4.1.4. pUC-GW-Amp ve pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmeleri	82
4.1.5. Gen kasetinin pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitine ligasyonu ve çoğaltılması	83
4.1.6. pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitinin NEB 10 Beta <i>E. coli</i> hücrelerinden LBA4404 <i>Agrobacterium</i> ırkına transformasyonu	84
4.1.7. pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitinin LBA4404 <i>Agrobacterium</i> ırkına transformasyonlarının kontrolü	85
4.1.8. Transformasyon için steril eksplantların elde edilmesi ve uygun besi ortamının belirlenmesi	86
4.2. Havuç Kallus Dokularına ve Hipokotillerine Genetik Transformasyon	87
4.2.1. Kallus dokularına <i>Agrobacterium</i> -aracılı transformasyon	87
4.2.2. Hipokotillere <i>Agrobacterium</i> -aracılı transformasyon	88
4.2.3. Transgenik kallusların taşıdıkları mutasyonun PZR ve sekans analizi ile değerlendirilmesi	89
4.2.4. Somatik embriyoların köklendirme ortamlarına alınmaları	92
4.2.5. Köklenen transforme havuç fidelerinin klorosülfon toleranslarının klorosülfon içeren kallus başlangıç ortamlarında kontrolü	93
4.2.6. Köklenen havuç bitkilerinin dış ortama alıştırılmaları	95
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	99
KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	130

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

%	Yüzde oran
°C	Santigrat derece
dk	Dakika
g	Gram
Kb	Kilobaz
L	Litre
µL	Mikrolitre
M	Molar
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
µM	Mikromolar

Kısaltmalar

Açıklama

ALS	Asetolaktat sentaz
B5	Gamborg's B5
bç	Baz çifti
Cas9	CRISPR ilişkili 9
CBE	Sitozin baz editörü
cDNA	Komplementer DNA
CRISPR	Düzenli aralıklar ile bölünmüş palindromik tekrar kümeleri
crRNA	Crispr RNA
CTAB	Cetyltriethylammoniumbromide
dCas9	İnaktif Cas9
DH	Çiftlenmiş haploid
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
gRNA	Rehber RNA
HR	Homolog rekombinasyon
HRAC	Herbisit Dayanıklılık Çalışmaları Komitesi
Indel	Ekleme-çıkarma
GDO	Genetiği değiştirilmiş organizmalar
GWAS	Genom-boyu ilişki analizleri
LB	Luria-Bertani
Mb	Mega baz
MS	Murashige&Skoog
nCas9	Nikaz Cas9
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NHEJ	Homolog olmayan uçların birleşimi

OD ₆₀₀	Optik yoğunluk 600
PAM	Protoaralık bitişik motif
PEG	Polietilen glikol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleoprotein
Sus	Sulfonylurea
TALEN	Transkripsiyon efektör benzeri nükleazlar
T-DNA	Transfer DNA
T _m	Erime sıcaklığı
tracrRNA	trans-crisRNA
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
vir	Virülans
ZFN	Çinko parmak nükleazlar
2,4-D	Diklorofenoksiasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	CRISPR sisteminin keşfi ve genom düzenleme aracı olarak kullanım süreci	12
Şekil 2.2.	Bakterilerde bulunan CRISPR/Cas sistemleri	17
Şekil 2.3.	CRISPR/Cas9 sisteminde RNA güdümlü Cas9 enziminin hedef DNA ipliklerini kesmesi	19
Şekil 2.4.	DNA’da oluşan çift zincir kırığının NHEJ ve HDR yolaklarının aktivasyonu ile onarımı	24
Şekil 2.5.	<i>Agrobacterium</i> tarafından enfekte edilen bitki	32
Şekil 2.6.	<i>Agrobacterium</i> -aracılı transformasyon	34
Şekil 3.1.	Çalışma öncesinde malzemelerin hazırlanması ve kabin sterilizasyonu	48
Şekil 3.2.	Ortam ve antibiyotik solüsyonlarının hazırlanmaları	49
Şekil 3.3.	Kromozomlara özel dizayn edilen gRNA’lar	50
Şekil 3.4.	Mutasyonu indükleyecek olan gen kaseti şeması	51
Şekil 3.5.	Bitki örneklerinin kurutulmaları	51
Şekil 3.6.	Kurutulmuş örneklerin öğütücü yardımı ile mekanik olarak parçalanmaları	53
Şekil 3.7.	Katı ve sıvı ortamlarında inkübe edilen <i>E. coli</i> bakteri hücreleri	57
Şekil 3.8.	Gen kasetinin 5’ ucuna, ortasına ve 3’ ucuna eklenen restriksiyon enzimlerinin kesim noktaları	58
Şekil 3.9.	pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmit haritası ve klonlama bölgesi	59
Şekil 3.10.	<i>E. coli</i> hücrelerinin katı ve sıvı ortamlarında büyütülmeleri	60
Şekil 3.11.	Gen kasetini taşıyan plazmitlerin LBA4404 bakteri hücrelerine aktarılması	61
Şekil 3.12.	Bakteri transformasyonu yapılmış <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ırklarına ait kolonilerin sıvı ortama inokülasyonu ile elde edilen LBA4404 hücreleri	62
Şekil 3.13.	Tohum sterilizasyon aşamaları	63
Şekil 3.14.	Petrilere ekilen tohumların çimlendirilmesi	64
Şekil 3.15.	Havuç eksplantlarının kallus başlangıç ortamlarına alınmaları	65
Şekil 3.16.	LBA4404 bakterilerinin katı ve sıvı ortamlarında kültürü	66
Şekil 3.17.	Kallus dokularına genetik transformasyon aşamaları	67
Şekil 3.18.	Havuç fidelerine ait hipokotillere <i>Agrobacterium</i> -aracılı transformasyon	69
Şekil 3.19.	Rejenerasyon ortamına alınan kallus dokularında sürgün oluşumları	70
Şekil 3.20.	Köklendirme ortamına ve vermikülite alınan turuncu havuç fideleri	72
Şekil 3.21.	Havuç bitkilerinin kademeli olarak dış ortama alıştırılmaları	73
Şekil 4.1.	Havuç genomu versiyon ASM162521v1’e göre kromozom 2’de bulunan <i>ALS</i> gen bölgesine ait özellikler	74
Şekil 4.2.	Havuç genomu versiyon ASM162521v1’e göre kromozom 6’da bulunan <i>ALS</i> gen bölgesine ait özellikler	75
Şekil 4.3.	Havuç genomuna ait hedef <i>ALS</i> gen bölgelerinin amino asit dizilerinin ve değişimi hedeflenen Prolin amino asidinin ExPASy çevrimiçi programı kullanılarak belirlenmesi	76

Şekil 4.4.	PZR ile çoğaltılan kromozom 2 ve 6'da bulunan <i>ALS</i> gen bölgelerine ait DNA fragmentlerinin agaroz jelde görüntülenmesi	78
Şekil 4.5.	<i>ALS</i> (kromozom 2) gen bölgesine ait sekans sonuçlarına göre gRNA1 ile hedeflenen bölge	78
Şekil 4.6.	<i>ALS</i> (kromozom 6) gen bölgesine ait sekans sonuçlarına göre gRNA2 ile hedeflenen bölge	79
Şekil 4.7.	Havuç genomunda <i>ALS</i> gen bölgelerini çoğaltan primer çiftleri	80
Şekil 4.8.	İzole edilen plazmitlerde <i>NptII</i> gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması	81
Şekil 4.9.	GW-Amp plazmitinin <i>PacI</i> ve <i>BamHI</i> enzimleri ile kesim sonuçlarının %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi	82
Şekil 4.10.	pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitinin <i>PacI</i> ve <i>BamHI</i> enzimleri ile kesimi	83
Şekil 4.11.	LBA4404 bakterilerinin Rifampisin ve Spektinomisin içeren seçici ortamlarında büyütülmeleri	85
Şekil 4.12.	LBA4404 bakteri hücrelerinde transformasyon başarısının PZR ile saptanması	86
Şekil 4.13.	B5-k ve MS-k ortamlarında oluşan kallus dokuları	87
Şekil 4.14.	Kallus dokularına genetik transformasyon ve dokuların gelişimleri	88
Şekil 4.15.	Hipokotil eksplantlarına <i>Agrobacterium</i> -aracılı transformasyon	89
Şekil 4.16.	Plazmite ait primerler kullanılarak transformasyon yapılan kallus dokularının PZR ile kontrolü	90
Şekil 4.17.	Transforme kallus dokularında hedeflenen kromozom 2 (Kr2) ve kromozom 6 (Kr6) da bulunan <i>ALS</i> hedef bölgelerinin Sanger dizilenmesi ile elde edilen kromatogramlar	91
Şekil 4.18.	Somatik embriyoların köklendirme ortamında gelişme aşamaları	93
Şekil 4.19.	Transformasyon yapılmamış ve transforme kallus dokularından gelişen bitkilerin hipokotillerinin klorsülforon içeren kallus başlangıç ortamlarına alınmaları	94
Şekil 4.20.	Havuç fidelerinin dış ortama alıştırılmaları	96
Şekil 4.21.	Transforme fidelerin kontrol grubundaki fideler ile morfolojik olarak karşılaştırılması	97
Şekil 4.22.	Transformasyon yapılan havuç eksplantlarından gelişen bitkilerin kromozom 2 <i>ALS</i> hedef bölgelerinin Sanger dizilenmesi ile elde edilen kromatogramlar	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. HRAC'a göre herbisitlerin etki mekanizmaları ve sınıflandırılmaları	8
Çizelge 2.1. HRAC'a göre herbisitlerin etki mekanizmaları ve sınıflandırılmaları (devam)	9
Çizelge 2.2. Genom düzenleme teknolojileri kullanılarak tarım bitkilerinde iyileştirilen özellikler	29
Çizelge 3.1. PZR'da kullanılan kromozom 2 ve kromozom 6 ALS bölgeleri için dizayn edilen primerler	54
Çizelge 3.2. Kromozom 2 ve kromozom 6 ALS bölgelerini çoğaltmak için kullanılan PZR bileşenleri	54
Çizelge 3.3. Kullanılan kallus geliştirme ortamları	65
Çizelge 3.4. PZR'da kullanılan CBE bölgesine özel primerler	70
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan gRNA1 ve gRNA2'nin özellikleri	76
Çizelge 4.2. pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della plazmiti ve gen kasetinde kullanılan restriksiyon enzim adları, tanıdığı diziler ve kesim lokasyonları	77

1. GİRİŞ

Havuç (*Daucus carota* L.) ekonomik değeri ve bulundurduğu yüksek besin içeriği ile önemli tarımsal ürünler içerisinde yer almaktadır. Lifli yapıya sahip olmasının yanı sıra provitamin A bakımından da zengindir. İnsanlarda A vitamini eksikliğinin körlüğe neden olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda karoten, antikansorejen etkiye de sahiptir. Ayrıca şeker, mineral gibi önemli nutrientleri; askorbik asit, poliasetilenler gibi insan sağlığına faydalı biyoaktif molekülleri; isoflavonoid, flavonoidler, fenolikler ve antosiyanin gibi antioksidanları da içerdiği için üretimi oldukça fazla yapılan bir sebzedir (Schulzova ve diğerleri, 2022). Farmakoloji, kozmetik ve gıda sanayi için antioksidan kapasitesi yüksek substratlar çok önemlidir. Çiğ bitki materyalleri ve ekstraktları mükemmel antioksidan kaynaklarıdır. Antioksidan kapasitelerinin yüksek olmasının yanı sıra bu içeriklerin, yatıştırıcı, anti-inflamatuvar ve yenileyici etkileri de bulunmaktadır (Zofia ve diğerleri, 2020).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre 2021 yılında dünya çapında üretilen havuç ve şalgam miktarı 41 666 714 44 tondur (FAO, 2022a). Aynı yıl Türkiye üretimi ise 592 109 ton olarak gerçekleşmiştir (FAO, 2022b). Türkiye de turuncu ve mor havuç yetiştiriciliği yapılmaktadır. Mor havuçlar yüksek oranda antosiyanin içerdiği için endüstride gıda boyası olarak da kullanılmaktadır. Havuç, hem üretim hem de pazardaki payı bakımından dünyada ekonomik önemi olan ilk on sebze içerisinde yer almaktadır. Serin iklim sebzesi olan havucun, yaz kış yetiştirilebilen çeşitlerinin geliştirilmesi ile birlikte tüketicilerin yıl boyunca kolayca havuca erişimi de mümkün hale gelmiştir (Simon ve diğerleri, 2008). Hem içerdiği besin maddeleri hem de günümüzde her mevsim ulaşılabilir ve sıkça tüketilen sebzeler arasında olması nedeni ile literatürde de birçok çalışmaya konu olmaktadır.

Havuç ve dahil olduğu Apiaceae ailesi mensuplarında ürün özelliklerini geliştirmek için moleküler markör sistemlerinden, gen fonksiyon analizleri gibi yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bunların yanı sıra omik teknolojileri kullanılarak yeni gen fonksiyonlarının ve metabolitlerin tespiti, popülasyon genetiği analizleri yardımı ile önemli agronomik özellikler taşıyan yeni genetik varyantların tanımlanması yapılmaktadır. Genom-boyu ilişki analizleri (GWAS), genetik transformasyon

yöntemleri, CRISPR-Cas9 genom düzenleme teknolojisi ve nanoteknoloji gibi birçok yeni nesil teknoloji de bu çalışmalarda kullanılmaktadırlar (Wang ve diğerleri, 2022).

Havuç üretimindeki en büyük problemlerden birisi yabancı otlardır. Yabancı otlar ışık ve toprak bitki besinleri açısından yetiştirilen ürünlerle rekabet halindedir. Yabancı otlar ile mücadelede başlıca yaygın olan 2 yöntem vardır; iş gücü kullanılarak üretim alanlarından uzaklaştırılması ve de arazilere herbisit uygulamalarının yapılmasıdır. Manuel olarak mücadele işgücünü çok arttırdığından ürün maliyetinde yükselmeye neden olmaktadır. Herbisit kullanımı ise her uygulama tekrarında maliyetin artmasına ve de toprağın gitgide kirlenerek sürdürülebilir tarım ilkelerinden uzaklaşılmasına neden olmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2021 yılı verilerine göre, Türkiye’de kullanılan toplam zirai ilaç miktarı 55 374 tondur. Bu miktarın 13 320 tonu herbisit kullanımına aittir (TÜİK, 2022). Bu kadar çok zirai ilaç kullanımı toprak yapısı, bu topraklar üzerinde yaşayan canlılar ve insanlar için sağlıklı değildir. Ayrıca ülke ekonomisi için de oldukça büyük bir kayıptır.

Türkçe ‘düzenli aralıklar ile bölünmüş palindromik tekrar kümeleri’ olarak anılan CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) (Afzal ve diğerleri, 2020), 2009 yılından itibaren, bakteri ve arkealarda doğal olarak bulunan adaptif bağışıklık sistemi olarak bilinmektedir. Bu sistem mikroorganizmaları faj ve plazmit istilalarından korumaktadır. 2011 ve 2012 yıllarında genetik mühendisliğince yapılan son düzenlemeler ile bu sistem 2013 yılından itibaren *in vitro* çalışmalarda da kullanılabilir. CRISPR/Cas 9 sistemi, endonükleaz olarak, Türkçe CRISPR-ilişkili9 olarak tanımlanan, Cas9 (CRISPR-associated9) (Afzal ve diğerleri, 2020) proteinini kullanmaktadır. Sistemin Cas9 proteininden başka rehber RNA olarak isimlendirilen, literatürde gRNA (Jinek ve diğerleri, 2012) kısaltması ile anılan kimerik bir RNA bileşeni vardır. Temel olarak sistem, RNA güdümlü bir endonükleaz kompleksidir. gRNA sayesinde genom bilgisi bilinen bir organizmanın hedeflenmiş gen bölgesine ulaşan ribonükleoprotein kompleksi, DNA ipliklerinde kırık oluşturabilme özelliğine sahip Cas9 endonükleazı vasıtası ile DNA’da istenilen değişimi meydana getirmektedir. Bu teknoloji tüm organizmalarda olduğu gibi yeni agronomik özellikler geliştirilmek istenen tüm bitkilerde de sıklıkla kullanılmaktadır. Sitidin deaminaz enzimlerinin temel çalışma prensibi, sitozin nükleotidinde bulunan amino grubunun

uzaklaştırılmasıdır. Bu grubun nükleotitten kaldırılması sitozin nükleotidinin urasil nükleotidine dönüşümüne neden olmaktadır. Urasil ise DNA replikasyonu sırasında ya da tamir mekanizmalarının aktive olması ile timin nükleotidine dönüştürülerek dizideki yerini almaktadır (Marzec ve Hensel, 2018). Cas9 enzimi DNA’da çift zincir kırığı oluşturup hataya açık DNA onarımına neden olmaktadır. Enzimin bu etkisini kontrol altına almak için enzimin sahip olduğu iki domainden birinde ya da her ikisinde birden mutasyon oluşturularak mutant Cas9 enzimleri meydana getirilmiştir (Vats ve diğerleri, 2019). Bu mutant enzimler nCas9 ve dCas9 enzimleri olarak anılmaktadırlar. nCas9 (nikaz Cas9) olarak anılan enzim, Cas9’un tek domaininde mutasyon oluşturularak elde edilen enzimdir (Thurtle-Schmidt ve Lo, 2018). dCas9 (dead=katalitik olarak inaktif Cas9) ise Cas9 enziminin çift domaininde mutasyon meydana getirilerek elde edilmiş mutant enzimdir (Komor ve diğerleri, 2016). Bu mutasyonlar sonucu Cas9 enzimleri, sitidin baz editörü ya da metiltransferaz gibi enzimlerle bağlanabilmektedir. Oluşturulan bu füzyonda eklenen enzim sitidin baz editörü ise DNA da kırık meydana getirmeden hedef bölgedeki baz değişimine neden olarak; metiltransferaz ise hedeflenen DNA bölgesinde metilasyona neden olarak etkisini göstermektedir. (Vats ve diğerleri, 2019).

Asetolaktat sentaz (ALS), yüksek yapılı bitkilerde dallanmış amino asitlerin biyosentezinde rol oynayan bir enzimdir. Valin, lösin ve izolösin amino asitlerinin biyosentezinde ilk basamağı katalize etmektedir. Bu enzim sulfonilurea (SUs) grubu herbisitlerin hedefidir. ALS inhibitör sınıfı herbisitler gösterdikleri yabancı ot-ürün seçiciliği, düşük dozda yüksek etki ve memelilerde düşük toksik etki gösterdikleri için sıklıkla tercih edilmektedirler (Shimizu ve diğerleri, 2018). Son çalışmalar ALS bölgesinde meydana getirilen mutasyonların, ALS hedefli herbisitlere tolerans gösterilmesine neden olduğunu belirtmektedir (Veillet ve diğerleri, 2019).

Bu tez çalışmasında, havuçta CRISPR/Cas9-Sitidin Baz Düzenleme Tekniği kullanılarak klorsülforon etken maddeli herbisitlere karşı toleranslı havuç genotiplerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için CRISPR/Cas9-Sitidin deaminaz füzyonu, doku kültüründe yetiştirilen havuç eksplantlarına, *Agrobacterium*-aracılığı ile aktarılmıştır. Yetiştirilen bitkiler klorsülforonlu ortamda büyütülmüş, toleranslı bitkilerin bu ortamdaki gelişimleri izlenmiştir. Toleranslı bitkilerde ALS bölgesinin 175. amino asidinin kodunda bulunan sitozin bazında oluşan deaminasyon ile sitozin nükleotidi timin nükleotidine

dönüşmüştür. Bu dönüşüm SUs grubu herbisitlerin etken maddesi olan klorsülforona toleranslı havuç genotiplerinin elde edilmesine neden olmuştur. Bu tez çalışması ile havuçta ilk kez CRISPR/Cas9-Sitidin deaminaz kullanılarak SUs grubu herbisitlere tolerans geliştirilmiştir. Ayrıca bu tez çalışmasının sonuçları bitkilerde ihtiyaç duyulan agronomik özelliklerin geliştirilmesinde yol gösterici olması açısından önemlidir.



2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1.Havuç Taksonomisi, Orijini, Genetik ve Fizyolojik Özellikleri

Bilimsel ismi *Daucus carota* L. olan ve Apiaceae ailesine mensup havuç bitkisi, kökü tüketilen, iki yıllık otsu bir sebzedir (Schulzova ve diğerleri, 2022). Aromatik bitkileri kapsayan en eski familyalardan olduğu düşünülen bu grup, çiçeklenen bitki familyaları içerisinde en önemlilerindendir ve yaklaşık olarak 3780 tür ve 434 cinsi kapsamaktadır. Havucun yanı sıra, kimyon (*Cuminum cyminum* L.), rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.), kişniş (*Coriandrum sativum* L.), anason (*Pimpinella anisum* L.), dereotu (*Anethum graveolens* L.) ve maydanoz (*Petroselinum crispum* L.), bu büyük taksonomik gruplandırmada en çok yetiştirilen üyelerdendir (Sayed-Ahmad ve diğerleri, 2017). Havucun, ilk olarak nerede ve ne zaman kültüre edilmeye başlandığı bilinmemektedir. Vavilov, kültürü yapılan havuçların Anadolu (Doğu Türkiye) ve Asya'nın iç bölgelerinden köken aldığını belirtmektedir. Kazakistan, Kırgızistan, Tacikistan, Türkmenistan ve Özbekistan'ı içine alan Orta Asya, doğu tipi havuçların ilk kültüre alınmaya başladığı bölgedir (Iorizzo ve diğerleri, 2013). Yetiştirilen havuçların kök renklerine bakılarak mor, sarı, beyaz ve turuncu olarak sınıflandırıldıkları görülmektedir. 20. yüzyıldan beri Avrupa'da doğu tipi havuç olarak bilinen mor renkli havuçlar, Mısır, Anadolu, Hindistan, Japonya, Çin ve diğer Asya ülkeleri de dahil olmak üzere büyük bir coğrafyada yetiştirilerek tüketilmektedirler. Rengini antosiyanin pigmentinin birikiminden alan bu havuçlar 'antosiyanin tipi havuç' olarak da sınıflandırılabilirler. Sarı havuçlar geçmişte Avrupa'da oldukça popüler olarak tüketilen kış sebzelerinden iken, günümüzde bu popülerliklerini kaybetmişlerdir. Beyaz köklü havuç varyeteleri 18. ve 19. yüzyıllarda insanlar tarafından tüketilirken aynı zamanda büyükbaş hayvanlarda yem olarak da kullanılmakta idiler. Günümüzde batı dünyasında oldukça sık tüketilen havuçlar turuncu renk olanlardır. Batı tipi havuç olarak da bilinen turuncu havuçların orijini net olarak bilinmemektedir. Ancak 17. yüzyılın başlarında Hollanda tablolarında bu havuç tipinin görülmesi kökeninin Hollanda olabileceği fikrini vermektedir. Batı tipi havuçlar, rengini karotenden aldığı için 'karoten tipi havuç' olarak da anılmaktadır (Banga, 1963; Rong ve diğerleri, 2014).

Dünyanın farklı yerlerindeki tüketiciler tarafından tercih edilen çeşitli havuç kökü tipleri vardır. Özellikle Asya'da Kuroda, Avrupa'da 'Nantes, Chantenay, Danvers, Paris Market, Flakkee' tipi havuç kökleri tüketiciler tarafından daha çok tercih edilmektedir. Güney Amerika'da 'Brasília' tipi havuç kökü tercih edilirken Kuzey Amerika 'Imperator' tipi havuç kökleri tercih edilmektedir (Simon, 2000).

Havuçta çiçekler şemsiye şeklindedir. Çiçeklenen bir havuç bitkisinde büyüme noktasındaki yaprak rozeti şemsiyenin ilk sırasını oluşturmaktadır, buna ana umbel adı verilmektedir. Daha sonra sıra ile ikinci, üçüncü, dördüncü sıralar gruplaşarak oluşmaktadırlar. Bir şemsiye üzerindeki umbellerde hem erselik, hem dişi, hem de erkek çiçekler bulunabilmektedirler. Erselik çiçeklerde yumurtalık alt durumludur. Beş adet yeşil kaliks ve beş adet beyaz petal, beş adet stamen ve iki adet stilus içermektedirler. Meyve, iki gözlü şizokarpik yapıdadır ve olgunlaştığında her biri bir tohum içeren iki akene ayrılmaktadır. Havuç bitkisinde protandri çiçek yapısı görülmesine karşın farklı zamanlarda olgunlaşan çiçekler birbirlerini tozlayabilmektedirler (Braak ve Kho, 1958; Cebeci ve Hancı, 2017).

Havuç, tohum ile yetiştirilmektedir. Ekim öncesi gübrelenmiş, drenajı iyi, organik madde içeriği yüksek kumlu topraklarda çok iyi yetişmektedir. Toprak sıcaklığı 4 °C'yi bulduğunda ekim yapılabilir. Tohumlar 12-18 °C'de çok iyi çimlenmektedirler ve hava sıcaklıkları 23 °C'yi aşmadığında çok iyi gelişim göstermektedirler. Düzenli sulama gerektiren havuç yetiştiriciliğinde damla sulama en uygun yöntemdir. Ekimden 70-100 gün sonra kökler olgunlaşmaktadır. Havuç yetiştiriciliğinin en büyük problemleri yabancı otlar, böcekler ve fungal hastalıklardır (Drost ve Bitner, 2020).

Daucus cinsi yaklaşık 40 türü kapsamaktadır. Çoğunlukla diploid yapıda olan bu cins $n=8$ ile $n=11$ arası kromozoma sahiptir. Havuç ise 9 çift ($2n=18$) kromozoma sahiptir. Havucun tüm genom sekanslanması 2016 yılında DH (doubled haploid) turuncu Nantes tipi havuç bitkisinde tamamlanarak yayınlanmıştır (Klimek-Chodacka ve diğerleri, 2019a). Nispeten daha küçük genoma sahip olan havucun genom büyüklüğünün yaklaşık 473 Mb olduğu tahmin edilmektedir (Iovene ve diğerleri, 2019). Bu boyutun 421,5 Mb'ı,

birçoğu bilinen cDNA'larla homoloji gösteren 32,133 gen bölgesinden, 532 küçük nükleer RNA ve 248 mikro RNA'dan oluşmaktadır. (Klimek-Chodacka ve diğerleri, 2019a).

2.2. Herbisitler

Yabani ot kontrolünde kullanılan herbisitlerin insan sağlığına ve çevreye olan etkilerini belirlemek için sayısız çalışma yapılmaktadır. Çevre kirliliği yakın gelecekte karşı karşıya kalınacak en zorlu problemlerden birisi olarak görülmektedir (Çelik ve diğerleri, 1996). Kirliliğin en büyük bileşenlerinden birisi olan ve yıllar geçtikçe kullanım miktarı da artan pestisitlerin yararlarının yanı sıra çevre için toksik sayılabilecek etkileri de çok fazladır. Tarım ürünleri ile rekabet eden istilacı bitki örtülerini kaldırmak için kullanılan herbisitler de bu kirlenmede büyük paya sahip olan pestisitler içerisinde yer alırlar (Kolpin ve diğerleri, 1998).

İnsanoğlu, tarım ürünlerinin kültüre edilmeye başlandığı tarihlerden itibaren yabani otların olumsuz etkileri için mücadele vermektedir. Otlarla mücadele ilk olarak ilkel çapalar ile manuel olarak başlamıştır. Daha sonra mücadelede hayvan gücünden yararlanılmış ardından mekanik güç devreye girmiştir. 1930'lardan itibaren biyolojik mücadele başlamıştır ve 1947'lerden sonra mücadele kimyasal yani herbisit kullanımları ile devam etmiştir. 2,4-D (diklorofenoksiasetik asit) ve MCPA (2-metil-4-klorofenoksiasetik asit) kullanılan ilk seçici herbisitlerdir. Bu herbisitlerin kullanımları zirai üretimde çok büyük olumlu etkilere neden olmuştur (Heap ve diğerleri, 2001). Herbisit, insektisit, fungusit gibi kimyasalları da kapsayan pestisitler kamu sağlığı ve gıda üretimine sayısız katkılar sağlamaktadırlar. Diğer bazı önemli kimyasalların aksine, pestisitler canlı sistemleri hedeflemek üzere üretilmektedirler. Uzun süredir kullanılan pestisitlerin insan sağlığına ve çevre üzerine etkileri her zaman şüphe konusu olmuştur. Bu kullanımın yaklaşık %40'lık bölümünü tarım arazilerinde yaygın olarak kullanılan herbisitler oluşturmaktadır (Blair ve diğerleri, 2014). FAO, dünyada pestisit kullanım miktarını 2021 yılı için yaklaşık 3 535 375 ton olarak açıklamıştır (FAO, 2022c). 2021 yılı toplam herbisit kullanımını ise 1 732 297 ton olarak bildirmektedir. 2019-2020 yıllarında kullanılan herbisit miktarının kıtalar arası dağılımı; %64,9 Amerika Kıtası, %17,4 Asya Kıtası, %11,1 Avrupa Kıtası, %2,8 Okyanusya Kıtası, %3,8 Afrika Kıtası

olarak belirtilmiştir. Aynı yılın verilerine göre; tarım alanında dünyada herbisit en çok Brezilya’da kullanılırken bunu Amerika, Arjantin, Çin, Kanada, Endonezya, Avustralya, Rusya, Fransa ve Malezya takip etmektedir. Türkiye’de ise bu miktar 13 320 ton olarak belirtilmektedir (FAO, 2022d). Herbisitler bitkilerde hedefledikleri yerlere veya mekanizmalara göre sınıflandırılmaktadırlar. Herbisit Dayanıklılık Çalışmaları Komitesi (HRAC) tarafından düzenlenen herbisitlerin etki mekanizmaları ve sınıflandırılmalarına ilişkin veriler Çizelge 2.1’de belirtildiği gibidir. Herbisitlerin sınıflandırılmaları birçok yönden faydalıdır. Bitkilerde etkiledikleri mekanizmalara göre ya da belli başlı özelliklerine göre ayrılmaları hem kullanımlarındaki hem de ticari faaliyetlerdeki hataları azaltmaktadır. Ülkemizde satışta bulunan herbisit ambalajlarında HRAC’ın 2021 öncesi sınıflandırma kodları yer almaktadır (Ateş, 2021). Çizelge 2.1’de HRAC kodları, I, M, P, Q, R, S, T, Z olarak belirtilen sınıflar dışında kalan bütün gruplar ülkemizde ruhsatlı olarak satışta bulunmaktadır (Torun, 2017).

Çizelge 2.1. HRAC’a göre herbisitlerin etki mekanizmaları ve sınıflandırılmaları (HRAC, 2022)

Sıra	HRAC kodu	Etki mekanizması
1	A	Asetil CoA karboksilaz (ACCCase) inhibitörü
2	B	Asetolaktat sentaz (ALS) inhibitörü
3	K1	Mikrotübül inhibitörleri
4	O	Sentetik oksinler
5	C1-2	Fotosentez II inhibitörü (PS II)-Serin 264
6	C3	Fotosentez II inhibitörü (PS II)-Histidin 215
9	G	5-enolpiruvil-şikimat-3-fosfat inhibitörü (EPSP)
10	H	Glutamin sentetaz enzim inhibitörü
12	F1	Karotenoid biyosentezi inhibitörü (phytoene desaturase=PDS aşamasında)
13	F4	Deoksiksilüloz 5-fosfat (DOXP)-sentaz enzim inhibitörü
14	E	Protoporfirinojen oksidaz enzim inhibitörü (PPO)
15	K3	Çok uzun zincirli yağ asitlerinin (VLCAs) inhibitörü
18	I	Dihidropiridin sentez (DHP) inhibitörü

Çizelge 2.1. HRAC’a göre herbisitlerin etki mekanizmaları ve sınıflandırılmaları (devam)

Sıra	HRAC kodu	Etki mekanizması
22	D	Fotosistem I (PS I) elektron transferini engelleyen inhibitörler
24	M	ATP ayırıcı ajan inhibitörü
27	F2	4- hidroksifenilpiruvat dioksijenaz (HPPD) inhibitörü
28	-	Dihidroorotat dehidrojenaz (DHODH) enzim inhibitörü
29	L	Selüloz sentez inhibitörü
30	Q	Yağ asidi dioesteraz enzim inhibitörü
31	R	Serin-treonin protein fosfotaz inhibitörü
32	S	Solanesil difosfat sentetaz enzim inhibitörü
33	T	Homojentisik solanesil transferaz inhibitörü

2.2.1. ALS inhibitörü herbisitler

Herbisitler, yabani otlarda hedefledikleri enzim ya da proteinleri inhibe ederek etki etmektedirler. Amino asit biyosentezini inhibe eden herbisitler, bitkideki enzimin işleyişini durdurarak amino asit ya da protein gruplarının sentezlenmesini engellemektedirler. Hayvanlar tüm amino asitleri sentezleyemedikleri için bu amino asitleri bitki ve bakteriler aracılığı ile almaktadırlar. Bu nedenle amino asit biyosentezini inhibe eden herbisit grupları, diğer grup herbisitler kadar hayvanlara etki edememektedirler. Bu durum enzim ya da protein hedefli herbisit gruplarını yeni herbisitlerin geliştirilmesinde oldukça öne çıkartmaktadır. Amino asit biyosentezini inhibe eden herbisitlerin etkilediği üç temel enzim vardır. Bu enzimler; aseto hidroksi asit sentaz (AHAS) ya da ALS olarak anılan dallanmış amino asitlerin biyosentezindeki yolakta bulunan enzim, şikimat yolağında bulunan 5-enolpiruvil-shikimat-3-fosfat (EPSPS) enzimi ve amonyum asimilasyonunda bulunan glutamin sentaz (GS) enzimidir (Tan ve diğerleri, 2006). Son zamanlarda herbisit alanındaki hızlı ilerlemeler, yenilikler mevcut olsa da bunların hiçbirisi AHAS ya da ALS inhibitör grubu herbisitlerdeki değişimler kadar hızlı değildir. (Stidham, 1991).

Birçok kültür bitkisinin yetiştirilmesinde sıklıkla kullanılmakta olan en önemli herbisit sınıfı ALS inhibitörleridir. Bu grup inhibitörlerin etki ettiği yabani ot spektrumu oldukça geniştir. Geniş ürün seçiciliğine sahiptirler ve az miktarlardaki doz uygulamaları dahi etkilidir. ALS inhibitörü herbisitler yapısal olarak beş ayrı grupta toplanmaktadır; sulfonylurea, imidazolinonlar, triazolopirimidinler, pyrimidinylthio benzoates ve sulfonlamino-carbonyltriazolinones (Park ve diğerleri, 2003; Zhou ve diğerleri, 2007). Bu sınıf herbisitlerin etki ettiği birincil hedef bölge iki farklı reaksiyonun katalizlenmesinden sorumludur. Bu reaksiyonlardan ilki, pirüvatın asetolaktata veya α -ketobütirata dönüşümü ikincisi ise pirüvatın, lösin, izolösin, valin gibi dallanmış amino asitlerin biyosentetik yollarında bulunan asetohidroksibütirata dönüşümüdür (Park ve diğerleri, 2003).

Sulfonylurea sınıfı herbisitler 1982 yılından beri aktif olarak kullanılmaktadırlar. Sulfonylurea ve imidazolinonların hedef bölgeleri lösin, izolösin ve valin amino asitlerinin sentezinden sorumlu ALS enzimidir. Tahıl yetiştiriciliğinde kullanılan klorsülforon, sulfonylurea grubu herbisittir. Buğday bitkisi klorsülforonu metabolize edebildiği için bu grup herbisitlere karşı tolerans gösterebilmektedir. Kochia (*Kochia scoparia* [L.] Schrad.), ALS inhibitör grubu herbisitlere karşı direnç gösterdiği belirlenen ilk yabani ottur. Bu tanımlamalardan itibaren dayanımın fizyolojik ve moleküler düzeyi birçok yabani ot çeşidinde çalışılmaktadır (Saari ve diğerleri, 1989). Bu grup herbisitler bitkilerde ALS bölgesini blokladığından dallanmış amino asit sentezi durmaktadır (Beetham ve diğerleri, 1999). ALS toleransının moleküler mekanizması bakteri, maya ve yüksek yapılı bitkilerde belirlenmiştir. Bitkilerde tolerans gösteren çeşitler klonlanarak sekanslanmıştır. Tüm yüksek yapılı bitkilerde, ALS proteininin kodlandığı lokasyon oldukça korunan 5 domain bölgeye sahiptir. Bu beş korunmuş bölge A-E arası harfler ile kodlanarak anılacaktır. Domainler bitkilerde 12-57 bç (baz çifti) arasında değişen uzunluklara sahip olabilmektedirler. (Boutsalis ve diğerleri, 1999). Her domainde amino asit değişimine sebep olabilecek tek nükleotid değişiminin bile bu toleransı sağlamaya yeterli olduğu görülmüştür (Beetham ve diğerleri, 1999). Domainlere ait diziler ve her birinin taşıdığı değişken amino asit altı çizili olarak aşağıda belirtilmiştir;

domain A (AITGQVPRRMIGT),
domain B (QWED),
domain C (VFAYPEGGASMEIHQALTRS),
domain D (AFQETP),
domain E (IPSGG) (Boutsalis ve diğ erleri, 1999).

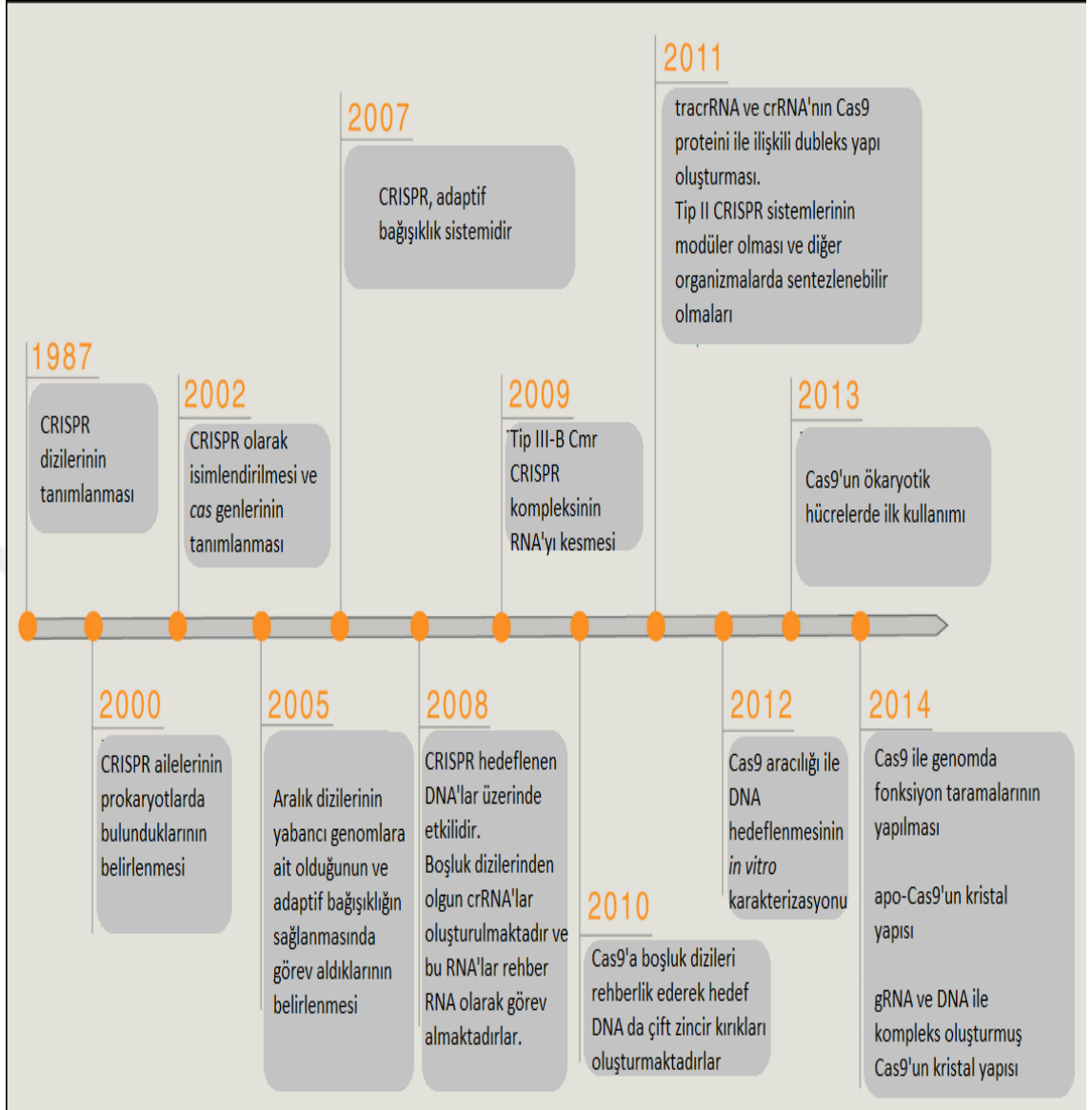
2.2.2. Bitkilerde dallanmış amino asitler ve biyosentezleri

Dallanmış zincirli amino asitler içerisinde bulunan valin, lösin ve izolösin, memelilerde sentezlenemeyen 10 esansiyel amino asitten bazılarıdır. Bu amino asitler bitki, mantar, bakteri ve arkeler tarafından sentezlenebilmektedirler. Bu nedenle antifungallar, antimikrobiyallar ve de herbisitler geliştirilirken bu yola lara ait enzimler hedeflenmektedir. Bu amino asitlerin önemini arttıran bir diğ er nokta ise insan ve hayvanların günlük diyetlerindeki yerleridir (Singh ve diğ erleri, 1995; McCourt ve diğ erleri, 2006).

Asetohidroksiasit sentaz (AHAS) ya da asetolaktat sentaz (ALS) (EC 2.2.1.6) enzimi, ototrof canlılarda bulunmaktadır. Dallanmış zincirli amino asitlerin biyosentezindeki ilk basamağını katalizlediğinden bu yola  ototrofik canlılar için çok önemlidir. Bu amino asitler bitkilerin tüm bölümlerinde, hüresel bazda ise kloroplastlarda sentezlenmektedir. Valinin biyosentezi tek bir metabolik yola  ile olurken izol sinin biyosentezinde ikinci bir yola  aktive olmaktadır. Lösin sentezi ise, valin sentezinin ara maddesi olan 2-ketoisovalerate üzerinden yapılmaktadır. Buradan lösin ve valinin ortak bir metabolik yoldan sentezlendikleri açıkça görülmektedir. İzolösin ise bu yola lara paralel farklı bir metabolik yol ile sentezlenmektedir (Singh ve diğ erleri, 1995; Ceylan Balog lu, 2017).

2.3. CRISPR/Cas Sistemlerinin Tarihi ve Biyolojisi

CRISPR/Cas9 sistemi, bakterilerin %40'ında ve arkelerin tamamına yakınında bulunan edinilmiş bağışıklık sistemidir. Sistem RNA güdümlü nükleazlardan oluşmaktadır ve bugün genom düzenleme ve genetik mühendisliğince kullanılan en güvenilir teknolojidir. Hikayesi 1987 yılında başlayan yöntemin keşfi (Hsu ve diğ erleri 2014), geliştirilmesi, genom düzenleme teknolojisi olarak bilim insanlarının kullanımlarına sunulması yaklaşık olarak 30 yıl sürmüştür (şekil 2.1). Genom üzerinde yapılan çalışmalar ilk zamanlarda



Şekil 2.1. CRISPR sisteminin keşfi ve genom düzenleme aracı olarak kullanım süreci (Hsu ve diğerleri, 2014'den değiştirilerek alınmıştır)

daha çok kodlama yapan bölgeler üzerine yoğunlaşmakta idi. Zaman geçtikçe genomda kodlama yapmayan bölgelerin, hücre fonksiyon ve regülasyonundaki işlevleri ortaya çıkmıştır. Şimdilerde kodlama yapmayan bölgelerden tekrarlı dizilerin transkribe edilmesi oldukça kabul görmektedir. 1987 yılında tanımlanmış CRISPR dizileri, transkribe edilen ancak kodlama yapmayan birçok RNA çeşidinden birisidir (Deveau ve diğerleri, 2010). Ishino ve diğerleri (1987) tarafından *Escherichia coli* bakterisinin K12 suşunda alkalik fosfat izoenzimlerinin dönüşümlerinden sorumlu olan *iap* (alkalik fosfat izoenzim) gen bölgesi üzerine bir araştırma yürütülmüştür. Çalışma sırasında gen

bölgesi klonlanarak sekanslanmıştır. Bu bölgede 29 nükleotidlik tekrarlı dizilerin bulunduğu ve bu dizilerin farklı nükleotid dizilimine sahip başka kısa dizilerce bölündüğü fark edilmiştir. Bu gelişme literatürde CRISPR hakkındaki ilk bildirimdir (Shabbir ve diğerleri, 2016). CRISPR dizileri bu dönemlerde kısa düzenli aralıklı tekrarlar (short regularly spaced repeats; SRSR), direkt tekrar (direct repeat; DR), direkt çeşitli tekrarlar (direct variant repeats; DVR), arka arkaya tekrarlar (tandem repeat; TREP) gibi farklı kısaltmalar ile anılmaktaydılar. Yapılan çalışmalar çoğaldıkça benzer dizilere hem farklı bakterilerde hem de halofilik arke genomlarında rastlanılmıştır. Dizilerin ilk fark edilmeye başlandığı bu dönemlerde dizi fonksiyonlarının biyolojik olarak tespit edilmesi oldukça zordu. Özellikle de hareketli genetik elementler için, DNA veri tabanlarındaki bilgiler çok sınırlıydı (Deveau ve diğerleri, 2010).

2002 yılında, Jansen ve diğerleri tarafından düzenli aralıklar ile bölünen diziler için CRISPR adı tanımlanmıştır. 2000'li yılların ortalarına doğru, CRISPR dizileri içerisinde yer alan ve aralık (spacer) olarak tanımlanan dizilerin bakteriyofaj gibi önceden karşılaşılan istilacı genomlara ait diziler olduğu anlaşılmıştır (Mojica ve diğerleri, 2005; Bolotin ve diğerleri, 2005). Mojica ve diğerleri (2004) çalışmalarında, bu dizileri taşıyan bakteri ırklarının, istilacı organizmalar ile karşılaştıklarında enfekte olmadıklarını görmüşler ve CRISPR'ın bakterilerde bulunan bağışıklık sistemi ile arasında bir bağlantı olduğunu belirtmişlerdir. Barrangou ve diğerleri (2007) tarafından CRISPR/Cas-aracılı uyarlanabilir bağışıklık sisteminin ilk deneysel kanıtı elde edilmiştir. Çalışma, laktik asit bakterisi olan *Streptococcus thermophilus* ile yapılmıştır. Bakteri hücrelerinin litik fajlar ile muamele edilmesinin ardından, bakteri hücresinde bulunan CRISPR lokusuna fajın genomuna ait kısa diziler eklendiği belirtilmiştir. CRISPR ve *cas* genlerinin birlikte faja karşı direnç göstermesi, aralık ve faj genom dizilerindeki komplementerlik ile belirlenerek CRISPR/Cas aracılı bağışıklığın sağlanma mekanizması da açıklığa kavuşturulmuştur (Barrangou ve Horvath, 2012).

Sistemin önemli bir bileşeni olan Cas proteinlerinin ilk zamanlarda DNA onarım mekanizmasında görev aldıkları düşünülmektedir. CRISPR dizilerine yakın konumlanmış proteinlerin yapıları ve görevleri incelendiğinde bu proteinlerin transkriptlerin işlenmesinden, hedef DNA/RNA'ların kesilmesinden ve CRISPR dizilerinin aralarına istilacı organizmaya ait yeni dizinin eklenmesinden sorumlu

oldukları belirlenmiştir. Bu proteinler, 25 protein ailesinde bulunan domainleri içermektedirler (Makarova ve diğerleri, 2006; Makarova ve diğerleri, 2011). Cas proteinleri için öne atılmış bir diğer görüş ise arke ve bakterilerde bulunan bu sistem ile ökaryotlarda bulunan RNA interferans (RNAi) mekanizması arasında benzerlik olmasıdır. Her iki sistemde de RNA spesifik çift iplikli helikaz-nükleaz, mRNA'ları hedefleyen endonükleaz gibi bileşenler bulunmaktadır. Ancak CRISPR/Cas ve RNAi sistemlerinde bulunan hiçbir bileşen aynı kökenden gelmemektedir. Ökaryotlarda bulunan RNAi mekanizmasında, CRISPR/Cas sisteminde olduğu gibi istilacı genomlarına ait dizilerin eklendiği CRISPR dizisi gibi bir dizi bulunmamaktadır. Bu eklenme CRISPR/Cas sisteminde, istilacı genoma karşı başlatılan savunmanın ilk adımıdır ve savunma bunu takip eden ilave iki aşama ile devam etmektedir. RNAi mekanizmasında bu olaylar zinciri de bulunmamaktadır (Makarova ve diğerleri 2006). Farklılıklar da göz önüne alındığında iki sistemin birbiri ile benzer olmadığı açıkça anlaşılmaktadır.

CRISPR lokusu ve *cas* genleri her zaman birbirlerine yakın olarak konumlanmaktadır. Bu durum her ikisinin de fonksiyonel olarak ilişki içinde olduğunu göstermektedir. Birçok türde *cas* genlerine ait 4 adet bölge bulunmaktadır ve bu gen bölgeleri genomda *cas3-cas4-cas2-cas1* sırasına göre yer almaktadırlar. *cas1* geni tüm türlerde CRISPR lokusu ile birlikte bulunmaktadır. Diğer 3 *cas* geni tüm türlerde bulunmaktadır ancak bu organizmaların hepsinde CRISPR lokusu bulunmayabilmektedir. Cas3 proteinlerinin amino asit dizilimleri yedi motif içermektedir (Jansen ve diğerleri, 2002). Bu yapı DNA'nın çözülmesinden sorumlu proteinlerden, helikaz 2 enzim ailesine ait karakteristik bir özelliktir. Bu enzim ailesi homologlarının; DNA onarımı, transkripsiyonel düzenleme, kromozom ayrılması, rekombinasyonu ve kromatinlerin tekrar düzenlenmesinde görev aldıkları düşünülmektedir (Hall ve Matson, 1999). Cas4 proteinin; RecBCD (Rekombinasyonel onarım B-C-D) kompleksinin bir parçası olan ve DNA'da çift zincir kırığı meydana geldiğinde homolog rekombinasyonu başlatmak üzere kırığın uçlarındaki parçaları ayıran RecB ekzonükleazı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Cas1 ve Cas2 yapıları için çalışmalar halen sürmektedir. CRISPR/Cas sistemlerinin evrimsel gelişimi incelendiğinde, sistem içerisinde korunan tek nükleazların Cas1 ve Cas2'ler olduğu görülmektedir. CRISPR/Cas sisteminin orijin aldığı düşünülen casposon (CRISPR ilişkili

transpozonlar) isimli hareketli genetik elementler hakkındaki çalışmalar devam etmektedir. (Ishino ve diğ erleri, 2018). Casposonlar, bakteri ve arke genomlarında rastlanan hareketli elementlerdir. Bu elementler, Cas1 proteinlerinin alt ailesini kodlamaktadırlar. Diğ er bilinen mobil genetik elementlerden (MGE) farklı olarak, casposonların, konak organizma genomlarına Cas1 endon kleazlarını kullanarak entegre olmaları için CRISPR-Cas sistemi tarafından kullanılan aralık (spacer) entegrasyonunu andıran bir mekanizma kullandığı d ş  n lmektedir. Bu neden ile Cas1'in CRISPR/Cas9 sisteminin sağladığı bağışıklıktaki anahtar enzim olduğu d ş  n lmektedir. Çünkü casposon homologlarının Cas1 filogenisi içerisinde gösterdiği geniş dallanma, casposonların prokaryotlardaki adaptif bağışıklık sisteminin tam ortasında olduklarını açıkça göstermektedir (Krupovic ve diğ erleri 2014).

CRISPR/Cas lokuslarının yapısı zaman içerisinde hızla değişim göstermektedir. Lokus yapılarında yeni düzenlemelerin ortaya çıkması ya da lokusların tamamının veya modüler olarak bir kısmının yatay transferler içermesi, başka sınıf ve tip CRISPR/Cas sistemlerinin ortaya çıkmalarına neden olmaktadır (Makarova ve diğ erleri, 2015; Godde ve Bickerton, 2006). Bazı  zellikler tüm sınıflar için korunmuşken bazı özellikler de ayırt edici niteliktedir. Bu sistemler birbirinden özellikle CRISPR lokusları ile ayrılmaktadır. Her sınıfın tekrarlı dizileri sınıflar için karakteristiktir (Plagens ve diğ erleri, 2015).

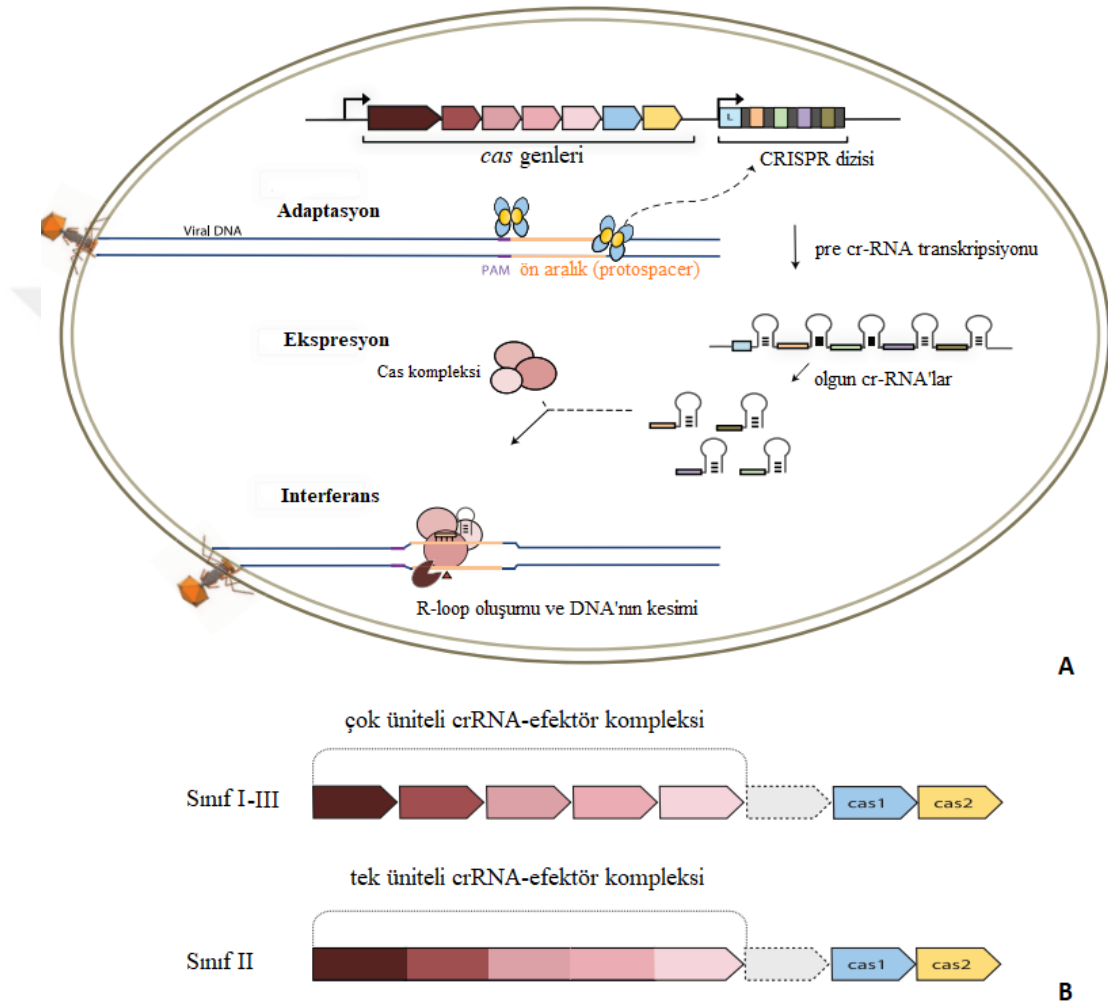
CRISPR/Cas sistemleri, istilacı genomlara karşı bağışıklık yanıtını; adaptasyon, ekspresyon ve interferans olmak üzere 3 aşamada vermektedirler (Jore ve diğ erleri, 2011) (şekil 2.2 A). Adaptasyon aşaması; virüs ya da plazmit genomuna ait kısa fragmentlerin, konakta bulunan kromozomal CRISPR lokusuna entegre olma aşamasıdır. Bakterinin viral istilas  sonucunda, virüs genomu ile homoloji gösteren ve yaklaşık 30 b'den oluşan bir aralık dizi, CRISPR lokusunun lider ucuna bağlanmaktadır. Aynı faja ait birden fazla aralık dizisinin eklenmesi çok nadir olmaktadır. Lokusa her yeni aralık dizisinin bağlanması, palindromik tekrar dizilerinin dublikasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu da yeni bir aralık-tekrar dizi ünitesinin oluşumuna neden olmaktadır. Boşlukların oluşturulma ve eklenme mekanizması tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır ancak Cas1 ve Cas2 proteinlerinin bu süreçte görev aldıkları d ş  n lmektedir (van der Oost ve diğ erleri, 2009). Sistemin ikinci aşaması ekspresyondur. CRISPR lokusundan uzun öncül-crRNA (pre-crisprRNA) sentezlenmektedir. Cas proteinlerinin aktivasyonu ile olgunlaşarak

kısa crRNA'lar oluşturulmaktadır. Pre-crRNA'nın olgunlaştırılması tracrRNA (transcrisRNA) adı verilen küçük bir RNA tarafından yapılmaktadır ve Cas9 olarak da bilinen Csn1 varlığında, RNase III tarafından katalizlenmektedir (Deltcheva ve diğerleri, 2011). Sistemin son aşaması interferanstır. Bu aşamada crRNA ve Cas enzimi ribonükleoprotein kompleksi oluşturmaktadır. crRNA, hedef DNA ile eşleşmektedir. İki dizi arasında komplementerlik sağlandığı zaman Cas proteini hedef DNA dizisini kesmektedir (Horvath ve Barrangou, 2010).

İstilacı organizma genomunun neresinden aralık dizisi alınacağını belirleyen nispeten kısa bir dizi daha vardır; PAM (Protospacer Adjacent Motif=Protoaralık Bitişik Motif) sekansı (Makarova ve diğerleri, 2011). PAM sekansı; aralık dizisinin istilacı organizmaya ait olduğunu sisteme tanıtacak olan ve sistemdeki nükleazlara özel 3-5 nükleotidden oluşan dizilerdir. PAM sekansı, kompleksin DNA'ya ilk bağlanmasında anahtar role sahiptir. Bu sekans hedef dizide olmadığında, grNA'nın tamamı bölge ile komplementer özellik gösterse de Cas9-RNA kompleksi tarafından tanınmamaktadır. PAM sekansının bir diğer önemli görevi ise Cas9 enziminin katalitik aktivitesini arttırmasıdır (Sternberg ve diğerleri, 2014).

CRISPR/Cas sisteminin I-II ve III olmak üzere 3 sınıfı bulunmaktadır. Her bir sınıf, nükleik asitlerin tanınması ve kesilmeleri aşamalarında farklı moleküler mekanizmalar kullanmaktadır. Bağışıklık yanıtında ilk basamak olan adaptasyon, her 3 sınıf içinde ortak seyretmektedir. Bu aşamada evrensel Cas1 ve Cas2 proteinleri eşliğinde istilacı genomdan elde edilen ön aralık dizisinin homoloğu, konakta bulunan CRISPR lokusuna entegre edilmektedir (Yosef ve diğerleri, 2012). Adaptasyon ve interferans aşamalarında kritik role sahip olan PAM dizileri sınıf I ve sınıf II CRISPR sisteminde aynıdır. Her ikisi de istilacı genomda 2-5 nükleotidlik PAM sekansı aramaktadırlar. Ancak sınıf III CRISPR sisteminde PAM sekansı aranmamaktadır (Sahah ve diğerleri, 2013). Her 3 sistemin crRNA ile kompleks oluşturduğu Cas proteinleri birbirinden farklıdır. Sınıf I Cas3, sınıf II Cas9, sınıf III ise Cas10 proteinini kullanmaktadır (Plagens ve diğerleri, 2015). Oluşturulan ribonükleoprotein (RNP) kompleksleri de 3 sistem için birbirlerinden farklıdır. Sınıf I crRNP'ye 'antiviral savunma için CRISPR ilişkili kompleks' (Cascade) adı verilmektedir. Sınıf I ve III'te interferans aşaması, çoklu-Cas protein kompleksi oluşumunu gerektirirken sınıf II sistemde sadece Cas9 (Csn1) proteini hedef dizi için

yeterlidir (Şekil 2.2 B). Sınıf II'yi diğerlerinden ayıran bir diğer farklılık da trans -aktive edici CRISPR RNA (trans-activating; tracrRNA) dır. Sınıf I ve III'de tek bir crRNA çoklu-Cas protein kompleksine rehberlik edip, istilacı hedef genoma doğru yönelirken, sınıf II çift RNA olan crRNA-tracrRNA'yı kullanmaktadır (Plagens ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.2. Bakterilerde bulunan CRISPR/Cas sistemleri (Mohanraju ve diğerleri, 2016'dan değiştirilerek alınmıştır) **A)** CRISPR/Cas sistemlerinin bağışıklık yanıtını verdiği adaptasyon, ekspresyon ve interferans aşamaları **B)** Sınıf I-III çok üniteli crRNA-efektör kompleksi, Sınıf II tek üniteli crRNA-efektör kompleksi

Prokaryotların virüs istilasından kurtulması, CRISPR/Cas sistemindeki crRNA ile istilacı genomda bulunan ön aralık (protospacer) dizisinin eşleşmesi ile olmaktadır. Virüslerdeki mutasyon ve rekombinasyon oranı oldukça yüksek olduğu için prokaryotların savunma sistemlerinden kaçışları kolay olabilmektedir (Mohanraju ve diğerleri, 2016). Bazen taşıdıkları nokta mutasyonu ile bile prokaryotik CRISPR/Cas sistemlerinin sağladığı bağışıklık yanıtından kaçabilmektedirler. Semenova ve diğerleri (2011) istilacı genomdaki ön aralık dizisinin her nükleotidindeki mutasyonun bu kaçışı sağlamadığını belirtmişlerdir. PAM dizisinin ardından gelen ilk 7 nükleotid crRNA ve istilacı genomda bulunan ön aralık dizisinin sıkı komplementerliğinden sorumludur. Bu bölgeye ‘çekirdek bölge’ adı verilmektedir. Sadece çekirdek bölgede bulunabilecek bir mutasyon crRNA-Cas kompleksinin istilacı genomdaki komplementer bölgeye karşı olan bağlanma afinitesini düşürmektedir ve de bağışıklık yanıtından kaçışa sebep olabilmektedir. Ancak çekirdek bölge dışında meydana gelen çoklu mutasyonlarda virüs CRISPR/Cas sistemin sağladığı bağışıklıktan kaçamamaktadır.

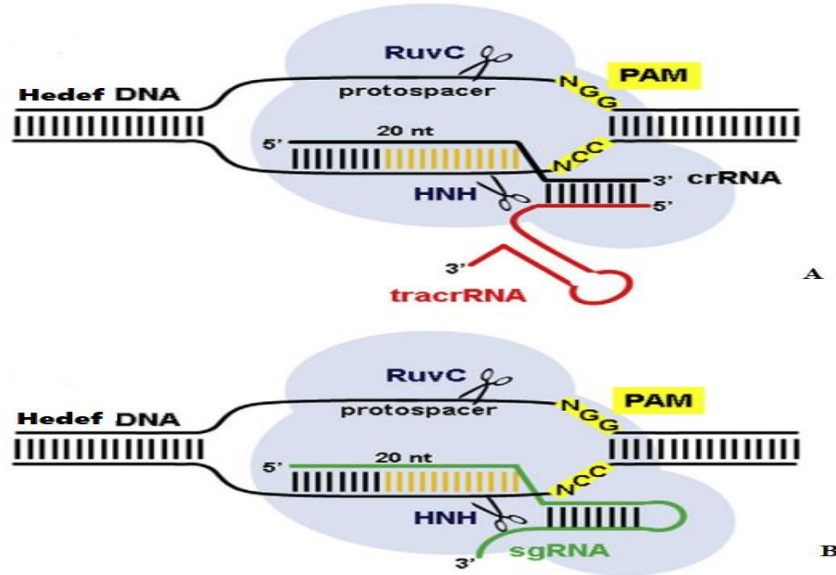
2.3.1. Fonksiyonel olarak CRISPR/Cas9 sistemi

Literatürde COG3513, Csx12, Cas5, Csn1 olarak da karşımıza çıkabilen Cas9, RuvC ve HNH olarak adlandırılan iki nükleaz domainine sahip multifonksiyonel özellikli bir proteindir (Deltcheva ve diğerleri, 2011; Doudna ve Charpentier, 2014). Deltcheva ve diğerleri (2011) tarafından insan patojeni olan *Streptococcus pyogenes* bakterisinde yapılan çalışmada, tracrRNA ile crRNA’nın tekrar dizileri arasında 24 nükleotidlik komplementer bir bağlanma alanı olduğu belirlenmiştir. tracrRNA, crRNA’ların olgunlaşmasında RNaseIII ve Cas9 proteini ile birlikte çalışmaktadır. tracrRNA-crRNA eşleşmesinin ardından bu yapı Cas9 proteinine bağlanarak kompleksi oluşturmaktadır. Cas9 proteini bakteri hücrelerinin virüs istilalarına karşı korunmasında görevlidir. Bir diğer önemi de sahip olduğu RuvC ve HNH domainleri sayesinde istilacı plazmitlerin transformasyon etkinliklerinin azaltılmasıdır. CRISPR/Cas sistemleri farklı türlerdeki bakterilere de aktarılabilmektedir (Sapranauskas ve diğerleri, 2011).

Cas9 proteininde bulunan HNH domaini, crRNA ile komplementer olan DNA ipliğini kesmektedir. RuvC domaini ise komplementer zincirin karşısındaki zinciri kesmektedir. Cas9 proteininin HNH ya da RuvC domainlerinden birinde mutasyon oluşturulursa, Cas9

proteini tek DNA ipliğinde kırık meydana getirmektedir. Oluşan mutant Cas9 proteini de nCas9 adını almaktadır. Cas9 proteininin her iki domaininde de mutasyon oluşturulursa Cas9 proteini mutant dCas9 proteinine dönüşmektedir (Jinek ve diğerleri, 2012). dCas9 enzimi DNA zincirlerinde kesim yapmamaktadır.

tracr-crRNA ile çalışan Cas9 sistemindeki RNA'lar tek bir RNA olacak şekilde düzenlenmektedirler (Şekil 2.3). Düzenlemenin ardından bu RNA, gRNA olarak anılmaya başlanmıştır. gRNA iki önemli bölgeye sahiptir. 5' ucunda yaklaşık 20 nükleotidlik bir dizi içermektedir. Bu dizi ile hedef genomdaki komplementer diziye bağlanmaktadır. 3' ucunda ise Cas9 proteinine bağlanmak için bir dizi bulunmaktadır. Kimerik gRNA'nın keşfinden sonra 2012 yılında Dr. Doudna ve Dr. Charpentier tarafından CRISPR/Cas9 sisteminin genom bilgisi bilinen herhangi bir organizmada da hedeflenen DNA bölgesinde çift zincir kırığı meydana getirebildiği belirtilmiştir (Jinek ve diğerleri, 2012). Bu gelişmelerin ışığında *S. pyogenes* tabanlı CRISPR/Cas9 sistemi bilim insanlarının gözdesi olmuş ve hızlıca istenilen organizma genomlarındaki düzenlemeler için adapte edilerek kullanılmaya başlanmıştır (Doudna ve Charpentier, 2014).



Şekil 2.3. CRISPR/Cas9 sisteminde RNA güdümlü Cas9 enziminin hedef DNA ipliklerini kesmesi (Bortesi ve Fischer, 2015'ten değiştirilerek alınmıştır)

A) CRISPR/Cas9 sisteminin bakteri hücresindeki işleyişi **B)** Genetik mühendisliğince geliştirilen CRISPR/Cas9 sisteminin işleyişi

2.3.2. Bir bağıklık yanıtı olarak CRISPR/Cas sistemi ve genom düzenleme aracı olma yolculuğu

CRISPR lokusu 20-50 bç uzunluğunda palindromik tekrarlı diziler içermektedir (Sorek ve diğerleri, 2013). Bu diziler, baz içerikleri birbirlerinden farklı ancak benzer uzunluklardaki ‘aralık (spacer)’ olarak adlandırılan başka dizilerce ayrılmaktadırlar (Semenova ve diğerleri, 2011). Aralık dizileri, bakteri ya da arkelerin karşılaştıkları istilacı genomlardan elde edilen dizilerdir. CRISPR dizileri ‘lider dizi’ olarak tanımlanan yaklaşık 500 bç uzunluğundaki AT nükleotidlerce zengin dizilerce çevrelenmektedir. Bu bölgenin transkripsiyon için sinyal oluşumu başlattığı ve yeni aralık-tekrar dizilerinin oluşumunda görev aldığı sanılmaktadır (Pul ve diğerleri, 2010). Yani istilacı genomdan alınan DNA dizisi, yeni bir aralık olarak lider bölgenin uç kısmına bağlanmaktadır. Bu bölge bütün istilacılar için moleküler hafıza gibi çalışmaktadır. Bu hafızadan crRNA sentezlenmektedir. Bağıklık yanıtı CRISPR dizisinden üretilen ve moleküler olarak rehber görevi gören RNA’nın (crRNA) Cas proteinleri ile kompleks oluşturması ile başlamaktadır. crRNA eşleşeceği istilacı DNA’ya doğru yönelmektedir. CRISPR lokusundan elde edilen ve Cas proteini ile de kompleks halinde bulunan crRNA ve istilacı DNA eşleşmesi gerçekleştiğinde, yabancı DNA, Cas proteinleri tarafından kesilmektedir. Böylece CRISPR/Cas sisteminin bağıklık yanıtı başarı ile sonlandırılmış olmaktadır (Nuñez ve diğerleri, 2014; Sontheimer ve diğerleri, 2010; Sahah ve diğerleri, 2013).

Genom düzenlemede temel olan DNA zincirinin iki ucunda meydana getirilen kıraktır. Ökaryotlarda bu kırıklar hataya açık bir sistem ile onarılmaktadır ve kırık oluşan lokasyonda mutasyon meydana gelmektedir (Hsu ve diğerleri 2014). Meydana gelen mutasyonun özelliği kırığın onarıldığı tamir mekanizmasına bağlıdır. Hücrelerdeki DNA onarım mekanizmaları tezde ‘DNA onarım mekanizmaları’ başlığı altında detaylı olarak incelenmiştir. Prokaryotlarda birçok genom düzenleme olayı genotiplerin rekombinasyon bazlı seçimi ile CRISPR’ın yaptığı hedefler sonucunda olmaktadır. Bu yüzden süreç ökaryotlarda endojen DNA tamir mekanizmaları ile bakterilerde ise rekombinasyon temelli CRISPR aracılı genom düzenleme ile yönetilmektedir (Barrangou ve van Pijkeren, 2016).

Doğada 4 bileşenden oluşan sınıf II CRISPR/Cas9 bağıklık sisteminin genetik mühendisliği tarafından 2 bileşenden oluşan kullanıma hazır bir paket teknolojisine

dönüştürülmesi CRISPR sistemlerine olan ilgi ve merakı arttırmıştır (Jinek ve diğerleri, 2012). Sınıf II CRISPR/Cas sistemindeki Cas9 endonükleazı aktive olabilmek için crRNA ve tracrRNA'nın rehberliğine ihtiyaç duymaktadır (Deltcheva ve diğerleri 2011). Bu teknolojiye gelinen son noktada kimerik sentetik bir rehber RNA, crRNA ve tracrRNA'nın işlevini üstlenerek sekans spesifik hedefine doğru ilerleyebilmektedir (Jinek ve diğerleri, 2012).

Kimerik gRNA, enzimatik olarak ya da kimyasal olarak sentezlenebilmektedir. gRNA'nın enzimatik olarak sentezlenmesi oldukça düşük maliyetlidir. *In vitro* olarak yapılan bu sentezleme de kalıp DNA, T3, T7 ya da SP6RNA polimerazlara ve ribonükleosit trifosfatlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntemin dezavantajı kullanılan kalıbının doğrulanması için sekans analizine ihtiyaç duyulmasıdır. Sekanslamanın yanı sıra senteze dahil olmayan trifosfatlar kaldırılmalı, sentezlenen RNA'dan DNA ve protein kalıntıları temizlenmelidir. Ek olarak bu yöntemde molekülün 5' ucunda hatalar ile karşılaşılabilir (Afzal ve diğerleri, 2020; Kelley ve diğerleri, 2016). Bir diğer sentez yöntemi kimyasal sentezdir. Kimyasal sentez ile zamandan ve üründen tasarruf sağlanmaktadır. Zorunlu olmamakla beraber bu yöntemle sentezlenmiş gRNA'lar da klonlanıp sekanslanabilmektedirler. Kimyasal sentezde nükleozid fosforamid yapı blokları birleştirilerek gRNA'lar elde edilmektedirler (Kelley ve diğerleri 2016). crRNA, tracrRNA, ve gRNA'lar sırası ile 40, 70 ve 100 baz uzunluklarına sahip yapılardır. Bu uzunluktaki fragmentler, kimyasal sentez ile daha hızlı, yüksek verimli, saflık oranı yüksek ve fazla miktarda temin edilebilmektedirler (Afzal ve diğerleri, 2020; Jinek ve diğerleri, 2012).

2.3.3. Cas9 proteini

Cas9 proteinleri, gRNA güdümlü hedeflenmiş nükleazlar (RGNs; RNA guided site-specific nucleases) olarak da bilinmektedirler (Sandhya ve diğerleri, 2020). Farklı bakteri türlerinden elde edilerek çalışmalarda kullanılan Cas9 enzimleri birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Her enzimin tanıdığı PAM sekansı birbirinden farklıdır. Bu nedenle bir genomda hedeflenen gen bölgesi için Cas9 enziminin seçimi çalışmanın başarısını etkilemektedir (Lino ve diğerleri 2018). İlave olarak Cas9 enziminin aktivitesinden bağımsız olarak sistemi etkileyen başka faktörler de vardır. Prokaryotlardan farklı olarak

ökaryotik hücrelerde gen bölgesinin hedeflenebilmesi için nükleazların, nüklear translokasyonu gerekmektedir. Nüklear translokasyon sinyali (NLS) Cas9 enzimine bağlanmaktadır. NLS ve Cas9 arasına 32 amino asitlik bağlayıcı fragment eklendiğinde Cas9'un hedef DNA bölgesi üzerindeki etkinliğinin de arttığı belirtilmektedir (Shen ve diğerleri, 2013).

S. pyogenes bakterisinde bulunan Cas9 proteini üzerinde yapılan çalışmalar sayesinde CRISPR/Cas9 mekanizması daha da iyi anlaşılmıştır. Cas9 proteininin moleküler yapısı elektron mikroskobu ve X ışını kristalografisi aracılığı ile incelenmiştir. İncelemeler enzimde farklı zamanlarda meydana gelen iki yapısal değişikliği ortaya çıkarmıştır. Bunların ilki, enzim gRNA'ya bağlanırken olmaktadır ve enzimin üç boyutlu yapısında büyük bir değişim meydana gelmektedir. Enzimde oluşan ikinci ve daha büyük değişiklik ise hedeflenen DNA bölgesine bağlanması sırasında oluşmaktadır. Bu değişimler proteinin, DNA'ya bağlanan kısmı ile gRNA'nın bağlı olduğu bölgede bir kanal oluşmasına neden olmaktadır. Meydana gelen bu değişikliklerin bir diğer nedeninin çift iplikli hedef DNA zincirlerinin açılması için olabileceği yapılan tahminler arasındadır (Jinek ve diğerleri, 2014). Katalitik olarak inaktif Cas9 proteini aktif formuna göre daha fazla hedef dışı diziye gitmektedir. Aktif Cas9 proteinleri çok nadir olarak hedef dışı bağlanmaların olduğu DNA bölgelerinde kırık meydana getirmektedirler. Hedef dışı DNA bağlanması, hedeflenen genom bölgesindeki PAM yoğunluğu ile ilişkilidir. DNA ipliklerindeki ayrışma ve RNA-DNA heterodubleksinin oluşumu PAM bölgesinde başlayıp hedef dizinin ucuna doğru devam etmektedir. Cas9 proteini, açık kromatin bölgelerde transkripsiyonun olmadığı inaktif kromatin bölgelere oranla daha çok bağlanma eğilimi göstermektedir (Doudna ve Charpentier 2014, Sternberg ve diğerleri 2014).

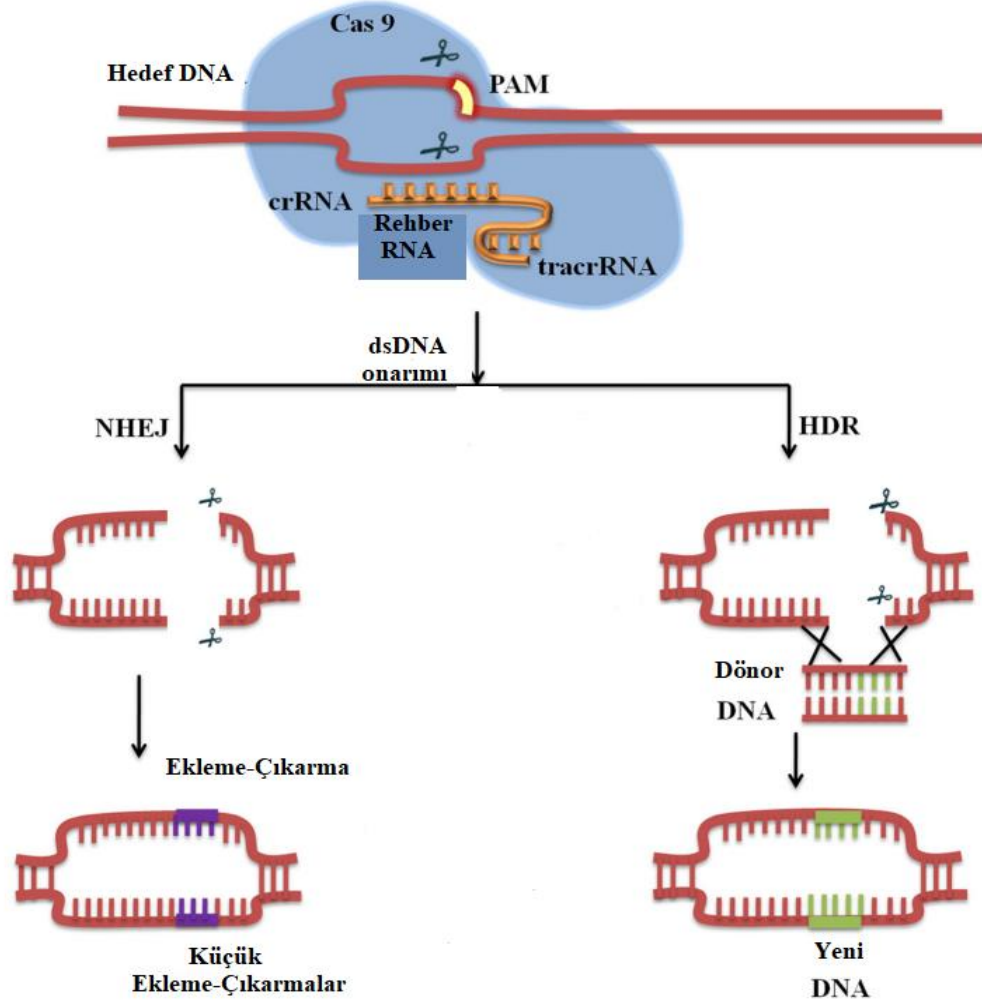
2012 yılında Cas9'un *in vitro*'da hedeflenen DNA dizilerinde kırık meydana getirdiğinin belirlenmesinin ardından birçok canlı organizmada çalışmalar yapılmıştır. Bu tarihten itibaren Cas9, maya, tütün, *Arabidopsis thaliana*, çeltik, buğday, fare, tavşan, kurbağa gibi birçok organizmada genlerin düzenlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır (Sander ve Joung, 2014).

2.3.4. DNA onarım mekanizmaları

Endojen ve ekzojen kaynaklı birçok genotoksik ajan, hücrelerin DNA'larında çift zincir kırıkları meydana getirmektedirler. DNA'da meydana gelen çift zincir kırıklarının onarımı için hücrelerde birkaç onarım mekanizması vardır (Rudin ve diğerleri, 1989; Vats ve diğerleri, 2019). Bu onarım mekanizmaları, hedeflenen gen modifikasyonları ya da düzenlemeleri için genomun belirli bölgelerinde kırıklar meydana getirmek için oldukça önemlidirler (Vats ve diğerleri, 2019). Hücrelerin durumları, tipleri ve çift zincir kırıklarının oluşum şekilleri DNA onarım mekanizmalarını etkilemektedir. Her ne sebeple oluşmuş olursa olsunlar DNA'da oluşan kırıklar hücre için oldukça risklidir. Kırıkların onarımları sırasında meydana gelen mutasyonlar, genomun devamlılığını bozabilmekte hatta hücre ölümleri ile sonuçlanabilmektedir. Sebep oldukları bu etkilerin yanı sıra çift zincir kırıkları, çeşitliliğin temel nedeni olan mayozun fizyolojik sürecine ve immün sistemin repertuarının zenginliğine de hizmet etmektedirler (Mcvey ve Sang, 2008; Le Guen ve diğerleri, 2015). DNA onarım mekanizmaları genetik stabiliteyi korurken aynı zamanda popülasyonlardaki genetik çeşitliliği de sürdürebilmelidir. Bu neden ile onarım sürecinin yüksek hassasiyet ve doğrulukla ilerlemesi bütün canlılar için oldukça önem taşımaktadır (Guirouilh-Barbatve diğerleri, 2014).

Hücrede DNA'da oluşan çift zincir kırıklarının onarımından sorumlu 2 temel mekanizma vardır; homolog olmayan uçların birleşimi (NHEJ=Non-homologous end joining) homolog rekombinasyon ya da homoloji yönlendirmeli onarım (HR=homologous recombination; HDR=homology directed repair) (Şekil 2.4). NHEJ, hata yapmaya meyilli bir mekanizmadır. NHEJ ile yapılan onarım bölgede ekleme-çıkarma, yer değiştirme mutasyonlarının görülmesine neden olmaktadır. Buna rağmen NHEJ, tüm ökaryot hücrelerde, hücre döngüsünün fazına bakılmaksızın sıklıkla devreye giren onarım şeklidir ve hücrede iki onarım mekanizması oranlandığında NHEJ ile onarım oranı daha yüksektir (Lino ve diğerleri, 2018; Anzalone ve diğerleri, 2020). Bu onarım mekanizmasında homolog kalıp kullanılmadığından kırık olan uçlar rastgele tekrar bağlanmaktadır (Lino ve diğerleri, 2018). HDR onarım mekanizması, genom mühendisliğinin temeli olarak görülmektedir. Hücre siklusunun interfaz evrelerinden biri olan S fazı ve mitotik fazdan önceki hazırlık evresi olan G2 evresinde, kardeş kromatitler DNA kırığının onarılması için kalıp olarak kullanılmaktadır. Bilim insanları bu mekanizmayı gen bölgesi ekleme,

gen fonksiyonlarının değiştirilmesi, yeni gen fonksiyonlarının tespiti gibi çalışmalarda kullanabilmektedirler (Wang ve Xu, 2017).



Şekil 2.4. DNA’da oluşan çift zincir kırığının NHEJ ve HDR yolaklarının aktivasyonu ile onarımı (Afzal ve diğerleri, 2020’den değiştirilerek alınmıştır)

2.3.5. Bitkilerde genom düzenleme teknolojisinin uygulanması ve genetiği değiştirilmiş organizmalarla ilişkisi

Genetik çeşitlilik, tarımsal ürünlerin geliştirilmesinin temelini oluşturmaktadır. Bitki ıslahının amacı, genetik varyasyonlar oluşturarak bu çeşitliliği kullanmaktır (Gao, 2021). Bitki ıslahının uzun tarihine bakıldığında bu amaçla dört temel teknik kullanılmıştır; çaprazlama, mutasyon ıslahı, transgenik ıslah ve genom düzenleme (Chen ve diğerleri, 2019). Çaprazlama ıslahında, istenilen özelliklere sahip bitki genomlarının çaprazlanarak özelliklerin bir genomda toplanması hedeflenmektedir ki bu yöntem tarımsal üretimi en

çok arttıran yöntemdir. Ancak çaprazlama ebeveyn hatların sahip olduğu özelliklerle sınırlı olduğundan ıslahçılara geniş çeşitlilikte bir genetik kaynak sunmamaktadır. Mutasyon ıslahında, kimyasal veya radyasyonla mutasyon indüklenerek genom genelinde rastgele mutasyonların oluşturulması hedeflenmektedir. Fakat istenilen özellikleri taşıyan bireylerin büyük bitki popülasyonlarından seçimi oldukça zaman alıcı bir yöntemdir. Bitki ıslahının dönüm noktası olan transgenik ıslahta ise iyileştirilmek istenilen özelliğe ait gen bölgesi farklı organizmalardan tarım bitkilerine aktarılmaktadır. Yabancı DNA fragmentinin rastgele bitki genomlarına entegre edilmesi sonucu elde edilen bitki, genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) kapsamına girmektedirler ve bu bitkilerin üretimleri sıkı devlet kontrolleri yapılarak engellenmektedir (Gao, 2021). Genom düzenleme ile ıslahta genomdaki manipülasyonlar nükleazlar aracılığı ile yapılmaktadırlar.

GDO, ilgili yasal düzenlemelerde en temel anlamı ile genetik materyalin, doğada kendiliğinden meydana gelemeyecek bir şekilde değiştirildiği organizmalar olarak tanımlanmaktadır (Kuntz, 2020). Dünya genelinde GDO'lar üzerindeki mevcut düzenlemeler, ya bağlayıcı olmayan rehber nitelikteki uluslararası düzenlemeler olarak ya da bağlayıcı hukuki düzenlemeler olarak ele alınmaktadırlar. Bunlar arasında Biyolojik Çeşitlilik Üzerine Birleşmiş Milletler Sözleşmesi ve Cartagena Biyogüvenlik Protokolü, GDO'lar için düzenlenmiş başlıca uluslararası metinlerdir. Genetiği değiştirilmiş bitkiler, ülkeler bazında ilgili yasal düzenlemelerce prosedürün tamamen yasaklandığı veya son ürün özelliklerinin kontrol edildiği iki çerçevede değerlendirilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Tarım Bakanlığı, GDO'yu belirli durumlarda geleneksel üretimle eşdeğer olarak görmektedir. Kanada yerel düzenleme sistemine koyduğu bilimsel kriterlere göre yetiştiriciliğe izin vermektedir. Arjantin, genetiği değiştirilmiş ürünlerin onaylanması için işlevsel bir düzenleme mekanizması kurmuştur. Ancak Avrupa Birliği ülkeleri, ABD, Brezilya, Kanada ve Arjantin gibi ülkelerin aksine GDO ürünlerinin üretimini ve ticaretini desteklememektedirler. Biyolojik Çeşitlilik Üzerine Birleşmiş Milletler Sözleşmesi ve Cartagena Biyogüvenlik Protokolü, Türkiye tarafından da tanınmaktadır (Turkoglu Coskun ve Olhan, 2022). Ülkemizde 5977 sayılı Biyogüvenlik Kanunu ve Yönetmelikleri 2010 yılından itibaren yürürlüktedir. Yönetmeliğe göre Türkiye'de GDO'lu bitki ve

hayvan üretimi yasaklanmıştır. Şu an için 26 çeşit mısır ve 10 çeşit soya fasülyesinin sadece yem amaçlı kullanımı izne tabiidir (Yılmaz Çebi ve Olhan, 2019).

ISAAA (Uluslararası Tarımsal Uygulamalı Biyoteknoloji Hizmetleri Ağı) verilerine göre 2019 yılında, biyoteknolojik yöntemler kullanılarak üretilen GDO'lu bitkilerin ekim alanları dünya çapında 190,4 milyon hektardır. Bu alanların %56'sı gelişmekte olan ülkeler, %46'sı gelişmiş ülkeler tarafından kullanılmaktadır. GDO'lu ürünlerin en çok yetiştirildiği ilk 5 ülke Amerika (71,5 milyon hektar), Brezilya (52,8 milyon hektar), Arjantin (24 milyon hektar), Kanada (12,5 milyon hektar) ve Hindistan (11,9 milyon hektar) olarak gösterilmektedir. Aynı yılın verilerine göre ekimi en çok tercih edilen GDO'lu tarım bitkileri %48,2 soya fasülyesi, %32 mısır, %13,5 pamuk, %5,3 kanola, %1 diğer bitkilerdir. ISAAA 2023 Genetik Modifikasyon Onay Veritabanı'na göre bu bitkilerin geliştirilmesinde kullanılan yöntemlerden bazıları arasında; *Agrobacterium rhizogenes* ve *Agrobacterium tumefaciens*-aracılı aktarım, kimyasal olarak indüklenmiş tohum mutasyonu, geleneksel ıslah ve transgenik bağışçı/bağışçılar içeren çapraz melezleme ve seçim, elektroporasyon, bitki hücre ve dokularına mikropartikül bombardımanı, mutasyon ıslahı, polen tüpü yolağı sayılabilmektedir.

GDO'lara karşı geliştirilen olumsuz tutumların altında GDO hakkında edinilen yetersiz bilgiler, yapılan araştırma-geliştirme çalışmalarına karşı duyulan güvensizlik, risk-yarar analizlerindeki eksiklikler ve etik bazı değerler yer almaktadır (Ishii ve Araki, 2016; Zhang ve diğerleri, 2018). Bu neden ile artan dünya nüfusunun gıda ihtiyacına cevap verecek, insan sağlığı ve çevre güvenliği açısından kamu onayını alabilecek, yeni nesil, hızlı ve güvenilir teknolojilerle geliştirilmiş yeni varyetelere ihtiyaç duyulmaktadır (Gao, 2015).

Son zamanlarda yaşam bilimlerinde geliştirilen teknolojilere verilebilecek örneklerin başında genom düzenleme teknolojisi gelmektedir. Bu teknoloji, biyolojik olayların keşiflerinde ve araştırmalarında kullanılmaktadır (Vats ve diğerleri, 2019). Genom düzenleme teknolojisi aslında ileri düzey moleküler biyoloji tekniklerinin bir toplamıdır. Bu teknikler kullanılarak, genomik lokuslarda, etkili ve kararlı modifikasyonlar yapılabilmektedir. GDO'lu bitkilerin elde edildiği klasik genetik mühendisliği uygulamalarında istenilen özelliklere sahip bitki genomlarının elde edilebilmesi için

transgenler kullanılmaktadır. Genom düzenleme teknolojisinde istenilen özellikler, genomda hedeflenen bölgede değişiklikler yapılarak ya da sadece birkaç nükleotidin değiştirilmesi ile elde edilebilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2018). Yeni nesil bu teknoloji, genomda hedeflenen bölgedeki değişiklikleri nükleazlar aracılığı ile DNA’da kırık meydana getirerek yapmaktadır. (Sun ve diğerleri, 2016; Komor ve diğerleri, 2017). Temel olarak genom düzenleme teknolojisi ile hedeflenen gen bölgesinde çalışmanın amacına göre düzenleme 4 farklı şekilde yapılabilmektedir. Bu düzenlemeler; genlerin susturulması, silinmesi, eklenmesi ve de gen bölgesinde değişiklik meydana getirilmesi olarak sıralanmaktadır. Bölgede meydana gelen ekleme-çıkarma ya da çerçeve kayması mutasyonları, anlamsız mRNA transkriplerine neden olmaktadır. Bu durum gen bölgesinin sessizleşmesi ile sonuçlanmaktadır. Gen silmede kullanılan iki farklı nükleaz, hedeflenen gen bölgesinin kodlama kısmında kırığa neden olmaktadır. Bu düzenleme gen ürünü olan proteinin sentezlenememesine neden olmaktadır. Gen bölgesinin düzenlenmesi ya da gen bölgesi ekleme çalışmaları, iki nükleaz tarafından işaretlenmiş ve hücre DNA’sı ile homoloji gösteren tek ya da çift iplikli fragment tarafından yapılmaktadır. Hücre onarım sırasında fragmentin gösterdiği homoloji ile kırığı HDR onarım mekanizması ile onarmakta ve hedeflenen gen bölgesinde istenilen düzenleme yapılmış olmaktadır (Lino ve diğerleri, 2018). Bu teknolojiye dizi hedefli nükleazların bitkisel dokulara aktarımı söz konusudur. Başlıca 3 çeşit dizi spesifik nükleaz vardır; çinko parmak nükleazlar (ZFN, zinc-finger nucleases), transkripsiyon efektör benzeri nükleazlar (TALEN, transcription activator-like effector nucleases) ve de CRISPR/Cas sistemleri. 2002 yılında kullanılmaya başlanan ilk nükleazlar ZFN’ lerdir. (Gao, 2015). Cys2His2 çinko parmaklar, ökaryotlarda transkripsiyon faktörlerinde bulunan başlıca DNA bağlayıcı motiflerdir. Bu proteinler bulundukları çoklu parmak yapıları sayesinde DNA’ya bağlanma sağlayabilmektedirler (Wolfe ve diğerleri 2000). *FokI* endonükleazının katalitik domaini ile füzyon haline getirilmiş ZF protein domaini, DNA’nın hedeflenen bölgelerine bağlanmaktadır ve hedeflenen bölgede kesik meydana getirmektedir (Budhagatapalli ve diğerleri, 2015). ZFN’ler tüm ökaryotlarda ortak olarak bulunmaktadır. Transkripsiyonel düzenleme ve protein-protein etkileşimlerinden sorumludurlar. ZFN’lerin keşfinden 4 yıl sonra DNA’ya bağlanabilen yeni bir protein keşfedilmiştir. Bu protein bitkilerde patojen olarak bulunan *Xanthomonas* bakterisinde bulunmaktadır (Zhang ve diğerleri, 2013). Protein DNA’ya bağlanacağı merkez etrafında

33-35 amino asitlik tekrar dizileri içermektedir. Her tekrarın 12 ya da 13. pozisyonunda bulunan ve RVDs (Tekrarlanan Değişken Di-kalıntılar) ile anılan ikili amino asit vasıtası ile hedef DNA bölgesine bağlanmaktadır. Protein, ZFN' de olduğu gibi, *FokI* endonükleazı ile birleştirilmiş ve TALE nükleazları yani TALEN'ler geliştirilmiştir (Christian ve diğerleri, 2010). İki yöntemde oldukça yüksek etkinlikle çalışmaktadır. Ancak yeni hedefler için protein çiftlerinin tasarımları, bu yöntemlerin kullanımlarını oldukça kısıtlamaktadır (Gao, 2015) ZFN'lerin aksine TALEN'lerin dizaynı çok daha kolay ve daha az zaman alıcıdır (Cermak ve diğerleri, 2011). ZFN'ler gibi hedef dışı mutasyona da neden olmayan TALEN ayrıca çok daha az sitotoksiktir. TALEN'in sınırlayıcı yönü 3 kb olan boyutudur. ZFN'ler için bu değer 1 kb'dır. Bu kadar büyük boyutlu fragmentlerin transformasyonları da oldukça güçtür. Bugün DNA manipülasyonunda güvenle kullanılan ve en gelecek vaat eden teknoloji CRISPR teknolojisi. Bu teknolojinin kullanımı bölgeye özgü nükleazlar için protein tasarımı gerektirmemektedir. Sadece küçük bir parça RNA sentezi yeterli olmaktadır. Bu da gen düzenleme aracının dizaynını ve de uygulanabilirliğini ciddi oranda kolaylaştırmaktadır (Lino ve diğerleri, 2018). Özellikle de sınıf II CRISPR/Cas9 sistemlerinde genomda hedeflenen bölgeye, hedefe spesifik bir rehber RNA aracılı Cas9 endonükleazı ile birlikte oldukça başarılı bir şekilde müdahale edilmektedir. Bu teknoloji günümüzde birçok kültür bitkisi üzerinde başarı ile kullanılmaktadır. Çizelge 2.2'de ayrıntılı belirtildiği gibi her üç teknoloji kullanılarak düzenleme yapılan özellikler arasında; verimin artırılması, geliştirilmiş kuraklık toleransı, sınırlı nutrient içeren topraklarda yetişen ürün veriminin artırılması, bitki patojenlerine karşı tolerans gösterilebilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2018; Sant'Ana ve diğerleri, 2020).

Çizelge 2.2. Genom düzenleme teknolojileri kullanılarak tarım bitkilerinde iyileştirilen özellikler (Zhang ve diğerleri, 2018'den değiştirilerek alınmıştır)

Bitki adı	Genom düzenleyici	Hedef gen	DNA onarım tipi	Hedeflenen özellik	Referans
Mısır	ZFN	<i>ZmIPK1</i>	HDR	Mısırdaki fitik asit sentezinin azaltılması	Shukla ve diğerleri, 2009
Mısır	ZFN	<i>ZmTLP</i>	HDR	Agronomik özelliklerin artırılması	Ainley ve diğerleri, 2013
Patates	TALEN	<i>VInv</i>	NHEJ	İndirgen şeker miktarının azaltılması	Clasen ve diğerleri, 2015
Domates	TALEN	<i>ANT1</i>	HDR	Antosiyanin miktarı artırılmış mor domates	Čermák ve diğerleri, 2015
Patates	CRISPR/Cas9	<i>ALS</i>	HDR	Herbisit toleransı	Butler ve diğerleri, 2016
Domates	CRISPR/Cas9	<i>SIAGL6</i>	NHEJ	Partenokarpi	Klap ve diğerleri, 2017

Gerek bilim gerekse kamu otoritelerince, genom düzenlenmesi yapılmış bitkilerde yabancı DNA fragmentinin, bitki genomuna entegrasyonu istenmemektedir. CRISPR/Cas9 teknolojisi bitki ıslahında oldukça yeni bir teknolojidir. Etkin ve kolay kullanımı, genomda çoklu bölge hedefleyebilme seçeneği gibi sahip olduğu avantajlı özellikler nedeni ile CRISPR/Cas9 teknolojisi diğer nükleazların kullanıldığı yöntemlerin önüne geçmiş bulunmaktadır. Birçok canlı grubunda kullanılan bu yeni nesil genom düzenleme teknolojisi oldukça fazla sayıda bitki türünde de kullanılmaktadır (Zhang ve diğerleri, 2018). Özellikle kültür bitkilerinin ıslahında kullanılan CRISPR/Cas9 teknolojisinin, bitki genomuna yabancı DNA fragmenti girmeden uygulanması en çok çalışılan konular arasındadır. Yabancı bir DNA fragmenti içermeyecek şekilde yapılan

transformasyonlar için birkaç yöntem bulunmaktadır. Bunların ilki ribonükleoprotein (RNP) komplekslerinin hücre içine PEG-aracılı ya da gen tabancası aracılığı ile ulaştırılmasıdır. CRISPR/Cas9 bileşenlerini, ribonükleoprotein (RNP) kompleksi halinde hücre içerisine göndermek plazmit DNA'sı kullanarak genomun hedeflenen bölgesinde istenilen mutasyonu yapmanın alternatifidir ve bitki genomuna entegre olan fragment de bulunmamaktadır (Andersson ve diğerleri, 2018). *Agrobacterium*-aracılı transformasyon ile transgen içermeyen genomların elde edilmesi bir diğer yöntemdir. Bu yöntemde genom düzenlenmesi yapılmış bitkilerin T1 jenerasyonunda seçilimi esastır ve Mendel'in açılım yasasından yararlanılarak yabancı fragment içermeyen genotipler seçilmektedirler (Danilo ve diğerleri, 2019).

Bugün dünyamızda bir milyar insan yeterli beslenme olanaklarına ulaşamamaktadır. Halihazırda kullanılmakta olan arazilerde toprak ve su kaliteleri giderek kötüleşmekte, biyolojik çeşitlilik gitgide azalmakta ve değişen iklim koşulları küresel anlamda birçok belirsizliği beraberinde getirmektedir (Foley ve diğerleri, 2011). Genom düzenleme teknolojilerinin ziraat alanında kullanımı ile verimi yüksek, stress koşullarına dayanıklı ve besin değeri yüksek bitki çeşitlerinin hızlı ve etkin bir şekilde ıslah edilmesi mümkündür. Bu teknolojiler sayesinde giderek artan dünya nüfusu için yeterli besin sağlanabilecektir (Li ve diğerleri, 2021).

2.3.6. CRISPR/Cas9 bileşenlerinin bitki dokularına transformasyonları

Cas9 ve gRNA, uygun promotörlerin kullanılması halinde herhangi bir vektör aracılığı ile bitki dokularına aktarılabilmektedir. Bitkinin rejeneratif dokularına transforme olmayı başaran gRNA ve Cas9 enzimi, hedef bölgede Cas9 enziminin tanıdığı PAM bölgesi de var ise, her iki DNA ipliğinin de kesilmesine neden olmaktadır. Tüm bu komponentlerin sert bir yapı ile çevrilmiş bitki hücrelerine aktarımları oldukça zordur. Bitki hücrelerinin genetik transformasyonunda kullanılan başlıca 3 esas yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler; PEG-aracılı protoplast aktarımı, (Sant'Ana ve diğerleri, 2020), gen tabancası aracılığı ile aktarım (Hamada ve diğerleri, 2018) ve de *Agrobacterium* -aracılı aktarımdır (Zhang ve diğerleri, 2020).

PEG-aracılı aktarım yönteminde polietilen glikol (PEG) kullanılmaktadır. Bu yöntem çeltik, soya fasülyesi gibi bitkilerde başarı ile uygulanmıştır. Bitki hücre çeperlerinin eliminasyonu sonucu oluşan hücrelere protoplast adı verilmektedir. Protoplast süspansiyonu ile Cas9 ve gRNA'yı içeren plazmit DNA'lar karıştırılmaktadır. Daha sonra protoplastlar, rejenere olabilecekleri uygun rejenerasyon ortamlarına alınmaktadırlar. Kullanılan PEG sayesinde hücre zarlarının geçirgenlikleri artmakta ve plazmit DNA'larının hücre içerisine alınması mümkün olmaktadır (Liang ve diğerleri, 2014).

Biyolistik yöntem ilk defa soğan hücre kültürlerinin transformasyonlarında kullanılmıştır. Bu yöntemde 'gen tabancası' adı verilen cihaz yardımı ile vektör ya da CRISPR/Cas9 ribonükleoproteinleri hücrelere gönderilmektedirler (Williams ve diğerleri, 1991; Hanson ve diğerleri, 2016; Sandhya ve diğerleri, 2020). Yöntemin başarı ile uygulanmasında; helyum gazının basıncı, hedef uzaklığı, partikül boyutu, kullanılan eksplant tipi gibi bileşenlerin optimizasyonu şarttır. Transforme olduğu varsayılan eksplantlar, seleksiyon baskısı altında yetiştirilmek üzere uygun rejenerasyon ortamlarına alınmaktadırlar (Sandhya ve diğerleri, 2020).

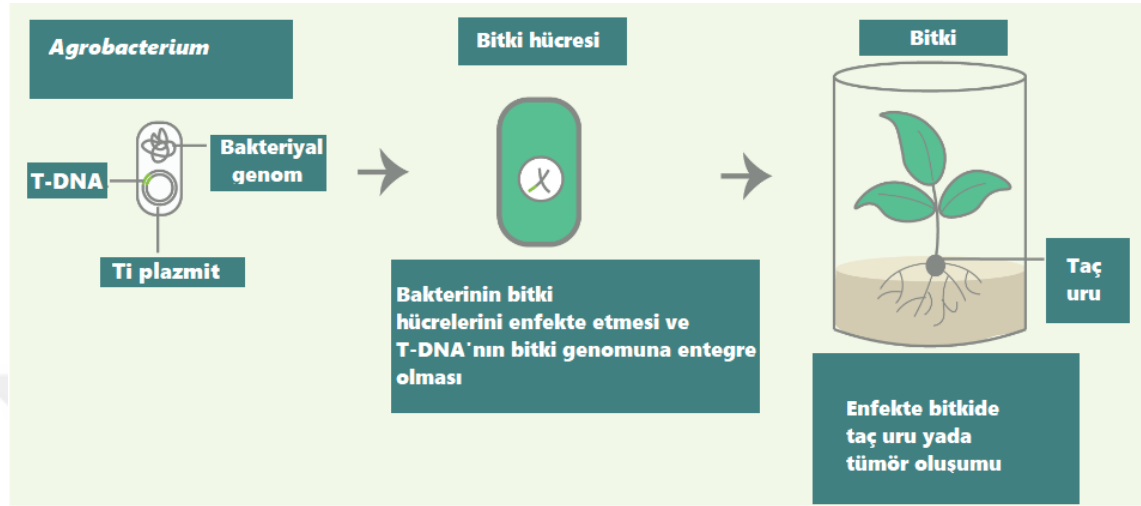
Agrobacterium -aracılı transformasyon, transgenik bitkiler oluşturmak için rutin olarak kullanılan yöntemdir. CRISPR/Cas9 bileşenlerini bu yöntem aracılığı ile bitki genomuna yerleştirmek üzere birçok vektör geliştirilmiştir (Xing, 2014). Bu transformasyon yöntemine bölüm 2.4.'de ayrıntılı olarak değinilmiştir.

2.4. Bitkilerde *Agrobacterium*-aracılı Gen Transferi

2.4.1. *Agrobacterium* biyolojisi

Agrobacterium, dikotiledon bitkilerin yaralanmış dokularından sızarak tümör oluşumuna neden olan gram negatif toprak bakterisidir (Mozo ve Hooykaas, 1992). Bu virü lent bakteri, taç uru indükleyici (Ti) ya da kök uru indükleyici (Ri) olmak üzere iki farklı plazmitten birini taşımaktadır. Ti plazmit taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*, Ri plazmitini taşıyan türü ise *Agrobacterium rhizogenes*'dir. Her iki bakteri türü de bitkilere gen aktarımı yapabilmektedir. *Agrobacterium rhizogenes*, Ri plazmitte taşıdığı kök lokus genleri (root locus; rol) sayesinde enfekte ettiği bitkilerde saçak kök oluşumuna neden

olmaktadır. *Agrobacterium tumefaciens* ise Ti plazmitinde taşıdığı tümör indükleyici gen bölgeleri sayesinde, bitkilerin taç bölgelerinde ur oluşumuna neden olmaktadır (Şekil 2.5).



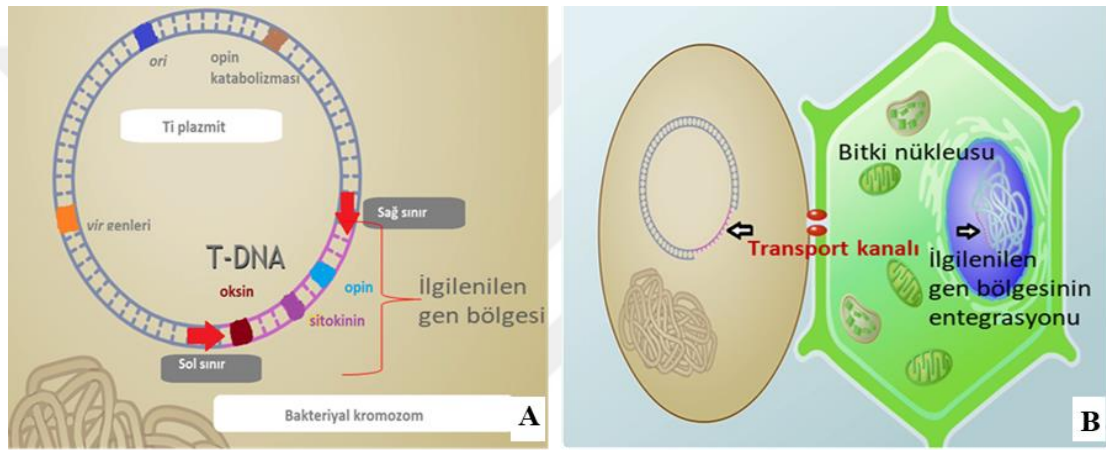
Şekil 2.5. *Agrobacterium* tarafından enfekte edilen bitki (Kroemer, 2023'den değiştirilerek alınmıştır)

Plazmit DNA'sında transformasyon için oldukça önemli birkaç bölge bulunmaktadır. DNA'nın bir kısmı, tümör hücrelerinde transkribe edilerek bitki büyüme düzenleyicilerin sentezinden sorumlu enzimleri kodlamaktadırlar (Wang ve diğerleri, 1984; Douglas ve diğerleri, 1985; Tomilov ve diğerleri, 2006). Plazmitte bulunan ve transformasyon açısından önemli olan bir diğer bölge de 35 kilobaz (kb) büyüklüğe sahip virülans (vir) bölgeleridir (Klee ve diğerleri, 1983). *vir* genleri, Ti plazmitinin bitki doku hücrelerine transferinden sorumlu fonksiyonların kodlanmasında görevlidir ve tümör hücrelerinde bulunmazlar. Bakteri hücresinden bitki hücrelerine DNA transfer yöntemleri çok açık olarak bilinmesede bakteriyal tümörjenez genetiği hakkında birçok mekanizma aydınlatılmıştır (Bundock ve diğerleri, 1995). *vir* bölgesinde Ti ya da Ri plazmitinin olmasına bağlı olarak yaklaşık 10 adet operon bulunmaktadır. Bu bölgeler 4 ana fonksiyona hizmet etmektedir. Bu fonksiyonların ilki bitkilerde salınan fenolik bileşiklerin algılanarak *vir A*, *vir G* gibi *vir* genlerinin ekspresyonlarının indüklenmesidir. Bu iki *vir* bölgesi, yaralanmış bitkilerden salınan fenolik bileşiklere yanıt oluşturan iki bileşenli bir sistemi oluşturmaktadır. *Agrobacterium*, bitkide salınan fenolik bileşikler sayesinde enfekte edebileceği bir konak olduğunu anlamaktadır. Algılanan fenolik bileşenler *vir A* bölgesini aktifleştirmektedir. *vir A* bölgesinin aktifleşmesi sonucu *vir G*

bölgesi de aktifleştirilmektedir. Ko-indükleyici olarak spesifik şeker salınımları başlamaktadır. Salınan şekerler bakteriyal kromozomda kodlanan ChvE proteini tarafından tanınmaktadır. Şekerlerin varlığında *vir* genlerinin ekspresyonları oldukça artmaktadır (Winans, 1991). İkinci ana fonksiyon T-DNA'nın hazırlanması ve bitki hücresinin içerisine gönderilmesidir. Bir helikaz (*virD1*) ve endonükleaz (*virD2*), T-DNA'nın yaklaşık 25 bp olan tekrarlı sınır bölgelerine bağlanarak, o bölgelere çentik atmaktadır. VirD2 proteini kesilmiş bu tek iplikli DNA fragmentinin (T strand; T zinciri) 5' ucuna kovalent olarak bağlanmaktadır. Hazırlanan T zinciri, protein eşliğinde, bakteri hücresinden bitki hücre çekirdeğine götürülmek üzere yola çıkartılmaktadır (Ward ve Barnes, 1988). Üçüncü fonksiyon ise T-DNA ve Vir proteinlerinin *virB* operonu ve *virD4* aracılığı ile salınmasıdır. Bu fonksiyon, bakterilerin konjugasyon makineleri olarak da bilinen 'Tip IV sekresyon sistemi' ya da 'T4S' olarak anılmaktadır. Bu sistem hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerde hücre zarfları içerisinde; translokasyon kanalı, yüzey filamentleri ya da protein adezini olarak bulunmaktadır. Bu organeller DNA'nın ve protein substratlarının prokaryotik ve ökaryotik hedef hücrelere taşınmasında görev almaktadırlar. *virB* operonu, 11 gen bölgesi içermektedir ve vir proteinlerinin zar boyunca geçişini kolaylaştıracak porların oluşumundan sorumludur (Christie ve diğerleri, 2005). Son fonksiyon ise, T-DNA'nın sitoplazmadaki yolculuğu, nükleusun hedeflenmesi, hedef genoma integrasyonudur. Burada görev alan vir bölgeleri; *virD2*, *virD5*, *virE2*, *virE3*, ve *virF*'dir. *VirD2* ve *VirE2*'nin T-iplikliğinin nükleusa transferinde görev aldığı düşünülmektedir. *VirE2*, T-iplikliğinin bitki hücresinde degrade olmasını engellemektedir. *VirF* ise T-iplikliğinin integrasyonu sırasında iplikçiğe bağlı olan proteinlerin iplikçikten ayrılmasını sağlamaktadır (Lee ve Gelvin, 2008).

Agrobacterium'da tümör oluşumundan sorumlu Ti plazmit ya da Ri plazmitlerinin yaklaşık %5'ini oluşturan küçük bir parçası T-DNA (transfer DNA) adı ile anılmaktadır. Bu bölge aktarım yapılan bitki kromozomlarına istikrarlı bir şekilde entegre olabilmekte ve de bitki genomunda aktif olarak transkribe edilmektedir (Braun ve Wood, 1962; Fraley ve diğerleri, 1983). Doğada T-DNA'da bulunan gen bölgelerin ifadesi bitki hücrelerinde fitohormonların aşırı olarak üretilmesi ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.6). Bu durumun fenotipik ifadesi tümör yapısının oluşmasıdır (Joos ve diğerleri, 1983). Böylece transforme bitki hücreleri herhangi bir fitohormon içermeyen ortamda rahatlıkla büyüme

gösterebilmektedirler. Transforme hücreler, bazal ortamda bulunan mineral tuzlarından ve sükrozdan ihtiyaç duydukları tüm büyüme faktörlerini sentezleyebilmektedirler (Braun ve Wood, 1962). Laboratuvar ortamında yapılan manipülasyonlar sonucu bu bakterilerin bitkiler dışındaki canlı hücrelere de aktarım yapabildiği belirtilmektedir. Bundock ve diğerleri (1995), yaptıkları çalışma ile *A. tumefaciens* bakterisinin *Saccharomyces cerevisiae* ırklarına da T-DNA transferini başarı ile yapabildiğini göstermişlerdir. Ayrıca Kunik ve diğerleri (2001) *Agrobacterium*-aracılığı ile HeLa hücrelerinin (Henrietta Lacks servikal habis tümörü) de içinde olduğu birkaç insan hücre tipinde transformasyonun başarı ile gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir.



Şekil 2.6. *Agrobacterium*-aracılı transformasyon (Science Learning Hub, 2023'den değiştirilerek alınmıştır). **A)** Ti plazmit ve T-DNA yapısı **B)** T-DNA bölgesine yerleştirilen ilgili gen bölgesinin, bakteri hücresinden bitki hücre nükleusuna transformasyonu ve entegrasyonu

2.4.2. *Agrobacterium*-aracılı transformasyon

Dünyada hızla değişen iklim koşulları ve sürekli artan nüfus nedeni ile tarım ürünlerinin hızlı bir şekilde istenilen özellikler açısından ıslahına gerek duyulmaktadır. Bu amaç ile günümüzde *in vitro* biyoteknoloji uygulamaları kullanılmaktadır. Böylece nadir bulunan kıymetli genotipler hızlı bir şekilde çoğaltılabilmekte, mikroçoğaltım yöntemi ile hastalıktan ari bitkiler elde edilebilmekte, bitki temelli metabolitler üretilenmekte ve gen transformasyonu gibi çalışmaları yapılabilmektedir (Hesami ve diğerleri, 2020). Genetik transformasyon, biyoteknojik uygulamalar arasında bitkilerde istenilen özelliklere ulaşarak verimliliğin artırılmasında çok büyük öneme sahiptir. Transformasyon, konu olarak bitki biyolojisi ve transgenik bitkiler için önemlidir. Ayrıca bugün bitkiler üzerinde

yapılan çalışmalar ve ıslah programlarının odak noktası konumundadır. *Agrobacterium*-aracılı transformasyon, spesifik DNA fragmentlerinin bitki genomlarına aktarımlarında sıklıkla uygulanan yöntemler arasındadır. Bu yöntem aracılığı ile istenilen gen bölgesinin bitki genomuna aktarılması basit ve etkili bir şekilde yapılabilmektedir (Alimohammadi ve Bagherieh-Najjar, 2009; Yun ve diğlerleri, 2019; Niedbala ve diğlerleri, 2021).

Yöntemin uzun yıllardır bitkilere başarı ile uygulanması ile birlikte yeni nesil genom düzenleme teknolojisi olan CRISPR/Cas9 sisteminin bileşenlerinden, Cas9 ve gRNA bölgelerini bitkilerde etkin bir şekilde eksprese edebilecek binary vektörler geliştirilmiştir. Düzenleme yapılan allellerin kalıtsal olarak nesiller arası aktarımları da sağlanabilmektedir (Yun ve diğlerleri, 2019).

Ti plazmitinde bulunan T-DNA'nın bitki hücrelerine entegrasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda bugün bu yöntemin bitki transformasyonunda kullanılmasının temellerini atan 3 önemli veri elde edilmiştir. Bunların ilki *Agrobacterium* tarafından bitkilerde oluşturulan tümör dokusunun, T-DNA'nın bitki hücrelerine entegrasyonu ve T-DNA üzerindeki genlerin ekspresyonu sonucunda oluşmasıdır. İkincisi, T-DNA üzerinde bulunan genlerin bitki hücrelerine transformasyon sürecinde eksprese edilmemeleri, sadece bitki hücrelerinde ekspresyonlarının yapılmasıdır. Son veri T-DNA sınırları arasında kalan bölgenin bitki genomuna aktarımının yapılması şeklindedir. Bu veriler ışığında ilk vektör tasarımı yapılmıştır ve bakteri hatları bitki transformasyonlarında kullanılmaya başlanmıştır (Zhang ve diğlerleri, 2020). *Agrobacterium* -aracılı aktarım yapılan ilk bitki tütündür (Herrera-Estrella, 1983, aktaran Riva ve diğlerleri, 1998). Tütün bitkisi, bitkilerde gen transformasyon çalışmaları için model bitkidir. Bu bitkide optimize edilen transformasyon protokolü, aktarımın zor olduğu diğler bitki türleri açısından fikir verici olmaktadır (Niedbala ve diğlerleri, 2021).

A. tumefaciens'de bulunan Ti plazmiti aracılığı ile bitkilere genetik transformasyon yapılabilmektedir. Bu konuda yeterli çalışma yapılmış olmasına rağmen aktarımlarda problemler ile karşılaşılabilir (Fraley ve diğlerleri, 1983). Ti plazmiti aracılığı ile yapılan aktarımlardan sonra bitki dokularından tam bir bitki oluşumu gerçekleşmemektedir. Bunun nedeni Ti plazmitinin hücrelerde fitohormon üretimlerini çok arttırmasıdır. Ancak T-DNA'da bulunan fitohormon genleri inaktifleştirilir, silinerek

virölansları azaltılır veya aktarımda Ri plazmiti kullanılırsa transforme dokulardan tam bitki rejenerasyonu gerçekleşebilmektedir. Bu gibi durumlarda bile gelişen bitkiler, morfolojik anormallikler ve bazı tümör özellikleri gösterebilmektedirler (An ve diğerleri, 1985; Fraley ve diğerleri, 1983). Bu plazmitlerin aktarımlarda kullanılmasının bir diğer dezavantajı ise plazmitte bulunan gen bölgelerinin yetersiz ekspresyonlarıdır. Yapılan çalışmalarda bu durum, bitki RNA polimerazlarının bakteri, mantar ya da memeli hücrelerinden gelmiş olabilecek heterolog genleri tanımıyor olması ya da normal şartlarda bitki dokularında yüksek regülasyona sahip gen bölgelerinin tümör hücrelerinde sentezlenememesi olarak açıklanmaktadır (Fraley ve diğerleri, 1983). Ti plazmitinin neden olduğu bu sorunlar dışında 200 kb'lık boyutu da *in vitro* da rekombinant DNA manipölasyonlarını zorlaştırmaktadır. Bu nedenler ile bitki hücrelerine transformasyon başarısını arttırmak ve aktarımı yapılan genlerin ifadesini sağlamak için bitki transformasyon vektörleri ve metodolojileri geliştirilmiştir. İlk geliştirilen vektörler Ti plazmit tabanlı vektörlerdir. Bu vektörler geliştirilirken *Agrobacterium*'un yüksek transformasyon başarısı ve kararlı genom entegrasyonu baz alınmıştır ve bu vektör sistemleri bitki transformasyonunda halen en etkili sistemlerdir. Bir başka vektör çeşidi de *vir* genlerini içeren binary vektörlerdir. Ayrıca bu vektörlerde matris bağlama bölgeleri (MAS), marker ve reporter gen bölgelerine eklenmiş intronlar da bulunmaktadır (An ve diğerleri, 1985; Veluthambi ve diğerleri, 2003).

Bitki transformasyonu için tasarlanmış vektörlerde kullanılan birkaç markör gen bölgesi vardır. Vektörler seçilirken kullanılan markörlerin belirlenmesinde göz önünde tutulması gereken bazı kriterler bulunmaktadır. Bunların en önemlisi markörün bitki hücrelerini inhibe edebilir olmasıdır. Ancak bitki hücrelerini inhibe edebilen her ajanın bu amaçla kullanımı uygun olmayabilmektedir. Bazen markör seçiminin doğru olması da aktarım yapılmış hücreleri seçmeye yetmemektedir. Transformasyon sırasında ölen bazı hücrelerden fenol gibi toksik bileşikler sentezlenmektedir. Transformasyonu başarılı olmayan ve ölen bu hücrelerden sızan fenolik bileşikler, transforme komşu hücreler için toksik etki yapmaktadırlar. Bu durumda aktarım yapılan hücreler tolerans geliştirmiş olsalar bile bu toksik etkiye karşı koyamamaktadırlar. Bu neden ile seçilen markör, aktarım yapılmayan hücrelerin gelişmesini durdurup yavaşça öldürebilme özelliğine sahip olmalıdır (Klee ve diğerleri, 1987). Bakterilerde bulunan Tn5 transpozonu,

Kanamisin ve Neomisin için direnç sağlayan *neo* (neomisin direnç geni, *nptII*) adında bir gen bölgesi bulundurmaktadır. Tn5 transpozon bölgesinden izole edilen bu gen bölgesi prokaryotlarda ve ökaryotlarda kullanılmak için tasarlanan vektörlerde markör olarak kullanılmaktadır (Beck ve diğerleri, 1982). Ancak Kanamisin toleransı bazı bitkilerde çalışmamaktadır, bunun en bilinen örneği *Arabidopsis thaliana* var. Columbia'dır. Bu durum Kanamisinin yeterli toksisiteyi sağlayamaması ya da enzimin transforme hücrelerde seçici özelliği gösterememesinden kaynaklanabilmektedir. Kanamisin toleransı, petunya, marul, domates, tütün, kereviz, ayçiçeği, pamuk gibi bitkilerde transforme hücrelerin birincil seçiminde başarı ile uygulanmaktadır (Klee ve diğerleri, 1987). Havuç bitkisinde de Kanamisin toleransı transforme hücrelerin ilk basamak seçiminde kullanılmaktadır. Pawlicki ve diğerleri (1992) havuç bitki eksplantlarının Kanamisin hassasiyeti üzerine yaptıkları çalışmada 10-25 mg/L Kanamisinin somatik eksplant gelişimini çok az inhibe ettiğini, 50 mg/L Kanamisinin eksplant gelişimini %42 oranında azalttığını, 100 mg/L ve üzeri dozların eksplant gelişimini tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Agrobacterium-aracılı transformasyonda tek hücreye aktarım esastır. Bu tek hücre gelişerek bütün bir bitkiyi vermektedir. Böylece doğrudan aktarım yöntemlerinde ortaya çıkan mozaik yapıları bitkiler bu aktarım yönteminde oluşmamaktadır (Riva ve diğerleri, 1998). Araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılan bu aktarım yönteminin en büyük zorluğu düşük transformasyon etkinliğine sahip olmasıdır. Transformasyon yönteminde kullanılan genetik ve çevresel bileşenlerin modifiye edilmesi ile sistemin daha anlaşılabilir olacağı ve de transformasyon etkinliğinin arttırılabileceği düşünülmektedir (Alimohammadi ve Bagherieh-Najjar, 2009). Transformasyon başarısını etkileyen etmenler arasında; kullanılan *Agrobacterium* ırkı, bakteri hücrelerinin yoğunluğu, eksplantlar ile bakteri hücrelerinin muamele süreleri, bakterilerin bitki doku hücrelerinden eliminasyonu sırasında kullanılan antibiyotiğin türü ve konsantrasyonu, enfekte dokuların seçiminde uygulanan antibiyotiğin türü ve konsantrasyonu, asetosiringon miktarı, ko-kültivasyon süresi, ortamların pH ve sıcaklıkları, eksplantların yaralanma metotları sayılabilmektedir. Her çalışma için bu etmenlerin her birinin optimize edilmesi gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır (Liu ve diğerleri, 2020). Bu faktörler önem sırasına göre 4 gruba ayrılabilirler. İlk sırada bakteri yoğunluğu,

kullanılan bakteri ırkı ve bakterilerin bitki dokularından eliminasyonunda kullanılan antibiyotik gelmektedir. İkinci sırada eksplant tipi, yaşı, bakteri ile muamele süresi ve yaralama yöntemleri yer almaktadır. Üçüncü etmen bitki dokularını seçmek için kullanılan antibiyotikler olurken dördüncü sırada sıcaklık, pH, süre gibi ko-kültüvasyon parametreleri bulunmaktadır. Ayrıca bitkiye aktarımı yapılan plazmitin bitki dokularında ekspresyonunun iyi olması da transformasyon başarısını etkileyen önemli etmenlerdendir. (Niedbala ve diğerleri, 2021).

2.5. Sitidin Baz Editörleri

Mutajenezis, gen fonksiyon analizlerinde ve yeni bitki varyetelerinin elde edilmesinde sıklıkla kullanılan bir araçtır. Bugün kimyasal, fiziksel birçok mutajenik teknik kullanılarak mutasyonlar oluşturulabilmektedir. Aynı zamanda CRISPR/Cas9 tabanlı sistemler gibi modern genom düzenleme yöntemleri de bu amaçla kullanılmaktadır (Szurman-Zubrzycka ve diğerleri, 2018). CRISPR/Cas9 sisteminin genom düzenleme için uyarlanmış olması hedeflenmiş mutajenezisin dönüm noktasıdır (Jinek ve diğerleri, 2012). RNA tarafından rehberlik edilen endonükleazların bir olumsuz yönü, genomda rastgele indel (insertion-deletion; ekleme-çıkarma) mutasyonlarının oluşmasına neden olmasıdır. Bu nedenle hedeflenen genom bölgesinde baz değişimleri yapabilen yeni yöntemler geliştirilmiştir. İlk kez memeli hücrelerinde çalışılan baz düzenleme tekniği, DNA zincir kırığı ve kalıp gerektirmeden hedef bazın diğerine geri dönüşümsüz olarak dönüştürülmesini sağlamaktadır (Lu ve Zhu, 2017). Bu değişim, fare sitidin deaminaz enzimi olan APOBEC1 (apolipoprotein B mRNA düzenleme enzimi katalitik, polipeptit-benzeri 1) aktivitesine dayanmaktadır. APOBEC1 enzimi dCas9 enzimi ile kompleks haline getirilmiştir. gRNA eşliğinde hedef genom bölgesine giden komplekste bulunan enzim, Cas9 vasıtası ile tek zincir haline getirilen DNA zincirinin L-loop bölgesine bağlanmaktadır ve sitozinden amino grubunu çıkararak sitozin (S) bazının urasil (U) bazına dönüşmesine neden olmaktadır (Komor ve diğerleri, 2016). Bu enzimler, sitozin baz editörleri (CBE) olarak adlandırılmaktadır ve 1. nesil CBE (BE1)'lerdir. Etkinliklerinin artırılması için CBE'ler üzerinde yapılan çalışmalar sürdürülmektedir. 2. nesil CBE (BE2)'lere PBS (*Flavobacterium okeanense*) fajından izole edilen UGI (urasil DNA glikozilaz inhibitörü) bölgesi eklenmiştir. UGI, urasil DNA glikozilazın aktivitesini inhibe ederek düzenleme sürecini optimize etmektedir. Bu nedenle BE2, BE1'e göre 3

kat yüksek etkinlikte düzenleme yapabilmektedir. 3. nesil olan BE3’de ise BE2’nin bağlandığı dCas9 proteininin yerini nCas9 proteini almış bulunmaktadır. nCas9, düzenlenmemiş DNA sarmalında bir boşluk oluşturmaktadır. Bu durum baz eşleşme onarımının uyarılmasına neden olarak sarmalda gerekli düzenlemelerin yapılmasına yardımcı olmaktadır. Yapılan bu düzenlemeler verimliliği artırarak istenilen genetik değişikliklerin daha etkili bir şekilde yapılmasını sağlamaktadır. Geliştirilen tüm yeni nesil CBE’lerin temelinde urasil, timinin baz eşleşme özelliğine sahip olması yatmaktadır. Replikasyon veya DNA onarım sürecinde urasil bazı, timin bazı ile değiştirilmektedir. Sonuç olarak DNA zincirinde bulunan C/G baz çifti T/A olarak değiştirilmiş olmaktadır. Bu yöntem başarı ile bitki genomlarına uygulanmaktadır (Li ve diğerleri, 2023).

2.6. Literatürde CRISPR/Cas9 ve Sitidin Baz Editörünün Bitki Islahında Kullanımı

Literatürde CRISPR/Cas9 sisteminin bitkiler üzerindeki ilk uygulaması Li ve diğerleri (2013) tarafından yapılmıştır. Yapılan çalışmanın amacı, model bitkilerden *Arabidopsis thaliana* genomunda sgRNA:Cas9 tabanlı genom düzenleme teknolojisinin uygunluğunun ve etkinliğinin belirlenmesidir. Çalışmada, kodon optimizasyonu yapılmış *SpCas9* (*pcoCas9*)’un ve genomda bulunan *PDS3* (*phytoene desaturase*) gen bölgesini hedefleyen sgRNA *Arabidopsis thaliana*’nın mezofil protoplastlarına aktararak hedef bölgenin ifade düzeylerine bakılmıştır. *pcoCas9* için 35SPPDK promotörü kullanılırken sgRNA için *Arabidopsis* U6 polimeraz III promotörü kullanılmıştır. Belirtilen sonuçlara göre *pcoCas9* *Arabidopsis* protoplastlarında, aynı ekspresyon vektörü ile aktarım yapılan insana ait PGP1 iPS (pluripotent kök hücreler) hücrelerine oranla (Mali ve diğerleri, 2013) çok daha yüksek seviyelerde ifade olmuştur. *Arabidopsis* protoplastlarındaki sgRNA:*pcoCas9* sisteminin mutajenez verimliliğinin belirlenmesi için transformasyon yapılan protoplastlardan elde edilen toplam genomik DNA (gDNA) Sanger Sekanslama yöntemiyle analiz edilmiştir. Ko-transfeksiyonda sgRNA:*pcoCas9* oranının 1:1 olduğu protoplast örneklerinden elde edilen AtPDS3 hedefli, rastgele 180 amplikonda yapılan sekans sonucuna göre mutasyon oranı % 5,6 olarak belirlenmiştir. Ko- transfeksiyonda sgRNA:*pcoCas9* oranının 1:19 olarak uygulandığı protoplast örneklerinden elde edilen 93 amplikonda ise mutasyon saptanmamıştır. Bu örneklerde sadece *pcoCas9*’un ifade olduğu belirtilmiştir. Aynı analizler ikinci hedef gen bölgesi olan *AtFLS2* (*flagellin sensitive 2*) için yapıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ko-transfeksiyon sırasında

sgRNA:pcCas9 oranının 1:1 olduğu örneklerden elde edilen ampikonlardaki mutasyon oranı % 1,1 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar çalışma grubu tarafından, bitki hücrelerinde, insan hücrelerinde olduğu gibi, optimal hedefleme ve mutajenez için sgRNA ifadesinin sınırlayıcı faktör olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Jiang ve diğeri (2013) tip II CRISPR/Cas9 teknolojisini dikotiledon bitkilerden Arabidopsis ve tütün, monokotil bitkilerden ise çeltik bitkisine uygulamışlardır. Cas9, gRNA ve fonksiyonu olmayan mutant yeşil floresan proteinlerini (GFP) kodlayan gen bölgeleri, Arabidopsis ve tütün bitkilerine *Agrobacterium*-aracılı transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Arabidopsis ve tütün bitkilerinde, fonksiyonel olmayan mutant GFP'nin 5' kodlama bölgesi hedeflenmiştir. Hedef bölgede CRISPR/Cas9 sistemi aracılı oluşturulan mutasyon sonucu fonksiyonel GFP genleri elde edilmiştir. CRISPR/Cas9 aracılığı ile oluşturulan mutasyon, bölgenin sekanslanması ile de doğrulanmıştır. Çeltik bitkisinde OsSWEET14 ve OsSWEET11 gen bölgeleri, bitkilerin bakteriyel yanıklığa duyarlı olmasından sorumlu olarak görülmektedir. Bu bölgelerin promotör bölgelerindeki mutasyon CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak başarı ile oluşturulmuş ve hedef bölgedeki mutasyonlar sekans analizi ile doğrulanmıştır.

Upadhyay ve diğeri 2013 yılında CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisini oldukça büyük ve karmaşık bir genoma sahip olan buğday bitkisine uygulamışlardır. Süspansiyon hücre kültürü kullanılan çalışmada buğday genomunda bulunan inositol oksijenaz (*inox*), fitoenden desaturaz (*pds*) ve *Nicotiana benthamiana* bitki genomundaki *pds* gen bölgeleri hedeflenmiştir. Tekli ve çoklu bölgeleri hedefleyen kimerik rehber RNA'ların (cgRNA) ifadesi, tüm test edilen örneklerde indel mutasyonlarına yol açmıştır. Ancak sadece Cas9'un veya gRNA'nın ifadesi herhangi bir mutasyona neden olmamıştır. Aynı gende iki farklı bölgeyi hedefleyen Cas9 ile çift cgRNA'nın ifadesi, hedeflenen diziler arasındaki DNA parçasının silinmesine yol açmıştır. Çoklu cgRNA kullanımı ile birden fazla genom bölgesinin hedeflenmesi mümkündür. cgRNA'nın hedef bölgeye olan spesifikliğı analiz edildiğinde, cgRNA'nın hedef bölgenin 3' ucu ile oluşturduğu yanlış eşleşmeler DNA ipliğinin kesilmesini tamamen engellerken 5' ucundaki yanlış eşleşmeler azda olsa DNA kırıkları ile sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar genomda çalışılmak istenilen bölgenin 3' ucundaki doğru dizilerin belirlenip hedeflenmesi ile *in vivo* da

istenmeyen mutasyonları azaltılabileceğini göstermektedir. Çalışma ekibi bu yaklaşımın bitki genom mühendisliği için güçlü bir yöntem olabileceğini öne sürmektedir.

Çeltik tanesinde bulunan yüksek protein miktarı tat ve pişirme kalitesinin düşmesine yol açmaktadır. Tanedeki protein miktarını düşürebilmek amacı ile amino asit taşıyıcıları (AAP) hedeflenmiştir. Amino asitler, protein sentezinde kullanılan substratlardır. Taşıma sisteminde yer alan genlerin ifade düzeyleri, amino asitlerin taşınma verimliliğini güçlü bir şekilde etkilemektedir. Bu düşünceden hareketle Wang ve diğerleri (2020) tarafından CRISPR/Cas9 tekniği, 4 farklı çeltik çeşidinde, amino asit taşınmasından sorumlu olan 2 gen bölgesini (*OsAAP6* ve *OsAAP10*) hedef alarak, bu genlerin susturulması için kullanılmıştır. Gen bölgelerinin 1. ekzonunda oluşan indel sonucu çerçeve kayması mutasyonu meydana gelmiş ve gen bölgesi susturulmuştur. Mutasyon verimliliği T_0 jenerasyonunda genetik yapıya bağlı olarak değişmiştir ve T_1 jenerasyonunda yüksek protein içeriği önemli ölçüde azalmıştır. Bu sonucun çeltik tanelerinde bulunan gluten içeriğinin azalması ile elde edildiği düşünülmektedir. Ayrıca bazı *OsAAP6* ve tüm *OsAAP10* mutasyonlarında amiloz içeriği de önemli ölçüde azalmıştır. Çalışma ekibi, çeltikte CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak *OsAAP6* ve *OsAAP10* gen gölgelerinden özellikle de *OsAAP10*'un hedeflenmesi ile tanedeki yüksek protein miktarının düşürülebileceğini ve pişme kalitesinin artacağını bildirmişlerdir. Bu yöntem, çalışmayı yapan grup tarafından, istenilen kaliteye sahip çeltik çeşitlerinin yetiştirilebilmesi için yeni bir strateji olarak sunulmaktadır.

Lu ve Zhu (2017) yaptıkları çalışmada sentezlenen APOBEC1 enzimini 16 aminoasitten oluşan bağlayıcı ara fragment vasıtası ile Cas9 (D10A) enziminin N terminaline bağlamışlardır. Nüklear lokalizasyon siyalini de Cas9 (D10A) enziminin C terminaline bağlamışlardır. Bu çalışmada nCas9 (Cas9 (D10A)) enziminin kullanılmasının amacı, yarı aktif olan nCas9 enziminin düzenleme yapılmayan DNA ipliğinde onarımı uyararak bu iplikteki U-G uyumsuzluğunu ortadan kaldırması ve bazların U:A ya da T:A dönüşümüne teşvikin arttırılmasıdır. Çalışmanın yapıldığı çeltik bitkisinde (*Oryza sativa*) bu kompleks kullanılarak C bazının T bazına dönüşüm yüzdesinin 1,4'den 11,5'e çıkarıldığı bildirilmiştir. Aynı yıl nCas9-PBE (bitki baz editörü) ve dCas9-PBE füzyonları Zong ve diğerleri (2017) tarafından tahıl bitkilerinde (çeltik, mısır, buğday) çalışılmıştır. Füzyon proteinleri tahıl bitkileri için optimize edilerek Ubiquitin-1 (Ubi-1)

promotörü kullanılmıştır. Çalışmada BFP (mavi floresan proteini) proteinini kodlayan gen bölgesi hedeflenmiştir. Hedeflenen bölgede 66. kodonda meydana gelen mutasyon sonucunda histidin (CAC) amino asidi ile tirozin (TAC) amino asidi yer değiştirmektedir. Bu değişim BFP'nin GFP'ye dönüşümüne neden olmaktadır. Çeltik, buğday ve mısır bitkilerinin tümünde 3, 6 ve 9. pozisyonlarda sitozin bazı dönüşümleri gözlemlenmiştir. Mutasyon oranları sırası ile %2,48-3,92, %5,86-8,75 ve %6,47-7,86 aralıklarında elde edilmiştir.

Tian ve diğerleri (2018) karpuz bitkisinde, bitkilerde valin, lösin, izölösün sentezinden sorumlu, *asetolaktat sentaz (ALS)* gen bölgesini hedef alarak CRISPR/Cas9 tekniğini uygulamışlardır. *ALS* geninin korunmuş bölgelerinde oluşan tek nokta mutasyonları herbisitlere yüksek seviyede tolerans sağlayabilmektedir. Bu nedenle bu bölge çalışmada hedef olarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre Pro 190 kodonundaki her iki sitozinin en az biri timin bazına dönüşmüştür. Dönüşüm oranı T₀ jenerasyonu için %23'dür. Mutasyonu taşıyan genotipler, tribenuron etken maddeli herbisit uygulamalarının yapıldığı arazilerde yetiştirilebilme potansiyeline sahiptirler. Çalışma ekibi, CRISPR/Cas9 aracılı baz düzenleme sisteminin, karpuz genomunda çeşitli varyetelerin elde edilmesinde oldukça güçlü bir araç olduğunu bildirmişlerdir.

Hunziker ve diğerleri (2020) yaptıkları araştırmada, domates bitkisinde karotenoid birikimi ile ilişkili çoklu gen bölgesine yönelik CRISPR/Cas9 ile birleştirilmiş Target-AID (hedef-aktivasyon indüklenmiş) baz düzenleme teknolojisi kullanılmıştır. Karotenoid birikimindeki rolleri nedeniyle *SLDDB1(UV hasarına özgü DNA bağlayıcı)*, *SLDET1 (deetiolyasyon1)* ve *SLCYC-B (likopen beta siklaz-B)* gen bölgeleri hedeflenmiştir. Bu gen bölgeleri domateste özellikle likopen birikiminden sorumludurlar. Bu amaç ile her 3 bölgeyi de hedefleyen 3 adet gRNA ve nCas9-CDA-UGI (Urasil-DNA glikozilaz inhibitörü) protein kompleksini içeren plazmit kullanılmıştır. 12 transforme T₀ hattı içerisinde, hedeflenen genlerin her birinde baz değişimi olan 10 adet T₀ hattı elde edilmiştir. Diğer iki hattın karotenoid birikimlerinde önemli ölçüde değişiklikler olduğu belirlenmiştir. Elde ettikleri sonuçlar eşliğinde araştırmacılar, Target-AID teknolojisinin çoklu gen hedeflerinde uygulanabilecek etkili bir araç olduğunu öne sürmektedirler.

Parsa ve diğerkleri (2023) genetik aktarımlarda zorlu genoma sahip olan kavun bitkisinde transformasyon aşamalarındaki anahtar parametrelerin optimize edilmesi odaklı çalışma yapmışlardır. Bu amaç ile eksptlanların hem ko-kültüvasyon hem de infiltrasyon (daldırma) yöntemlerine verdikleri cevaplar belirlenmeye çalışılmıştır. CRISPR/Cas9 kompleksinin sitidin deaminaz ile oluşturduğu füzyonun kullanıldığı çalışmada, hedef bölgesi *eIF4E* (*ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E*) olarak seçilmiştir. Kavun bitkisinde *Potyviriidae* virüslerine karşı tolerans, istenilen bir agronomik özelliktir. Bu tolerans *eIF4E* genindeki mutasyonlar ile sağlanabilmektedir. Çünkü Poty virüslerinin viral protein genomu (VPg) ile bitkide bulunan eIF4E bölgesinin interaksyonu virüs siklusunun devamlılığı açısından oldukça önemlidir. Elde edilen sonuçlara göre 20 dakika boyunca OD600'daki hücre yoğunluğu 0,4 olan *Agrobacterium* solüsyonuna daldırılan eksplantlarda daha stabil genetik dönüşüm elde edilmiştir. Uzun sürelerde ve daha yoğun *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerinin bulunduğu solüsyona daldırılan eksplantlarda transformasyon etkinliği düşmüştür. Bu sonuç bitkide devreye giren savunma sistemi olarak yorumlanabilmektedir. Bunun yanı sıra uzun süreli inokülasyonlarda kullanılan seçici gen bölgesinin ekspresyonu artarken transforme eksplantların rejenerasyon ve hayatta kalma sürelerinin azaldığı belirtilmiştir. Kullanılan 3 farklı çeşit kavun genomunda sitidin baz editörünün yaptığı düzenleme çerçevesi PAM sekansını takiben 10. ve 17. nükleotidler arasında gözlemlenmiştir. Sekans analizi sonuçlarına göre genetik transformasyonun yapıldığı üç kavun çeşidinin T₀ jenerasyonunda genom düzenleme sıklığı %20 ila %40 arasında değişmektedir. Çalışma ekibi, optimize edilen genetik transformasyon protokolünün, CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme teknolojisinin hızlandırılmış kavun ıslahında ve arttırılmış virüs toleransına sahip genotiplerin eldesinde önemli bir araç olabileceğini belirtmektedir.

Bir diğerk çalışmada, domates ve patates bitkilerinde *ALS* gen bölgesini hedeflemişlerdir. Model organizmalardan biri olan Arabidopsisin, *ALS* bölgesinde 197. sıradaki amino asit olan Prolini kodlayan bölgede meydana gelen mutasyonlar sonucu bitkinin, klorsülforona dayanım sağladığı belirtilmektedir. Çalışmada *Agrobacterium* aracılı aktarım gerçekleştirilmiş ve domateste baz değişim oranı %71'in üzerinde saptanmıştır. Ayrıca klorsülforona direnç gösteren bitkilerin ilk jenerasyonlarının %12,9'unun transgenik olmadığı belirtilmiştir. Patateste ise bu direnci gösteren ve transgenik olmayan bitkilerin

oranı %10 olarak belirtilmiştir (Veillet ve diğerleri, 2019). Cas9 enzimi ile birleştirilen sitidin deaminaz enziminin hedef bölgede yaptığı değişimin bitkilerde klorsülforona direnç göstermesinin yanı sıra transgenik olmayan bitkilerin elde edilebiliyor olması oldukça önemlidir.

Veillet ve diğerleri (2020) yaptıkları çalışmada *Staphylococcus aureus* (SaCas9) tabanlı CRISPR/Cas9 sistemini kullanmışlardır. Bu sistem kullanılarak tetraploid patates (*Solanum tuberosum*) genomunda çerçeve kaydırma mutasyonlarının indüklenmesini hedeflenmişlerdir. Ayrıca patateste *S. aureus*-sitozin bazı düzenleyici kullanılarak düzenleyici elementlerde mutasyonlar hedeflenmiştir. Hedeflenen gen bölgesi bitkilere mildiyö toleransı sağlayan *StDMR6-1* (*Downy Mildiyö direnci 6*)' dır. CRISPR/Cas9 kompleksini içeren plazmitin bitki hücrelerine aktarımında *Agrobacterium*-aracılı transformasyon yöntemi kullanılmıştır. CRISPR/SanCas9 sitidin baz editörü patates bitkisinde PAM sekansından (5'-NNGGAT-3') itibaren oldukça uzak konumunda sitozin bazında dönüşümü sağlamıştır. Çalışma ekibi, bu uygulamanın dikotiledonlardaki ilk çalışma olduğunu belirtmektedirler. CRISPR/SanCas9 sitidin baz editörü (18-24 bç), *Streptococcus pyogenes* tabanlı CRISPR/Cas9 sitidin baz editörüne (yaklaşık 20 bç) göre hedef genom bölgesinde daha uzun hibrit oluşturma imkanına sahiptir. Bu durum, aralık dizisindeki uzak konumlu nükleotidlerin hedeflenebilmesi açısından avantajlıdır.

Havuç bitkisi, *in vitro* hücre ve doku kültürü çalışmalarında kullanılan model organizmalardan birisidir. Yeni havuç çeşitlerinin geliştirilmesi, üretici, endüstri ve tüketici talepleri doğrultusunda olmaktadır. İleri biyoteknolojik yöntemler kullanılarak havuç genomunda yapılan iyileştirmeler, araştırmacılar için ilgi çekici ve yüksek potansiyele sahip olarak görülmektedir. Özellikle yatay gen transferinin keşfinden sonra 1980'lerden itibaren havuçta hücre çoğaltım teknikleri, mikroçoğaltım ve somatik emriyogenez için protokoller oluşturulmaya başlanmıştır. Young ve diğerleri (2001) havuç bitkisini, *Agrobacterium rhizogenes* aracılığı ile yaptıkları gen transferi sonrasında saçak kök oluşum mekanizmasının aydınlatılmasında, heterolog gen ve promotör işlevlerinin ortaya çıkarılması için model organizma olarak kullanmışlardır. CRISPR/Cas9 teknolojisi, transgenik teknolojiler, RNAi (RNA interferans), bölgeye özel rekombinasyon gibi genetik mühendisliğe özel teknolojilerin havuç genomu için optimizasyonu ile havuçta besin değerlerinin arttırılması, abiyotik etmenlere dayanıklılık,

patojenlere karşı dayanımın artırılması alanlarında birçok çalışmalar yapılmaya başlanılmıştır. Şu ana kadar genetiği değiştirilmiş havuçların ticarileştirilmesi için ön arazi denemelerine ilişkin kayıt bulunmamaktadır. (Baranski ve Lukasiewicz, 2019). Genetiği değiştirilmiş havuç hücreleri tarafından biyoreaktörlerde üretilen rekombinant bir protein, 2012 yılında Gaucher hastalığının tedavisi için onaylanmış ve ticarileştirilmiştir. Sentezlenen bu protein, havuçta genetik transformasyon çalışmalarının sonucu insanlarda kullanılan ilk üründür. Farklı rekombinant proteinler için yapılan klinik denemeler devam etmektedir (Klimek-Chodacka ve diğerleri, 2019a).

Xu ve diğerleri (2019)'ne göre CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisi havucun da dahil olduğu birçok bitki türüne uygulanmıştır ancak şimdiye kadar havuç bitkisinde kalıcı ve devamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu amaç ile turuncu ve mor havuç türlerinde klorofil biyosentezinde rol oynayan PDS (fiton desatüraz) enzimini kodlayan gen bölgesi ve antosiyanin biyosentezinden sorumlu olan *DcMYB113* gen bölgesi hedeflenmiştir. *PDS* gen bölgesinin ilk dört ekzonunu hedefleyen birer adet, *DcMYB113* gen bölgesinin ilk ekzonunu hedefleyen iki adet, ikinci ve üçüncü ekzon bölgelerini hedefleyen birer adet gRNA bölgeleri belirlenmiştir. Hedeflere özel dizayn edilen her 4 gRNA için AtU3b, AtU3d, AtU6-1 ve AtU6-29 promotörleri kullanılmıştır. *PDS* gen bölgesinin susturulması sonucu turuncu havuç eksplantlarından albino bitkicikler elde edilmiştir. Transformasyon etkinliği %35,3 olarak bildirilmiştir. *DcMYB113* gen bölgesinin hedeflendiği mor havuç eksplantlarında depigmentasyon görülmüştür ve mutasyon oranı %36,4 olarak belirlenmiştir. AtU6-29 promotörünün kullanıldığı gen kasetleri, hedeflenen her iki gen bölgesi için en iyi mutajen özelliği göstermiştir. Çalışma grubu, CRISPR/Cas9 teknolojisi ile havuç bitkisinde de kalıcı transformasyonların yapılabileceğini belirtmektedir.

Klimek-Chodacka ve diğerleri (2019b) tarafından yapılan başka bir çalışmada, CRISPR/Cas9 teknolojisinin havuç genomunda etkili kullanımı için tekniğin optimizasyonu amaçlanmıştır. Genomda hedef olarak antosiyanin sentezinden sorumlu *F3H* (flavanon-3-hidroksilaz) gen bölgesi seçilmiştir. Kullanılan eksplant tipi mor havuç kallus dokularıdır. Bitki dokularına aktarım, *Agrobacterium*-aracılı transformasyon metodu kullanılarak yapılmıştır. Hedeflenen gen bölgesinin susturulması ile bu hücrelerde antosiyanin sentezi olamayacak ve böylece hücrelerde oluşturacak renk

değişimi ile tekniğin başarısı kolayca belirlenebilecektir. Hedef gen bölgesinin ikinci ekzonu için iki adet gRNA dizisi belirlenmiştir. Arabidopsis kodon optimizasyonlu *Cas9* geni kullanılmıştır. CRISPR/Cas9 tekniğinin kullanılmasının sonucu olarak hedef bölgede oluşan küçük ekleme-çıkarma mutasyonları ve daha büyük delesyon mutasyonlarının restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) analizleri ve sekanslama ile belirlenebildiği belirtilmiştir. Yapılan çalışmada RFLP sonuçlarına göre kontrol grubuna ait DNA örneğinde hedeflenen *F3H* gen bölgesine ait DNA fragmenti *NcoI* enzimi ile kesildiğinde, 147 ve 391 bp uzunluğunda fragmentler ortaya çıkmaktadır. CRISPR/Cas9 aracılı düzenlemenin yapıldığı eksplantlardan elde edilen hedef bölgeye ait DNA fragmenti aynı enzim ile kesildiğinde 538 bp'lik bir bant elde edilmiştir. Bu sonuç düzenleme sonucu enzim kesim bölgesinin kaybolması şeklinde yorumlanmaktadır. Çalışma ekibi bu yöntemin havuçta diğer gen bölgelerinin hedeflenmesinde de kolaylıkla uygulanabileceğini belirtmiştir.

Dunemann ve diğerleri (2019), CRISPR/Cas9 teknolojisi aracılığı ile CENH3 (sentromerik histon H3)'de oluşturdukları mutasyon ile havuçta haploid indükleyici bitkiler elde etmeyi hedeflemişlerdir. CRISPR/Cas9 aracılı düzenleme için hedef bölge CENH3 bölgesindeki beşinci ekzondan belirlenmiştir. Havuç bitkisine genetik transformasyon *Agrobacterium rhizogenes* aracılı yapılmıştır. CRISPR/Cas9 teknolojisi, kültüre edilen havuç bitkilerine başarı ile uygulanmış, hedeflenen bölgede istenilen mutasyonlar oluşturulmuştur. Yapılan sitogenetik analizler, mutant saçak köklü hatlarda ve rejenere olan havuç bitkilerinde farklı seviyelerde CENH3 birikiminin olduğunu göstermiştir. Haploid indükleyici olduğu belirlenen bazı genotipler geliştirilmiştir ancak çalışma grubu, diğer bitki türlerinde olduğu gibi havuçta da henüz etkili CENH3 tabanlı haplodizasyon yönteminin geliştirilemediğini bildirmişlerdir.

Havuçta CENH3'ün hedeflendiği bir diğer çalışma 2022 yılında Meyer ve diğerleri tarafından yapılmıştır. Çalışmada PEG-aracılı transformasyon yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın amacı, *CENH3* gen bölgesinde sitozin baz editörü aracılığı ile hedeflenen mutasyonun geçici ekspresyon yolu ile elde edilmesidir. Transformasyonun ardından protoplast hücreleri somatik embriyoların gelişmesi için uygun ortam ve koşullarda inkübe edilmişlerdir. Gen bölgesinde iki farklı bölge hedeflenerek iki gRNA kullanılmıştır. İlk gRNA'nın kullanıldığı transformasyonda 184 rejenere bitkiden 22

tanesinde hedeflenen mutasyon oluşturulmuştur ve mutasyon oranı %11,9 olarak belirtilmiştir. İkinci gRNA'nın kullanıldığı transformasyon sonucu, 190 bitki rejenere olmuş ve 28 tanesi hedeflenen mutasyonu taşımaktadır. Mutasyon oranı bu gRNA için %14,7 olarak belirtilmiştir. Elde edilen 50 mutant bitkinin 43 tanesinin taşıdığı mutasyon bakımından homozigot olduğu belirlenmiştir. Bitkilerde ekspresyon vektörüne ait herhangi bir fragment bulunmadığı bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çalışma ekibi, kullandıkları yöntem ile transgenik olmayan fazla sayıda havuç genotipinin elde edilmesinin mümkün olduğunu bildirmişlerdir.



3. MATERİYAL ve YÖNTEM

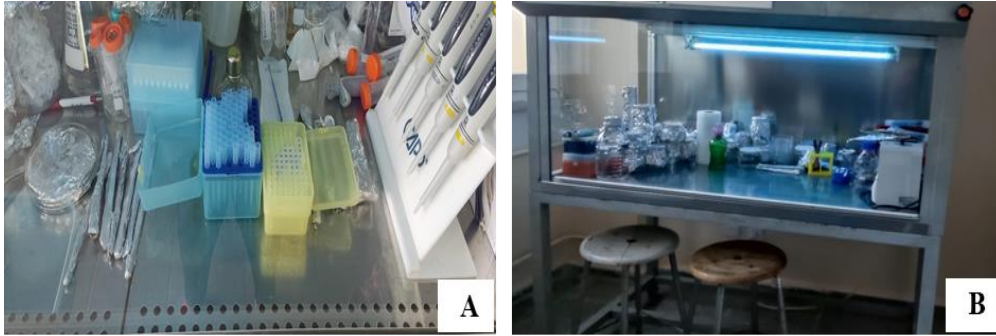
Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölüm laboratuvarlarından ‘Doku Kültürü Laboratuvarı, Biyoteknoloji Laboratuvarı ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1. Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında Dragon F1 havuç tohumlarının çimlendirilmesiyle elde edilen eksplantlara *Agrobacterium*- aracılı genetik transformasyon yapılmıştır.

3.2. Steril Kabin ve Diğer Malzemelerin Sterilizasyonu

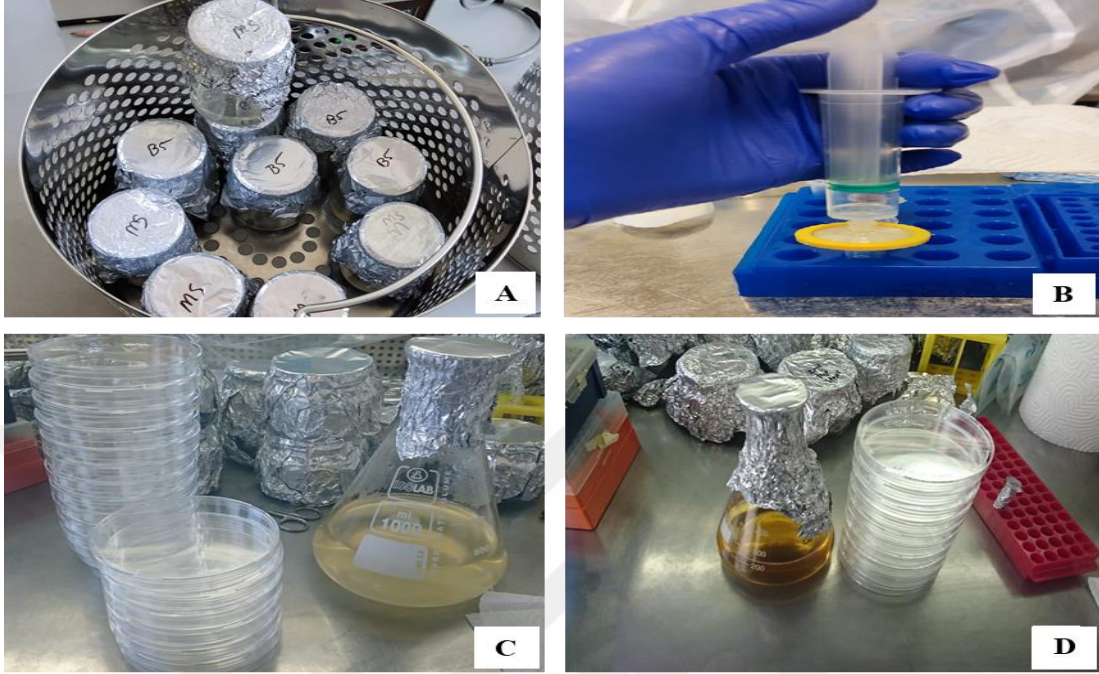
Tezde bulunan çalışmaların çoğu steril kabin kullanımını gerektirmektedir. Steril kabin, çalışmanın yapılmasından 15 dk önce açılarak %70’lik (v/v) etil alkol ile iyice silinmiştir. Çalışmada kullanılacak steril pens, petri, beher, mezür gibi tüm ekipmanlar %70’lik alkol ile silindikten sonra kabine alınarak 10-15 dakika boyunca UV ışığına maruz bırakılmışlardır (Şekil 3.1). Çalışma esnasında kullanılan pens, bistüri, makas gibi metal malzemelerin sterilizasyonları cam boncuk sterilizatör (Yooning-GS300D, Çin) kullanılarak 300 °C’de yapılmıştır.



Şekil 3.1. A), B) Çalışma öncesinde malzemelerin hazırlanması ve kabin sterilizasyonu

Tez çalışması sırasında kullanılan tüm bakteriyel ortamlar ve bitki doku kültürü ortamları çalışma öncesinden hazırlanarak petri ve bitki büyütme kavanozlarına aktarılmışlardır. Çalışma boyunca bakteri hücrelerinin ve havuç eksplantlarının yetiştirilmelerinde 90x17 mm boyutlarında steril polistiren petri kapları kullanılmıştır. Otoklavlanamayan ortam bileşenlerinin sterilizasyonunda filtrasyon yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan stok

çözeltiler ışık ve sıcaklık hassasiyetlerine uygun olarak ve son kullanma tarihleri de dikkate alınarak stoklanmışlardır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Ortam ve antibiyotik solüsyonlarının hazırlanmaları **A)** Ortamların hazırlanarak otoklavlanması **B)** Antibiyotik solüsyonlarının filtre ile sterilizasyonu **C), D)** Bitki doku kültürü ortamları ve bakteriyel ortamların petrilere dökülmeleri

3.3. Gen Kasetinin Dizayn Edilmesi

Havuç bitkisine ait *ALS* gen bölgesinin sekansına NCBI (National Center for Biotechnology Information)'da bulunan 'gen' veritabanı aracılığı ile erişilmiştir. NCBI'da 'acetolactate synthase 2' olarak anılan *ALS* gen bölgesinin havuç genomunda iki adet kopyası bulunmaktadır. Kopyaların birisi 2. kromozom üzerindedir ve gen ID numarası 108209456'dır. Diğer kopya 6. kromozom üzerinde bulunmaktadır ve gen ID numarası 108228060 olarak belirtilmektedir. gRNA dizaynı için gen bölgesinde belirlenen diziler kromozom 2 ve kromozom 6 için hizalandığında, PAM sekansından itibaren 6. ve 12. nükleotidlerin farklı olduğu görülmüştür. Bu neden ile hedef bölge için 2 adet gRNA dizisi belirlenmiştir. Kromozom 2'de bulunan kopya için belirlenen dizi gRNA1; kromozom 6'da bulunan kopya için belirlenen gRNA dizisi gRNA2 olarak adlandırılmıştır. gRNA bölgeleri, PAM sekansları hariç 20 nükleotitten oluşmaktadırlar (Şekil 3.3).

gRNA1 : CAAGTGCCAAGGAGGATGAT**TGG**
gRNA2 : CAAGTGCCTAGGAGAATGAT**TGG**
PAM

Şekil 3.3. Kromozomlara özel dizayn edilen gRNA'lar

Havuç genomunda *ALS* geni için belirlenen gRNA bölgelerinin uygunluğu CRISPRDirect (Naito ve diğerleri, 2015) programında kontrol edilmiştir. Hedef genomda gRNA bölgelerinin belirlenebileceği birçok çevrimiçi program mevcuttur. Ancak birçoğu sınırlı genom verisi ile kısıtlı kullanım alanlarına sahiptir. Bu neden ile CRISPRDirect Programı tercih edilmiştir.

NCBI aracılığı ile edilen havuç *ALS* gen bölgesinin amino asit dizisine ExPASy-translate (Gasteiger ve diğerleri, 2003) aracılığı ile ulaşılmıştır. Yapılan bu biyoinformatik çalışmalar sonunda hedeflenen bölgeye özel olarak dizayn edilen gRNA dizileri ve mutasyon oluşturulması beklenen amino asit bölgeleri kontrollü tekrarlar yapılarak belirlenmiştir.

Kromozom 2 ve 6'ya ait gRNA'ları taşıyan gen kasetleri birbirinden *SpeI* restriksiyon enziminin kesim bölgesi ile ayrılmaktadır (Şekil 3.4). Bu bölge bağlayıcı (linker) DNA olarak kullanılmıştır. İhtiyaç duyulması halinde gen kaseti buradan kesilecek ve farklı plazmitlere klonlanarak bitki dokularının transformasyonu sağlanabilecektir. Mutasyonu oluşturacak gen kaseti, kodon optimizasyonu yapılmış *A. thaliana*'ya ait universal AtU6-26 promoter bölgesi (425 bç) ile başlamaktadır. 20 nükleotidden oluşan gRNA dizisini universal gRNA yapısal bölgesi (76 bç) takip etmektedir. Gen kaseti, AtU6-26 terminatör universal bölgesine ait (192 bç) dizi ile sonlandırılmıştır. Gen kasetinin 5' ve 3' uçlarına sırası ile *PacI* ve *BamHI* restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerine ait diziler eklenmiştir.

Çalışmada kullanılacak plazmit sekansı ve gen kaset dizileri, GenScrip Restriction Enzyme Map Analyses (GenScript, 2022) programına çevrimiçi olarak yüklenmiş ve kesim enzimlerinin tanıdığı bölgelerin yüklenen sekans içerisindeki yerleri kontrol edilmiştir.



Şekil 3.4. Mutasyonu indükleyecek olan gen kaseti şeması

3.4. Havuç DNA'larının İzolasyonu

DNA izolasyonu için havuç bitkilerinden alınan genç yaprak örnekleri 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine konularak liyofilizatörde (Christ Alpha 1-4 LD plus, Germany) 72 saat boyunca kurutulmuşlardır (Şekil 3.5 A, B).



Şekil 3.5. Bitki örneklerinin kurutulmaları **A)** Bitki örneklerinin kurutulmak üzere hazırlanarak stok kutularına yerleştirilmeleri **B)** Örneklerin vakum atmosferi altında dondurularak kurutuldukları liyofilizatör cihazı

Çalışmanın farklı aşamalarında kullanılan DNA'ların izolasyonu, aşağıda detayları belirtilen modifiye CTAB (cetyltriethylammoniumbromide) yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Futterer ve diğerleri, 1995).

I- DNA izolasyonunun ilk aşamasında içerikleri ve derişimleri aşağıda ayrıntılı olarak verilen tampon çözeltiler hazırlanmıştır.

Ekstraksiyon solüsyonu (EB): 50 mM Tris-HCl (Tris(hidroksimetil)aminomethan hidroklorid) pH 8.0, 700 mM NaCl, %1 (w/v) CTAB, 50 mM Na₂EDTA (sodyum etilendiamintetraasetat) içeren EB solüsyonuna, kullanılmadan önce %1 (v/v) oranında β-merkaptoetanol eklenmiştir.

Kloroform:izoamil alkol çözeltisi: 24:1 oranında hazırlanmıştır.

CTAB çözeltisi: %10'luk (w/v) hazırlanmış, otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

NaCl (sodyum klorür) çözeltisi: 1 M hazırlanarak otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

II- Liyofilizatörde kurutulan yaprak örnekleri 25 mg olacak şekilde tartılarak, 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alınmışlardır. Örneklerin öğütülmesine mekanik olarak destek vermesi amacı ile tüp içlerine cam boncuklar eklenmiş ve 15 dakika boyunca öğütücüde bırakılmışlardır (Şekil 3.6).

III- Örneklerin üzerlerine 1000 µL EB eklenerek, örnekler vorteks yardımı ile süspansiyon haline getirilmiş ve 65 °C'ye ayarlı sıcak su banyosunda 30 dakika bekletilmişlerdir.

IV- İnkübasyon sonrası örneklerle 800 µL kloroform:izoamil alkol çözeltisi eklenmiş ve 16.000 g hızda 5 dakika santrifüj (VWR, Micro Star 17, İngiltere) edilmiştir. Daha sonra tüplerin en üstlerinde bulunan fazlar, daha önceden hazırlanan ve içlerine %10'luk CTAB solüsyonundan 100'er µL eklenmiş tüplere aktarılmışlardır.

V- Tüplere 800 µL kloroform:izoamil alkol çözeltisi eklenerek örnekler iyice karıştırılmışlardır. Örnekler 16.000 g hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstte toplanan fazlar 2 mL'lik yeni tüplere alınmışlardır.

VI- Örneklerin üzerlerine -20 °C'de tutulan 800 µL izopropanol eklenmiştir ve örnekler -80 °C'de 1 saat bekletilmişlerdir. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen örnekler 16.000 g hızda 10 dakika santrifüj edilmişlerdir.

VII- Üstteki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra tüplere 1 M'lık NaCl çözeltisinden 400 µL eklenmiş ve 65 °C'ye ayarlı sıcak su banyosunda 15 dakika boyunca bırakılmışlardır. Oda sıcaklığına gelen tüpler 16.000 g hızda 5 dakika santrifüj edilmişlerdir.

VIII- Santrifüj işleminden sonra örneklerin üst fazları 1,5 mL'lik yeni tüplere konulmuş ve 1000 µL %96'lık etil alkol eklenerek -20 °C'de 1 gece bekletilmişlerdir.

IX- -20 °C'den çıkarılan örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra 16.000 g hızda 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstteki sıvı faz dökülmüştür.

X- Tüplere %70'lik 500 µL etil alkol eklenmiş ve 16.000 g hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra etil alkol dökülerek tüplerden uzaklaştırılmıştır.

XI- Etil alkolün tamamen uçurulduğu örneklerin üzerine 100 µL TE (Tris-EDTA) tamponu eklenmiş ve örnekler -20 °C'ye kaldırılmışlardır.

İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu Qubit flourometre (Invitrogen, A.B.D) aracılığı ile ölçülmüştür. Elde edilen DNA çözeltileri son konsantrasyonu 50 ng/μL olacak şekilde ddH₂O (double distile H₂O) ya da TE tamponu ile seyreltilmiştir.



Şekil 3.6. Kurutulmuş örneklerin öğütücü yardımı ile mekanik olarak parçalanmaları

3.5. NCBI Veri Bankasında Belirlenen gRNA Dizilerinin Çalışmada Kullanılacak Havuç Genotipinin ALS Gen Bölgelerinde Varlıklarının Kontrol Edilmesi

NCBI veri bankasında belirlenen *ALS* gen kopyalarından dizayn edilen gRNA dizilerinin çalışmada kullanılan havuç genotipine ait genomdaki dizilerle aynı olup olmadığının kontrolü için hedeflenen kromozom 2 ve kromozom 6 *ALS* gen bölgelerinden Primer3 web programı (Primer3 web, 2021) kullanılarak primerler dizayn edilmiştir (Çizelge 3.1). Dizayn edilen primerler kullanılarak *ALS* gen bölgeleri Dragon turuncu havuç çeşidinde PZR ile çoğaltılmış ve elde edilen *ALS* genine ait DNA fragmentlerinde DNA dizi analizi yapılmıştır (Çizelge 3.2). Sekanslama hizmeti BM Yazılım Firması'ndan (Ankara-Türkiye) alınmıştır.

Çizelge 3.1. PZR’da kullanılan kromozom 2 ve kromozom 6 ALS bölgeleri için dizayn edilen primerler

Primer Adı	Primer Dizisi (5’→3’)	Uzunluk (bç)	Tm (°C)
Dc-ALS-CR2-F	TCTCCAGATTCTCCTCCGACGAG	23	66
Dc-ALS-CR2-R	GGCCTCCCCGAAGTAGCT	18	61
Dc-ALS-CR6-F	CACCTCCCGTTTCCCCCCTTC	21	67
Dc-ALS-CR6-R	GGCGACCCGATGAGGCCA	18	63

Çizelge 3.2. Kromozom 2 ve kromozom 6 ALS bölgelerini çoğaltmak için kullanılan PZR bileşenleri

Bileşen	Miktar (µL)
Kalıp DNA	2,00
ddH ₂ O	10,55
10x Taq Buffer	2,00
dNTP (25 mM)	2,00
MgCl ₂ (25 mM)	1,30
Primer-F (5 µM)	1,00
Primer-R (5 µM)	1,00
Taq DNA Polimeraz (5 U/µL)	0,15
Toplam	20

Uygulanan PZR döngü koşulları sırasıyla; 95 °C’de 4 dakika bir döngü, 95 °C’de 45 saniye, 61 °C’de 50 saniye, 72 °C’de 2 dakika olarak 35 döngü ve son uzatma 72 °C’de 5 dakikadır. Bütün PZR amplifikasyonları Applied Biosystems Veriti 96-well termal döngü (A.B.D.) cihazında yapılmıştır. PZR ürünleri %1’lik agaroz jelde 75 V’da 60 dakika koşturulmuşlardır. Agaroz jelin görüntülenmesi UVP High Performance Transilluminator (A.B.D.) üzerinde yapılmıştır.

3.6. Gen Kasetinin Genetik Transformasyona Hazırlanması

Bu bölüm havuç dokularına genetik transformasyon hazırlıklarını içermektedir. Bölüm kapsamında; transformasyonda kullanılan plazmitin seçimi, gen kasetinin sentezlenmesi, pUC-GW-Amp plazmitine klonlanan gen kasetinin çoğaltılması ve izolasyonu, pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della plazmitinin temini ve klonlamaya hazırlanması,

pUC-GW-Amp ve pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitlerinin restriksiyon enzimlerince kesilmeleri, gen kasetinin transformasyonda kullanılan plazmite ligasyonu ve plazmitin *E. coli* hücrelerinden LBA4404 hücrelerine aktarım yöntemi bulunmaktadır.

3.6.1. Vektör seçimi

Çalışmada klonlama vektörü olarak, Shimatani ve diğerleri (2017) tarafından geliştirilen pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della binary plazmiti kullanılmıştır. Bu plazmit CRISPR/Cas9 ve sitidin baz editörü füzyonu ile oluşturulmuştur. Nokta mutasyonu hedeflenerek yapılacak düzenleme için kalıp bir DNA parçasına ya da homolojiye dayalı onarıma ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak birçok bitki türünde hücrelere kalıp DNA parçasının aktarılması oldukça zordur. Bu problemin üstesinden aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz enzimi vasıtası ile gelinmektedir. Bu yöntem nükleaz aktivitesi olmayan Cas9 ya da nCas9'un sitidin deaminazla füzyonu ve bu füzyonu hedefe götürecek olan rehber RNA'lar ile yapılmaktadır (Shimatani ve diğerleri, 2017). Plazmitte, *Streptococcus pyogenes* bakterisine ait, tip II CRISPR/Cas sisteminin nikaz formu olan Cas9 endonükleazı bulunmaktadır. Nikaz olan bu endonükleaz, taşıdığı D10A mutasyonu sayesinde rehber RNA eşliğinde ulaştığı hedef bölgede sadece RuvC katalitik domain bölgesi ile kırık meydana getirebilmektedir. *PmCDA1* bölgesi Bofa Balığı'na (*Petromyzon marinus*) ait sitidin deaminaz enzimini üreten ve sitozin nükleotidinin timin nükleotidine çevrilmesinden sorumlu olan bölgedir. Plazmit, bitki dokularının seçilmesinde kullanılan Neomisin ve Kanamisin antibiyotiklerine dayanım sağlayan *NeoR/KanR* bölgesini de içermektedir. Plazmitin aktarıldığı bakteri kolonileri, plazmitin sağladığı Spektinomisin ve Streptomisin direnci sayesinde bu antibiyotikleri içeren ortamlarda seçilebilmektedirler.

3.6.2. Gen kasetinin sentezi

Tasarlanan gen kasetine ait sekans bilgileri, yapılan kontrollerin ardından, sentezlenmesi için GENEWIZ Firması (South Plainfield, A.B.D.) ile paylaşılmıştır. Oligonükleotid sentezinin tamamlanmasının ardından fragment pUC-GW-Amp plazmitine klonlanarak liyofilize olarak laboratuvarımıza gönderilmiştir.

3.6.3. pUC-GW-Amp plazmitinin çoğaltılması ve plazmit izolasyonu

Laboratuvarımıza liyofilize halde gelen pUC-GW-Amp plazmiti, 50 µL TE tamponunda çözülerek kullanıma hazırlanmıştır. Plazmit, NEB 10 Beta Kompotent *Escherichia coli* bakteri hücrelerinde çoğaltılmıştır. Bakteri hücrelerine plazmitin aktarılması 'ısı şoku' yöntemi kullanılarak aşağıda detayları verilen üretici firma protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. İnkübatör kullanımını gerektirmeyen tüm aşamalar steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

I- Bakteri hücrelerinin 10 dakika boyunca buz içerisinde çözünmesi sağlanmıştır.

II- 1-5µL plazmit DNA'sı bakteri hücreleri ile çok yavaş bir şekilde karıştırılmıştır.

III- Bakteri hücreleri 30 dakika boyunca buz içerisinde inkübasyona bırakılmışlardır.

IV- 42 °C'de 30 saniye ısı şoku uygulamasının ardından hücreler 5 dakika boyunca buz içerisinde bekletilmişlerdir.

V- Üretici firma tarafından sağlanan SOC (super optimal broth with catabolite repression; katabolit represyonu ile süper optimal besi ortamı) ortamından bakteri hücreleri üzerine 950 µL ilave edilmiştir.

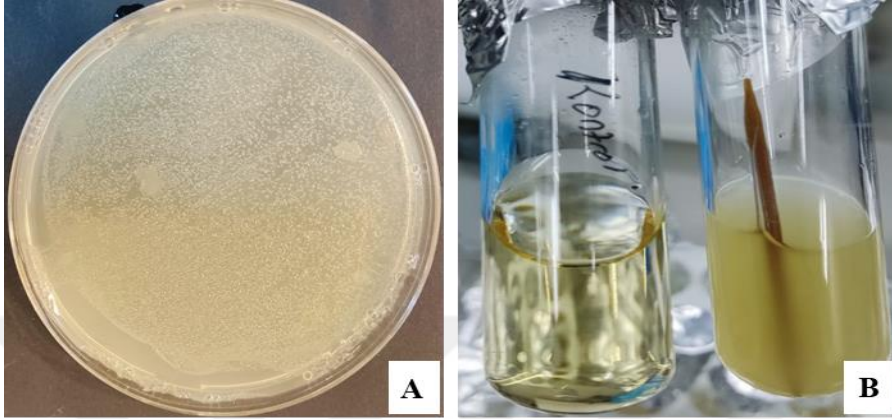
VI- Hücreler bir saat boyunca 37 °C'de 250 rpm'de inkübasyona bırakılmışlardır.

VII- Bakteri solüsyonu, oda sıcaklığındaki sıvı LB (Luria-Bertani -Lennox) ortamı (%1 tripton, %0,5 maya özütü, 0,17 M NaCl, pH 7,5, Sigma Aldrich, A.B.D.) ile on kat seyreltilmiştir.

VIII- Daha önceden hazırlanarak 37 °C de inkübe edilen 100 µg/mL Ampisilin içeren katı LB ortamları (%1 tripton, %0,5 maya özütü, 0,17 M NaCl; %1,5 agar, pH 7,5) bulunan petri kaplarına 100-200 µl seyreltilmiş bakteri hücreleri eklenmiş ve katı LB ortamı yüzeyine düzgün bir şekilde yayılmıştır. Petriler 37 °C de bir gece inkübasyona bırakılmışlardır (Şekil 3.7 A). Bakteri hücreleri tek tek büyüyen kolonilerinden 100 µg/mL Ampisilin içeren 10 mL sıvı LB besiyerlerine (%1 tripton, %0,5 maya özütü, 0,17 M NaCl, pH 7,5) inoküle edilmişlerdir. İnokülasyon kültürü 37 °C, 200 rpm'de 16 saat sıcaklık kontrollü ve çalkalayıcı Promax 1020 inkübatör cihazında (Heidolph, Almanya) inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.7 B).

Hücre solüsyonlarının bir kısmı %50'lik gliserol çözeltisi kullanılarak -80 °C ye kaldırılarak saklanmışlardır. Kalan hücre solüsyonları plazmit ekstraksiyonu için

kullanılmıştır. Bakteri hücrelerinden plazmit izolasyonları NucleoSpin plazmid mini kiti (Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak üretici firma protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Elde edilen plazmit miktarları Qubit cihazında (Invitrogen, ABD) Qubit dsDNA Br Assay kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.



Şekil 3.7. Katı ve sıvı ortamlarında inkübe edilen *E. coli* bakteri hücreleri **A)** Katı ortamlarında 1 gece inkübe edilen bakteri kolonilerinin oluşumu **B)** Sıvı ortamlarında 200 rpm salınımda bir gece büyütülen bakteri hücreleri, fotoğrafta sol tarafta bulunan tüp kontrol grubudur ve bakteri hücresi içermemektedir

3.6.4. Genetik trasformasyonda kullanılan pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della plazmitinin temini ve klonlamaya hazırlanması

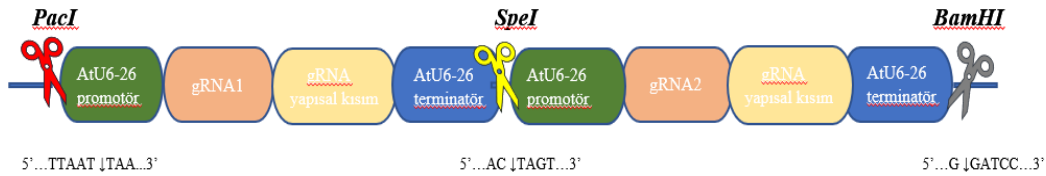
pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmiti, tasarımcısı olan çalışma ekibinden (Dr. Keiji Nishida, Kobe Üniversitesi, Kobe, Japonya) temin edilmiştir. Filtre kağıdına emdirilmiş olarak laboratuvarımıza gönderilen plazmit, TE tampon çözeltisi ile çözülerek *E. coli* bakterisinde çoğaltılmak üzere hazırlanmıştır. Plazmitin NEB 10 Beta *E. coli* bakteri hücrelerine aktarılmasında, bir önceki bölümde detayları verilen ısı şoku yöntemi kullanılmıştır. Aktarımı yapılan bakteri solüsyonlarının 100-200 µl'si, 65 µg/mL Spektinomisin (Sigma Aldrich, A.B.D) içeren katı LB ortamlarının (%1 tripton, %0,5 maya özütü, 0,17 M NaCl; %1,5 agar, pH 7,5) yüzeylerine yayılmıştır. Petriler 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmışlardır. Bakteri hücreleri tek tek büyüyen kolonilerinden 65 µg/mL Spektinomisin içeren sıvı LB besiyerlerine (%1 tripton, %0,5 maya özütü, 0,17 M NaCl, pH 7,5) inoküle edilmişlerdir. Bakteri hücreleri 37 °C, 200 rpm'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Hücre solüsyonlarının bir kısmı %50'lik gliserol çözeltisi kullanılarak -80 °C'de saklanmışlardır. Kalan hücre solüsyonları plazmit ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Plazmit izolasyonları NucleoSpin plazmid mini kiti

(Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak üretici firma protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Elde edilen plazmit miktarları Qubit cihazında (Invitrogen, ABD) Qubit dsDNA Br Assay kiti (Invitrogen, ABD) kullanarak ölçülmüştür.

İzole edilen plazmitler PZR yapılarak kontrol edilmiştir. PZR reaksiyonunda kullanılan primerler, plazmit sekansında bulunan *NptII* gen bölgesinden dizayn edilmiştir (Veillet ve diğerleri, 2019). Uygulanan PZR koşulları sırasıyla; 95 °C’de 3 dakika bir döngü, 95 °C’de 30 saniye, 58 °C’de 50 saniye, 72 °C’de 3 dakika olarak 38 döngüdür ve son uzatma 72 °C’de 7 dakikadır. Üretilmesi beklenen bant uzunluğu yaklaşık 592 bp’dir. PZR ürünleri ve plazmit %0,7’lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.6.5. pUC-GW-Amp ve pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmeleri

Gen kasetinin 5’ ve 3’ uçlarında sırası ile *PacI* ve *BamHI* kesim enzimlerinin tanıdığı diziler bulunmaktadır (Şekil 3.8). pUC-GW-Amp ve pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitleri *PacI* ve *BamHI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, A.B.D.) enzimleri ile kesilmiştir. Kesim protokolü, üretici firmaya ait çevrimiçi web aracı kullanılarak oluşturulmuştur.



Şekil 3.8. Gen kasetinin 5’ ucuna, ortasına ve 3’ ucuna eklenen restriksiyon enzimlerinin kesim noktaları

Uygulanan *PacI*-*BamHI* çift enzim kesimi 50 µL’lik reaksiyon hacmi için 2 µL plazmit DNA’sı, 5 µl (1X) 10x rCut Smart Buffer, 1.0 µL (10 ünite) *PacI*, 1.0 µL (20 ünite) *BamHI* ve 41 µL ddH₂O kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonunda ürünler, %1’lik agaroz jele yüklenerek değerlendirilmiştir. Elde edilen DNA fragmentleri steril bistüri yardımı ile kesilerek, NucleoSpin Gel and PZR Clean-up kitinin (Macherey-Nagel, Almanya) üretici firma protokolüne uygun olarak agaroz jelden izole edilmiştir.

3.6.6. Gen kasetinin pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitine ligasyonu ve çoğaltılması

Gen kasetinin (1446 bç) pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitinde bulunan *PacI* ve *BamHI* enzim kesim bölgelerine (Şekil 3.9) ligasyonu T4 DNA Ligaz (New England Biolabs, Ipswich, MA, ABD) enzimi ile üretici firma protokolü uygulanarak yapılmıştır. NEB online hesaplama aracı (NEBioCalculator) kullanılarak reaktif hacimleri hesaplanmıştır.

Ligasyon tepkimesinin protokolü;

I. Reaksiyon buz içerisinde ve toplam reaksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

II. T4 DNA ligaz buffer (10X) 2 µL,

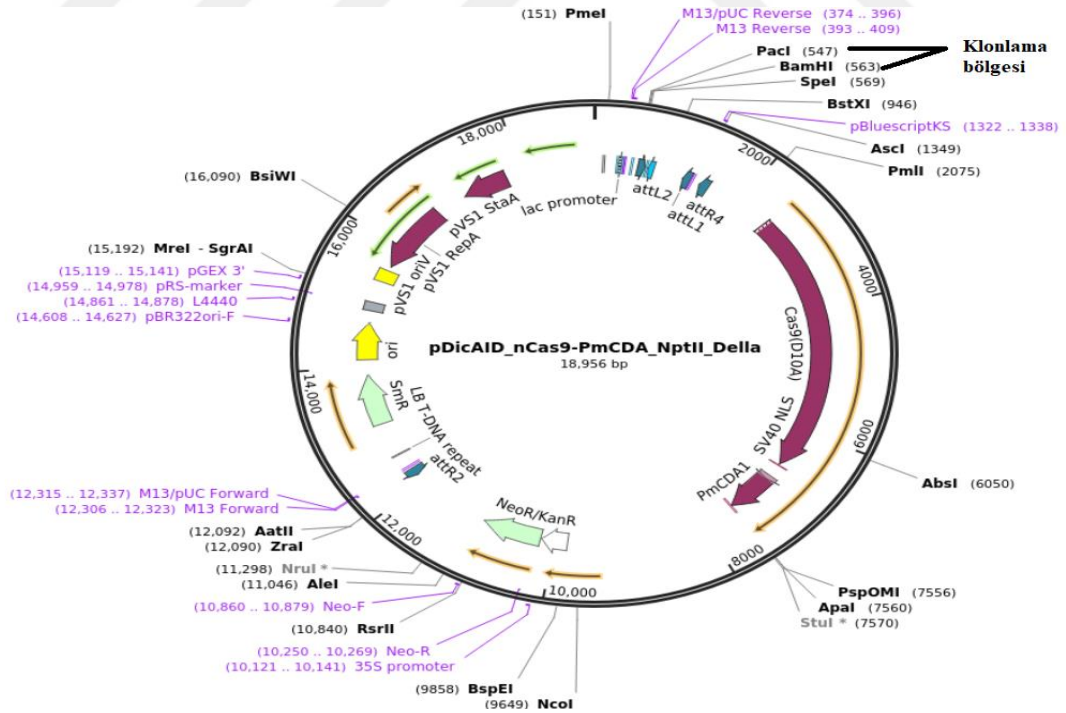
III. Plazmit DNA 4,23 µL,

IV. Fragment DNA 1,86 µL,

V. dH₂O 10,91 µL,

VI. T4 DNA Ligaz 1 µL hacimde kullanılmıştır.

Ligasyon, 16 °C’de gece boyunca inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmiştir.

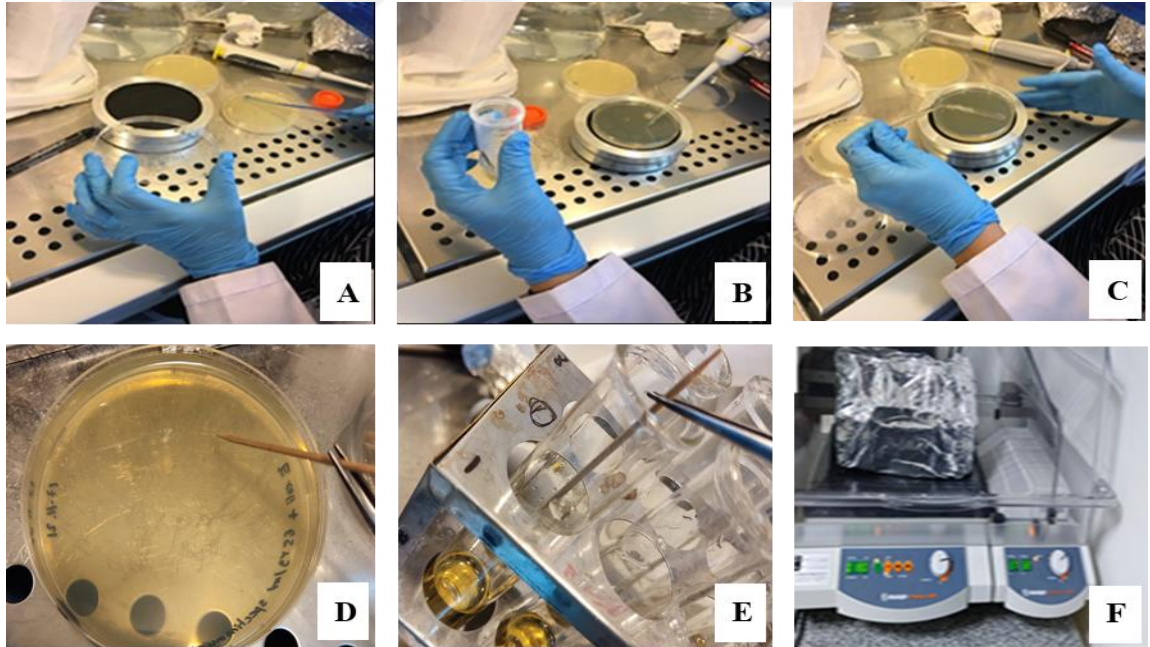


Şekil 3.9. pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmit haritası ve klonlama bölgesi (Addgene, 2020)

Gen kasetini içeren plazmitin *E. coli* (NEB 10 Beta *E. coli*) bakteri hücrelerine aktarılması üretici firmanın protokolüne göre 'ısı şoku' yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bakteriler 65 µg/mL Spektinomisin içeren katı LB ortamlarında (%1 tripton, %0,5 maya özütü, 0,17 M NaCl, %1,5 agar, pH 7,5) 37 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. Seçilen bakteri kolonileri plazmit ekstraksiyonu için 65 µg/mL Spektinomisin içeren sıvı LB ortamlarında (%1 tripton, %0,5 maya özütü, 0,17 M NaCl, pH 7,5) 250 rpm'de 16 saat boyunca 37 °C 'de inkübasyona bırakılmışlardır (Şekil 3.10). Bakteri hücrelerinin bir kısmı %50'lik gliserol solüsyonu içinde -80 °C'ye kaldırılmıştır.

Plazmitler, bakteri hücrelerinden NucleoSpin plasmid mini kiti (Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak üretici firma protokolüne uygun olarak izole edilmiştir. Elde edilen plazmit miktarları Qubit cihazında (Invitrogen, ABD) Qubit dsDNA Br Assay kiti (Invitrogen, ABD) kullanarak ölçülmüştür.

Ekstraksiyonu yapılan plazmitler klonlama kontrolü için *PacI* ve *BamHI* enzimleri ile kesilmiştir. Kesim reaksiyonu %1'lik agaroz jele yüklenerek görüntülenmiştir.

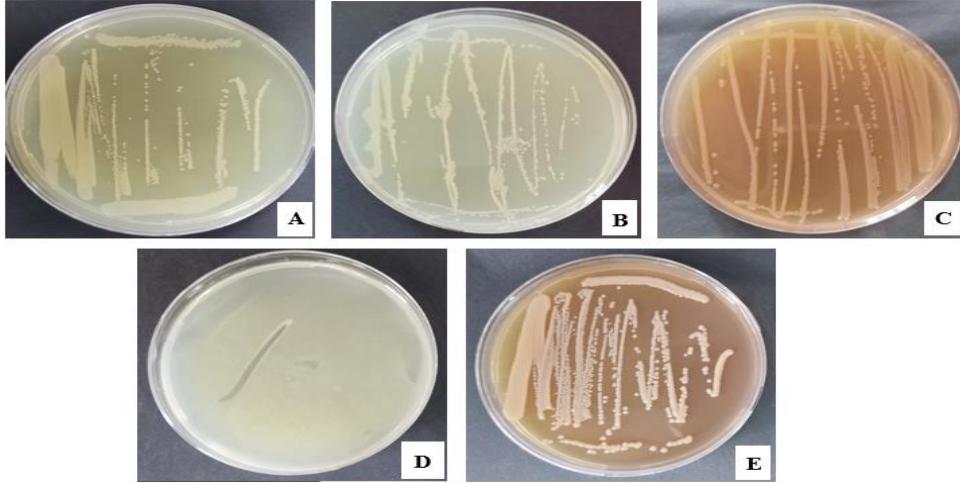


Şekil 3.10. *E. coli* hücrelerinin katı ve sıvı ortamlarında büyütülmeleri **A)**, **B)** ve **C)** bakteri hücrelerinin seçici katı ortamlarına ekimi **D)** Katı ortamında büyüyen bakteri kolonisinin seçilmesi. **E)** Seçilen bakteri kolonisinin sıvı ortamına inokülasyonu **F)** Uygun sıcaklık, süre ve rpm'de bakteri kültürlerinin büyütülmeleri

3.6.7. pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitinin NEB 10 Beta *E. coli* hücrelerinden LBA4404 *Agrobacterium* ırkına transformasyonu ve transformasyonun PZR ile kontrolü

pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitinin LBA4404 bakteri ırklarına aktarılması Wise ve diğerlerinin (2006) çalışmasından optimize edilerek ‘tri-parental mating’ yöntemi ile yapılmıştır. Gen kasetini de içeren pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitleri önce NEB 10 Beta *E.coli* hücrelerine aktarılmıştır. *E.coli* kompetent hücrelerinden LBA4404 bakteri hücrelerine plazmit aktarımı, *pRK2013* plazmitini taşıyan *E.coli*’nin H101 ırkı vasıtası ile yapılmıştır (Şekil 3.11).

‘Tri-parental mating’ ile aktarımın sonunda petrilerde gelişen kolonilerin *Agrobacterium*’a ait transforme bakteriler olması beklenmektedir (Şekil 3.11 E). Transforme *Agrobacterium*’ların yetiştirildiği petrilerde kullanılan Rifampisin, petrideki bakterilerin *Agrobacterium* olduğunu belirlemek için; Spektinomisin ise konjugasyon sonucu pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitini taşıyan *Agrobacterium* hücrelerini seçmek için kullanılmıştır.



Şekil 3.11. Gen kasetini taşıyan plazmitlerin LBA4404 bakteri hücrelerine aktarılması **A)** pRK2013 plazmitini taşıyan bakteri hücrelerinin uygun antibiyotik bulunan petrilerinde büyütülmeleri **B)** Gen kasetini taşıyan plazmiti içeren NEB 10 beta *E.coli* bakteri hücrelerinin uygun antibiyotik bulunan seçici ortamlarında büyütülmeleri **C)** LBA4404 bakteri hücrelerinin 100 mg/L Rifampisin içeren petrilerde büyütülmeleri **D)** Tri-parental mating yöntemi ile gen kasetini taşıyan plazmitin LBA4404 bakteri hücrelerine aktarılması **E)** Plazmit aktarımı yapılan LBA4404 bakteri hücrelerinin seçici petrilerinde büyütülmeleri

pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitini taşıyan *Agrobacterium* hücreleri, 100 µg/mL Rifampisin ve 65 µg/mL Spektinomisin içeren sıvı LB ortamlarına inoküle edilerek (%1 tripton, %0,5 maya özütü, %0,5 NaCl, pH 7,0) 2 gece boyunca 200-250 rpm'de çalkalamalı inkübatör cihazında 28 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır (Şekil 3.12).

LBA4404 bakteri hücreleri bitki dokularının genetik transformasyonlarında kullanılmak üzere stoklanmadan önce sıvı LBA4404 bakteri kültüründen alınan hücreler ile plazmit aktarımının başarısının tespiti amacı ile PZR yapılmıştır. Aktarımı yapılan pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitine ait gRNA, NptII, Cas9 (Veillet ve diğerleri, 2019) ve CBE bölgeleri için dizayn edilen primerler kullanılmıştır. Uygulanan PZR koşulları 95° C'de yapılan ön denatürasyon işleminin ardından sırasıyla; 95° C 4 dakika, 95° C 45 saniye, 50° C 50 saniye, 72° C 2 dakika olarak 35 döngüdür ve son uzatma 72° C'de 5 dakikadır.

Bakteri hücre solüsyonları, %50'lik gliserol stoğu yapılarak havuç bitki dokularının transformasyonlarında kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırılmışlardır.



Şekil 3.12. Bakteri transformasyonu yapılmış *Agrobacterium tumefaciens* ırklarına ait kolonilerin sıvı ortama inokülasyonu ile elde edilen LBA4404 hücreleri, fotoğrafta sol tarafta bulunan tüp kontrol grubudur ve bakteri hücresi içermemektedir

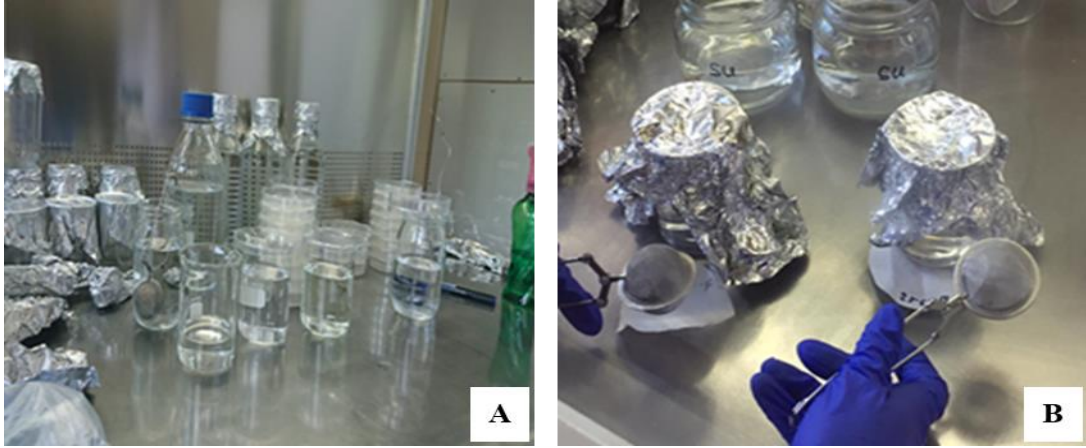
3.7. *Agrobacterium*-aracılı Transformasyonda Kullanılacak Havuç Eksplantlarının Yetiştirilmesi

Bu çalışmada havuç bitkilerine ait hipokotiller ve kallus dokuları genetik transformasyonda eksplant olarak kullanılmıştır. Hipokotil ve kallus dokuları steril ortamda ekimi yapılan havuç tohumlarının çimlendirilmesi ile elde edilmişlerdir. Bu bölüm; tohum sterilizasyonu, çimlendirilme koşulları, hipokotil ve kallus dokularının elde edilmesini içermektedir.

3.7.1. Havuç tohumlarının sterilizasyonu

Tohum sterilizasyonunda kullanılacak olan cam malzemeler, su, süzgeçler, pensler ve filtre kağıtları, materyal yapılarına uygun olan sterilizasyon yöntemlerine göre önceden steril edilerek, steril kabin içerisine alınmışlardır (Şekil 3.13 A).

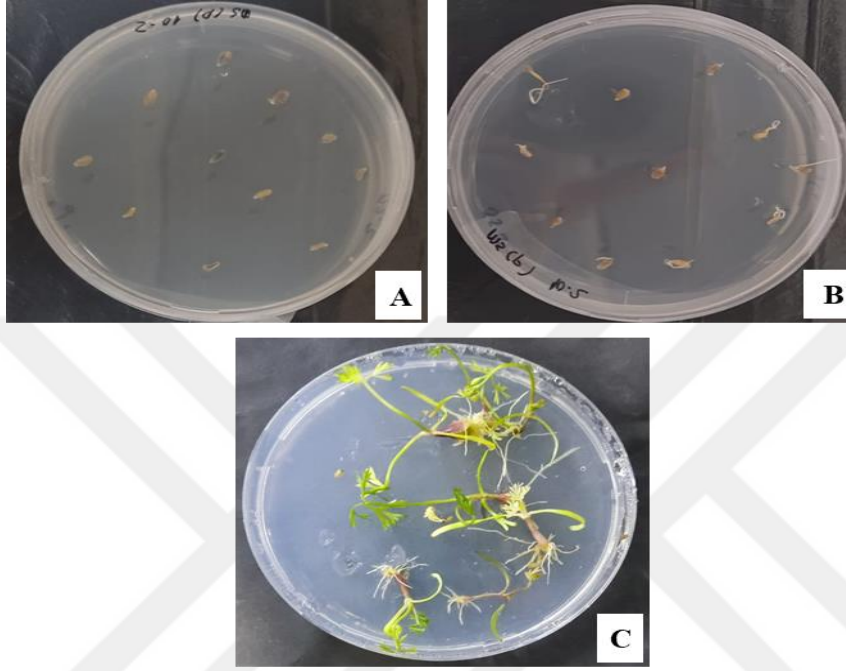
Çalışmada kullanılan turuncu havuç genotiplerine ait tohumlar; %70'lik etanol içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra, içerisine 2 damla tween-20 damlatılmış %50'lik ticari çamaşır suyuna alınmış ve 15 dakika bekletilmişlerdir. Tohumlar iyice durulanana kadar en az 3 kez steril distile su ile durulanmışlardır (Şekil 3.13 B). Tüm sterilizasyon ve kurutma işlemleri steril kabin içerisinde yapılmıştır.



Şekil 3.13. Tohum sterilizasyon aşamaları **A)** Sterilizasyonunda kullanılan tüm malzeme ve solüsyonların hazırlanması **B)** Tohumların sterilizasyonları

Steril filtre kağıdına yayılarak kurutulan tohumlar, hormon içermeyen katı MS (Caisson, ABD) ortamlarına (Murashige&Skoog vitaminli 4,43 g/L; sükroz 30 g/L; bitki agarı 8 g/L, pH 5.8) 10'ar adet ekilerek petriler parafilmle kapatılmıştır (Şekil

3. 14 A, B). Ekim yapılan petrilere oda sıcaklığında ve soğuk beyaz floresan ışıkları altında 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda çimlenmeye bırakılmışlardır (Şekil 3. 14 C). Kallus transformasyonunda kullanılacak tohumlar oda sıcaklığında ve karanlık ortamda çimlendirilmişlerdir.



Şekil 3.14. Petrilere ekilen tohumların çimlendirilmesi **A)** Steril edilmiş turuncu havuç tohumlarının ortamlarına ekilmeleri **B)** Tohumlarda çimlenmenin başlaması **C)** 4 haftalık havuç fideleri

Genetik transformasyonda iki farklı çeşit havuç eksplantı kullanılmıştır. Transformasyon hem havuç hipokotillerine hem de kallus dokularına yapılmıştır. Bu amaçla transformasyonda kullanılan hipokotiller, 4 hafta boyunca yetiştirilen havuç fidelerinden elde edilmiştir ve 1'er cm uzunlukta kesilerek transformasyona hazırlanmışlardır.

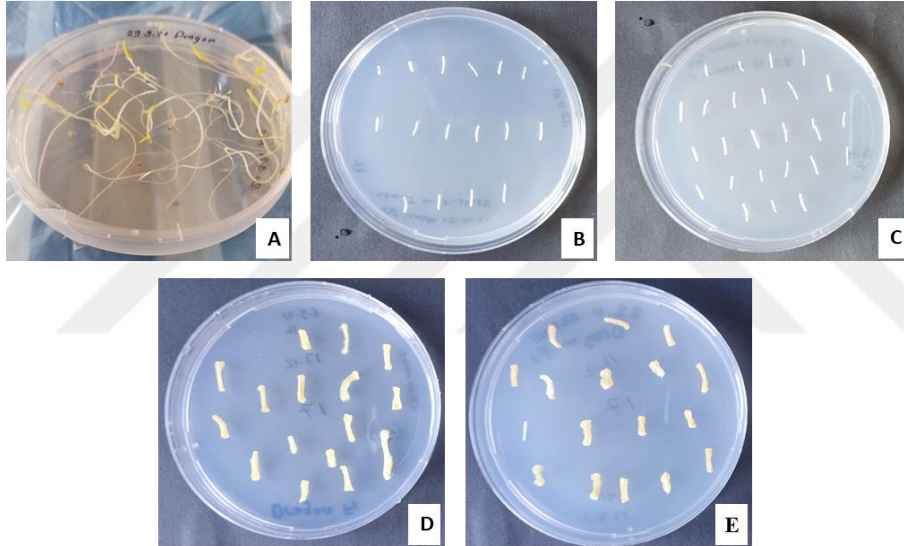
3.7.2. Havuç fidelerinin kallus başlangıç ortamlarına alınması

Dört haftalık olan havuç fideleri, yaklaşık 1'er cm uzunluğunda kesilerek, kallus oluşumu için farklı bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları içeren farklı ortamlara alınmıştır (Şekil 3.15). Kallus oluşumu için eksplant aktarımı yapılan ortamlar ve farklı bitki büyüme düzenleyicilere ait konsantrasyonları Çizelge 3.3'te verilmiştir. Kallus başlangıç ortamı olarak kullanılan MS ortamı MS-k olarak, B5

ortamı ise B5-k olarak adlandırılmıştır. Kullanılan B5-k ortamındaki büyüme düzenleyicilerin oranları, kallus başlangıç ortamı olarak MS ortamını tercih eden Nong Liu ve diğerlerinin (1992) çalışmasından optimize edilmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan kallus geliştirme ortamları

Besi ortamının adı	Besi ortamı içeriği ve bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonu ve pH
MS-k (Murashige&Skoog kallus başlangıç ortamı)	MS vitaminli toz ortam; 4,43 g/L, süktroz 30 g/L, plant agar 7 g/L, 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0,1 mg/L, pH 5.8 (Ipek, 2002).
B5-k (Gamborg's B5 kallus başlangıç ortamı) (Duchefa, Hollanda)	B5 vitaminli toz ortam; 3,16 g/L, süktroz 30 g/L, plant agar 7 g/L, 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0,5 mg/L, pH 5.8



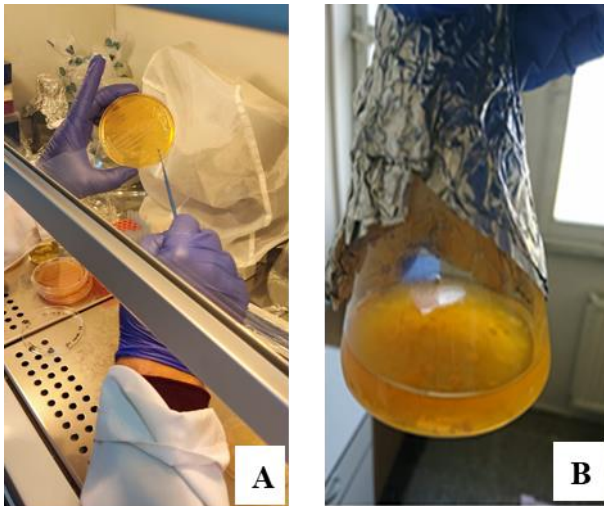
Şekil 3.15. Havuç eksplantlarının kallus başlangıç ortamlarına alınmaları **A)** Dört haftalık havuç fideleri **B)** MS-k ortamına alınan havuç eksplantları **C)** B5-k ortamına alınan havuç eksplantları **D)** MS-k ortamında gelişmeye başlayan kallus dokuları **E)** B5-k ortamında gelişmeye başlayan kallus dokuları

3.8. Kallus ve Hipokotillere *Agrobacterium*-aracılı Transformasyon

Çalışmanın bu bölümü; turuncu havuç çeşidinden kallus dokularının ve hipokotillerin yetiştirilerek, gen kasetini içeren *pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA* plazmitinin *A. tumefaciens*'in LBA4404 ırkı aracılığı ile eksplantlara aktarım aşamalarından oluşmaktadır.

3.8.1. *Agrobacterium tumefaciens* ırklarından LBA4404 bakteri hücrelerinin transformasyona hazırlanmaları

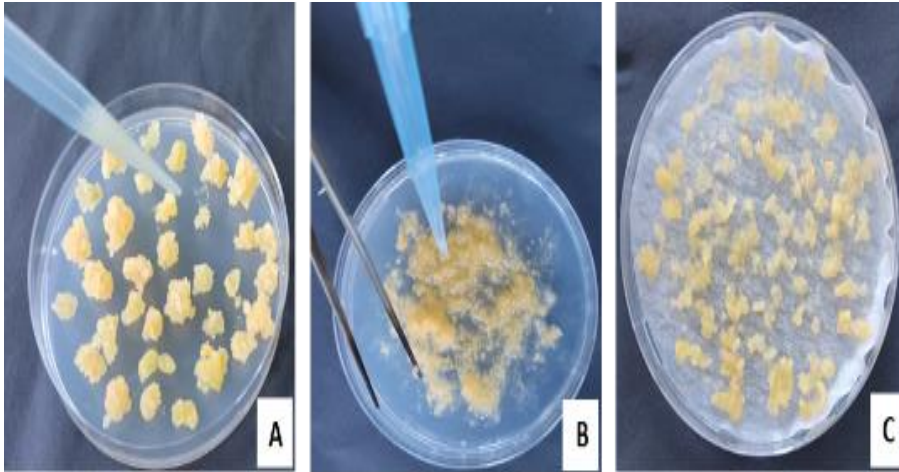
LBA4404 bakteri hücreleri 100 µg/mL Rifampisin, 65 µg/mL Spektinomisin antibiyotiklerini içeren katı LB ortamlarında (%1 tripton, %0,5 maya özütü, %0,5 NaCl; %1,5 agar, pH 7,0) 28 °C’de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Bakteri hücreleri tek tek büyüyen kolonilerinden 100 µg/mL Rifampisin ve 65 µg/mL Spektinomisin antibiyotiklerini içeren sıvı LB besiyerlerine (%1 triptone, %0,5 yeast extract, %0,5 NaCl, pH 7,0) inoküle edilmişlerdir (Şekil 3.16 A). Bakteri hücreleri 28 °C, 200-250 rpm’de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır (Şekil 3.16 B). Spektrofotometrede (Beckman Du530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer, A.B.D) bakteri süspansiyonunun OD₆₀₀ nm’deki yoğunluk ölçümleri yapılmıştır. Bakteri hücreleri 2500 rpm’de oda sıcaklığında 15 dakika boyunca santrifüj (Allegra X-15R Centrifuge, Beckman Coulter, A.B.D) edilerek toplanmışlardır. Hücre pelleti OD₆₀₀ nm’deki değeri 0,3 (Chen ve Punja, 2002) olacak şekilde 200 µM asetosiringon içeren sıvı B5 ortamı (B5 vitaminli toz ortam 3,16 g/L, sükroz 30 g/L, 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0,5 mg/L, pH 5,8) ile tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Bakteri hücreleri 200 rpm’de, 28 °C’de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Hücre süspansiyonları kallus dokularının ve hipokotillerin transformasyonlarında kullanılmışlardır.



Şekil 3.16. LBA4404 bakterilerinin katı ve sıvı ortamlarında kültürü **A)** LBA4404 bakterilerinin LB katı ortamlarında büyümeleri ve koloni seçimi **B)** LBA4404 bakterilerinin LB sıvı ortamlarında büyütülmesi

3.8.2. Kallus dokularına *Agrobacterium*-aracılı transformasyon

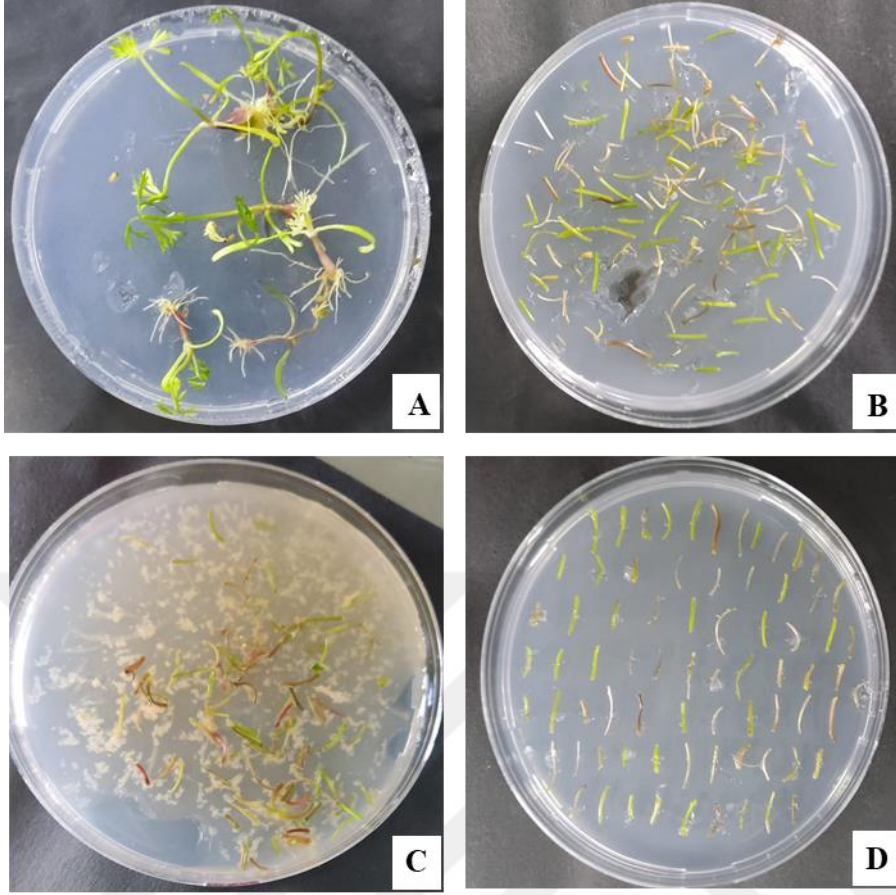
Yaklaşık 2 haftalık kallus dokusu, önceden hazırlanmış ve üzerine steril filtre kağıdının yerleştirilmiş olduğu ko-kültivasyon ortamlarının (B5 vitaminli toz ortam 3,16 g/L, süktroz 30 g/L, bitki agarı 7 g/L, 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0,5 mg/L, asetosiringon 100 μ M, pH 5.8) bulunduğu petriye alınmıştır. Kallusların genetik transformasyonu için bakteri süspansiyonlarının 100 μ L'si, 500 mg kallus için kullanılmıştır (Ipek, 2002). (Şekil 3.17 A, B). Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda LBA4404 hücreleri ile 2 gece inkübasyona bırakılan kallus dokuları sürenin sonunda seçici antibiyotiğin bulunduğu B5 ortamına alınmışlardır (Şekil 3.17 C). Kullanılan ortamda seçici antibiyotik olarak 100 μ g/mL Kanamisin (Sigma Aldrich, A.B.D) kullanılmıştır. Kanamisin, plazmit aktarımı başarı ile gerçekleşmiş bitki dokularının seçimi için kullanılmıştır. Ortamlarda kullanılan diğer bir antibiyotik Timentin (Goldbio)' dir (Chen ve Punja, 2002; Veillet ve diğerleri, 2019). Timentin, bitki dokularından bakteri hücrelerinin elemine edilmesi amacı ile kullanılmıştır. Ortamlarında 10-14 gün duran kallus dokuları, mutasyon taşıyan dokuların tespiti için 40 ng/mL klorsülforon (Veillet ve diğerleri, 2019) ve 250 μ g/mL Timentin içeren yeni ortamlarına (B5 vitaminli toz ortam 3,16 g/L; süktroz 30 g/L, bitki agarı 7 g/L, 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0,5 mg/L, pH 5.8) alınmışlardır. Yeni kallus dokuları gelişene kadar besi ortamları birkaç haftada bir yenilenmiştir.



Şekil 3.17. Kallus dokularına genetik transformasyon aşamaları **A), B)** kalluslara genetik transformasyon **C)** LBA4404 bakteri hücreleri ile ko-kültivasyon

3.8.3. Hipokotillere *Agrobacterium*-aracılı transformasyon

Turuncu havuç fideleri %3 süzkroz, %0,7 agar içeren MS çimlendirme ortamlarında dört hafta boyunca yetiştirilmiştir (Şekil 3.18 A). Havuç fidelerine ait hipokotiller 1'er cm olarak kesilmişlerdir (Şekil 3.18 B). Bitki eksplantlarının üzerlerine *Agrobacterium* hücre süspansiyonları eklenerek 15 dakika beklenmiştir (Şekil 3.18 C). Süre sonunda bakteri süspansiyonu petriden çekilmiştir. Filtre kağıdı aracılığı ile kurulan eksplantlar, ko-kültüvasyon ortamının (B5 vitaminli toz ortam 3,16 g/L, süzkroz 30 g/L; bitki agarı 7 g/L, 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0,5 mg/L, asetosiringon 100 µM, pH 5.8) bulunduğu petrilere alınmışlardır (Şekil 3.18 D). Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bakteri hücreleri ile 3 gece ko-kültüvasyona bırakılan hipokotiller, sürenin sonunda 100 µg/mL Kanamisin ve 250 µg/mL Timentin antibiyotiklerinin de bulunduğu, kallus geliştirme ortamlarına alınmışlardır. Geçici ekspresyon için uygun olan 10 günün (Veillet ve diğerleri, 2019) geçmesinin ardından ortamdan Kanamisin kaldırılmıştır ve eksplantlar, hedeflenen mutasyonu taşıyan dokuları belirleyecek olan 40 ng/mL klorsülforon ve 250 µg/mL Timentin içeren yeni kallus geliştirme ortamlarına alınmışlardır. Yeni kallus dokuları gelişene kadar besi ortamları birkaç haftada bir yenilenmiştir.



Şekil 3.18. Havuç fidelerine ait hipokotillere *Agrobacterium*-aracılı transformasyon
A) Dört haftalık turuncu havuç fideleri B) 1 cm uzunluğunda kesilmiş hipokotiller
C) LBA4404 bakteri solüsyonu ile muamele edilen hipokotil eksplantları D) 72 saat boyunca ko-kültivasyona bırakılan hipokotil eksplantları

3.9. Transgenik Kallusların Taşıdıkları Mutasyonun PZR ve Sekans Analizi ile Değerlendirilmesi

Klorsülforon içeren seçici ortamlarında gelişimlerini sürdüren kallus dokularında oluşması beklenen mutasyonun tespiti için, dokulardan alınan örneklerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Kallus DNA'larının bir kısmı dokularda T-DNA varlığının tespiti için kullanılmıştır. Bu tespit, AtU6-grNA, Cas9, NptII (Veillet ve diğerleri, 2019) ve Çizelge 3.4'te belirtilen ve Primer3 web programı (Primer3 web, 2021) aracılığı ile tasarlanan CBE bölgelerine ait primerler kullanılarak PZR ile yapılmıştır. Uygulanan PZR koşulları sırasıyla; 95° C 4 dakika, 95° C 45 saniye, 50° C 50 saniye, 72° C 2 dakika olarak 35 döngüdür ve son uzatma 72° C'de 5 dakikadır. PZR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jelde, 98 V'da, 50 dakika boyunca koşturulmasının ardından, dokulardaki T-DNA varlığı kallus DNA'larında belirlenmiştir.

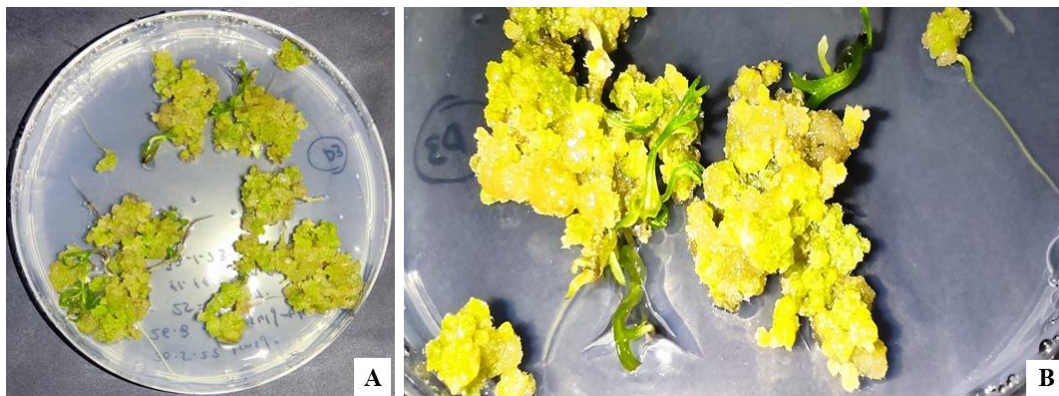
Çizelge 3.4. PZR’da kullanılan CBE bölgesine özel primerler

Primer Adı	Primer Dizisi (5' → 3')	Uzunluk (bp)	Tm (°C)
CBE-F	GCTTTGGAAGCTTGAGGGATAATG	23	58
CBE-R	CAGCTGGACTCTTAGTGGTATG	22	59

Kromozom 2 ve kromozom 6 da bulunan *ALS* gen bölgeleri, daha önceden dizayn edilen ve Bölüm 3.5’de detayları verilen primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. Agaroz jelde görüntülenen DNA fragmentleri steril bistüri yardımı ile kesilerek NucleoSpin Gel and PZR Clean-up kitinin (Macherey-Nagel, Almanya) üretici firma protokolüne uygun olarak agaroz jelden izole edilmiştir. Mutasyon tespitinde kullanılan sekanslama hizmeti BM Yazılım Firması’ndan (Ankara-Türkiye) alınmıştır.

3.10. Somatik Embriyoların Oluşumu

Klorsülforon içeren kallus geliştirme ortamlarında gelişme gösterebilen kallus dokuları sürgün oluşumları için rejenerasyon ortamlarına alınmışlardır. Çalışmada, rejenerasyon ortamı olarak klorsülforon (40 ng/mL) ve kinetin (0,6 mg/L) içeren katı (agar 7 g/L) Gamborg’s B5 (B5 vitaminli toz ortam 3,16 g/L; sükroz 30 g/L pH:5,8) ortamları kullanılmıştır. Bitki dokuları, 23 °C’de soğuk beyaz floresan ışıkları altında 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamlarına alınmışlardır (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. A), B) Rejenerasyon ortamına alınan kallus dokularında sürgün oluşumları

3.11. Somatik Embriyoların Köklendirme Ortamlarına Alınmaları

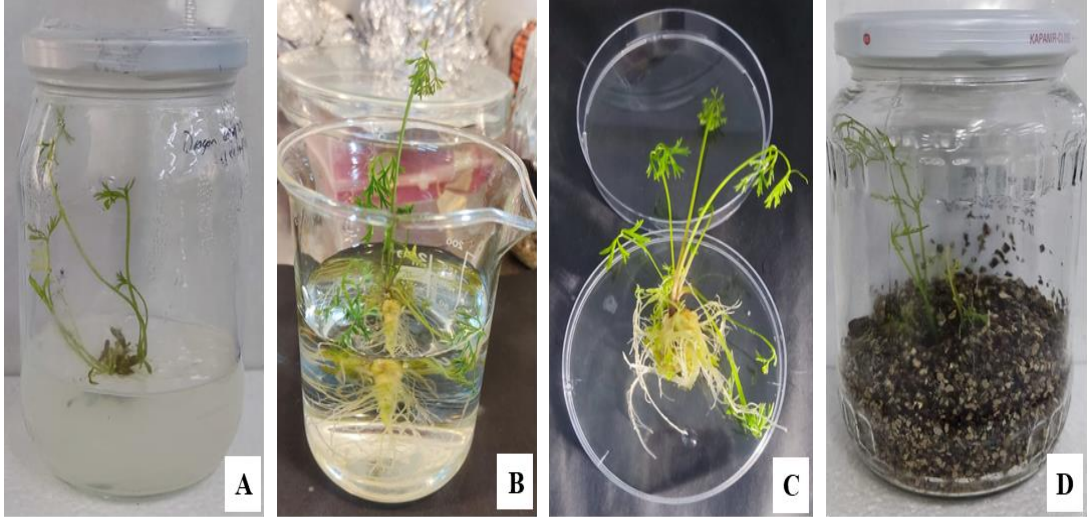
Köklendirme ortamı olarak klorsülforon (40 ng/mL) etken maddesini bulunduran, hiçbir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen, yarı katı (agar 4 g/L) Gamborg's B5 ortamları (B5 vitaminli toz ortam 3,16 g/L, süktroz 30 g/L, pH:5,9) kullanılmıştır. Kök ve sürgün gelişimlerini tamamlayan bitkicikler, köklendirme ortamlarının bulunduğu kavanozlara alınarak, 23 °C'de soğuk beyaz floresan ışıkları altında 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamlarında büyümeye bırakılmışlardır (Şekil 3.20 A, B, C).

3.12. Köklenen Transform Havuç Fidelerinin Klorsülforon Toleranslarının Klorsülforon İçeren Kallus Başlangıç Ortamlarında Kontrolü

Köklendirme ortamlarında yeterli derecede kök gelişimi gösteren transforme havuç fidelerinden, klorsülforonlu ortamda kallus geliştirebilme yeteneklerinin gözlemlenebilmesi için, hipokotil örnekleri alınmıştır. Alınan hipokotiller 1 cm boylarında kesilmişlerdir. Hipokotil eksplantları klorsülforon içeren kallus geliştirme ortamlarına (3,16 g/L vitaminli B5 ortamı, %3 süktroz, %0,7 agar, 1 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L kinetin, 40 µg/L klorsülforon pH 5,8) alınarak gelişimleri gözlemlenmiştir.

3.13. Köklenen Havuç Bitkilerinin Dış Ortama Alıştırılmaları

Kökleri iyi gelişmiş, boyları yaklaşık 6-8 cm olan fideler dış ortama alışmaları için içlerinde vermikülit olan kavanozlara alınmışlardır. Vermikülitler 800 mL'lik kavanozların dörtte birine kadar doldurulmuştur. İçlerine yarı yoğun sıvı B5 ortamından (B5 vitaminli toz ortam 1,58 g/L, pH:6,3) eklenen kavanozlar 121 °C'de 20 dakika boyunca 1 atmosfer basınç altında otoklavlanarak hazırlanmışlardır. Fidelerin aktarımı için kullanılan ddH₂O, pensler ve cam malzemeler de önceden otoklavlanarak hazırlanmışlardır. Köklendirme ortamından alınan havuç fidelerinin kökleri şeker ve agar kalıntılarından arınmaları için ddH₂O ile iyice yıkanmışlardır. Vermikülit içerisinde yetiştirilen havuç fidelerinin bulunduğu kavanozlar kök yapılarının gelişmeleri için parafilm ile kapatılarak 23 °C'de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortama bırakılmışlardır (Şekil 3.20 D).

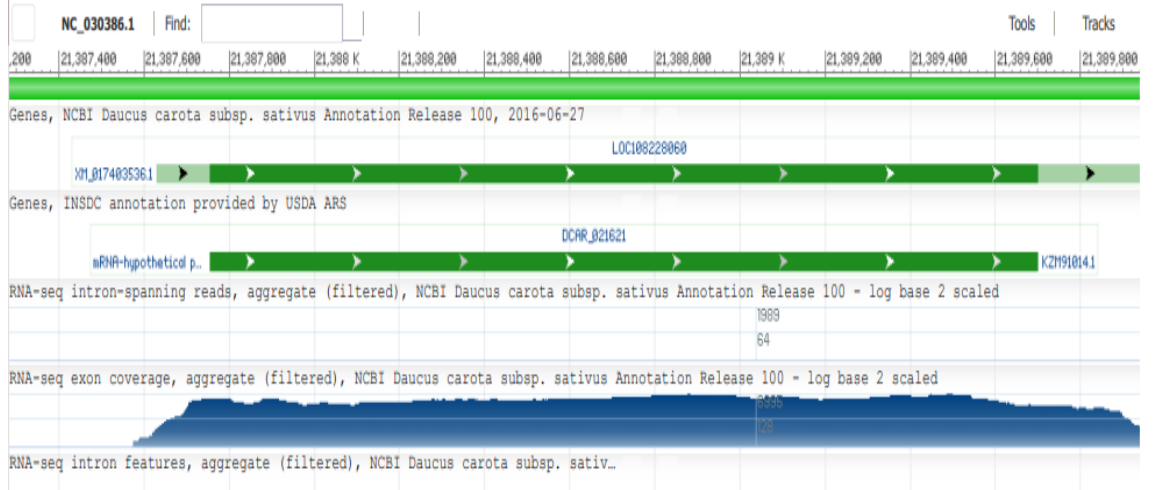


Şekil 3.20. Köklendirme ortamına ve vermikülite alınan turuncu havuç fideleri **A)** Bitkilerin köklendirme ortamında gelişimleri **B), C)** Köklenen havuç fidelerinin vermikülite alınma hazırlıkları **D)** Fidelerin vermikülitte gelişimleri

Kök yapıları iyice gelişme gösteren kavanozların ağızları kademeli olarak gevşetilerek açılmıştır (Şekil 3.21 A). Havuç fideleri yarı hacimde torf, yarı hacimde perlit bulunan saksılara alınarak polietilen poşetler içerisinde 23 °C’de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortama bırakılmışlardır (Şekil 3.21 B, C). Poşetler, nem dengesinin sağlanması için kademeli olarak açılmıştır. Saksılar 2-3 gün aralıklarla sulanmıştır. Gelişme gösteren fideler poşetlerinden çıkartılmışlardır (Şekil 3.21 D, E).



Şekil 3.21. Havuç bitkilerinin kademeli olarak dış ortama alıştırmaları
A), B) Köklenmenin kontrolü **C)** Nem dengesi oluşana kadar havuç fidelerinin polietilen poşetlere alınmaları **D)** Kök gelişimi ve nem dengesi iyi olan fidelerde kök durumları **E)** Havuç bitkilerinin uygun saksılara alınmaları



Şekil 4.2. Havuç genomu versiyon ASM162521v1'e göre kromozom 6'da bulunan *ALS* gen bölgesine ait özellikler

Kromozom 2 ve 6'da bulunan hedef bölge dizileri ExPASy-translate programına çevrimiçi yüklenerek *ALS* gen bölgesine ait proteinin amino asit dizisi elde edilmiştir. Hedeflenen bölgeye özel olarak dizayn edilen gRNA dizileri ve mutasyon ile değişimi öngörülen Prolin amino asidinin lokasyonu her iki kromozom için de belirlenmiştir. Şekil 4.3'te amino asit dizileri belirtilmiştir. Her iki kromozomda da kırmızı ile vurgulanmış bölgeler açık okuma çerçevelerini belirtmektedir. Mavi ile vurgulanan kısım klorsülforon toleransının oluşmasından sorumlu (Boutsalis vd., 1999) ve bu çalışma için de hedef olan domaini, kırmızı belirteç ile belirtilen P ise çalışmada havuç genomunda değişimi hedeflenen ve 175. sırada bulunan Prolin amino asidini ifade etmektedir.



Şekil 4.3. Havuç genomuna ait hedef ALS gen bölgelerinin amino asit dizilerinin ve değişimi hedeflenen Prolin amino asidinin ExPASy çevrimiçi programı kullanılarak belirlenmesi

Kromozom 2 (kr 2) ve kromozom 6' (kr 6) da bulunan ALS gen bölgelerini hedefleyen gRNA dizileri sırası ile gRNA1 ve gRNA2 olarak adlandırılmıştır. Çalışmada kullanılan plazmitte bulunan Cas9 enzimi *Streptococcus pyogenes* bakterisi temelli olduğu için PAM sekansı için tarama yapılırken hedef bölgede NGG dizisinin varlığı dikkate alınmıştır. Her iki kromozom için de belirlenen gRNA'lar ve özellikleri Çizelge 4.1'de belirtilmiştir. PAM sekansları altı çizilerek belirtilen nükleotidlerdir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan gRNA1 ve gRNA2'nin özellikleri

Gen	Sekans bilgileri (5'-3')	Hedef bölgedeki yeri (nt)	Uzunluk (nt)	GC%	gRNA adı
ALS (kr 2)	CAAGTGCCAAGGAGGA TGATTGG	667-689	23	50	gRNA1
ALS (kr6)	CAAGTGCCTAGGAGAA TGATTGG	640-662	23	50	gRNA2

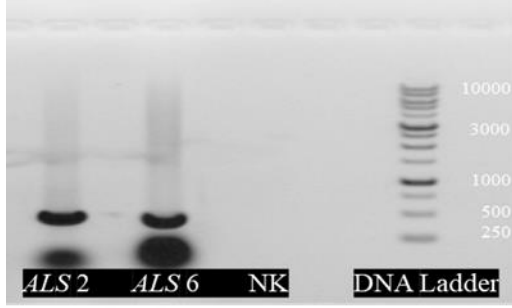
gRNA'ların belirlenmesinin ardından sentezlettirilecek gen kasedi şeması oluşturulmuştur. 5' ucunda *PacI* enzim kesim noktası ile başlayan gen kaseti sırası ile universal AtU6-26 promotörü, gRNA1 dizisini, universal gRNA yapısal bölgesini ve AtU6-26 terminatör bölgesini kapsamaktadır. Bağlayıcı DNA olarak *SpeI* enzim kesim bölgesini bulunduran kaset aynı sıra ile promotör bölgeyi, gRNA2 dizisini, yapısal bölgeyi içermekte ve terminatör bölgesi ile sonlanmaktadır. Fragmentin 3' ucunda *BamHI* enziminin kesim noktası bulunmaktadır. Gen kasetine ait şema hazırlandıktan sonra kesim enzimlerinin tanıdıkları bölge sayıları plazmitte ve tasarlanan gen kaseti dizilerinde kontrol edilmiştir. Fragment, plazmite restriksiyon enzimleri aracılığı ile bağlanmaktadır. Bu nedenle belirlenen enzim kesim noktalarının plazmit ve gen kasetinde birer adet olması çok önemlidir. Plazmit ve gen kaseti dizileri ayrı ayrı GenScript çevrimiçi programına yüklenerek kesim noktaları kontrol edilmiştir. 18 956 bç'den oluşan plazmit ve 1446 bç'den oluşan gen kaseti fragmentine ait program verileri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi restriksiyon enzimlerinin kesim noktaları sadece plazmitin klonlama bölgesinde ve gen kasetine klonlama amacıyla eklenen dizilerde bulunmaktadır.

Çizelge 4.2. pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della plazmiti ve gen kasetinde kullanılan restriksiyon enzim adları, tanıdığı diziler ve kesim lokasyonları

pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della Plazmiti				Gen Kaseti			
Enzim Adı	Tanıdığı Dizi	Tanıdığı Yer Sayısı	Lokasyon	Enzim Adı	Tanıdığı Dizi	Tanıdığı Yer Sayısı	Lokasyon
<i>PacI</i>	TTAATTAA	1	543/548	<i>PacI</i>	TTAATTAA	1	1/6
<i>SpeI</i>	ACTAGT	1	569/570	<i>SpeI</i>	ACTAGT	1	722/723
<i>BamHI</i>	GGATCC	1	563/564	<i>BamHI</i>	GGATCC	1	1442/1442

Genetik transformasyon basamakları uygulanmadan önce Dragon çeşidine ait bitki örnekleri kurutularak DNA izolasyonları yapılmıştır. Havuç genomunda hedeflenen ALS gen bölgeleri için tasarlanan primerler (DC-ALS-CR2 F ve R, DC-ALS-CR6 F ve R) kullanılarak yapılan PZR'da 477 bç uzunluğunda fragmentlere ait görüntüler agaroz jel elektroforezi sonucunda görüntülenmiştir (Şekil 4.4). Elde edilen ampliconlar gRNA'ların hedefledikleri bölgelerin doğrulanması için sekans analizine gönderilmiştir. Sekans sonuçları kullanılarak havuç genomunda belirlenen gRNA'ların hizalama

işlemleri NCBI Nucleotide BLAST çevrimiçi programı kullanılarak yapılmıştır. Yapılan çalışma sonunda sekanslanan *ALS* gen bölgesinde hedeflenen gRNA bölgelerinin doğruluğu tespit edilmiştir. Eşleşmeye ait sekans turuncu ile işaretlenerek gösterilmiştir. (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.4. PZR ile çoğaltılan kromozom 2 ve 6'da bulunan *ALS* gen bölgelerine ait DNA fragmentlerinin agaroz jelde görüntülenmesi, NK: negatif kontrol, DNA ladder: GeneDirex 100 bp

12	ATT-TCCTCCGACGAGCCTCGAAAGGGCTCCGACGTGCTCGTCGAAGCCCTGGAACGCGA	70
50226533	ATTCTCTCCGACGAGCCTCGAAAGGGCTCCGACGTGCTCGTCGAAGCCCTGGAACGCGA	50226474
71	AGGCGTGGAGCAGCTCTTCGCGTACCCCGGTGGCGCCTCCATGGAGATTACACAGGCTTT	130
50226473	AGGCGTGGAGCAGCTCTTCGCGTACCCCGGTGGCGCCTCCATGGAGATTACACAGGCTTT	50226414
131	AACTCGCTCTCAGACCATTCAGAATATTCTTCCAGGCATGAACAGGGCGGGATTTTCGC	190
50226413	AACTCGCTCTCAGACCATTCAGAATATTCTTCCAGGCATGAACAGGGCGGGATTTTCGC	50226354
191	TGCTGAGGGGTATGCTCGTGCCACCGGGCGCCCTGGAATCTGTATTGCAACTTCAGGGCC	250
50226353	TGCTGAGGGGTATGCTCGTGCCACCGGGCGCCCTGGAATCTGTATTGCAACTTCAGGGCC	50226294
251	TGGAGCTACTAATTTGGTTAGTGGCCTTGCTGATGCGCTTCTTGATAGTACTCCGCTTGT	310
50226293	TGGAGCTACTAATTTGGTTAGTGGCCTTGCTGATGCGCTTCTTGATAGTACTCCGCTTGT	50226234
311	CGCGATTACGGGGCAAGTGCCAAGGAGGATGATTGGGACTGATGCATTTACAGGAACTCC	370
50226233	CGCGATTACGGGGCAAGTGCCAAGGAGGATGATTGGGACTGATGCATTTACAGGAACTCC	50226174
371	TATTGTTGAGGTAACCAGGTCTATTACTAAGCATAATTATCTGTTTTGGATGTTGAGGA	430
50226173	TATTGTTGAGGTAACCAGGTCTATTACTAAGCATAATTATCTGTTTTGGATGTTGAGGA	50226114
431	TAT-CCTAGGA	440
50226113	TATCCTAGGA	50226103

Şekil 4.5. *ALS* (kromozom 2) gen bölgesine ait sekans sonuçlarına göre gRNA1 ile hedeflenen bölge, hizalamada üstteki nükleotid dizileri Dragon F1 havuç çeşidinden elde edilen dizilerdir

19	ccccccTCCGAACCCGAAAGGGTCCGACATTCTGGTGAAGCCCTTGAACGCGAAGG	78
25455594	CCCCCTTCCGAACCCGAAAGGGTCCGACATTCTGGTGAAGCCCTTGAACGCGAAGG	25455653
79	CGTTAATCACGTCTTCGCGTACCCTGGTGGAGCCTCCATGGAGATCCACCAGGCTCTTAC	138
25455654	CGTTAATCACGTCTTCGCGTACCCTGGTGGAGCCTCCATGGAGATCCACCAGGCTCTTAC	25455713
139	CCGCTCTAATGCGATTAAGAATATTCTCCCCGCCACGAACAAGGCGGGGTTTCGCTGC	198
25455714	CCGCTCTAATGCGATTAAGAATATTCTCCCCGCCACGAACAAGGCGGGGTTTCGCTGC	25455773
199	CGAAGGGTATGCTCGTGCTACTGGGAACAGGTGTCTGCATTGCCACTTCTGGCCCTGG	258
25455774	CGAAGGGTATGCTCGTGCTACTGGGAACAGGTGTCTGCATTGCCACTTCTGGCCCTGG	25455833
259	TGCTACCAATTTGGTCAGTGGACTTGCTGATGCTTTGCTTGATAGTATTCCGATTGTCGC	318
25455834	TGCTACCAATTTGGTCAGTGGACTTGCTGATGCTTTGCTTGATAGTATTCCGATTGTCGC	25455893
319	GATTACGGGGCAAGTGCCTAGGAGAATGATTGGGACTGATGCGTTTCAGGAAACACCTAT	378
25455894	GATTACGGGGCAAGTGCCTAGGAGAATGATTGGGACTGATGCGTTTCAGGAAACACCTAT	25455953
379	TGTTGAGGTAACAAGGTCTATTACTAAGCATAATTATCTTGTTTGAATGTTGAGGATAT	438
25455954	TGTTGAGGTAACAAGGTCTATTACTAAGCATAATTATCTTGTTTGAATGTTGAGGATAT	25456013
439	-CCAAGAA 445	
25456014	TCCAAGAA	25456021

Şekil 4.6. ALS (kromozom 6) gen bölgesine ait sekans sonuçlarına göre gRNA2 ile hedeflenen bölge, hizalamada üstteki nükleotid dizileri Dragon F1 havuç çeşidinden elde edilen dizilerdir

Sekans sonuçlarında belirlendiği gibi gRNA bölgeleri hedeflenen gen bölgesi ile birebir eşleşmektedir. Çalışmada kullanılan Cas9 enziminin hedef bölgede aradığı PAM sekansı da (TGG) genomdaki hedef dizide bulunmaktadır. gRNA seçimi bu çalışma için oldukça doğru görülmektedir. gRNA'nın mutasyon etkinliği ileriki bölümlerde incelenecektir.

PZR ve sekanslamada kullanılan primerlerin havuç genomu üzerindeki gösterimi de Clustal Omega'nın Multiple Sequence Alignment (Clustal Omega, 2022) aracı kullanılarak yapılmıştır (Şekil 4.7 A ve B). Aynı zamanda bu programda genetik transformasyon yapılmamış kontrol bitkisine ait hedef bölge ile NCBI referans sekansı da hizalanmıştır.



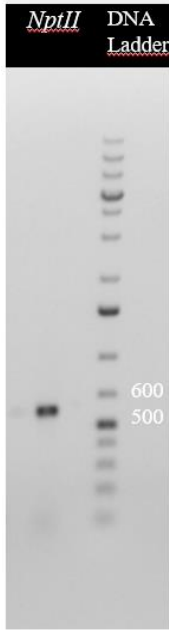
Şekil 4.7. Havuç genomunda ALS gen bölgelerini çoğaltan primer çiftleri **A)** Kromozom 2 ALS gen bölgesini çoğaltan primer çifti **B)** Kromozom 6 ALS gen bölgesini çoğaltan primer çifti, çalışmada sekanslama her 2 kromozom içinde tek yönlü olarak R primerler kullanılarak yapılmıştır, hizalamada alttaki nükleotid dizileri Dragon F1 havuç çeşidinin sekanslanması ile elde edilen dizilerdir

4.1.2. pUC-GW-Amp plazmitinin çoğaltılması ve plazmit izolasyonu

Gen kasetinin dizi bilgisi, sentezlenmek üzere GENEWIZ Firması (South Plainfield, A.B.D.) ile paylaşılmıştır. Firma tarafından sentezlenen gen kaseti laboratuvarımıza pUC-GW-Amp plazmitine klonlanarak gönderilmiştir. NEB 10 Beta Kompotent *E. coli* hücrelerinde çoğaltılarak izole edilen plazmitlerin miktarları Qubit (Invitrogen, A.B.D) ölçümlerine göre 289 ng/μl olarak belirlenmiştir.

4.1.3. Genetik trasformasyonda kullanılan pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della plazmitinin klonlamaya hazırlanması

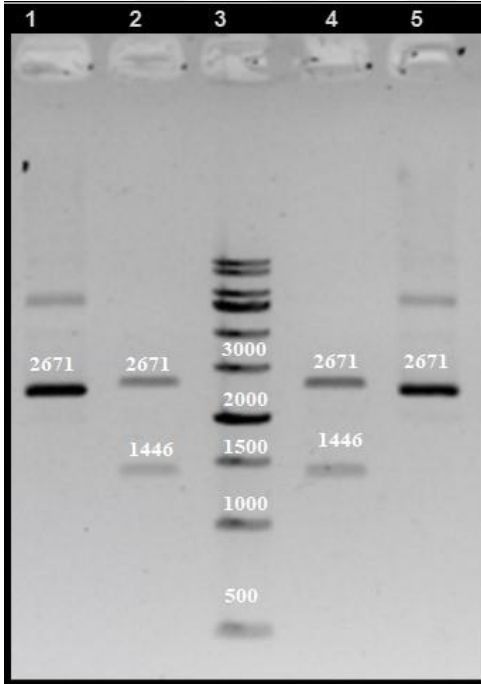
pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della plazmitleri NEB 10 Beta Kompotent *E. coli* hücrelerinde çoğaltılmıştır. Bakteri hücrelerinden izole edilen plazmitlerin miktarları Qubit (Invitrogen, ABD) ölçümlerine göre 314 ng/μl olarak belirlenmiştir. İzolasyonu yapılan plazmitlerin doğruluğu, plazmitte bulunan *NptII* gen bölgesi için dizayn edilen primerler kullanılarak PZR ile belirlenmiştir. Yaklaşık 592 bp uzunluğunda DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 4.8). Bu fragment, izole edilen plazmitin pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della plazmiti olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 4.8. İzole edilen plazmitlerde *NptII* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması, DNA ladder: Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Plus

4.1.4. pUC-GW-Amp ve pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmeleri

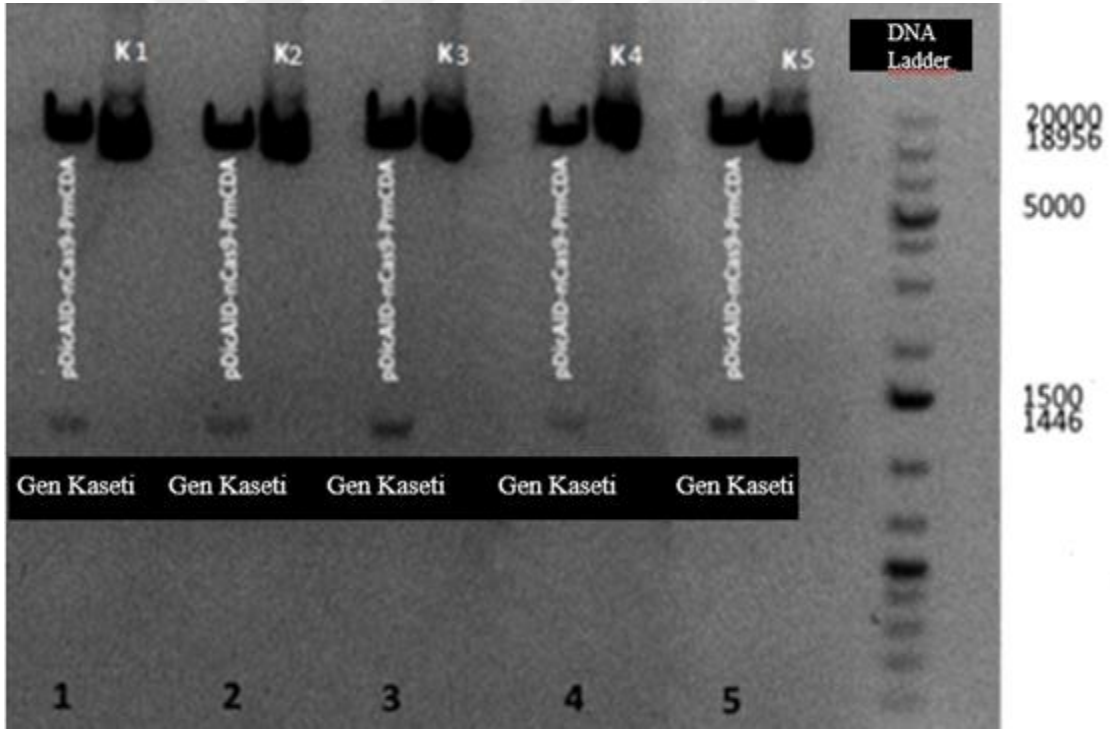
Gen kaseti, transformasyonda kullanılan pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della plazmitine restriksiyon enzimleri kullanılarak klonlanmıştır. Bunun için pUC-GW-Amp ve pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitleri *PacI* ve *BamHI* enzimleri ile kesilmişlerdir. pUC-GW-Amp plazmitinde *PacI* enziminin kesim noktası (5'TTAAT↓TAA3') plazmite klonlanan gen kasetinin 5' ucunda bulunmaktadır. *BamHI* enziminin kesim noktası (5'G↓GATCC3') ise gen kasetinin 3' ucunda bulunmaktadır. Plazmit, bu iki enzim tarafından kesilerek sonuçlar %1'lik agaroz jelde değerlendirilmiştir. Jelde 1446 bp uzunluğuna sahip gen kasetine ve 2671 bp uzunluğuna sahip pUC-GW-Amp plazmitine ait 2 farklı bant görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.9). Gen kaseti fragmenti ile aynı enzimlerle kesilen pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmiti birbirlerine bağlanabilmek için gerekli uygun uçlara sahip olmuştur. Gen kasetine ait DNA fragmenti jelden izole edilerek pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitine klonlanlama aşamasına geçilmiştir.



Şekil 4.9. GW-Amp (2671 bp) plazmitinin *PacI* ve *BamHI* enzimleri ile kesim sonuçlarının %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi, 1 ve 5 numaralı kuyucuklar; gen kaseti içermeyen GW-Amp plazmiti, 2 ve 4 numaralı kuyucuklar; gen kasetini taşıyan GW-Amp plazmitinin *PacI* ve *BamHI* enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan bantlar, DNA ladder: Sinapse 1 Kb

4.1.5. Gen kasetinin pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitine ligasyonu ve çoğaltılması

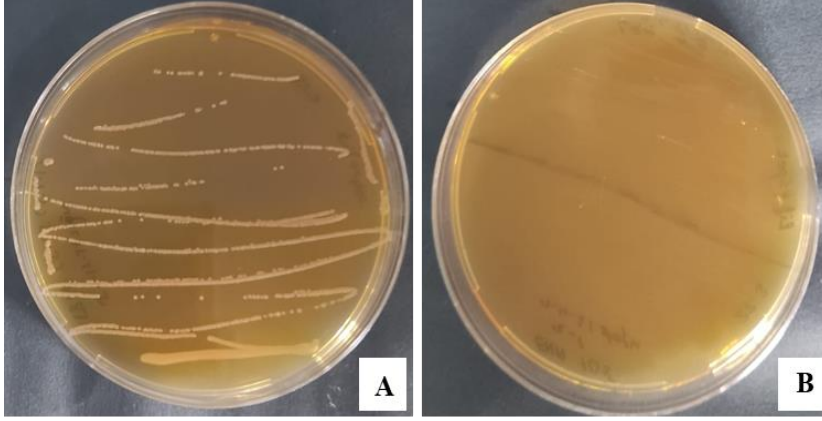
5' ve 3' uçları benzer şekilde kesilmiş gen kaseti fragmenti çalışmada kullanılan pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitine T4 DNA Ligaz enzimi ile bağlanmıştır ve plazmit NEB 10 Beta Kompotent *E. coli* hücrelerinde çoğaltılmıştır. Oluşan bakteri hücrelerinden rastgele koloniler seçilerek sıvı ortamlarına inoküle edilmişlerdir. Sıvı ortamlarında büyüme gösteren bakteri kolonilerinden plazmit izolasyonu yapılmıştır. 5 farklı koloniye ait bakteri hücrelerinden izole edilen plazmitler klonlama başarısının tespiti için *PacI* ve *BamHI* enzimleri ile kesilmiştir. pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitinin uzunluğu 18 956 bp'dir. Gen kaseti 1446 bp uzunluğundadır. Farklı bakteri kolonilerinden elde edilen plazmitlerin enzimlerle kesimi sonucu 18 956 ve 1446 bp'lik uzunluklara sahip 2 bant görüntüsünün elde edilmesi, klonlamanın başarı ile yapıldığının göstergesidir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitinin *PacI* ve *BamHI* enzimleri ile kesimi, alttaki küçük bantlar 1446 bp'lik gen kasetine ait fragmentler, K1, K2, K3, K4 ve K5: kesim uygulanmamış plazmitler (kontrol), DNA Ladder: Thermo Scientific GeneRuler 1Kb Plus

4.1.6. pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitinin NEB 10 Beta *E. coli* hücrelerinden LBA4404 *Agrobacterium* ırkına transformasyonu

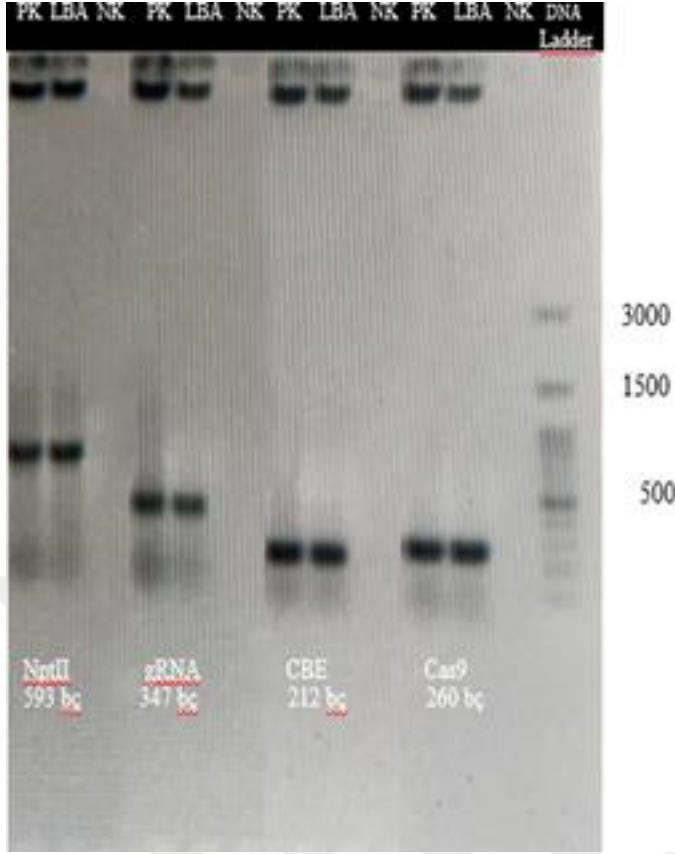
pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitini içeren NEB 10 Beta *E. coli* bakterilerinden plazmitlerin *Agrobacterium* LBA4404 ırkına aktarımında ‘tri-parental mating’ yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde donör bakteri ırkı, pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitini taşıyan NEB 10 Beta *E. coli* bakterileridir. Bu bakteriler ortamlarına 65 µg/mL Spektinomisin eklenerek seçilmişlerdir. Bakterilere bu antibiyotiğe karşı dayanım sağlayan taşıdıkları pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitidir. Petrilere koloni gelişimi gösteren bakteriler aynı zamanda ‘ışık şoku’ yöntemi ile plazmit geçişinin olduğu hücrelerdir. Yöntemdeki alıcı bakteri ırkı LBA4404 bakterileridir. Bu bakteriler besiyerlerine 100 µg/mL Rifampisin eklenerek büyütülmüşlerdir. Petride sadece Rifampisine dayanıklı olan LBA4404 ırkına ait koloniler büyüyebilmişlerdir. Yöntemde kullanılan son bakteri ırkı plazmit aktarımını başlatmak için gerekli genleri taşıyan yardımcı bakteri ırkıdır. Çalışmada pRK2013 yardımcı (helper) plazmitini taşıyan *E.coli* HB101 hattı kullanılmıştır. Bakterilerin besiyerlerine 50 µg/mL Kanamisin eklenerek bu besiyerde büyüme gösteren bakteri kolonileri seçilmiştir. Seçilen her üç bakteri ırkına ait koloniler herhangi bir antibiyotiğin bulunmadığı petrilere ekilmişlerdir. Burada amaç konjugasyon ile plazmitin LBA4404 bakteri hücrelerine geçişini sağlamaktır. Petride gelişme gösteren kolonilerin seleksiyonları 100 µg/mL Rifampisin ve 65 µg/mL Spektinomisin içeren besi ortamlarında yapılmıştır. Bu ortamlarda Rifampisin olduğu için sadece LBA4404 bakteri ırkları gelişebilmektedir. Aynı zamanda ortamda bulunan Spektinomisin antibiyotiği, plazmit aktarımı başarılı olan LBA4404 bakteri hücrelerinin büyüyerek seçilmesine olanak sağlamıştır (Şekil 4.11 A). LBA4404 ırkına ait olan Rifampisine dayanıklı ancak plazmit taşımadığı için Spektinomisine karşı hassas olan plazmit aktarımı yapılmamış LBA4404 hücreleri, Spektinomisin ve Rifampisin bulunan petrilere büyüme gösterememiştir (Şekil 4.11 B). Bu petrilere alınan koloniler sıvı ortamlarına inoküle edilip büyütüldükten sonra, bakteri süspansiyonlarının gliserol stokları yapılarak havuç bitki dokularının genetik transformasyonlarında kullanılmıştır.



Şekil 4.11. LBA4404 bakterilerinin Rifampisin ve Spektinomisin içeren seçici ortamlarında büyütülmeleri **A)** Plazmit aktarımı yapılan LBA4404 hücrelerinin seçici ortamda büyütülmesi **B)** Plazmit aktarımı yapılmamış LBA4404 hücrelerinin seçici ortamda büyütülmesi

4.1.7.pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitinin LBA4404 *Agrobacterium* ırkına transformasyonlarının kontrolü

LBA4404 bakteri hücreleri bitki dokularının genetik transformasyonlarında kullanılmak üzere stoklanmadan önce, plazmit aktarımının başarısının tespiti amacı ile bakteri kültüründen alınan hücreler ile PZR yapılmıştır. Aktarımı yapılan pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitine ait gRNA, NptII, Cas9 (Veillet ve diğerleri, 2019) ve CBE bölgeleri için dizayn edilen primerler kullanılmıştır (bkz Çizelge 3.4). Bu bölgeler için elde edilen PZR ürünlerine ait bantlar Şekil 4.12’de verilmiştir. LBA4404 bakterileri hücrelerinde plazmitin gRNA, CBE, NptII ve Cas9 bölgeleri için elde edilen fragment büyüklükleri pozitif kontrol olarak kullanılan plazmit DNA’sındaki fragment boyutları ile aynı bulunmuştur. Bu sonuç plazmitin ‘tri-parentel mating’ yöntemi ile NEB 10 Beta *E. coli* bakterisinden LBA4404 *Agrobacterium* bakterisine başarılı bir şekilde transforme olduğunu göstermektedir.



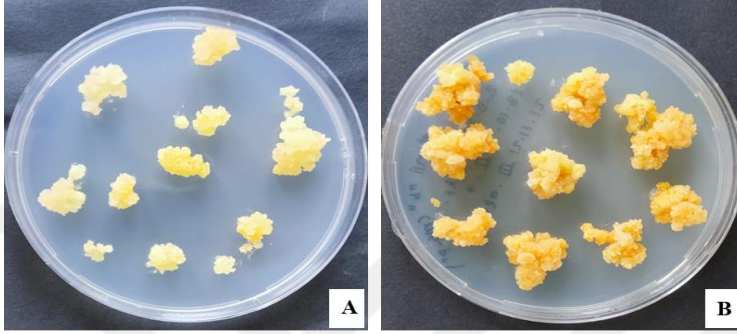
Şekil 4.12. LBA4404 bakteri hücrelerinde transformasyon başarısının PZR ile saptanması, PK: plazmit kontrol, LBA: LBA4404 hücreleri, NK: negatif kontrol, DNA Ladder: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus

4.1.8. Transformasyon için steril eksplantların elde edilmesi ve uygun besi ortamının belirlenmesi

Havuç tohumlarının sterilizasyonunda Rosales-Mendoza ve diğerlerinin (2007) çalışmalarında kullandıkları sterilizasyon yöntemi optimize edilerek kullanılmıştır. Sterilizasyondan sonra besi ortamlarına ekilen tohumların çimlenme oranları yaklaşık %80 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç sterilizasyon yöntemin tohumların çimlenme güçlerini çok etkilemediği göstermektedir.

Dört haftalık havuç fidelerinin hipokotilleri yaklaşık 1'er cm kesilerek kallus başlangıç ortamlarına alınmışlardır. Kallus oluşumunun optimizasyonunda iki farklı kallus başlangıç ortamı kullanılmıştır. Bu ortamlar MS-k (MS vitaminli toz ortam; 4,43 g/L, süktroz 30 g/L, plant agar 7 g/L, 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0,1 mg/L, pH 5.8 (Ipek, 2002) ve B5-k (B5 vitaminli toz ortam; 3,16 g/L, süktroz 30 g/L, plant agar 7 g/L, 2,4-D 1 mg/L,

kinetin 0,5 mg/L, pH 5.8) ortamları olarak adlandırılmıştır. Yaklaşık olarak 4 haftanın sonunda kallus dokuları genetik transformasyon için uygun büyüklüğe gelmişlerdir. Ancak B5-k ortamında gelişen kallus dokuları daha parlak sarı ve yumuşak dokulu olarak olurken (Şekil 4.13 A) MS-k ortamında gelişen kallus dokuları daha koyu renkli ve sert yapılı olmuşlardır (Şekil 4.13 B). Bu sonuçlar neticesinde tez çalışmasında genetik transformasyonda kullanılan kallus dokuları B5-k ortamında yetiştirilmişlerdir.



Şekil 4.13. B5-k ve MS-k ortamlarında oluşan kallus dokuları **A)** B5-k ortamında oluşan kallus dokuları **B)** MS-k ortamında oluşan kallus dokuları

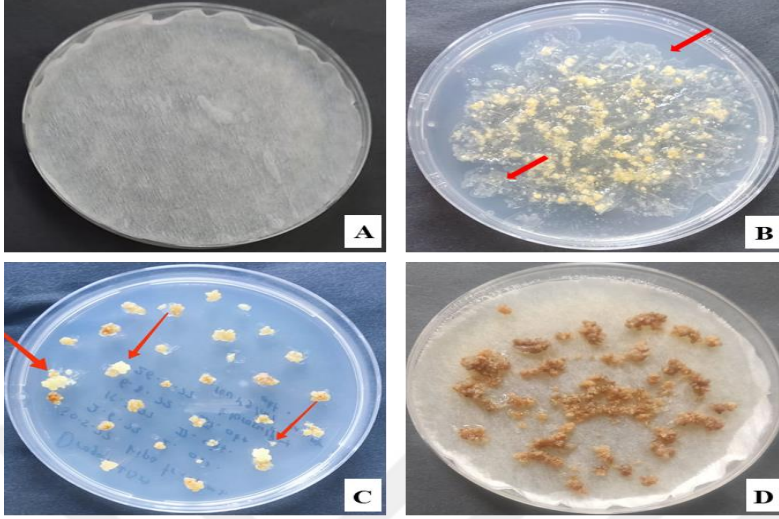
4.2. Havuç Kallus Dokularına ve Hipokotillerine Genetik Transformasyon

Bu bölüm, havuç fidelerinden elde edilen kallus dokularına ve hipokotillerine yapılan *Agrobacterium*-aracılı transformasyona ait bulguları içermektedir.

4.2.1. Kallus dokularına *Agrobacterium*-aracılı transformasyon

Havuç kallus dokuları, üzerlerine bakteri solüsyonu damlatıldıktan sonra pens yardımı ile yaralanmışlardır. Bakteri solüsyonunun parçalanmış kallus dokusuna homojen bir şekilde temas ettiğinden emin olunduktan sonra dokular, yüzeylerine steril filtre kağıdı yayılmış ko-kültivasyon ortamlarına alınmışlardır (Şekil 4.14 A). Filtre kağıdı hem bakteri hücrelerinin aşırı çoğalmasını engellemek hem de küçük doku parçalarının kayıp oranlarını en aza indirmek için kullanılmıştır. Her transformasyonda filtre kağıdının olmadığı petriler de kullanılmıştır. Bu petrilerin kullanılmalarının amacı 48 saat sonunda bakteri harelerinin gözlenmesidir (Şekil 4.14 B). 7-8 hafta içerisinde LBA4404 bakteri hücreleri ile enfekte olan hücreler gözle görülür şekilde kallus dokularında büyümeye başlamıştır (Şekil 4.14 C). Transformasyonun olmadığı dokularda, ortamlarda bulunan

Kanamisin ve klorsülforon nedeni ile kahverengileşmeler ve sonunda ölümler görülmüştür (Şekil 4.14 D).



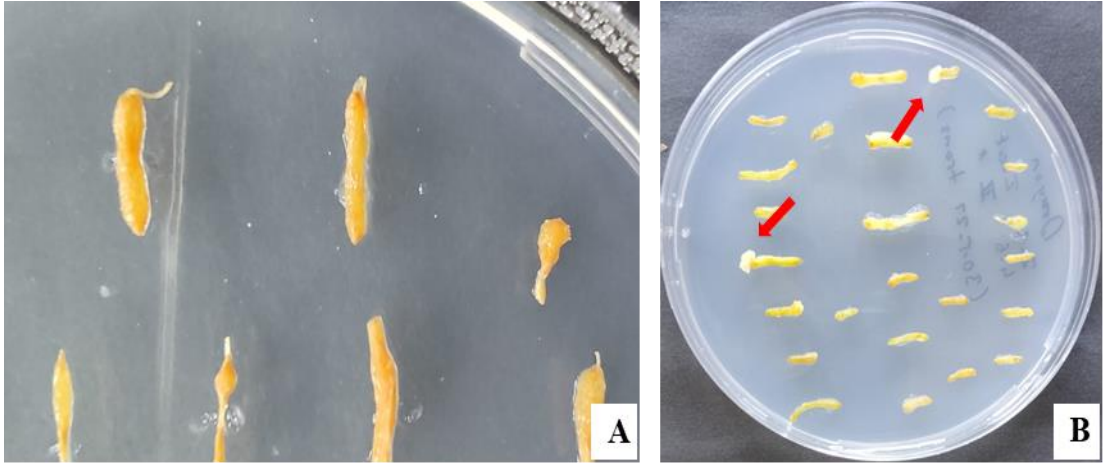
Şekil 4.14. Kallus dokularına genetik transformasyon ve dokuların gelişimleri
A) Petrilere steril filtre kağıtlarının yerleştirilmesi **B)** Ko-kültivasyonda oluşan bakteri hareleri **C)** Transformasyonun başarılı olduğu petrilere kallus dokularının gelişmesi **D)** Transformasyonun olmadığı kallus dokularında meydana gelen ölümler

4.2.2. Hipokotillere *Agrobacterium*-aracılı transformasyon

Hipokotil transformasyonunda bitki eksplantlarına *Agrobacterium*-aracılı transformasyon, transgenik kallus oluşumu gözlemlenene kadar farklı zamanlarda kurulan denemeler ile yapılmıştır. Kallus oluşumunun gözlemlenmediği petrilere hipokotil eksplantları, ortamlarındaki seçici ajanların etkisiyle ölmüşlerdir (Şekil 4.15 A). Transgenik kallus oluşumu gözlenen genetik transformasyonda 187 hipokotil eksplantı kullanılmıştır. Transformasyondan birkaç hafta sonra hipokotil eksplantlarının uçlarında kallus oluşumları gözlemlenmiştir (Şekil 4.15 B). Çalışmada transformasyon etkinliği %5,35 olarak hesaplanmıştır. Transformasyon etkinliği Ebrahimzadegan ve Maroufi (2022)'nin çalışmasında belirtildiği şekilde aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır. Bu tez çalışmasında 187 hipokotilin kullanıldığı *Agrobacterium*-aracılı transformasyonda gelişen transgenik kalluslardan 10 adet bitki elde edilmiştir.

$$\text{Transformasyon etkinliği (\%)} = (\text{Transgenik bitki sayısı/enfekte edilen eksplant sayısı}) \times 100$$

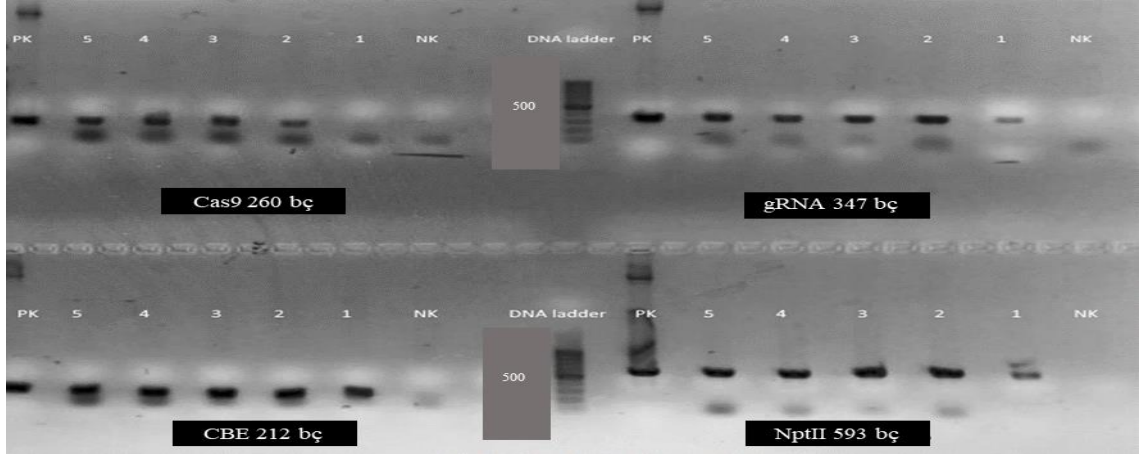
$$\text{Transformasyon etkinliği (\%)} = (10/187) \times 100 = 5,35$$



Şekil 4.15. Hipokotil eksplantlarına *Agrobacterium*-aracılı transformasyon
A) Transformasyonun başarılı olmadığı hipokotil eksplantları **B)** Transformasyonun başarılı olduğu hipokotil eksplantlarında kallus dokularının gelişimi

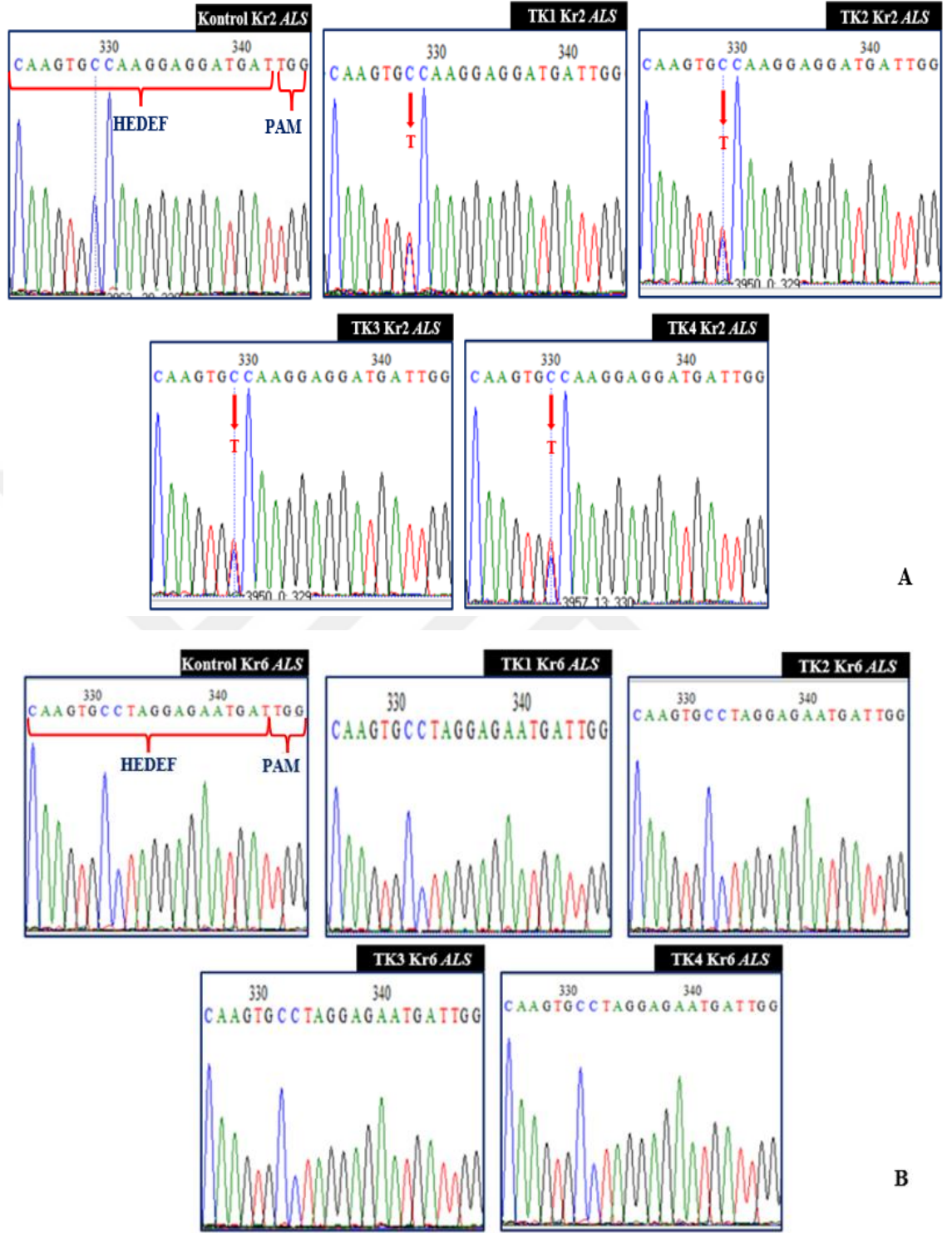
4.2.3. Transgenik kallusların taşıdıkları mutasyonun PZR ve sekans analizi ile değerlendirilmesi

Mutasyonun genomik düzeyde belirlenebilmesi için hipokotil ve kallus transformasyonlarından gelen kallus dokularından DNA izolasyonu yapılmıştır. Transforme kallus dokularındaki T-DNA entegrasyonunun saptanabilmesi için AtU6-gRNA, Cas9, NptII ve CBE bölgelerine göre dizayn edilmiş primerler ile PZR yapılmıştır. PZR ürünleri agaroz jele yüklendiğinde; Cas9 bölgesine özel primerler kullanılarak görülmesi beklenen 260 bp uzunluğundaki bant, gRNA (AtU6-gRNA) bölgesine özel primerler kullanılarak görülmesi beklenen 347 bp uzunluğundaki bant, CBE bölgesine özel primerler kullanılarak görülmesi beklenen 212 bp uzunluğundaki bant ve NptII bölgesine özel primerler kullanılarak görülmesi beklenen 592 bp uzunluğundaki bant görüntülenmiştir (Şekil 4.16). Bu sonuç transformasyon yapılan kallus dokularındaki T-DNA varlığını göstermektedir.



Şekil 4.16. Plazmite ait primerler kullanılarak transformasyon yapılan kallus dokularının PZR ile kontrolü, PK: plazmit kontrol, 5-4-3-2-1: transforme kalluslar, NK: negatif kontrol, DNA ladder: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp

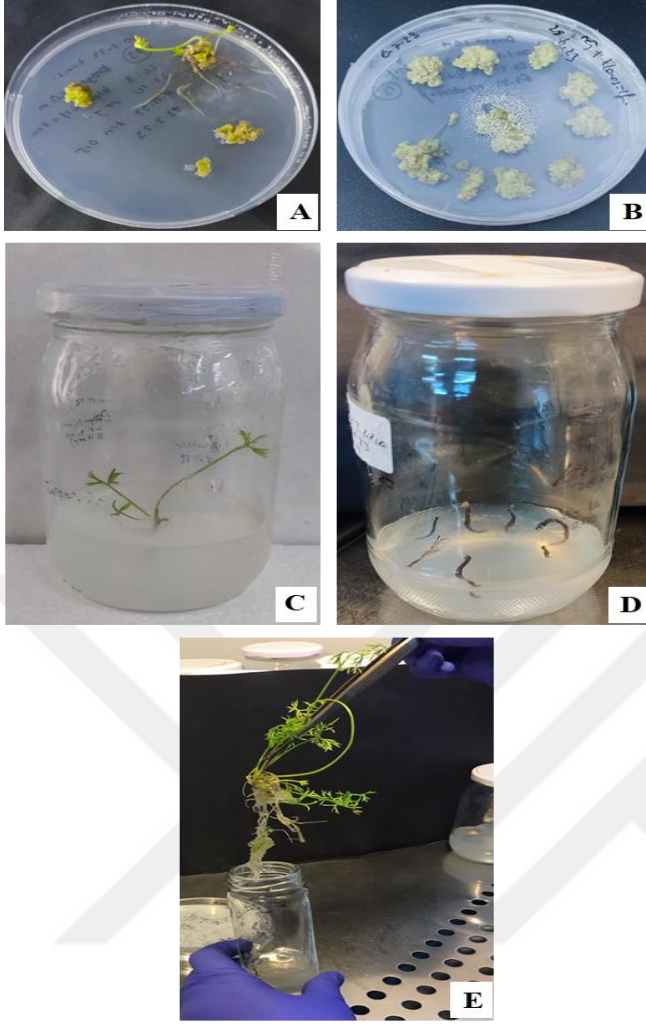
PZR ile kontrol edilen ve seçici ajanların olduğu petride büyüme göstermeye devam edebilen 4 adet transgenik kallusa ve kontrol grubuna ait DNA örnekleri hedef bölgenin sekanslanması için BM Yazılım Firması (Ankara, Türkiye)'na gönderilmiştir. Sekanslama sonuçlarının kromotogramları incelendiğinde gRNA1'in hedeflediği kromozom 2 *ALS* gen bölgesinde, 4 transforme kallusta da PAM sekansını takip eden 14. sitozin bazlarında timin bazına dönüşüm olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17 A). Ancak gRNA2'nin hedeflediği kromozom 6 *ALS* gen bölgesinde hiçbir mutasyon gözlemlenmemiştir (Şekil 4.17 B). Sekans analizlerinin değerlendirilmesinde BioEdit Sequence Alignment Editor Programı versiyon 7.2.5 kullanılmıştır.



Şekil 4.17. Transforme kallus dokularında hedeflenen kromozom 2 (Kr2) ve kromozom 6 (Kr6) da bulunan ALS hedef bölgelerinin Sanger dizilenmesi ile elde edilen kromatogramlar **A)** Kromozom 2’de hedeflenen ALS gen bölgesine ait kromatogramlar **B)** Kromozom 6’da hedeflenen ALS gen bölgesine ait kromatogramlar

4.2.4. Somatik embriyoların köklendirme ortamlarına alınmaları

Hipokotil ve kallus dokularına yapılan transformasyon sonrası gelişen kallus dokuları her üç haftada bir klorsülforon içeren yeni kallus geliştirme ortamlarında alt kültürlerle alınmışlardır. Bu dokular rejenerasyon ortamlarına alındıklarında hipokotil transformasyonundan gelen bazı kallus dokularında sürgün oluşumları başlarken, kallus transformasyonundan gelen kallus dokularında sürgün oluşumu olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.18 A). Bu kallus dokuları geliştikçe daha koyu turuncu renk olarak dış yüzeylerinde camsı bir tabaka oluşmuştur (Şekil 4.18 B). Hipokotil transformasyonu sonucu oluşan kallus dokularından gelişen 20 adet sürgün farklı zamanlarda 40 ng/mL klorsülforon içeren köklendirme ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 4.18 C). Köklendirme ortamında bulunan klorsülforon etken maddesinin seçiciliğini belirlemek için, genetik transformasyonun yapılmadığı kontrol grubuna ait kalluslardan gelişen birkaç sürgün aynı konsantrasyonda klorsülforon içeren köklendirme ortamlarına alınmıştır. Sürgünler bu ortamda gelişmemiş ve bir süre sonra ölmüşlerdir (Şekil 4.18 D). Bu sonuç mutasyon taşıyan bitkiler için klorsülforonun yeterli dozda ve etkin seçici ajan olarak ortamda bulunmasını doğrulamaktadır. Köklendirme ortamına alınan 20 transgenik sürgünden 5 tanesi kök gelişimi göstermeyip ölmüştür. Kalan 15 havuç bitkiciği iyice köklenme gösterdikten sonra yarı yoğun sıvı B5 ortamının bulunduğu, steril vermikülit ortamlarına alınmışlardır (Şekil 4.18 E).

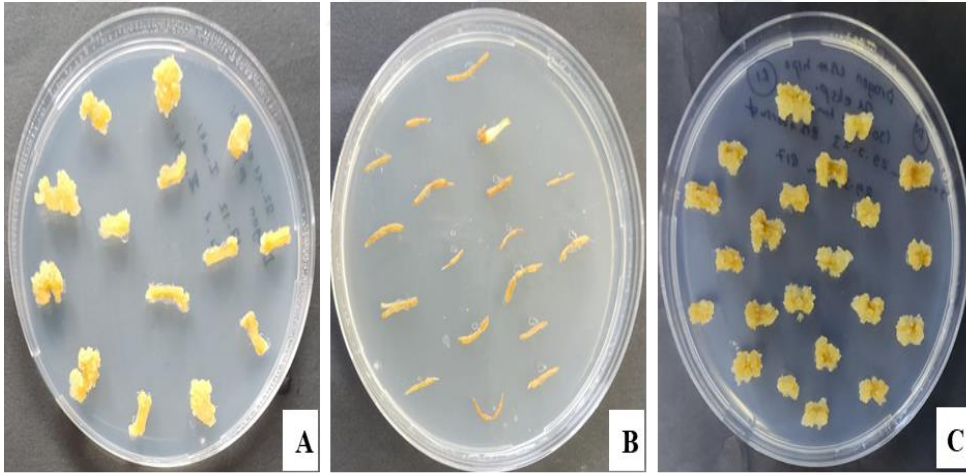


Şekil 4.18. Somatik embriyoların köklendirme ortamında gelişme aşamaları **A)** Sürgün gelişimi olan transforme kallus dokuları **B)** Sürgün gelişimi olmayan transforme kallus dokuları **C)** Klorosülfuron içeren köklendirme ortamında gelişen havuç bitkisi **D)** Klorosülfuron içeren köklendirme ortamında, transforme olmayan havuç bitkiciklerinin gelişimleri **E)** Transforme fidenin köklendirme ortamındaki kök gelişimi

4.2.5. Köklenen transforme havuç fidelerinin klorosülfuron toleranslarının klorosülfuron içeren kallus başlangıç ortamlarında kontrolü

Vermikülitlere alınmadan hemen önce *Agrobacterium*-aracılı transformasyon sonucu elde edilen turuncu havuç fidelerinden hipokotil örnekleri alınmıştır. Klorosülfuron dayanımlarının tespiti için yapılan bu çalışmada, transformasyon yapılmamış gruba ait fidelerden iki kontrol grubu ve transforme fidelerden oluşan birer kontrol grubu oluşturulmuştur. Kontrol gruplarının ilkinde (Şekil 4.19 A) transformasyon yapılmamış grubuna ait fidelerden alınan hipokotiller, klorosülfuron

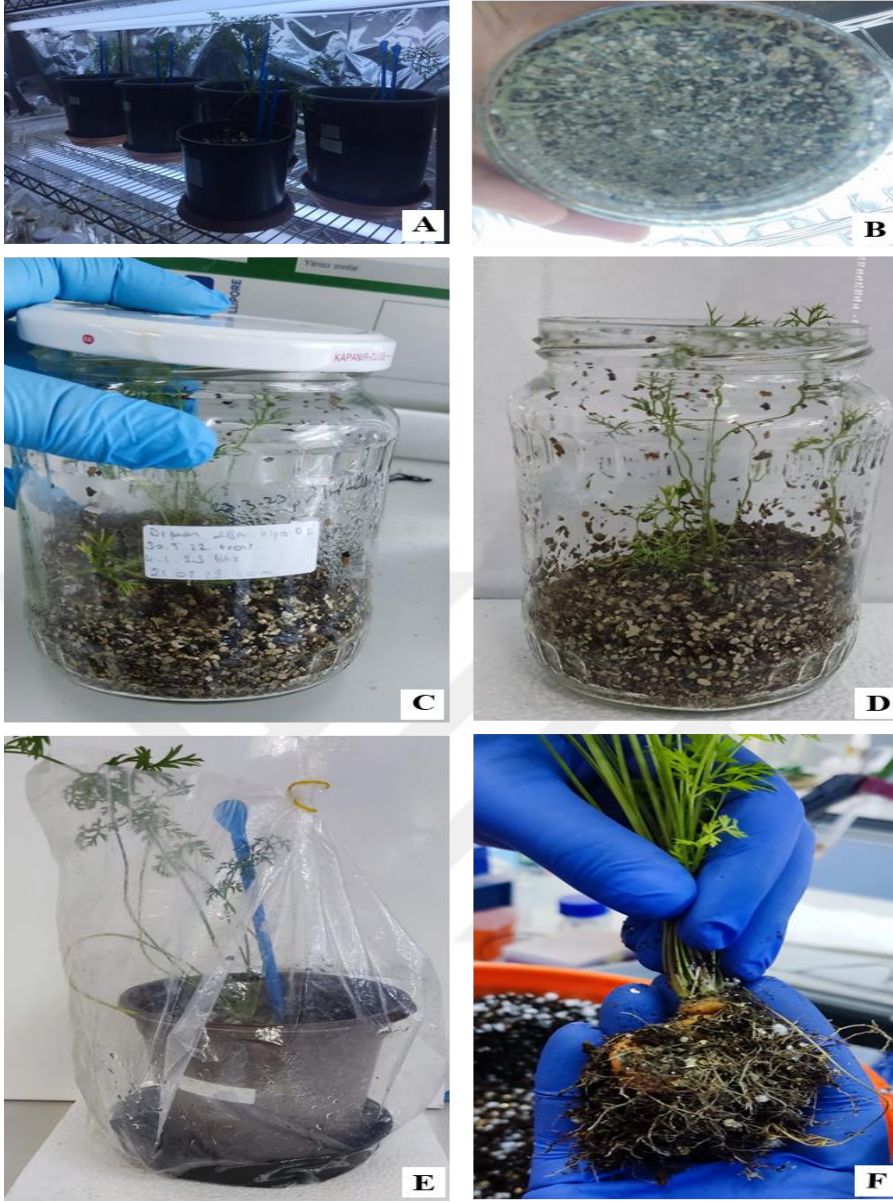
içermeyen kallus geliştirme ortamına alınmışlardır. Yaklaşık 6 hafta içerisinde kallus dokularının tamamı ile oluştuğu gözlemlenmiştir. İkinci kontrol grubu (Şekil 4.19 B) ortama eklenen klorsülforonun etkinliğini belirlemek amacı ile oluşturulmuştur. Transformasyon yapılmamış havuç fidelerine ait hipokotil eksplantları, transforme havuç eksplantları için hazırlanan klorsülforonlu kallus geliştirme ortamlarına alınmışlardır. Hipokotil eksplantlarının bu ortamlarda kahverengileşerek öldükleri gözlemlenmiştir. Bu sonuç, çalışma boyunca kullanılan klorsülforon dozunun seçici ajan olarak doğru konsantrasyonda kullanıldığını göstermektedir. Üçüncü kontrol grubunda (Şekil 4.19 C) transforme havuç fidelerine ait eksplantlar kullanılmıştır. Bu kontrol grubunun amacı, havuç fidelerinin toprağa alınmadan son bir kez klorsülforon toleranslarının gözlenmesidir. Denemede kullanılan tüm hipokotil eksplantlarının seçici ortamlarında kallus oluşturabildiği gözlemlenmiştir. Ancak kallus gelişimleri ilk kontrol grubuna göre (Şekil 4.19 A) çok daha uzun sürmüştür. Yaklaşık 10 haftada gelişen kallus dokularının, ortamlarında klorsülforon olduğu için ya da kullanılan eksplantların, çalışmada kullanılan hipokotil eksplantlarına oranla daha yaşlı olduğu için daha uzun sürede gelişim gösterdikleri düşünülmektedir.



Şekil 4.19. Transformasyon yapılmamış ve transforme kallus dokularından gelişen bitkilerin hipokotillerinin klorsülforon içeren kallus başlangıç ortamlarına alınmaları **A)** Kallus geliştirme ortamında gelişen kontrol bitkisine ait hipokotil eksplantları **B)** Klorsülforon içeren kallus geliştirme ortamında bulunan kontrol bitkisine ait hipokotil eksplantları **C)** Klorsülforon içeren kallus geliştirme ortamında bulunan transforme havuç fidelerine ait hipokotil eksplantları

4.2.6. Köklenen havuç bitkilerinin dış ortama alıştırılmaları

Bu bölümdeki tüm uygulamalar 18 saat aydınlık, 6 saat karanlık beyaz floresan ışıklarına sahip bitki büyütme raflarında 23 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.20 A). Köklendirme ortamlarında kök gelişimi iyi olan havuç bitkileri vermikülitlere alınmışlardır. Vermikülit ortamları bitkilerin toprağa geçmeden önceki son ortamıdır. Bu ortamların partiküllü yapısı sayesinde bitki kökleri toprakta yaşama adaptasyonunu kazanabilmektedir. Vermikülite eklenen vitaminli sıvı Gamborg B5 ortamı bitkilere ihtiyaç duydukları makro ve mikro elementler ile vitaminleri sağlaması için kullanılmıştır. Çalışmada 15 transforme havuç bitkisi vermikülit ortamında iyi köklenme ve gelişme göstermiştir. Fidelerin kök gelişimleri kavanoz altlarından kontrol edilmiştir (Şekil 4.20 B). Yeşil aksamı iyi gelişmiş ve kökleri kavanoz dibini saracak kadar gelişme gösteren bitkilerin bulunduğu kavanozların kapakları kademeli olarak gevşetilerek bitkilerin dış ortama alışması sağlanmıştır (Şekil 4.20 C ve D). Çalışmada filtreli kapaklara sahip kültür kapları kullanılmadığı için 5 adet bitki nem dengesini sağlayamayarak kurumuştur. Yarı hacimde perlit içeren torf dolu saksılara alınan 10 bitki iyice sulandıktan sonra polietilen poşetlere koyulmuşlardır (Şekil 4.20 E). İlk haftalarda kapalı olan poşetler kademeli olarak açılmaya başlanmıştır. Saksılara haftada iki kez, kaynatılıp soğutulmuş su ile sulama yapılmıştır. Nem dengesini iyice sağlayabilen 7 bitki poşetten tamamen çıkarılmıştır. Depo kök oluşumu başlayan havuç bitkileri daha büyük saksılara alınmışlardır (Şekil 4.20 F).



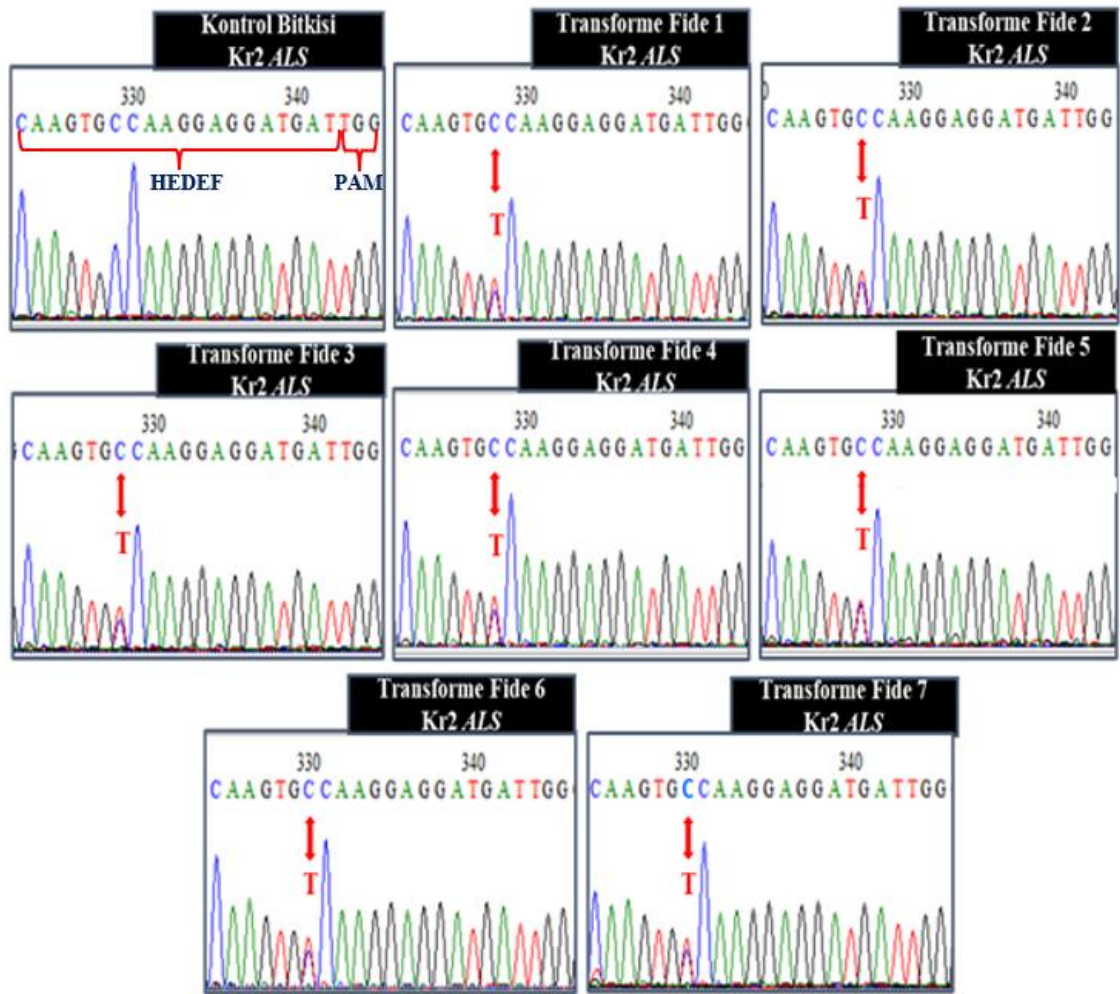
Şekil 4.20. Havuç fidelerinin dış ortama alıştırılmaları **A)** Bitkilerin büyütüldükleri ışık rafı **B)** Vermikülitte gelişen kök yapıları **C), D)** Gelişme gösteren fide kavanozlarının kapaklarının kademeli olarak açılması **E)** Havuç fidelerinin polietilen poşetlere alınması **F)** Depo kök oluşumu başlayan havuçlarda saksı değişimlerinin yapılması

Transforme fideler ve genetik transformasyon yapılmamış kontrol grubuna ait fideler morfolojik olarak karşılaştırıldıklarında 2 grup arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Transforme fidelerin kontrol grubundaki fideler ile morfolojik olarak karşılaştırılması **A), G)** Transforme havuç fideleri **H)** Kontrol grubu **I)** Kontrol grubu fideye ait yaprak yapısı **İ)** Genetik transformasyon yapılmış fideye ait yaprak yapısı

Kalluslardan elde edilen ve dış ortama tamamen alışan 7 adet transforme havuç bitkisi ve transformasyon yapılmamış havuç bitkisine (kontrol) ait DNA örnekleri hedef bölgenin sekanslanması için BM Yazılım Firması (Ankara, Türkiye)'na gönderilmiştir. Sekanslama sonuçlarına ait kromatogramlar incelendiğinde, transforme tüm havuç fidelerinde, gRNA1'in hedeflediği kromozom 2 ALS gen bölgesinde PAM sekansını takip eden 14. sitozin bazlarında timin bazına dönüşüm olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.22). Sekans analizlerinin değerlendirilmesinde BioEdit Sequence Alignment Editor Programı versiyon 7.2.5 kullanılmıştır.



Şekil 4.22. Transformasyon yapılan havuç eksplantlarından gelişen bitkilerin kromozom 2 ALS hedef bölgelerinin Sanger dizilenmesi ile elde edilen kromatogramlar

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yabancı otlar, dünya genelinde modern tarımın karşılaştığı en büyük sorunlardan biridir ve tarım verimliliği üzerindeki etkileri nedeniyle de önemli bir sorundur. Bu nedenle, tarlada yabancı otları kontrol etmeye yardımcı olacak, maliyetleri düşürecek, herbisit direncine veya toleransına sahip bitki çeşitlerinin geliştirilmesi gereklidir. Herbisit toleransına sahip bitkilerin geliştirilmesi, başlangıçta geleneksel bitki ıslahı ve transgenik teknolojiye dayanmaktaydı. Son yıllarda yükselen genom teknolojilerinin bitki genomlarında yaptıkları hassas manipülasyonlar ile bitki ıslahı için yeni bir yol sağlanmıştır (Gosavi ve diğerleri, 2022). CRISPR tabanlı genom düzenleme, bitki ıslahında devrim niteliğinde bir uygulamadır. Bu teknoloji ile bitki genomlarında ihtiyaç duyulan özelliklerin elde edilmesi hassas, az maliyetle ve hızlı bir şekilde yapılabilmektedir. CRISPR teknolojisinin bitki fizyolojisine olan etkilerinin belirlenmesi üzerine *Arabidopsis thaliana* ve *Nicotiana benthamiana* model bitkileri ile sayısız çalışma yapılmıştır. Bu bitkiler sahip oldukları küçük ve kolay manipüle edilebilir genomları ile ilk araştırmalar için oldukça uygun bitki materyalleridir. Yapılan tüm çalışmalar, araştırmacılara CRISPR teknolojisinin işleyişi ve bitki genomlarında iyileştirmenin nasıl yapılacağı konusunda çok önemli katkılar sağlamıştır (Saini ve diğerleri, 2023). Bitkilerde zincirli esansiyel amino asitlerin sentezinden sorumlu olan ALS gen bölgesi; sulfonylurea, imidazolinonlar, triazolopirimidinler, pyrimidinylthio benzoates ve sulfonylamino-carbonyltriazolinones grubu herbisitlerin hedef bölgesidir. ALS inhibitörü herbisitler, geniş spektrumda yabancı ot kontrolü sağlama, çok düşük dozlarda uygulama imkanı, düşük memeli toksisitesi ve geniş ürün seçiciliği nedeniyle 1980'lerin başlarından bu yana yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bu faktörlerin birleşimi, bu grup herbisitlerin yabancı ot yönetimi uygulamalarında popülerlik kazanmasına ve geniş çapta kullanılmasına katkıda bulunmuştur (Yu ve Powles, 2013). Baz editörleri, hedef bölgelerde DNA kırığı oluşturmada ve donör bir DNA iplikçisi gereksinimi olmadan hassas ve etkili bir şekilde nokta mutasyon yapmada çığır açan bir teknolojidir (Hua ve diğerleri, 2022).

Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak Dragon F1 turuncu havuç fidelerinden elde edilen bitki eksplantları genetik transformasyonda kullanılmıştır. Tohum sterilizasyonu,

bitki eksplantlarının eldesi, genetik transformasyon aşamaları bu çalışmaya göre optimize edilerek uygulanmıştır.

Dragon F1 havuç tohumlarının sterilizasyon basamakları; etil alkol çözeltisi ve NaClO (sodyum hipoklorit) çözeltilerinde belirli sürelerde bekletilerek ardından steril suda durulama aşamalarından oluşmaktadır. Tohum yüzeylerinin sterilizasyon basamakları içerisindeki en etkin kimyasallar etil alkol ve NaClO çözeltileridir. Bu nedenle literatürde bulunan, ilgili çalışmalarda belirtilen konsantrasyonlar ve bekletme süreleri denenerek tohumların kontamine olmadığı ve canlılıklarını kaybetmedikleri konsantrasyon ve muamele süreleri belirlenmiştir. Çünkü tohum sterilizasyonlarında kullanılan etil alkol ve NaClO gibi çözeltilerin konsantrasyon ve muamele süreleri tohumlarda bulunan zigotik embriyoya zarar verebilmektedir (Younesikelaki ve diğerleri, 2016). NaClO çözeltisi olarak ticari çamaşır suyu kullanılmıştır. Ticari çamaşır sularında bulunan NaClO oranı %5,25'tir. Denenen konsantrasyonlara ait çözeltiler bu oran üzerinden seyreltilerek hazırlanmıştır. Çalışmada ilk olarak 100 mL %0,79'luk sodyum hipoklorit çözeltisi kullanılmıştır. Çözelti içerisine iki damla Triton X-100 eklenmiştir. Tohumlar bu çözelti içerisinde 12 dakika bekletilmişlerdir (Ipek, 2002). NaClO çözeltisinin bu konsantrasyonu çalışmada kullanılan tohumların sterilizasyonunda yeterli gelmemiştir. Bazı tohumlarda çimlenmenin başlaması ile fungal kontaminasyonlar oluşmaya başlamıştır. Kontaminasyonların olduğu petriler açılmadan doku kültürü laboratuvarından uzaklaştırılmışlardır. Hardegger ve Sturm (1998), çalışmalarında havuç tohumlarının sterilizasyonunda kullandıkları NaClO çözeltisini, %10 konsantrasyonda 15 dakika boyunca uygulayarak kullanmışlardır. Bu uygulamayı çalışmamızda %5'lik NaClO çözeltisinde 25 dakika muamele olarak uyguladığımızda havuç tohumlarında çimlenme olmadığı gözlemlenmiştir. Rosales-Mendoza ve diğerleri (2007) ticari çamaşır suyunu %50 konsantrasyonunda kullanarak havuç tohumlarını hazırladıkları çözelti içerisinde 15 dakika bekletmişlerdir. NaClO çözeltisinin bu konsantrasyonda ve bekletme süresinde kullanımı bizim çalışmamızda da en iyi sonucu vermiştir. Yapılan literatür araştırmaları ve denemeler sonucunda çalışmada kullanılan tüm havuç tohumları %70'lik etanol içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra, içerisine 2 damla Tween-20 damlatılmış %50'lik ticari çamaşır suyuna alınmış ve 15 dakika bekletilmişlerdir. Ardından iyice durulanana kadar steril ddH₂O ile durulanarak sterilizasyon işlemleri bitirilmiştir.

Elbasheer ve diğerkleri, 2019 yılında *Acacia tortilis*, *A. senegal* ve *Dalbergia melanoxylon* bitki tohumları ve genç/olgun eksplantların sterilizasyonunda kullanılan en etkili kimyasal ve uygulama süresini belirlemek üzere çalışma yapmışlardır. Çalışmada belirtildiğine göre tohum veya bitki eksplantlarının NaClO çözeltisinin %0,5-5 aralığında bulunan konsantrasyonlarının 5-30 dakika aralığındaki muamele sonuçları ve etil alkolün %70-95 aralığındaki konsantrasyonu ile 0,1-5 dakika aralığındaki muamelesi, tohumlarda yüzey sterilizasyonunda en iyi sonuçları vermektedir. Bizim çalışmamızda kullandığımız sterilizasyon ajanlarının konsantrasyon ve muamele süreleri yapılan çalışma ile uyum gösteren sonuçlar vermiştir.

Kallus eksplantlarının elde edilmesi için çalışmada yapılan denemede MS-k ve B5-k olmak üzere 2 farklı kallus geliştirme ortamı kullanılmıştır. B5-k ortamında daha açık renkli ve yumuşak dokulu kalluslar gelişirken, MS-k ortamında daha koyu renkli ve kırılğan kallus dokuları gelişmiştir. Hardegger ve Sturm (1998) çalışmalarında, B5 ortamının havuçta kallus indüksiyonunda MS ortamına göre daha canlı ve kolay rejenere olan kallus dokularının gelişimine neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle bu tez çalışmasında genetik transformasyonda kullanılan kallus eksplantlarının elde edilmesine B5-k ortamı ile devam edilmiştir. Hipokotil transformasyonunda kullanılan hipokotil eksplantları da kallus oluşumlarının başlaması için B5-k ortamına alınmışlardır.

Havuç bitkisinin *Agrobacterium*-aracılı transformasyonunda kullanılan bitki eksplant tipleri farklılık göstermektedir. Kallus eksplantının kullanıldığı çalışmalarda kallusun elde edildiği bitki kısımları havuç kök korteksi (Wurtele ve Bulka, 1989; Baranski ve diğerkleri, 2006), kök ve hipokotil (Hardegger ve Sturm 1998) olarak seçilebilmektedir. Çalışmamızda elde edilen kallus dokuları 4 haftalık fidelerin hipokotillerinden elde edilmişlerdir. *Agrobacterium*-aracılı transformasyonda kallus dokularından (Klimek-Chodacka ve diğerkleri, 2019b) başka hipokotiller (Guan ve diğerkleri, 2009), kotiledonlar (Pawlicki ve diğerkleri, 1992), epikotiller (Gilbert ve diğerkleri, 1996), petiyoller (Wally ve diğerkleri, 2008), kökler (Hardegger ve Sturm, 1998; Pawlicki ve diğerkleri, 1992) bitki eksplantı olarak kullanılabilirler. Bu çalışmada bitki eksplantı olarak kallus dokuları ve hipokotiller kullanılmıştır.

Çalışmalarda kullanılan *Agrobacterium* ırkları da farklılık göstermektedir. En sıklıkla kullanılan *Agrobacterium* ırkları; LBA4404 (Kim ve diğerleri, 2009; Noh ve diğerleri, 2012; Jayaraj ve Punja, 2008; Mikschofsky ve diğerleri, 2009), GV3101 (Monreal-Escalante ve diğerleri, 2016; Maass ve diğerleri, 2009; Simpson ve diğerleri, 2016) ve EHA105 (Gilbert ve diğerleri 1996) olarak sayılabilmektedir. Bu çalışmada bitki dokularından eliminasyonu kolay olduğu için *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA4404 ırkı tercih edilmiştir.

Agrobacterium-aracılı transformasyonda bitki eksplantlarına farklı yoğunluklardaki *Agrobacterium* hücreleri, farklı muamele sürelerinde uygulanmaktadır. Çalışmalarda kullanılan bakteri yoğunlukları ve eksplantlarla muamele süreleri; $OD_{600}=0,4$ yoğunluğundaki bakteri hücreleri ile 15 dakika muamele (Xu ve diğerleri, 2019), $OD_{600}=0,5$ yoğunluğundaki bakteri hücreleri ile 15 dakika muamele (Rosales-Mendoza ve diğerleri, 2007), $OD_{600}=1$ yoğunluğundaki bakteri hücreleri ile 5 dakika muameledir (Pawlicki ve diğerleri, 1992). Bakteri hücrelerinin yoğunluğu ve bitki eksplantları ile muamele süresi ters orantılı olarak değişmektedir. Çünkü bakteri hücrelerinin artan yoğunluğu ve bitki eksplantları ile uzun süreli muameleler, bitkilerde savunma sistemlerinin devreye girmesini indükleyebilmekte ve eksplantların rejenerasyon kapasitelerini düşürebilmektedir (Parsa ve diğerleri, 2023). *Agrobacterium*-aracılı transformasyonda, transformasyon etkinliğini etkileyen faktörlerden birisi de ko-kültivasyon süresidir. Havuç bitkisinde eksplantların 2-3 gün bakteri hücreleri ile birlikte kültüre edilmesi en yüksek transformasyon etkinliğini vermektedir (Pawlicki ve diğerleri, 1992). Literatürde yapılan çalışmalar dikkate alınarak bu tez çalışmasında $OD_{600}=0,3$ yoğunluğundaki LBA4404 hücreleri kallus ve hipokotil eksplantlarının genetik transformasyonlarında kullanılmıştır. Kallus dokularının ko-kültivasyon süreleri 2 gün, hipokotil eksplantlarının ko-kültivasyon süreleri 3 gün olarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışması, CRISPR/Cas9-Sitidin Baz Düzenleme teknolojisi kullanarak klorsülforon etken maddeli herbisitlere karşı toleranslı havuç genotiplerinin geliştirilmesi amaçlı ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır. *Agrobacterium*-aracılı transformasyonun, aktarım metodu olarak seçilmesinin nedeni, bu yöntemle havuçta genetik transformasyonun daha önceki çalışmalarda başarılı bir şekilde yapılmış olmasıdır (Klimek-Chodacka ve diğerleri, 2019b; Xu ve diğerleri, 2019). *Agrobacterium*-aracılı

transformasyon ile yapılan aktarımlarda, diğer aktarım yöntemlerinden bazılarında da olabildiği gibi, geçici ekspresyonun olabilme olasılığı bulunabilmektedir. Geçici ekspresyonda, ifade olan Cas9 ve gRNA'lar hücre içinde kompleksler oluşturarak genomda hedef bölgelerde mutasyonlar yapabilmektedir. Böylece genomlarında yabancı DNA fragmenti içermeyen bitkiler elde edilebilmektedir. Ancak çalışmada geçici ekspresyonun olduğu bitkiler elde edilememiştir. Klorosülfuronun seçici ajan olarak kullanıldığı kallus geliştirme ortamında gelişen kallus dokularından alınan doku örneklerinde T-DNA'ya ait 4 bölgeye özel dizayn edilen primerler kullanılarak PZR yapılmış ve PZR ürünleri yapılan agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (bkz Şekil 4.16). Bu sonuç transformasyon yapılan kallus hücrelerinin çekirdek genomuna, plazmitin gen konstraktını taşıyan T-DNA bölgesinin stabil bir şekilde girdiğini göstermektedir. Veillet ve diğerleri, 2019 yılında bu tez çalışmasında kullanılan pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitini kullanarak domates ve patates bitkilerinde klorosülfurona toleranslı bitki genotipleri elde etmeyi amaçlamışlardır. Klorosülforon içeren rejenerasyon ve köklendirme ortamlarında büyütülen bitkilerde T-DNA entegrasyonu PZR ile belirlenmiştir. PZR sonuçlarına göre elde edilen domates bitkilerinin %12,9'unun ve patates bitkilerinin %10'nunun T-DNA içermediği belirlenmiştir. Ancak patates bitkilerinin birisinde transfer edilen DNA fragmentinin sol sınırında bulunan *nptII* bölgesinin kısmi entegrasyonu saptanmıştır. Transgen içermeyen bu patates bitkileri Kanamisin içeren ortama alınarak gelişimleri transgenik patates bitkileri ile kıyaslandığında, bitkilerde bozulmuş büyüme durumu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, çalışma ekibinin moleküler analizlerini doğrulamaktadır. T-DNA içermediği belirlenen domates bitkilerinde HRM (Yüksek Çözünürlüklü Eritme Yöntemi) analizi yapıldığında bu bitkilerde hedeflenen *SIALS1* lokuslarında kontrol grubuna göre mutant erime eğrisi görülmüştür. C-20, C-14 ve C-13 çalışmada kullanılan domates bitkisinin genomu için dizayn edilen gRNA'nın hedef çerçevesinde bulunan 3 sitozin bölgesidir. Bu sitozinlerin son 2 tanesi domateste 186. konumda bulunan Pro (Prolin) amino asidini kodlamaktadır. Sekans analizi için örnek alınan 105 bitkinin 104 tanesinin sonuçlarında hedeflenen *SIALS1* lokusunda mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonların %28,5'i hedeflenen bölgede oluşan indel mutasyonlarıdır. Çalışma ekibi, istenmeyen bu indel mutasyonlarının aynı sitidin baz editörünü kullanan Shimatani ve diğerleri (2017)'nin çalışmasında da oluştuğunu belirtmektedir. 105 bitkinin 75'inde (%71,4), hedef *SIALS1*

lokusunda, Pro186 (CCA) kodonunda baz düzenlemesi belirgin bir şekilde gerçekleşmiştir bu da *Agrobacterium* ile inoküle edilen kotiledonların yaklaşık %54'üdür. Bu genomların %98,7'sinde düzenleme C-14 pozisyonunda gerçekleşmiştir. Ekip, beklendiği üzere C-20 pozisyonunda herhangi bir düzenleme görülmediğini, C-20 pozisyonu sonlanma kodonu olduğundan bu bölgede meydana gelen düzenlemenin bitki rejenerasyonlarını etkileyebileceğini belirtmektedir. Sekans sonuçlarına göre domates bitkilerinin %34'ünde düzenleme olması beklenen 14. sitozin pozisyonunda mutasyonun gözlemlendiği belirtilmiştir. Patates bitkisinde *StALS1* ve *StALS2* lokusları hedeflenmiştir. Bu bölgeler sekanslandığında *StALS1* için dizayn edilen gRNA'nın çekirdek bölge sınırındaki bir nükleotidin *StALS2*'deki hedef bölge ile eşleşmediği belirlenmiştir. *StALS1* için dizayn edilen gRNA, hedef bölgede beklenen düzenlemeyi yapmıştır. Rejenere olan 20 bitkide HRM analizi yapılarak bitkilerin hedeflenen mutasyonu taşıdıkları belirlenmiştir. Sekans analizi ile hedef bölgedeki mutasyon doğrulanmıştır. Ancak domates bitkisinde olduğu gibi 20 bitkiden 15'inde düzenleme çerçevesinde indel mutasyonları görülmüştür. Oluşan indel mutasyonlarının urasil eksizyonu ve sonraki onarım aşamaları nedeni ile olduğu düşünülmektedir. pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitinin havuç bitkisinin transformasyonunda kullanıldığı bu tez çalışmasında transgen içermeyen bitkilerin elde edilememesinin dışında da bazı farklı sonuçlar elde edilmiştir. Havuç genomunda *ALS* gen bölgesinin kromozom 2 ve kromozom 6'da olmak üzere iki kopyası vardır. Hedeflenen Pro 175 kodonunu hedefleyen gRNA'nın düzenleme çerçevesi PAM sekansını takip eden C-20, C-14 ve C-13 konumundaki sitozin bazlarıdır. C-13 ve C-14 konumundaki sitozinler Pro 175 kodonunu oluşturmaktadır. Klorosülfon içeren ortamda gelişme gösteren transforme kallus dokularının ve bu dokulardan gelişen havuç fidelerinin sekans analizleri incelendiğinde CBE'nin sadece C-14 konumunda düzenleme yaptığı görülmektedir (bkz Şekil 4.17 ve Şekil 4.22). Bitkilerde *ALS* gen bölgesinde bulunan Prolin amino asidini kodlayan bölgede meydana gelen tek nükleotid değişimi, bitkilerin *ALS* inhibitör sınıfı herbisitlere tolerans geliştirmesini sağlamaktadır. Tek nükleotid değişikliklerinden kaynaklanabilecek tüm amino asit değişimleri (serin, lösin, glutamin, alanin, treonin, arjinin ve histidin), arazide bitkilerin bu grup herbisitlere gösterdikleri tolerans ile ilişkilendirilmektedir (Boutsalis ve diğerleri, 1999).

Bu çalışmada hedeflenen bölge 175. pozisyonundaki Prolin amino asidini kodlayan CCA bölgesidir. Bu lokasyonda oluşan nokta mutasyonu sonucu CCA dizisi TCA dizisine dönüşmüştür ve bu dönüşüm sonucu Prolin amino asidinin yerine Serin amino asidi gelmektedir. Transforme kallus dokularının klorsülforon içeren ortamlarında oluşan bu mutasyon sonucu gelişme göstermeye devam edebildikleri düşünülmektedir. Domates ve patates bitki genomlarında düzenleme çerçevesinde görülen indel mutasyonlarına transforme havuç bitkilerinin hedef bölgelerinde rastlanmamıştır. gRNA'nın 6. ve 12. nükleotidlerindeki uyuşmazlık nedeni ile kromozom 2 (gRNA1) ve kromozom 6 (gRNA2)'da bulunan *ALS* lokuslarını hedefleyen iki adet gRNA dizayn edilmiştir. Sekans sonuçlarına göre gRNA1'in hedeflediği bölgede C-14 pozisyonunda beklenen düzenleme olmuştur ancak gRNA2'nin hedeflediği bölgede herhangi bir düzenleme olmamıştır. Tasarlanan gRNA'lardan sadece gRNA1'in hedeflediği bölgede beklenen mutasyonun gerçekleşip gRNA2'nin hedeflediği bölgede düzenleme yapılamamasının nedeni CRISPR/Cas9 teknolojisinin olası sonuçlarından birisidir. CRISPR/Cas9-Sitidin Baz Editörü kompleksinin hücre içerisine başarı ile aktarılması, her hücrede aynı düzenlemeleri yapacağı anlamı taşımamaktadır. 2n kromozomlu bir hücrede hedeflenen gen bölgesinin düzenlenmesi ile ilgili beklenebilecek 4 farklı olasılık bulunmaktadır. Bunların ilki hedef gen bölgesinde hiçbir değişikliğin olmamasıdır. İkinci olasılık heterozigot mutasyonun oluşmasıdır yani hedeflenen gen bölgesine ait allellerden sadece birisinde düzenleme görülmesidir. Üçüncü olasılık biallelik mutasyondur, bu durumda gen bölgesinin her bir alleli farklı şekilde düzenlenmektedir. Son olasılık hedeflenen gen bölgesine ait allellerde aynı düzenlemenin yapıldığı homozigot mutasyondur (Yeşilbostan, 2020). Çalışmada kromozom 6'da hedeflenen bölgede farklı nedenler ile düzenleme yapılmadığı düşünülmektedir. Bu nedenlerden birisi her iki gRNA'nın aynı konstrakta arka arkaya dizayn edilmesi, daha sonra pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA transformasyon plazmitine bu şekilde klonlanması ve transformasyonun yapılmış olması olabilir. Bu nedenle bundan sonra yapılacak çalışmalarda arkaya arkaya tek bir konstrakt şeklinde sentezlenen gRNA1 ve gRNA2'yi birbirine bağlayan *SpeI* enziminin kesim bölgesinden keserek ayrılabilir ve her gRNA ayrı bir pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_DELLA plazmitine klonlanabilir. gRNA1 ve gRNA2 kasetlerini içeren plazmitlerin aynı anda veya farklı zamanlarda transformasyonu yapılarak sonuçlar incelenebilir. Kromozom 6'da bulunan hedef *ALS* gen bölgesinde

düzenleme yapılamamasının bir diğer nedeni ise *ALS 6* kopyasının kromozom 6'da heterokromotin bir bölgede bulunma olasılığıdır.

Bu doktora tez çalışmasında yeni nesil genom düzenleme teknolojilerinden CRISPR/Cas9-Sitidin Baz Editörü kullanılarak *ALS* inhibitörü herbisitlere toleranslı havuç genotipleri elde edilmeye çalışılmıştır. Dış ortama tamamen alışmış 7 adet transgenik havuç bitkisi elde edilmiştir. Elde edilen havuç genotiplerinde oluşan tek nokta mutasyonu fonksiyon kazandıran baskın mutasyondur. gRNA'nın düzenleme çerçevesinde indel mutasyonu görülmemiş, bitkilerde letal etkiye sebep olabilecek bir gen ürünü ortaya çıkmamıştır. Çalışmanın devamında transgenik bitkilerden kendileme/melezleme yolu ile transgenik olmayan havuç genotiplerinin elde edilmesi planlanmaktadır. Böylece CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisi ile *ALS* inhibitör grubu herbisitlere toleranslı transgenik olmayan havuç genotipleri elde edilebilecektir ve bu bitkiler GDO'lu bitkiler kapsamından muaf tutulabileceklerdir. Bu tez çalışması, yeni nesil genom düzenleme teknolojisi uygulanarak üretilen ve CRISPR bileşenlerinden ayrılacak olan havuç genotipleri sayesinde, havuç üretiminde yabancı otlarla mücadelenin daha kolay sağlanabilmesi açısından oldukça önemli bir adımdır. Dahası bu çalışma tüm dünya da olduğu gibi ülkemizde de ekonomik değeri olan tarım bitkilerinin modern ıslahında kullanılmak üzere yapılacak araştırmalara ışık tutabilecek nitelikte olması yönüyle de oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

Addgene, (15 Kasım 2020). Addgene Full Sequence Map for pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della. <https://www.addgene.org/91694/>

Afzal, S., Sirohi, P. & Singh N.K. (2020). A review of CRISPR associated genome engineering: application, advances and future prospects of genome targeting tool for crop improvement. *Biotechnology Letters*, 42(9):1611–1632. doi.org/10.1007/s10529-020-02950-w

Ainley, W.M., Sastry-Dent, L., Welter, M.E., Murray, M.G., Zeitler, B., Amora, R., Corbin, A.R., Miles, R.R., Arnold, N.L., Strange, T.L., Simpson, M.A., Cao, Z., Carroll, C., Pawelczak, K.S., Blue, R., West, K., Rowland, L.M., Perkins, D., Samuel, P., Dewes, C.M., Petolino, J.F (2013). Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnology Journal*, 11:1126–34. doi: 10.1111/pbi.12107.

Alimohammadi, M. & Bagherieh-Najjar, M.B., (2009). Agrobacterium-mediated transformation of plants: Basic principles and influencing factors. *African Journal of Biotechnology*, 8 (20), 5142-5148.

An, G., Watson, B. D., Stachel, S., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1985). New cloning vehicles for transformation of higher plants. *THE EMBO JOURNAL*, 4:277-84. doi: 10.1002/j.1460-2075.1985.tb03626.x

Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Fäلتa, A.-S., Ohlsson, P., Gonzalez, M.N., Samuelsson, M. & Hofvander, P. (2018). Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiologia Plantarum*, 164, 378–384. doi.org/10.1111/ppl.12731

Anzalone, A. V., Koblan, L. W. & Liu, D. R. (2020). Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology*, 38, 824–844. doi.org/10.1038/s41587-020-0561-9

Ateş, E. (2021). *Herbisitlerin Etki Mekanizması: Yabancı Ot Biliminde Güncel Konular* (H. Mennan, F., Pala, Ed.). İKSAD Publishing House. <https://iksadyayinevi.com/wp-content/uploads/2021/12/YABANCI-OT-BILIMINDE-GUNCCEL-KONULAR.pdf>

Banga, O. 1963. ORIGIN AND DISTRIBUTION OF THE WESTERN CULTIVATED CARROT. *Genetica Agraria*, XVII.

Baranski, R., Klocke, E. & Schumann, G., (2006). Green fluorescent protein as an efficient selection marker for *Agrobacterium rhizogenes* mediated carrot transformation. *Plant Cell Reports*, 25: 190–197. Doi:10.1007/s00299-005-0040-2

Baranski, R. & Lukasiewicz, A., (2019). *Genetic Engineering of Carrot. The Carrot Genome*, (P., Simon, M., Iorizzo, D., Grzebelus, R., Baranski; Ed). Springer Link. doi: 10.1007/978-3-030-03389-7_10

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A. & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819):1709-12. doi: 10.1126/science.1138140.

Barrangou, R. & Horvath, P. (2012). CRISPR: New horizons in phage resistance and strain identification. *Annual Reviews Food Science Technology*, 3, 143–162. doi: 10.1146/annurev-food022811-1011

Barrangou, R. & van Pijkeren, J.P. (2016). Exploiting CRISPR–Cas immune systems for genome editing in bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 37:61–68. doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.003

Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B. & Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*, 19:327-36.

Beetham, P.R., Kipp, P.B., Sawycky, X.L., Arntzen, C.J. & May, G.D., (1999). A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *PNAS*, 96(15):8774-8. doi:10.1073/pnas.96.15.8774.

Blair, A., Ritz, B., Wesseling, C. & Freeman, L.B., (2014). Pesticides and human health. *Occupational and Environmental Medicine*, 72(2):81-2. doi: 10.1136/oemed-2014-102454.

Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. & Ehrlich, S.D., (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8): 2551-2561. doi: 10.1099/mic.0.28048-0.

Bortesi, L. & Fischer, R., (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41-52. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006

Boutsalis, P., Karotam, J. & Powles, S.B., (1999). Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. *Pesticide Science*, 55:507-516. [doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199905\)55:5<507::AID-PS971>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199905)55:5<507::AID-PS971>3.0.CO;2-G)

Braak, J.P. & Kho, Y.O., (1958). SOME OBSERVATIONS ON THE FLORAL BIOLOGY OF THE CARROT (*DAUCUS CAROTA L.*). *Euphytica*, 7: 131-139.

Braun, A.C. & Wood, H.N., (1962). The Plant Tumor Problem. *Advances in Cancer Research*, 6, 81-109. [doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60619-3](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60619-3)

Budhagatapalli, N., Rutten, T., Gurushidze, M., Kumlehn, J. & Hensel, G., (2015). Targeted Modification of Gene Function Exploiting Homology-Directed Repair of TALEN Mediated Double-Strand Breaks in Barley. *G3-Genes Genomes Genetics*, 5(9):1857-1863.

Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A. & Hooykaas, P.J.J., (1995). Trans kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *THE EMBO JOURNAL*, 14(13):3206-14. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07323.x.

Butler, N.M., Baltes, N.J., Voytas, D.F. & Douches, D.S., (2016). Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum L.*) using sequence-specific nucleases. *Frontiers in Plant Science*, 7:1045. doi: 10.3389/fpls.2016.01045

Cebeci, E. & Hanci, F., (2017). Mor havuçta (*Daucus carota* ssp. sativus var. *atrorubens* Alef) Kendilemenin Tohum Verim ve Kalitesine Etkileri. *Akademik Ziraat Dergisi*, 102, 99–102.

ermk, T., Baltes, N.J., egan, R., Zhang, Y. & Voytas, D.F., (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biology*, 16:232. DOI 10.1186/s13059-015-0796-9

Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J. & Voytas, D.F., (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, 39:e82. doi:10.1093/nar/gkr218

Ceylan Baloğlu, F.Ö., (2017). *NOHUTTA (Cicer arietinum L.) YABANCI OT İLACINA (IMIDAZOLINONE) DAYANIKLILIĞIN KALITIMI*. (Tez No. 501841) [Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi]. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>

Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H. & Gao, C. (2019). CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annual Review of Plant Biology*, 70:667-697. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100049

Chen, W.P. & Punja, Z.K., (2002). Transgenic herbicide- and disease-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 20:929–935. doi: 10.1007/s00299-001-0419-7

Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J. & Voyta, D.F. (2010). Targeting DNA double strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186:757–61. doi: 10.1534/genetics.110.120717

Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. & Cascales, E. (2005). Biogenesis, architecture, and function of bacterial Type IV secretion systems. *Annual Review of Microbiology*, 59:451-85. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123630.

Clasen, B.M., Stoddard, T.J., Luo, S., Demorest, Z.L., Li, J., Cedrone, F., Tibebu, R., Davison, S., Ray, E.E, Daulhac, A., Coffman, A., Yabandith, A., Retterath, A., Haun, W., Baltes, N.J., Mathis, L., Voytas, D.F. & Zhang, F. (2015). Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnology Journal*, 14:169–76. doi: 10.1111/pbi.12370

Clustal Omega (3 Mart 2022). Tools > Multiple Sequence Alignment > Clustal Omega. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=clustalo-I20231115-000831-0373-89459239-p1m>

Çelik, I., Çamaş, H., Arslan, O. & Küfrevioğlu, O., (1996). The effects of some pesticides on human and bovine erythrocyte carbonic anhydrase enzyme activities *in vitro*. *Environmental Science and Health*, 10:2651–2657. doi.org/10.1080/10934529609376516

Danilo, B., Perrot, L., Mara, K., Botton, E., Nogu , F. & Mazier, M. (2019). Efficient and transgene-free gene targeting using *Agrobacterium* mediated delivery of the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant Cell Reports*, 38:459–462. doi.org/10.1007/s00299-019-02373-6

Deltcheva E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., & Charpentier, E., (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471 (7340): 602–607. doi: 10.1038/nature09886; p

Deveau, H., Garneau, J. E. & Moineau S., (2010). CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual Review of Microbiology*, 64:475-93. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134123.

Doudna, J.A. & Charpentier, E., (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213):1258096. doi: 10.1126/science.1258096.

Douglas, C.J., Staneloni, R.J., Rubin, R.A. & Nester, E.W., (1985). Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *Journal of Bacteriology*, 161(3): 850–860. doi: https://doi.org/10.1128/jb.161.3.850-860.1985

Drost, D. & Bitner, W., (2020). Carrots in the Garden. *All Current Publications*, 291. https://digitalcommons.usu.edu/extension_curall/291

Dunemann, F., Unkel, K. & Sprink, T., (2019). Using CRISPR/Cas9 to produce haploid inducers of carrot through targeted mutations of centromeric histone H3 (CENH3). *Acta Horticulturae*, 1264, 211-220. doi: 10.17660/ActaHortic.2019.1264.26

Ebrahimzadegan, R. & Marouf, A., (2022). In vitro regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Dragon’s Head plant (*Lallemantia iberica*). *Scientific Reports*; 12: 1784. doi: 10.1038/s41598-022-05776-w

Elbasheer, Y.H.A., Alem, S.A. & Osman, E.E., (2019). Feasible Surface Sterilization Protocol for Microbial Contamination of Some Forest Trees on in vitro Cultures Explants. *Acta Scientific Microbiology*, 2,5.

FAO, (2022a). Word production carrots and turnips. The state of food and agriculture organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>

FAO, (2022b). Production/Yield quantities of Carrots and turnips in Türkiye. The state of food and agriculture organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>

FAO, (2022c). Pesticides (total) + (Total)- Agricultural Use (%). The state of food and agriculture organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>

FAO, (2022d). Herbicides + (Total)- Agricultural Use (%). The state of food and agriculture organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>

Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M., Mueller, M.N., O'Connell, C., Ray, D.K., West, P.C., Balzer, C., Bennett, E.M., Carpenter, S.R., Hill, J.S., Monfreda, C., Polasky, S., Rockstrom, J., Sheehan, J., Siebert, S., Tilman, D. & Zaks, D.P.M., (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 2011;478:337–42. doi:10.1038/nature10452

Fraley, R.T., Rogers, S.R., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. & Woo, S.C., (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(15),4803-4807. doi: 10.1073/pnas.80.15.4803

Futterer, J., Gisel, V., A., Iglesias, A., Klöti, A., Kost, B., Scheid, O.M., Neuhaus G., Url-Neuhaus, G., Schrott, M., Shillito, R., Spangenberg, G. & Wang, Z.Y., (1995). Standard Molecular Techniques for the Analysis of Transgenic Plants. *Gene Transfer to Plants*, 215-263.

Gao, C., (2015). Genome editing in crops: from bench to field. *National Science Review*, 2(1) 13-15. doi.org/10.1093/nsr/nwu054

Gao, C., (2021). Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*, 184 (6): 1621-1635. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.005>.

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. & Bairoch, A., (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13): 3784-3788.

GenScript. (10 Şubat 2022). *GenScrip Restriction Enzyme Map Analyses*. <https://www.genscript.com/tools/restriction-enzyme-map-analysis>

Gilbert, M.O., Zhang, Y.Y. & Punja, Z.K., (1996). Introduction and expression of chitinase encoding genes in carrot following *Agrobacterium*-mediated transformation. *Vitro Cell Dev Biol Plant*, 32:171–178.

Godde, J.S. & Bickerton, A., (2006). The Repetitive DNA Elements Called CRISPRs and Their Associated Genes: Evidence of Horizontal Transfer Among Prokaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 62:718–729. DOI: 10.1007/s00239-005-0223-z

Gosavi, G., Ren, B., Li, X., Zhou, X., Spetz, C. & Zhou, H., (2022). A New Era in Herbicide-Tolerant Crops Development by Targeted Genome Editing. *ACS Agriculture Science & Technology*, 2, 2, 184–191. doi.org/10.1021/acsagscitech.1c00254

Guan, Y., Ren, H., Xie, H., Ma, Z. & Chen, F., (2009). Identification and characterization of bZIP-type transcription factors involved in carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. *The Plant Journal*, 60(2):207–17. doi: 10.1111/j.1365-3113.2009.03948.x.

Guirouilh-Barbat, J., Lambert, S., Bertrand, P. & Lopez, B. S. (2014). Is homologous recombination really an error-free process? *Frontiers in Genetics*, 5:175. doi: 10.3389/fgene.2014.00175

Hall, M.C. & Matson, S.W. (1999) Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Molecular Microbiology*, 34:867–877. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01659.x

Hamada, H., Liu, Y., Nagira, Y., Miki, R., Taoka, N. & Imai, R., (2018). Biolistic delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Scientific Reports*, 8:14422. doi: 10.1038/s41598-018-32714-6

Hardegger, M. & Sturm, A. (1998). Transformation and regeneration of carrot (*Daucus carota* L.). *Molecular Breeding*, 4: 119–127.

Hanson, J., Taylor, K. & Wernick, A. (2 Mayıs 2016). What Is a Gene Gun? <https://www.oreilly.com/content/how-to-build-and-use-a-gene-gun/>

Heap, I., LeBaron, H., (2001). *Introduction and overview of Resistance: Herbicide Resistance and World Grains*, CRC Press. (S.B. Powles, D.L., D.L. Shaner, Ed.). [https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=ugWcDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT11&dq=Herbicides+Resistance+and+World+Grains.&ots=RDZIsxIem&sig=N5yZz_z8r472yKEeTiWdhx0HE&redir_esc=y#v=onepage&q=Herbicides%20Resistance%20and%20World%20Grains.&f=false-\(Erişim Tarihi:12.04.2023\).](https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=ugWcDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT11&dq=Herbicides+Resistance+and+World+Grains.&ots=RDZIsxIem&sig=N5yZz_z8r472yKEeTiWdhx0HE&redir_esc=y#v=onepage&q=Herbicides%20Resistance%20and%20World%20Grains.&f=false-(Erişim Tarihi:12.04.2023).)

Herrera-Estrella, L., (1983). Transfer and expression of foreign genes in plants. PhD thesis. Laboratory of Genetics, Gent University, Belgium.

Hesami, M., Naderi, R., Tohidfar, M. & Yoosefzadeh-Najafabadi, M., (2020). Development of support vector machine-based model and comparative analysis with artificial neural network for modeling the plant tissue culture procedures: effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis of chrysanthemum, as a case study. *Plant Methods*, 16:112. doi: 10.1186/s13007-020-00655-9

Horvath, P. & Barrangou, R., (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327(5962):167-70. doi: 10.1126/science.1179555.

HRAC, (2022). Herbicide Resistance Action Committee, Mode of Action Classification 2022 MAP, <https://hracglobal.com/tools/hrac-mode-of-action-classification-2022-map>

Hsu, P.D., Lander, E.S. & Zhang, F., (2014). Development and Applications of CRISPR–Cas9 for Genome Engineering. *Cell*. 157(6): 1262–1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010

Hua, K., Han, P. & Zhu, J-K., (2022). Improvement of base editors and prime editors advances precision genome engineering in plants. *Plant Physiology*, 188: 1795–1810. doi.org/10.1093/plphys/kiab591

Hunziker, J., Nishida, K., Kondo, A., Kishimoto, S., Ariizumi, T., & Ezura, H., (2020). Multiple gene substitution by Target-AID base-editing technology in tomato. *Scientific Reports*, 10(1):20471. doi: 10.1038/s41598-020-77379-2.

Primer3 web (10 Mayıs 2021). version 4.1.0. <https://primer3.ut.ee/>

Iorizzo, M., Senalik, D.A., Ellison S.L., Grzebelus, D., Cavagnaro, P.F, Allender, C., Brunet, J., Spooner, D.M., Deynze A.V. & Simon, P.W., (2013). Genetic structure and domestication of carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*) (Apiaceae). *American Journal of Botany*, 100(5):930-8. doi: 10.3732/ajb.1300055.

Iovene, M. & Grzebeluz, E., (2019). *Carrot Molecular Cytogenetics: The Carrot Genome*, (P., Simon, D., Grzebelus, M., Iorizzo, R., Baranski, Ed). Springer. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-03389-7_8

Ipek, A. (2002). *Introduction Of An Ac/Ds Based Two-Element Transposon Tagging System and Trans-Activation Of Ds In Carrot (Daucus carota L.)*. Doctor of Philosophy (Horticulture) University Of Wisconsin-Madison 185s, USA.

ISAAA (2019). Pocket K No. 16: Biotech Crop Highlights in 2019. <https://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16/>

ISAAA (20 Kasım 2023). GM Approval Database Methods of Trait Introduction. <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/traitintrolist/default.asp>

Ishii, T.& Araki, M., (2016). Consumer acceptance of food crops developed by genome editing. *Plant Cell Reports*, 35:1507–1518. doi 10.1007/s00299-016-1974-2

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. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987

Ishino, Y., Krupovic, M. & Forterre, P., (2018). History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of Bacteriology*, 200(7):e00580-17. doi: 10.1128/JB.00580-17.

Jansen, R., Embden, J.D., Gastra, W. & Schouls, L.M., (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6):1565-75. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x

Jayaraj, J. & Punja, Z., (2008). Transgenic carrot plants accumulating ketocarotenoids show tolerance to UV and oxidative stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46 (10):875–883. doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.05.015

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. doi: 10.1093/nar/gkt780.

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):816-21. doi: 10.1126/science.1225829

Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., Sternberg, S.H., Kaya, E., Ma, E., Anders, A., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Kaplan, M., Iavarone, A.T., Charpentier, E., Nogales, E. & Doudna, J.A., (2014). Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science*, 343(6176):1247997. doi:10.1126/science.1247997

Joos, H., Inze, D., Caplan, A., Sormann, M., Van Montagu, M. & Schell, J., (1983). Genetic Analysis of T-DNA Transcripts in Nopaline Crown Galls. *Cell*, 32(4):1057-67. doi: 10.1016/0092-8674(83)90290-8

Jore, M.M., Lundgren, M., van Duijn, E., Bultema, J.B., Westra, E.R., Waghmare, S.P., Wiedenheft, B., Pul, Ü., Wurm, R., Wagner, R., Beijer, M.R., Barendregt, A., Zhou, K., Snijders, A.P.L, Dickman, M.J., Doudna, J.A., Boekema, E.J., Heck, A.J.R., van der Oost, J. & Brouns, S.J.J., (2011). Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nature Structural & Molecular Biology*, (5):529-36. doi: 10.1038/nsmb.2019

Kelley, M.L., Strezoska, Z., He, K., Vermeulen, A. & van Brabant, S.A., (2016). Versatility of chemically synthesized guide RNAs for CRISPR-Cas9 genome editing. *Journal of Biotechnology*, 233:74–83. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.011

Kim, Y-S., Kim, Mi-Y., Kim T-G., & Yang M-S., (2009). Expression and assembly of cholera toxin B subunit (CTB) in transgenic carrot (*Daucus carota* L.). *Molecular Biotechnology*, 41(1):8-14. doi: 10.1007/s12033-008-9086-z

Klap C, Yeshayahou E, Bolger AM, Arazi T, Gupta SK, Shabtai S, Usadel, B., Salts, Y. & Barg, R., (2017). Tomato facultative parthenocarp results from *SIAGAMOUS-LIKE 6* loss of function. *Plant Biotechnology Journal*, 15:634–47. doi: 10.1111/pbi.12662

Klee, H. J., White, F.F., Iyer, V.N., Gordon, M.P & Nester, E.W., (1983). Mutational analysis of the virulence region of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Journal of Bacteriology*, 153:878-883. doi.org/10.1128/jb.153.2.878-883.1983

Klee, H., Horsch, R. & Rogers, S., (1987). Agrobacterium-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annual Review of Plant Physiology*, 38:467-86. doi.org/10.1146/annurev.pp.38.060187.002343

Klimek-Chodacka, M., Oleszkiewicz, T., Qi, Y. & Baranski, R., (2019a). Carrot genome editing using CRISPR-based systems. *Acta Horticulture*, 1264, 53-66. DOI: 10.17660/ActaHortic.2019.1264.7

Klimek-Chodacka, M., Oleszkiewicz, T. & Baranski, R., (2019b). Visual Assay for Gene Editing Using a CRISPR/Cas9 System in Carrot Cells. *Methods in Molecular Biology*, 1917:203-215. doi: 10.1007/978-1-4939-8991-1_15

Kolpin, D.W., Thurman, E.M. & Linhart, S.M., (1998). The Environmental Occurrence of Herbicides: The Importance of Degradates in Ground Water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 385–390

Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A. & Liu, D.R., (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533, 420–424. doi:10.1038/nature17946

Komor, A.C., Badran, A.H. & Liu, D.R., (2017). CRISPR-Based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, 168, 20–36. doi: [dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.044](https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.044)

Kroemer, T. (30 Haziran 2023). A Guide to T-DNA Binary Vectors in Plant Transformation. GOLDBIO, <https://goldbio.com/articles/article/a-guide-to-agrobacterium-t-dna-binary-vectors>

Krupovic, M., Makarova, K.S., Forterre, P., Prangishvili, D. & Koonin, E.V., (2014). Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity. *BMC Biology*, 12:36. doi: 10.1186/1741-7007-12-36

Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. & Citovsky, V., (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4):1871-6. doi: 10.1073/pnas.98.4.1871

Kuntz, M. (2020). Technological Risks (GMO, Gene Editing), What Is the Problem With Europe? A Broader Historical Perspective. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8:557115. doi: 10.3389/fbioe.2020.557115

Le Guen, T., Ragu, S., Guirouilh-Barbat, J. & Lopez, B. S., (2015). Role of the double-strand break repair pathway in the maintenance of genomic stability. *Molecular and Cellular Oncology*, 2:e968020. doi: 10.4161/23723548.2014.968020

Lee, L.Y. & Gelvin, S.B., (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325–332. doi: 10.1104/pp.107.113001

Li, J.F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G.M. & Sheen, J., (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31: 688–691

Li, Y., Li, W. & Li, J. (2021). The CRISPR/Cas9 revolution continues: from base editing to prime editing in plant science. *Journal of Genetics and Genomics*, 48, 661–670. doi: 10.1016/j.jgg.2021.05.001

Li, Y., Liang, J., Deng, B., Jiang, Y., Zhu, J., Chen, L., Li, M. & Li, J., (2023). Applications and Prospects of CRISPR/Cas9-Mediated Base Editing in Plant Breeding. *Current Issues in Molecular Biology*, 45, 918–935. doi.org/10.3390/cimb45020059

Liang, Z., Zhang, K., Chen, K. & Gao C., (2014) Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(2):63–68. doi: 10.1016/j.jgg.2013.12.001

Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P. & Timlin, J. A., (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, 25, 1234–1257. doi: 10.1080/10717544.2018.1474964

Liu, S., Ma, J., Liu, H., Guo, Y., Li, W. & Niu, S., (2020). An efficient system for *Agrobacterium*-mediated transient transformation in *Pinus tabulaeformis*. *Plant Methods*, 16:52. doi: 10.1186/s13007-020-00594-5

Lu, Y. & Zhu, J.K., (2017). Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 System. *Molecular Plant*, 10, 523–525. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.11.013>

Maass, D., Arango, J., Wust, F., Beyer, P. & Welsch, R. (2009). Carotenoid crystal formation in Arabidopsis and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS ONE*, 4(7):e6373. doi: 10.1371/journal.pone.0006373

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.*, 1:7. doi: 10.1186/1745-6150-1-7

Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P. & Van Der Oost, J., (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, (6):467-77. doi: 10.1038/nrmicro2577

Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Terns, R.M., Terns, M.P., White, M.F., Yakunin, A.F., Garrett, R.A., van der Oost, J., Backofen, R. & Koonin E.V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11):722–36. doi.org/10.1038/nrmicro3569

Mali, P. Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E. & Church, G.M., (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339(6121): 823–826. doi:10.1126/science.1232033

Marzec, M. & Hensel, G., (2018). Targeted Base Editing Systems Are Available for Plants. *Trends in Plant Science*, (11):955-957. doi: 10.1016/j.tplants.2018.08.011

McCourt, J.A., Duggleby, R.G., (2006). Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acid.* (2):173-210. doi: 10.1007/s00726-005-0297-3.

Mcvey, M. & Sang, E. L., (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in Genetics*, 24, 529–538. doi: 10.1016/j.tig.2008.08.007

Meyer, C.M., Goldman, I.L., Grzebelus, E. & Krysan, P.J., (2022). Efficient production of transgene-free, gene-edited carrot plants via protoplast transformation. *Plant Cell Reports*, 41:947–960. doi.org/10.1007/s00299-022-02830-9

Mikschofsky, H., Mann, G. & Broer, I., (2009). Soil adaptation of transgenic *in vitro* carrot plantlets. *Journal of Agricultural Science*, 147:43–49. doi.org/10.1017/S0021859608008009

Mohanraju, P., Makarova, S.K., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E.V. & van der Oost, J., (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, 353(6299):aad5147. doi: 10.1126/science.aad5147

Mojica, F.C.M., Díez-Villasenor, C., García-Martínez, J. & Soria, E., (2004). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60:174–182. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3

Mojica, F.J.M., Villasenor, C.D., Martínez, J.G. & Soria, E., (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60:174–182. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3

Monreal-Escalante, E., Govea-Alonso, D.O., Hernández, M., Cervantes, J., Salazar-González, J.A., Romero-Maldonado, A., Rosas, G., Garate, T., Fragoso, G., Sciutto, E. & Rosales-Mendoza, S., (2016). Towards the development of an oral vaccine against porcine cysticercosis: expression of the protective HP6/TSOL18 antigen in transgenic carrots cells. *Planta*, 243(3):675–685. Doi:10.1007/s00425-015-2431-0

Mozo, T. & Hooykaas, P.J.J., (1992). Design of a novel system for the construction of vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular Genetics and Genomics*, 236:1-7.

Naito, Y., Hino, K., Bono, H. & Ui-Tei, K., (2015). CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 31: 1120-1123

Niedbala, G., Niazian, M. & Sabbatini, P., (2021). Modeling *Agrobacterium*-Mediated Gene Transformation of Tobacco (*Nicotiana tabacum*)-A Model Plant for Gene Transformation Studies. *Frontiers in Plant Science*, 12:695110. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.695110>

Noh, S.A., Lee, H.S., Huh, G.H., Oh, M.J., Paek K.H., Shin, J.S. & Bae, J.M., (2012). A sweetpotato SRD1 promoter confers strong root-, taproot-, and tuber-specific expression in *Arabidopsis*, carrot, and potato. *Transgenic Research*,(2):265-78. doi: 10.1007/s11248-011-9528-4

Nong Liu, C., Li, X.-Q. & Gelvin, S.B. (1992). Multiple copies of *virG* enhance the transient transformation of celery, carrot and rice tissues by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 20: 1071-1087

Nuñez, J.K., Kranzusch, P.J., Noeske, J., Wright, A.V., Davies, C.W. & Doudna, J.A., (2014). Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(6): 528–534. doi: 10.1038/nsmb.2820

Park, K.W. & Mallory-Smith, C.A., (2003). Physiological and molecular basis for ALS inhibitor resistance in *Bromus tectorum* biotypes. *Weed Research*, 44, 71-77, doi.org/10.1111/j.1365-3180.2003.00374.x

Parsa, H.S., Sabet, M.S., Moieni, A., Shojaeiyan, A., Dogimont, C., Boualem, & Bendahmane, A., (2023). CRISPR/Cas9-Mediated Cytosine Base Editing Using an Improved Transformation Procedure in Melon (*Cucumis melo* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 11189. doi.org/10.3390/ijms241311189

Pawlicki, N., Sangwan, R.S. & Sangwan-Norreel, B.S., (1992). Factors influencing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31: 129-139.

Plagens, A., Richter, H., Charpentier, E. & Randau, L., (2015). DNA and RNA interference mechanisms by CRISPR-Cas surveillance complexes. *FEMS Microbiology Reviews*,39(3):442-63. doi: 10.1093/femsre/fuv019

Pul, Ü., Wurm, R., Arslan, Z., Geissen, R., Hofmann, N., & Wagner, R., (2010). Identification and characterization of *E. coli* CRISPRCas promoters and their silencing by H-NS. *Molecular Microbiology*, 75(6):1495-512. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07073.x

Riva, G.A., Gonzalez-Cabrera, J., Vasqu-Padru, J. & Ayra-Pardo, C., (1998). *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer to plant cell. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.2, no. 3. <https://www.scielo.cl/fbpe/img/ejb/v1n3/1/bip/>

Rong, J., Lammers, Y., Strasburg, J.L., Schidlo, N.S., Ariyurek, Y., de Jong, T.J., Klinkhamer, P.G.L., Smulders, M.J.M., Vrieling, K., (2014). New insights into domestication of carrot from root transcriptome analyses. *BMC Genomics*, 15(1):895. doi: 10.1186/1471-2164-15-895.

Rosales-Mendoza, S., Soria-Guerra, R.E., Olivera-Flores, M. T., de J., pez-Revilla, R. L., ello-Astorga, G. R. A., Jime'nez-Bremont, J.F., de la Cruz, R.F.G, Loyola-Rodri'guez, J.P. & Alpuche-Soli's, A.G., (2007). Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin b subunit (LTB) in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports*, 26:969–976. DOI 10.1007/s00299-007-0310-2

Rudin, N.; Sugarman, E. & Haber, J.E., (1989). Genetic and Physical Analysis of Double-Strand Break Repair and Recombination in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics*, 122(3): 519–534. doi: 10.1093/genetics/122.3.519

Saari, L.L., Cotterman, J.C. & Primiani, M.M., (1989). Mechanism of Sulfonylurea Herbicide Resistance in the Broadleaf Weed, *Kochia scoparia*. *Plant Physiology*, 93, 55-61.

Sahah, S.S., Erdmann, S., Mojica, F.J.M. & Garrett, R.A. (2013). Protospacer recognition motifs Mixed identities and functional diversity. *RNA Biology*, 10(5):891-9. doi: 10.4161/rna.23764.

Saini, H., Thakur, R., Gill, R., Tyagi, K. & Goswami, M. (2023). CRISPR/Cas9-gene editing approaches in plant breeding. *GM Crops & Food*, 14:1, 1-17. doi:10.1080/21645698.2023.2256930

Sander, J.D. & Joung, J.K., (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnology*, 32(4): 347–355. doi: 10.1038/nbt.2842

Sandhya, D., Jogam, P., Allini, V.R., Abbagani, S. & Alok, A., (2020). The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plants *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18:25. doi.org/10.1186/s43141-020-00036-8

Sant'Ana, R., Caprestano, C. A., Nodari, R. O. & Agapito-Tenfen, S. Z., (2020). PEG-delivered CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins system for gene editing screening of maize protoplasts. *Genes*, 11:1029. doi:10.3390/genes1109102910.1007/s10529-020-02950-w.

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, 9275–9282. doi: 10.1093/nar/gkr606; pmid: 21813460

Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., Merah, O., (2017). The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Industrial Crops & Products*, 109 661–671. doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.027

Schulzova, V., Koudela, M., Chmeloreva, H., Hajslova, J. & Novotny, C., (2022). Assessment of Carrot Production System Using Biologically Active Compounds and Metabolomic Fingerprints. *Agronomy*, 12, 1770. doi.org/10.3390/agronomy12081770

Science Learning Hub (12 Şubat 2023). Agrobacterium in the wild. The University of Waikato. <https://www.sciencelearn.org.nz/videos/1791-agrobacterium-in-the-wild> .

Semenova, E., Joreb, M.M., Datsenkoc, K.A., Semenova, A., Westrab, E.R., Wanner, B., van der Oost, J., Brouns, S.J.J. & Severinov, K., (2011). Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25):10098-103. doi:10.1073/pnas.1104144108

Shabbir, M.A.B., Hao, H., Shabbir, M.Z., Hussain, I.H., Iqbal, Z., Ahmed, S., Sattar, A., Iqbal, M., Li, J. & Yuan, Z., (2016). Survival and Evolution of CRISPR–Cas System in Prokaryotes and Its Applications. *Front Immunology*, 7:375. doi: 10.3389/fimmu.2016.00375.

Shen, B., Zhang, J., Wu, H., Wang, J., Ma, K., Li, Z., Zhang, X., Zhang, P. & Huang, X., (2013). Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Reserch*, (5):720-3. doi: 10.1038/cr.2013.46.

Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., Ishii, H., Teramura, H., Yamamoto, T., Komatsu, H., Miura, K., Ezura, H., Nishida, K., Ariizumi, T. & Kondo, A., (2017). Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*, volume 35, pages441–443. doi:10.1038/nbt.3833

Shimizu, M., Kawai, K., Kaku, K., Shimizu, T. & Kobayashi, H., (2018). Application of Mutated Acetolactate Synthase Genes to Herbicide Resistance and Plant Improvement. *Application of Mutated Acetolactate Synthase Genes for Herbicide to Crop Improvement*. (M. Larramendy Ed, S.Solonoski Co-ed), Intech, China. doi: 10.5772/13449

Shukla, V.K., Doyon, Y., Miller, J.C., DeKolver, R.C., Moehle, E.A., Worden S.E., Mitchell, J.C., Arnold, N.L., Gopalan, S., Meng, X., Choi, V.M., Rock, J.M., Wu, Y.Y., Katibah, G.E., Zhifang, G., McCaskill, D., Simpson, M.A., Blakeslee, B., Greenwalt, S.A., Butler, H.J., Hinkley, S.J., Zhang, L., Rebar, E.R., Gregory, P.D. & Urnov, F.D., (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 459:437–41. doi:10.1038/nature07992

Simon, P.W., (2000). Domestication, Historical, Development, and Modern Breeding of Carrot. *Plant Breeding Reviews*, (J. Janick, Ed). John Wiley & Sons, Canada.

Simon, P.W., Freeman, R.E., Vieira, J.V., Boiteux, L.S., Briard, M., Nothnagel, T., Michalik, B., Kewon, Y.S., (2008). Carrot: Vegetables II. Fabaceae, Liliaceae, and Umbelliferae, (Ed: J. Prohens, F. Nuez). New York, USA.

Simpson, K., Quiroz, L., Rodriguez-Concepcion, M. & Stange, C., (2016) Differential contribution of the first two enzymes of the MEP pathway to the supply of metabolic precursors for carotenoid and chlorophyll biosynthesis in carrot (*Daucus carota*). *Frontiers in Plant Science*, 7. doi.org/10.3389/fpls.2016.01344

Singh, B.K., Shaner, D.L., (1995). Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids: From Test Tube to Field. *Plant Cell*, 7(7):935-944. doi: 10.1105/tpc.7.7.935

Sontheimer, E. J. & Marraffini, L. A., (2010). Slicer for DNA. *Nature*, 468(7320):45-6. doi: 10.1038/468045a

Sorek, R., Lawrence, C.M. & Wiedenheft, B., (2013). CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 237–266.

Sternberg, S.H., Redding, I., Jinek, M., Greene, E.C. & Doudna, J.A., (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507, 62–67. doi:10.1038/nature13011

- Stidham, M.A., (1991). Herbicide that inhibit acetohydroxyacid synthase. *Weed Sci.*, (39) 428-434. <https://www.jstor.org/stable/4044976>
- Sun, Y., Li, J. & Xia, L., (2016). Precise genome modification via sequence-specific nucleases-mediated gene targeting for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 7:1928. doi: 10.3389/fpls.2016.01928
- Szurman-Zubrzycka, M.E., Zbieszczak, J., Marzec, M., Jelonek, J., Chmielewska, B., Kurowska, M.K., Krok, M., Daszkowska-Golec, A., Guzy-Wrobelska, J. Gruszka, G., Gajacka, M., Gajewska, P., Stolarek, M., Tylec, P., Segal, P., Lip, S., Kudelko, M., Lorek, M., Gorniak-Walas, M., Malolepszy, A., Podsiadlo, N., Szyrajew, K.P., Keisa, A., Mbambo, Z., Todorowska, E., Gaj, M., Nita, Z., Orlowska-Job, W., Maluszynski, M. & Szarejko, I., (2018). HorTILLUS—A Rich and Renewable Source of Induced Mutations for Forward/Reverse Genetics and Pre-breeding Programs in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Frontiers in Plant Science*, Sec. Plant Breeding, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00216>
- Tan, S., Evans, R. & Singh, B., (2006). Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids*, 30(2):195-204. doi: 10.1007/s00726-005-0254-1.
- Thurtle-Schmidt, D.M. & Lo Te-Wen, (2018). Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 46(2): 195–205. Doi:10.1002/bmb.21108
- Tian, S., Jiang, L., Cui, X., Zhang, J., Guo, S., Li, M., Zhang, H., Ren, Y., Gong, G., Zong, M., Liu, F., Chen, Q. & Xu, Y., (2018). Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. *Plant Cell Reports*, 37:1353–1356. doi.org/10.1007/s00299-018-2299-0
- Tomilov, A., Tomilova, N., Yoder & Y.I., (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of the parasitic plant *Triphysaria versicolor* retain parasitic competence. *Planta*, 225:1059–1071. doi: 10.1007/s00425-006-0415-9
- Torun, H., (2017). Herbisitler ve Türkiye'deki Ruhsatlı Herbisitlerin Güncel Durumu. *Turkish Journal of Weed Science*, 20(2):61-68.
- Turkoglu Coskun, S. & Olhan, E. (2022). Genetically modified organisms and biosafety as perceived by professionals according to their sociodemographic characteristics. *International Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 6 (1): 121-129. doi.org/10.31015/jaefs.2022.1.16

TÜİK, (2022). Türkiye İstatistik Kurumu, Tarımsal ilaç kullanımı, 2006-2021. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/DownloadIstatistikselTablo?p=BhORnbCe8aJdQrdM4v1/u7b/pluCHxTcNtvgeVnXAxCFD5YEBWrl1h1rLVoeEsMw> -(Erişim Tarihi: 02.04.2023)

Upadhyay, S.K., Kumar, J., Alok, A. & Tuli, R., (2013). RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 Genes Genomes Genetics*, 3(12):2233-8. doi: 10.1534/g3.113.008847

van der Oost, J., Jore, M. M., Westra, E. R., Lundgren, M. & Brouns, S. J., (2009). CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(8):401-7. doi: 10.1016/j.tibs.2009.05.002

Vats, S., Kumawat, S., Kumar, V., Patil, G. B. & Deshmukh, R., (2019). Genome editing in plants: exploration of technological advancements and challenges. *Cells*, 8 (11):1386. doi.org/10.3390/cells8111386

Veluthambi, K., Gupta, A.K. & Sharma, A., (2003). The current status of plant transformation technologies. *Current Science*, 84, 3, 368-38.

Veillet, F., Perrot, L., Chauvin, L., Kermarrec, M.-P., Guyon-Debast A., Chauvin, J.-E., Nogué, F. & Mazier, M. (2019). Transgene-Free Genome Editing in Tomato and Potato Plants Using Agrobacterium-Mediated Delivery of a CRISPR/Cas9 Cytidine Base Editor. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2):402. doi: 10.3390/ijms20020402

Veillet, F., Durand, M., Kroj, T., Cesari, S. & Gallois, J.-C., (2020). Precision Breeding Made Real with CRISPR: Illustration through Genetic Resistance to Pathogens. *Plant Communications*, 1(5):100102. doi: 10.1016/j.xplc.2020.100102

Yu, Q. & Powles, S.B., (2013). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Management Science*, 70(9):1340-50. doi: 10.1002/ps.3710

Wally, O., Jayaraj, J. & Punja, Z.K., (2008). Comparative expression of beta glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues. *Plant Cell Reports*, 27(2):279–87. doi: 10.1007/s00299-007-0461-1

Wang, H. & Xu, X., (2017). Microhomology-mediated end joining: new players join the team. *Cell Biosci.*, 7:6. doi: 10.1186/s13578-017-0136-8

Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, V. & Zambryski, P. (1984). Right 25 bp Terminus Sequence of the Nopaline T-DNA is Essential for and Determines Direction of DNATransfer from Agrobacterium to the Plant Genome. *Cell*, 38, 455-462. doi.org/10.1016/0092-8674(84)90500-2

Wang, S., Yang, Y., Guo, M., Zhong, C., Yan, C. & Sun, S., (2020). Targeted mutagenesis of amino acid transporter genes for rice quality improvement using the CRISPR/Cas9 system. *The Crop Journal*, 8:457–464. doi.org/10.1016/j.cj.2020.02.005

Wang, X-J., Lou, Q., Li, T., Meng, P.-H., Pu, Y.-T., Liu, J., X., Zhang, J., Liu, H., Tan, G.-F.& Xiong, A., S., (2022). Origin, evolution, breeding, and omics of *Apiaceae*: a family of vegetables and medicinal plants. *Horticulture Research*, 9: uhac076. https://doi.org/10.1093/hr/uhac076

Ward, E.R. & Barnes, W.M., (1988). VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. *Science*, 242:927–930. doi: 10.1126/science.242.4880.92

Williams, R.S., Johnston, S.A., Riedy, M., Devit, M.J., Mcelligott, S.G. & Sanford, J.C., (1991). Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, 88(7), 2726-2730. doi.org/10.1073/pnas.88.7.2726

Winans, S.C., (1991). An Agrobacterium two-component regulatory system for the detection of chemicals released from plant wounds. *Molecular Microbiology*, 5(10):2345-50. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb02080.x

Wise, A. A., Liu, Z. & Binns, A.N., (2006). Three methods for the introduction of foreign DNA into Agrobacterium. *Methods in Molecular Biology*, 343:43-53. doi: 10.1385/1-59745-130-4:43. DOI: 10.1385/1-59745-130-4:43

Wolfe, S.A., Nekludova, L. & Pabo, C.O., (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29:183–212.

Wurtele, E.S. & Bulka, K. (1989). A simple, efficient method for the *Agrobacterium*-mediated transformation of carrot callus cells. *Plant Science*, 61, 253-262. doi.org/10.1016/0168-9452(89)90232-X

Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., Wang, X.-C. & Chen, Q.-J., (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 14:327. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/14/327>

Xu, Z.S., Feng, K., Xiong, A.S., (2019). CRISPR/Cas9-Mediated Multiply Targeted Mutagenesis in Orange and Purple Carrot Plants. *Molecular Biotechnology*, 61:191–199 doi.org/10.1007/s12033-018-00150-6

Yeşilbostan, S., (2020). Fare spermatogonyal kök hücrelerinde CRISPR-CAS9 ile hedefli genom düzenleme. (Tez no: 634396) [Doktora tezi, Ankara Üniversitesi]. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>

Yılmaz Çebi, S. & Olhan, E., (2019). Genetiği Değiştirilmiş Tarım Ürünlerinin Küresel Düzeyde Olası Etkileri. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(1), s. 179-196.

Yosef I., Goren M.G. & Qimron U., (2012). Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 40(12):5569–76. doi: 10.1093/nar/gks216

Younesikelaki, F.S., Ebrahimzadeh, M.H., Desfardi, M.K., Banala, M., Marka, R. & Nanna, R.S. (2016). Optimization of Seed Surface Sterilization Method and *in vitro* Seed Germination in *Althaea officinalis* (L.) - An Important Medicinal Herb. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(28), doi: 10.17485/ijst/2016/v9i28/90896

Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51 (1), 89–103. doi.org/10.1099/00207713-51-1-89

Yun, J.-Y., Kim, S.T., Kim, S.G. & Kim, J.S., (2019). A zero-background CRISPR binary vector system for construction of sgRNA libraries in plant functional genomics applications. *Plant Biotechnology Reports*, 13(5): 543-551. doi.org/10.1007/s11816-019-00567-8

Zhang, Y., Massel, K., Godwin, I.D. & Gao, C., (2018). Applications and potential of genome editing in crop improvement. *Genome Biology*, 19, 210. doi.org/10.1186/s13059-018-1586-y

Zhang, Y., Zhang, Q. & Chen, Q.J., (2020). *Agrobacterium*-mediated delivery of CRISPR/Cas reagents for genome editing in plants enters an era of ternary vector systems. *Science China Life Sciences*, 63(10). doi.org/10.1007/s11427-020-1685-9

Zhang, Z., Zhang, S., Huang, X., Orwig, K.E. & Sheng, Y., (2013). Rapid assembly of customized TALENs into multiple delivery systems. *PLoS One*, 8:e80281. doi.org/10.1371/journal.pone.0080281

Zhou, Q., Liu, W., Zhang, Y., Liu, K.K., (2007). Action mechanisms of acetolactate - inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89–9. doi:10.1016/j.pestbp.2007.04.004

Zofia, N.L., Martyna, Z-D., Aleksandra, Z. & Tomasz, B., (2020). Comparison of the Antiaging and Protective Properties of Plants from the *Apiaceae* Family. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi.org/10.1155/2020/5307614

Zong, Y., Wang, Y., Li, C., Zhang, R., Chen, K., Ran, Y., Qiu, J.L., Wang, D. & Gao, C., (2017) Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*, 35, 438–440. DOI:10.1038/nbt.3811