



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

**CRISPR/CAS9 SİSTEMİ KULLANILARAK TÜTÜN
BİTKİSİNDE AGOS7 GENİNİN SUSTURULMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Ayşenur Efşan YARAR

Danışman
Doç. Dr. Musa KAVAS

SAMSUN
2023

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



CRISPR/CAS9 SİSTEMİ KULLANILARAK TÜTÜN BİTKİSİNDE AGOS7 GENİNİN SUSTURULMASI

Yüksek Lisans Tezi

Ayşenur Efşan YARAR

Danışman

Doç. Dr. Musa KAVAS

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Ayşenur Efşan YARAR tarafından, Doç. Dr. Musa KAVAS danışmanlığında hazırlanan “CRISPR/CAS9 SİSTEMİ KULLANILARAK TÜTÜN BİTKİSİNDE AGOS7 GENİNİN SUSTURULMASI” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 10.5.2022 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Musa KAVAS Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Ceyhun KAYIHAN Başkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret

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

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

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

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

05/01 / 2023

Ayşenur Efşan YARAR

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : CRISPR/CAS9 SİSTEMİ KULLANILARAK TÜTÜN BİTKİSİNDE AGOS7 GENİNİN SUSTURULMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 05.01.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 16

Tek kaynak oranı : % 5 çıkmıştır.

05 /01/ 2023

Doç. Dr. Musa KAVAS

ÖZET

CRISPR/CAS9 SİSTEMİ KULLANILARAK TÜTÜN BİTKİSİNDE AGO7 GENİNİN SUSTURULMASI

Ayşenur Efşan YARAR
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans, Ocak/2023
Danışman: Doç. Dr. Musa KAVAS

Tütün (*Nicotiana tabacum L.*), patlıcangiller (Solanaceae) familyasından tek yıllık bir bitki olup, keyif verici bitkiler kategorisine girmektedir. Ekonomik olarak oldukça önemli bir konuma sahip olan tütün bitkisi endüstriyel ve aromatik bitki olarak da sınıflandırılmaktadır. Coğrafi şartlardaki farklılıklara hızlı ve etkin bir şekilde uyum sağlayabilen tütün, uyum yeteneği en iyi olan tarım ürünlerinden birisi olarak bilinmektedir. Genom düzenleme teknolojilerinin kullanılmasıyla oluşan mutasyonların, doğal olarak oluşan genetik mutasyonlarla ve varyasyonlardan ayrılmadığı için, çeşitli sektörlerde kullanım alanları genişlemektedir. Bu yöntemler, tarımsal ürünün hastalık veya zararlılara karşı direncini bir bölgeye veya gene özgü mutasyonla arttırmak için kullanılabilir. Ek olarak, gen fonksiyonlarının belirlenebilmesi için de kullanılabilir. Sonuç olarak, ZFN, TALEN ve CRISPR/Cas9 gibi yeni nesil genom düzenleme teknolojileri, güçlü genom düzenleme araçları olarak ortaya çıkmaktadır. Yeniliği, düşük maliyeti ve geniş uygulanabilirliğinden dolayı, CRISPR/Cas9 son 5 yılda popüler bir genom düzenleme tekniği haline gelmiştir. Bitkiler için önemli olan genlerden birisi de Argonaute (AGO) gen ailesi proteinleridir. Argonaute gen ailesi birçok farklı türde bulunabilir ve RNA kaynaklı susturma kompleksinde çok önemli bir role sahiptir. Bu gen ailesinin proteinleri; bitki gelişimi, büyümesi, biyotik ve abiyotik streslere yanıtta rol oynayan PAZ ve PIWI olmak üzere iki farklı bölge içermektedir. Önceki çalışmalar, AGO genlerinin ifadesinin, kuraklık, tuzluluk, yüksek sıcaklık ve düşük sıcaklık gibi farklı abiyotik stres türleri altında önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir. Ayrıca, AGO gen ailesinin bazı üyelerinin hücre büyümesi, programlı ölüm ve hücre iskeleti üzerinde bir işlevi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Model bitkilerde biyoinformatik analiz ile bulunan sonuçların homolojisine dayanarak, tütün bitkisinde AGO7 geni (LOC107784577) seçilmiştir ve CRISPR/Cas9 tekniği ile susturulmuştur. Elde edilen veriler ışığında, AGO7 mutantlarının, yabani tip bitkilere kıyasla bitkilerin morfolojisi ve fizyolojisinde önemli ölçüde değişiklik gösterdiği gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: AGO7, Tütün, CRISPR/Cas9, Hücre iskeleti, Abiyotik stres

ABSTRACT

CRISPR/CAS9 SYSTEM USING FOR AGO7 GENE SILENCING IN TOBACCO PLANTS

Ayşenur Efşan YARAR
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Agricultural Biotechnology
Master, February/2023
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Musa KAVAS

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is an annual plant of Solanaceae family and categorized in delightful plants. Economically important tobacco is also classified as an industrial and aromatic plant. Tobacco which can adapt to differences of geographic conditions quickly and efficiently is known as one of the agricultural plants which have best ability to adapt. DNA-free genome editing can reduce some limitations. These methods allow us to create gene specific mutations to increase resistance against biotic stress factors. Additionally, they can be used to demonstrate the functions the genes. Consequently, modern genome editing tecnics such as ZFN, TALEN CRISPR/Cas9 appeared as powerful genome editing tools. Because of its low cost and applicability, CRISPR/Cas9 has become most popular genome editing tool in the last 8 years. Proteins of Argonaute gene family is one of the most important protein families of plants. *Argonaute* gene family can be found in many species and has very important role in RNA-mediated gene silencing. Proteins of this gene family has two domains (PAZ and PIWI) which have critic roles in stress respoonse and development. Previous studies demonstrated that there are diffirence in gene expression of *AGO* genes under abiotic stress such as drought, salinity, high temperature and, low temperature. Moreover, there are some studies showed funtions of *AGO* genes in cell expansion, cytoskeleton and, programmed cell death. *AGO7* (LOC107784577) is chosen based on homology of other model organisms, and knocked-out using CRISPR/Cas9. The results showed that there are diffirences in morphology and physiology between *AGO7* and wild-type plants.

Keywords: *AGO7*, Tobacco, CRISPR/Cas9, Cell cytoskeleton, Abiotic stress

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak gerçekleştirilmiştir.

CRISPR/Cas9 Sistemi Kullanılarak Tütün (*Nicotiana Tabacum*) Bitkisinde AGO7 Geninin Susturulması konulu bu araştırmayı bana öneren ve konu üzerinde çalışma fırsatını veren, bilimsel düşünce, bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Musa KAVAS'a ve öğrenimim boyunca emeği geçen bütün hocalarıma sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız ve her daim paylaşacağımıza inandığım, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Zafer SEÇGİN'e, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Gökhan GÖKDEMİR, Abdullah AYDIN'a, desteğini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Mehmet Han BAŞTÜRK, Halime Eda SEFER, Şeymanur KILIÇ, Fatma KILIÇ ve Mutlu YALÇIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doğduğum günden bugüne hep en iyi yerlere gelmemi arzulayan, benden uzakta da olsalar her zaman ilgilerini ve sevgilerini çok yakınımnda hissettiğim, benden maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tezi kardeşim Ali Mert YARAR'a ithaf ediyorum.

Ayşenur Efşan YARAR

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tütün.....	3
1.2. Hücre Fonksiyonu	4
1.3. Genom Düzenleme Sistemi Mekanizmaları.....	4
1.4. Çinko Parmak Nükleazlar (ZFN)	6
1.5. TALEN (Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar).....	7
1.6. CRISPR/Cas9.....	8
1.7. CRISPR/Cas9 Keşfi.....	8
1.8. Farklı CRISPR/Cas9 Sistemleri	9
1.9. Bitkilerde Genom Düzenleme İçin Kullanılan CRISPR/Cas9 Vektörleri	10
1.10. Bitki Islahında CRISPR/Cas9 Uygulamaları	11
1.11. CRISPR/Cas9 Sisteminin Avantajları	11
1.12. AGOS7	12
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
2.1. Bitki Materyali ve Doku Kültürü Ortamının Hazırlanması	15
2.2. Kullanılan Bakteri Suşları ve Plazmidler	15
2.3. Besi Ortamı Bileşenleri ve Kullanılan Stok Solüsyonlar	15
2.4. Bitki İfade Vektörünün Oluşturulması	15
2.4.1. gRNA Dizaynı.....	15
2.4.2. AarI Enzimi ile pKI1.1R Plazmitinin Kesimi ve Defosforilasyonu	16
2.4.3. AarI Enzimi ile Kesilen pKI1.1R Plazmitinin Jelden Ekstraksiyonu	17
2.4.4. sgRNA Primerlerinin Çift İplikli Yapılması	18
2.4.5. gRNA'nın pKI1.1R Vektörüne Ligasyonu	18
2.5. Ligasyon Ürününün <i>E. Coli</i> Bakterisine Transformasyonu	19
2.5.1. Kompetan <i>E. Coli</i> Dh5α Bakterilerinin Hazırlanması	19
2.5.2. Ligasyon Ürününün <i>E. Coli</i> Transformasyonu.....	20
2.5.3. Koloni PCR	20
2.5.4. Plazmit Stok Hazırlanması	22
2.5.5. Plazmit İzolasyonu.....	22
2.6. pKI1.1R-AGO7 Vektörünün <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> 'e (AGL1) Transformasyonu	23
2.6.1. Kompetan <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> (AGL1) Bakterilerinin Hazırlanması.....	23
2.6.2. Elektrokompetan <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> (AGL1) Bakterilerine pKI1.1R-AGO7 Plazmitinin Transformasyonu	23
2.6.3. Koloni PCR	24
2.7. <i>Agrobacterium</i> Aracılığıyla Tütün Transformasyonu	25
2.7.1. <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> (AGL1) Bakterilerinin Büyütülmesi	25
2.7.2. <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> ile Tütün Yapraklarının İnokülasyonu	25
2.8. Genom Düzenlenmiş Tütün Bitkilerinde Analizler	26
2.8.1. Tütün Bitkilerinden Genomik DNA İzolasyonu.....	26
2.8.2. Higromisin Primerleri Kullanılarak PCR Kontrol	27
2.8.3. VirD Primerleri Kullanılarak PCR Kontrol.....	28
2.8.4. Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Sekans ile Doğrulanması.....	29

3. BULGULAR VE TARTIŞMA	30
3.1. Transgenik Tütün Hatlarının Üretilmesi	30
3.2. Transgenik T ₀ Bitkilerinde Moleküler Analizler	31
3.3. Transgenik Tütün Bitkilerinde Fenotipik Analizler	33
4. SONUÇ	35
KAYNAKÇA	36
Ek 1. Besi Ortamı Bileşenleri ve Kullanılan Stok Solüsyonlar	41
ÖZ GEÇMİŞ	42



SİMGELER VE KISALTMALAR

AGO/AGOS	: Argounate
RISC	: RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi
BA	: Benzil Aminopüril
Cas	: CRISPR ile ilişkili
cDNA	: Komplementer DNA
CRISPR	: Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar
CrRNA	: crispr RNA
DSB	: Çift Zincir Kırığı
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
gRNA	: Kılavuz RNA
LB	: Luria Broth
MS	: Murashige- Skoog
NAA	: Naftalin Asetik Asit
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme
PAM:	: Protoarlık Bitiş Motif
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pre-crRNA	: Öncül CRISPR RNA
sgRNA	: Tek Rehber RNA
TAE	: Tris- Asetik Asit- EDTA
TALEN	: Transkripsiyon Aktivatörü Benzeri Efektör Nükleazlar
tracrRNA	: Trans- aktive edici crRNA
YEB	: Yeast Extract Broth
ZFN	: Çinko Parmak Nükleazı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. NHEJ ve HDR'ye dayalı potansiyel genom düzenleme sonuçlarına genel bakış (Mei vd., 2016)	6
Şekil 1.2. . Çinko Parmak Nükleazlar ile Genom Düzenleme (Samanta vd., 2016)	7
Şekil 1.3. Transkripsiyon Aktivatör-Benzeri Efektör Nükleazlar ile Genom Düzenleme (Samanta vd., 2016)	7
Şekil 1.4. CRISPR'ın yapısal özellikleri (Ishino vd., 2018)	9
Şekil 1.5. CRISPR/Cas9 sistem tiplerinin crRNA biyogenez ve hedeflendirme mekanizması (Barrangou ve Marraffini, 2014).....	10
Şekil 1.6. miRNA ve siRNA'yı içeren insan RISC fonksiyonu için bir model (Chu ve	14
Şekil 2.1. pKI1.1R plazmiti	16
Şekil 2.2. Agrobacterium tarafından aktarılan plazmit bölgesi.....	16
Şekil 2.3. pKI1.1R (18.557 bp) plazmidinin AaRI enzim kesimi	17
Şekil 2.4. pKI1.1R sekans primerleri ile yapılan koloni PCR sonucu	21
Şekil 2.5. pKI1.1R-AGO7gRNA vektörünün sekans ile doğrulanması	22
Şekil 2.6. pKI1.1R sekans primerleri ile yapılan koloni PCR sonucu	24
Şekil 2.7. a, Gen aktarımı gerçekleşmiş ve besi ortamında 2 gün inkübe edilmiş tütün eksplantları b. Transforme olmuş tütünlerin yaklaşık 1 ay sonra oluşturduğu kallus ve sürgünler	25
Şekil 2.8. Sera ortamında aday transgenik bitkiler	26
Şekil 2.9. Köklendirme ortamındaki bitkilerin yaklaşık 4-6 hafta sonraki görüntüsü	26
Şekil 2.10. Higromisin primerleriyle yapılan PCR'ın elektroforez sonucu	28
Şekil 2.11. VirD primerleriyle yapılan PCR'ın elektroforez sonucu	29
Şekil 3.1. a) Ko-kültivasyondan sonra bitki yaprakları b) Fazla bakteriyi uzaklaştırmak için sıvı MS ile yıkama işlemi	30
Şekil 3.2. Yıkama işlemi sonrası kurutma kağıdı üzerinde bitki yapraklarının kurutulması ..	31
Şekil 3.3. AGO7 geninin ICE-Synthego aracı kullanılarak yapılan mutasyon kontrolü sonuçları	32
Şekil 3.4. Sera ortamında yetişen transgenik tütün bitkisi.....	33
Şekil 3.5. CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak tütün bitkilerinde hedeflenen gen düzenlemesi a, transgenik olmayan doğal bir tütünün T0 bitkisi b, tütün bitkisinde AGO7'nin hedeflenmiş mutajenezi	34

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. pKI1.1R plazmiti AarI enzimle kesim protokolü	16
Tablo 2.2. pKI1.1R AarI Kesim Ürünü NanoDrop ölçüm bilgileri	18
Tablo 2.3. pKI1.1R AarI Kesim Ürünü NanoDrop ölçüm bilgileri	18
Tablo 2.4. sgRNA Primerlerinin Çift İplikli Yapılması için gerekli koşullar.....	18
Tablo 2.5. Çift iplik yapılan gRNA'ların AarI enzimi ile kesim yapılan pKI1.1R plazmitine ligasyon için gereken bileşenler	19
Tablo 2.6. Çift iplik yapılan gRNA'ların AarI enzimi ile kesim yapılan pKI1.1R plazmitine ligasyon için gereken koşullar.....	19
Tablo 2.7. Tampon 1	19
Tablo 2.8. Tampon 2	19
Tablo 2.9. Koloni PCR için kullanılan bileşenler	21
Tablo 2.10. Koloni PCR koşulları.....	21
Tablo 2.11. Koloni PCR için kullanılacak bileşenler ve miktarları	24
Tablo 2.12. Koloni PCR koşulları.....	24
Tablo 2.13. PCR için kullanılacak olan bileşenler ve miktarları	27
Tablo 2.14. PCR Koşulları	28
Tablo 2.15. PCR bileşenleri ve miktarları	29
Tablo 2.16. PCR koşulları	29

1. GİRİŞ

Gıda güvenliğinin sağlanması, günümüzde hızla artan dünya nüfusunun karşı karşıya olduğu en önemli zorluklardan biridir. 2050 yılına kadar 9,6 milyar kişiye ulaşması beklenen dünya nüfusu ile birlikte, ürünlere olan küresel talebin 2005 yılına göre %100-110 oranında artacağı tahmin edilmektedir. Tarımsal kaynakların giderek tükenmesiyle birlikte, ürün kalitesi, besin içeriği, hastalık direnci ve stres toleransı ile verim gibi özellikleri geliştirilmiş yeni çeşitler geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. İklim değişikliği, artan biyotik ve abiyotik stresörler, azalan ekilebilir alanlar ve yetersiz su kaynakları karşısında hızla artan nüfusun beslenme ihtiyaçlarını karşılamak, tarımsal üretimi artırmak ve sürdürülebilir tarımsal kalkınmayı teşvik etmek için bitki ıslahı uygulamalarında yeniliklere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda birçok biyolojik mekanizma deşifre edilerek, genetik ve epigenetik faktörlerin rolü aydınlatılarak bitkisel ürünlerin gelişimine katkıda bulunulmuştur.

Bitki yetiştiricileri ve bitki bilimciler, çevresel stres faktörlerine karşı bitki tepkilerinin altında yatan genetik mekanizmaları incelemektedir. Son zamanlarda bitkilerde birçok yeni gen ve bunların düzenleyici yolları tanımlanmıştır (Cao ve Li, 2018). Verimi artırmak, seçkin çeşitler geliştirmek ve mahsullerin kalitesini iyileştirmek için, önemli tarımsal özelliklerle ilişkili genlere odaklanan bir "elit çeşitle elit çeşitlerin melezlenmesi" stratejisi uygulanmaktadır. Bununla birlikte, elde edilen ürünün kalitesini artırmak için klasik bitki yetiştirme stratejileri kullanılarak elit çeşitlerin geliştirilmesi çalışmaları hem zor hem de zaman alıcıdır.

Mahsulün iyileştirilmesine yönelik geleneksel ıslah araştırmalarının bir parçası olan mutant ıslahı, mutajen kimyası ve radyasyon kullanılarak mutajenezin neden olduğu, doğada doğal olarak meydana gelen genetik varyasyonlara dayanmaktadır (Songstad et al., 2017). Ayrıca, sınırlı miktarda doğal genetik varyasyon ve yapay mutajenez yöntemlerinde indüklenmiş mutasyonların rastgele ortaya çıkması, düşük verim ve zaman, yavaşlık ve maliyet gibi bariz dezavantajlar vardır (Puchta & Fauser, 2013). Ancak, modern genom düzenleme teknikleri, yabancı bir genin genomun önceden belirlenmiş bir bölgesine tam olarak entegrasyonuna ve mevcut bir allelin alternatif bir allel ile tam olarak değiştirilmesine olanak sağlamaktadır (Feng et al., 2013).

Modern ıslah yöntemleriyle tarımsal verimliliği artırmak, küresel alanda gıda güvenliği ve artan nüfus için gerekli üretim için temel bir hedeftir. Hem biyotik hem de abiyotik stres faktörleri, ürün kalitesini etkilediği kadar ürün verimini de

etkilemektedir ve bu stres faktörlerine karşı geliştirilmiş uyarlanabilirlik, geliştirilmiş verimlilik ve geliştirilmiş performans, etkinlik ve dayanıklılık ile ürünler geliştirmek çok önemlidir.

Yeni nesil dizileme ile birlikte desteklenen modern OMICS yaklaşımları ve genom düzenleme araçlarındaki en son gelişmeler, genomik mühendislik çalışmaları için bu yeni yolların yanı sıra hedeflenen mutagenезin yolunu açmaktadır. Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleaz (TALEN), çinko parmak nükleaz (ZFN) ve meganükleaz (MN) gibi çeşitli genom düzenleme yöntemleri, bitki bilimcilerinin bitkilerde istenen genleri manipüle etmesine izin vermektedir. Ancak bahsi geçen bu yöntemler pahalı ve zahmetlidir. Ayrıca, başarılı bir genom düzenlemesi için karmaşık prosedürler gerektirmektedir (Gupta & Musunuru, 2014; Harrison et al., 2014).

Bu yöntemlerden farklı olarak, CRISPR/Cas9, spesifik ve verimli bitki genom düzenlemesi için çekici, tasarımı kolay, uygun maliyetli ve esnek bir araçtır (Xu et al., 2020). Son zamanlarda bu sistem, tek nükleotid değişimi, poligenik düzenleme, genin susturulması ve bitkide gen ifadenin düzenlenmesi dahil olmak üzere hedeflenen mutagenез için etkili bir uygulama olarak ortaya çıkmıştır. Bu sebepten dolayı ise, CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme uygulamaları, bitkilerin geliştirilmesi için büyük bir potansiyele sahiptir. Hibridizasyon, mutasyon, transgenik yetiştirme ve seçici yetiştirme, modern tarımda mahsulleri geliştirmek için kullanılan başlıca yöntemlerdir. İstenilen allellerin melezleme yapılarak, yani geleneksel ıslah yöntemleri kullanılarak aktarılmaya çalışması çok uzun süreler almaktadır. Buna ek olarak, binlerce yıldır yapılmakta olan melezleme araştırmaları ve çalışmaları sonucunda bitkilerin genomlarında homozigotluk artmış, genetik varyasyon büyük ölçüde azalmış ve yapılan bu uygulamaların sonucu olarak ihtiyaç duyulan birçok özelliğin geliştirilme potansiyelinin önüne geçilmiştir. Ancak, mutasyon ıslahı çalışmalarında kimyasal ya da fiziksel mutantların kullanılarak oluşturulan rastgele mutasyonların sayesinde daralan genetik çeşitlilik genişletilmiştir (Pacher & Puchta, 2017). Bu prosedürler, verimli fenotiplerin üretilmesini ve çok sayıda mutasyon için taranmasını zorlaştıran rastgele yapılara sahip olmasından dolayı zordur. Bunun gibi uzun, zahmetli ve hedefi belirlenmemiş ıslah uygulamalarında seleksiyonun etkinliğini artırmak için markör destekli ıslah yöntemleri kullanılmış olsa bile, tarımsal üretimin artan taleplerini karşılamak için yeterli değildir (Scheben et al., 2017).

Son yıllarda, tarımsal ürünleri iyileştirmek için hızlı, verimli ve teknik olarak yeni çeşitlerin geliştirilmesini mümkün kılan genom düzenleme teknolojileri ortaya çıkmaktadır. Daha da önemlisi, “genomu düzenlenen” çeşitler, geleneksel yetiştirme teknolojisi kullanılarak yetiştirilen transgenik olmayan çeşitlerden ayırt edilememektedir. Genom düzenleme aynı zamanda fonksiyonel genomu incelemek için son derece değerli bir araçtır (Songstad et al., 2017).

Faydalı özellikleri içerisinde barındıran genetiği değiştirilmiş (GD) ürünler, bilinen işlevlere sahip genlerin (transgenler) ya da genetik faktörlere sahip genlerin elit çeşitlere aktarılmasıyla elde edilmektedir. Bununla birlikte, genetiği değiştirilmiş bitkilerin kullanımı, çevre güvenliği ve küresel sağlık konusundaki endişelerden etkilenmektedir. GD mahsullerin arzu edilen özellikleri nedeniyle hızla benimsenmesiyle birlikte, insan ve çevre için biyogüvenliği korumaya yönelik devlet düzenleyici politikaları geliştirilmiş ve belirli bir maliyetle belirlenmiştir. Sonuç olarak, GD bitkilerin özelliklerinden dolayı faydalı olsa da az sayıda bitkinin büyümesine izin verilmektedir (Prado et al., 2014). Gen transferi yöntemlerinin kullanılarak eksojen genlerin elit çeşitlere aktarılmasıyla birlikte istenilen özelliklerin elde edilmesi üreme izolasyonu darboğazını kırabilme potansiyeli bulunmaktadır. Fakat, transgenik mahsullerin ticarileştirilmesi, zaman alıcı ve maliyetli süreçlerle birlikte kamu endişesi ile sınırlıdır.

1.1. Tütün

Tütün (*Nicotiana tabacum L.*), gıda harici kullanım alanında dünyanın en fazla üretilen ve yapraklarının kullanıldığı tek yıllık bitkidir. Dünyada genelinde yaklaşık 3,6 milyon hektarlık bir alan içerisinde 6,7 milyon ton tütün, tütün üretiminde dünyada 15. sırada yer alan Türkiye’de ise 99.528 hektarlık alanda üretilen 93.665 ton tütün ile diğer doğu tütün üreticisi ülkelerle aynı pazar payına sahiptir. (Anonim, 2021a). Tütünün küresel anlamda ekonomik değerinin 756 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir ve bunun yaklaşık olarak 400 milyar doları tütün ürünlerinin üzerindeki vergileri içermektedir (Anonim, 2021).

Ülkemizde toplam değeri yaklaşık 1,34 milyar TL olan tütün üretiminin %66 'sı Ege Bölgesi, %15 'i Güneydoğu Anadolu'da ve %10 'u Karadeniz Bölgesi'nde geriye kalan %9 'luk pay ise Marmara, Doğu Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinde üretilmektedir. İhracat verilerinin incelenmesiyle birlikte; zirai ürünlerin içerisinde tütünün döviz getirisi fındıktan hemen sonra gelmektedir. Türkiye'nin 2017 yılındaki tütün ihracatı 352 milyon dolar değerinde 51.000 ton olarak gerçekleşti

(SEYDİÖĞÜLLARİ & Veriler). Dünya çağında tütünün üretim istatistiklerine bakıldığında Türkiye'nin önemli bir hacime sahip olduğu anlaşılmaktadır. Dünyanın önde gelen tütün üreticilerinden biri olan Türkiye, üretilen tütün miktarları farklılık gösterse dahi üretici konumunda olan ülkeler arasında ilk sırada yer almaktadır. Ülkemizde her yıl giderek artan nüfus ile birlikte tütün ve tütünden elde edilen ürünlerin tüketiminin arttığı ve buna bağlı olarak tütün üretiminin ulusal ve uluslararası arzı karşılamak üzere arttığı görülmektedir (Çamaş et al., 2009).

Önemli derecede ekonomik değere sahip tütün için yapılmak istenen farklı ıslah çalışmaları için yerel çeşitlere ve gen bankaları gerekmektedir. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO), tütün ürünlerindeki nikotin düzeylerini 0,3-0,5 mg/g oranında düşürmeyi planlayarak bağımlılık düzeyinin altına çekmeyi hedeflemektedirler (Anonim, 2015). Bu ve bu duruma benzer uygulamalar dolayısıyla tütün üreten ülkelerin sahip oldukları tütün genotiplerindeki varyasyonları tanımlaması ve karakterize etmesi son derece önemlidir.

1.2. Hücre Fonksiyonu

Hücresinin içerisinde var olan belirli bazı bileşenler genetik bilgi içermektedir. Hücresinin kontrol merkezi olan çekirdekte, hücredeki genlerin birçoğu bulunmaktadır. Çekirdek içerisinde bulunan deoksiribonükleik asit (DNA) kromozomlar şeklinde düzenlenmektedir. İçerisinde genetik bilgiyi taşımakta olan bu yapılar DNA molekülü içeren ve içerisinde birkaç protein içeren kromatin yapılarını oluşturmaktadır. Kromatin ismi verilen bu kompleks yapılar ayrı ayrı yoğunlaştırılmış kromozomlar olarak ifade edilebilmektedir (Reece et al., 2014). Canlı hücrelerde yapılmak istenen gen düzenleme işlemleri, bir takım zorluklar doğurmaktadır. Gen mutasyonları, gen fonksiyonlarını incelemek adına önemlidir. Çoğu önemli biyolojik mekanizma doğal mutajenik ajanlar sebebiyle araştırılmıştır. Bu duruma ek olarak; tesadüfi meydana getirilen bir mutagenез, istenmeyen mutasyonlara yol açmasından dolayı uygulamaları sınırlı olmaktadır (Luo et al., 2015). Fakat ters genetik çalışmalarında gen fonksiyonlarını araştırabilmek için uygulanabilirliği bulunmaktadır (Griffiths et al., 2000).

1.3. Genom Düzenleme Sistemi Mekanizmaları

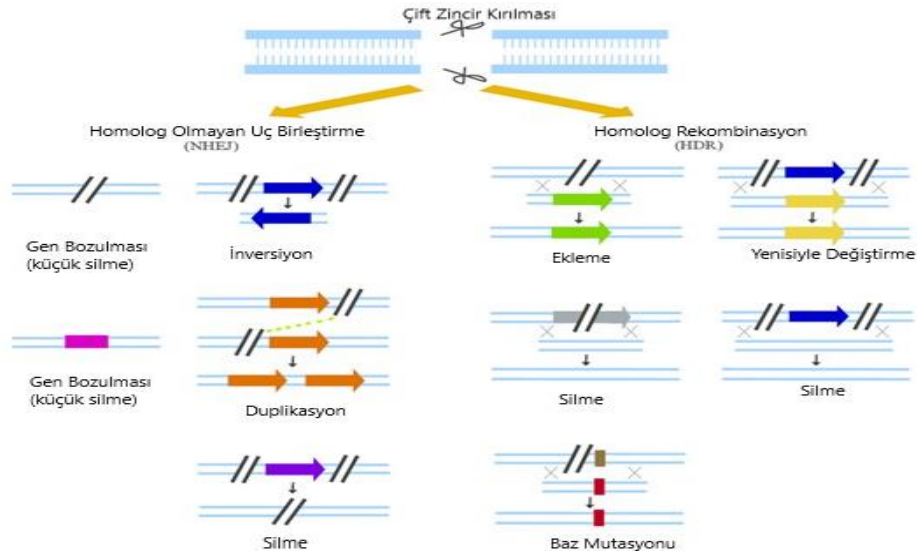
Genomun düzenlenmesi, bir organizmanın genomunun belirli bölgelerinde hedeflenen mutajenez veya bu bölgeye özel olarak eklemeler, silmeler ve değiştirme gibi modifikasyonları gerçekleştirebilen teknolojileri ifade etmektedir. Genom düzenleme uygulamaları, bölgeye spesifik DNA çift zincirli yapıların bozulmasıyla

birlikte (DSB'ler), bu bozulmaların diğer yollara göre hataya daha fazla yatkın olan homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ya da homolog kılavuzlu onarım (HDR) yolu ile hatasız olarak onarılmasına dayanmaktadır. Bitkilerde gerçekleşmekte olan çift sarmallı DNA kırıkları (DSB'ler), homolog onarım kılavuzuna gereksinim duyulmadan çeşitli enzimler kullanılarak homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ'ler) yöntemiyle gerçekleştirilmektedir (Şekil 1.1) (Puchta, 2005).

Ökaryotlarda hücre döngüsü süre zarfında meydana gelmesi ve DNA onarımının rasgele olmasından dolayı tamir oranının doğruluğu oldukça düşüktür (Mladenov & Iliakis, 2011). NHEJ uygulamasının hataya meyilli olmasından kaynaklı olarak, nükleotid eklenmesine ya da silinmesine yol açması ve bu duruma ek olarak belirlenen çift zincir DNA kırıkları bölgelerinde sekansın değişmesine sebebiyet vermektedir. Çoğu durumda, NHEJ tarafından üretilen ekzonlardaki eklemelerin veya silinmelerin (indel), yanlış veya anlamsız mutasyonlara yol açabilme olasılığından dolayı, genin işlevinin tamamıyla ortadan kaybolmasına neden olabilmektedir. Bugüne kadar gerçekleştirilen çoğu genom modifikasyon çalışmasında gen susturma uygulaması için NHEJ yolu kullanılmıştır (Mladenov & Iliakis, 2011).

HDR yoluna homolog olan bir dizi, DNA çift zincir kırılmalarını (DSB'ler) onarmak için hata payı içermeyen şablon olarak görev yapmaktadır (Puchta, 2005). HDR, nükleotit dizilerinin hatasız olarak değiştirilmesi ya da bir onarım şablonu olarak ekzojen bir donör DNA aracılığıyla hedeflenen bölgelerdeki genleri değiştirmek veya bu bölgelere gen eklemek için kullanılabilir. Hücre döngüsünün S/G2 aşamalarında gerçekleşmekte olan HDR 'nin bitkilerde daha zor olmasından kaynaklı olarak düşük verimlilik özelliğiyle NHEJ'den ayrılmaktadır (Puchta, 2005).

Genomu bir bütün ve doğruluk payı yüksek şekilde değiştirmek amacıyla organizmaların DNA onarım mekanizmalarından faydalanılarak DSB üreten araçlar kullanılabilmektedir. Bugüne kadar, çinko parmak nükleazı (ZFN'ler), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler), CRISPR ve CRISPR ile ilişkili protein 9 (CRISPR/Cas9), CRISPR/Prevotella ve Francisella 1 CRISPR (CRISPR /Cpf1) dahil olmak üzere hedeflenen bölgeye yönelik olarak çift zincirli kırılma (DSB) üretimi için önde gelen dört adet genom modifikasyon aracı bulunmaktadır. Genellikle bu yaklaşımlar, hedef dizide DNA zincir kırıkları oluşturmak ve ek olarak nükleaz alanına bağımlı dizi özgüllüğünü yakalayabilmek için bir DNA-bağlama alanından oluşan diziye özgü bir nükleaz (SSN) kullanılmaktadır (Zhang et al., 2017).



Şekil 1.1. NHEJ ve HDR'ye dayalı potansiyel genom düzenleme sonuçlarına genel bakış (Mei vd., 2016)

1.4. Çinko Parmak Nükleazlar (ZFN)

Çinko Parmak Nükleazları (ZFN), bitki genomlarında modifikasyon yapabilmek için ilk olarak 2005 yılında genom düzenleme aracı olarak kullanılmıştır (Lloyd et al., 2005). Spesifik bir Çinko Parmak DNA bağlama domaini ile birlikte tip II restriksiyon endonükleaz FokI 'den oluşturulan bir DNA kesim domaininin birleştirilmesiyle ZFN 'ler meydana getirilmektedir (Kim et al., 1996). Çinko Parmak Nükleazlar üç ya da altı adet çinko parmak motifini içermekle birlikte 9 – 18 baz çifti içeren bir DNA uzunluğunu spesifik olarak tanıyabilmektedir. FokI nükleazını DNA 'nın iki çift zincirli yapısını kesebilme işlemini yapabilmesi için dimerize olması gerekmektedir (Şekil 1.2). Bundan dolayı, DNA 'nın çift zincirini kesip DNA kırığı (DSB) gerçekleştirebilmek için çift ZFN tasarlanması gerekmektedir (Bitinaite et al., 1998). Dimerizasyon işleminin gerçekleşebilmesi için ayrı ayrı iki adet ZFN 'nin forward ve reverse zincirlerine bağlanması gerekmektedir. Ayrıca bu iki hedef bölgenin 5 – 7 baz çifti uzunluğunda boşluk (spacer) ile ayrılması gerekmektedir. ZFN 'nin ticari anlamda alınması pahalı olmasıyla birlikte tasarımlarının ve montajlarının teknik açıdan zor olmasından kaynaklı olarak yaygın olarak kullanılması kısıtlanmıştır (Ramirez et al., 2008).

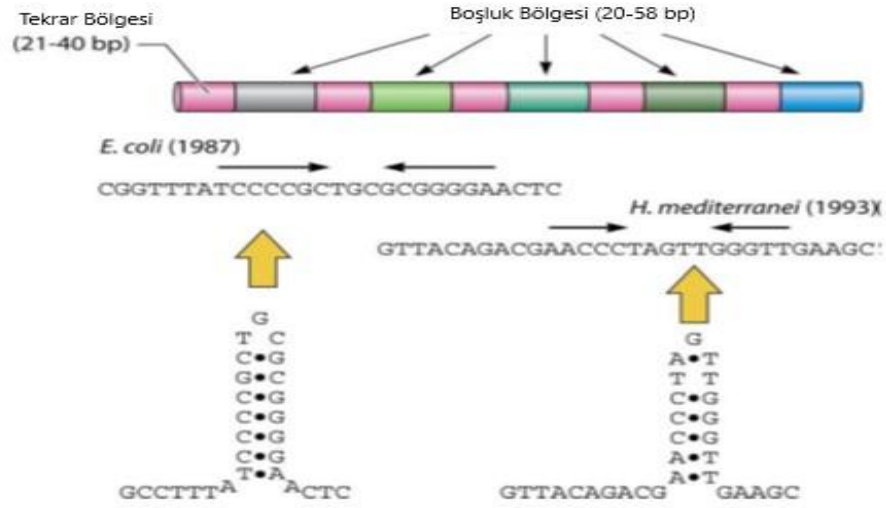
1.6. CRISPR/Cas9

Son yıllarda birçok organizma üzerinde hedeflenen genlerin ifadenmesi ve istenilen gen modifikasyonlarının yapılabilmesi için ZFN ve TALEN'lerden farklı olarak genom düzenleme aracı olan CRISPR/Cas9 sistemi bulunmuştur (Alagoz et al., 2016; Feng et al., 2013). Bulunan bu sistem birçok organizmada çok güçlü ve uygulanabilirliği en yüksek düzenleme sistemi olarak benimsenmiştir. CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi, hedef DNA'ya, protospacer bitişik motifine (PAM) ve PAM sekansına bağlanabilir ve bu motifi takip eden üçüncü ve dördüncü bazlar arasında kesebilmekle birlikte 20 nükleotit uzunluğundaki sentetik kısa gRNA sekansını tespit edebilmektedir ve Cas9 nükleaz enziminde yer almaktadır (Jinek et al., 2012). Cas9 nükleaz enziminin RuvC benzeri domaini ve HNH domaini olmak üzere iki alanı vardır ve her iki alan da tek bir DNA sarmalını kesebilmektedir. CRISPR/Cas9 sisteminin çalışma prensibinin açıklığa kavuşturulmasından sonra bitki ve hayvanlarda genom modifikasyon araştırmalarının geniş kapsamlı uygulamaları görülmüştür. Genom düzenleme araştırmasını yürütmek için kurulmuş temel bir bitki genom modifikasyonu yapabilen küçük bir laboratuvar da bile, CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenlemede gerekli olan basit yöntemler gerçekleştirilebilir. Kullanım kolaylığı açısından, CRISPR/Cas9 teknolojisi, ZFN'ler ve TALEN'lere kıyasla son yıllarda bitki genomu düzenleme araştırmalarında en yaygın kullanıma sahiptir (Jiang et al., 2013).

1.7. CRISPR/Cas9 Keşfi

CRISPR/Cas9, prokaryotik organizmalarda tanımlanan DNA tekrarlayan dizileridir. CRISPR ve CRISPR ile ilişkili (Cas) proteinler, arkea ve bakterilerin adaptif bağışıklık sistemleri tarafından plazmitlere ve fajlara karşı koruma sağlamak için kullanılır.

İlk CRISPR'ler, 33 yıl önce alkalın fosfataz izozim dönüşümünden sorumlu geni incelerken *Escherichia coli*'de keşfedilmiştir (Şekil 1.4) (Ishino et al., 1987). CRISPR'ler, 1993'te arkelerde, özellikle *Haloferax mediterranei*'de keşfedilmiştir (Mojica & Rodriguez-Valera, 2016). Jansen, çeşitli bakteri ve arkelerde çok sayıda özdeş yapı keşfettikten sonra 2002 yılında CRISPR terimini ortaya atmıştır (Jansen et al., 2002).



Şekil 1.4. CRISPR'ın yapısal özellikleri (Ishino vd., 2018)

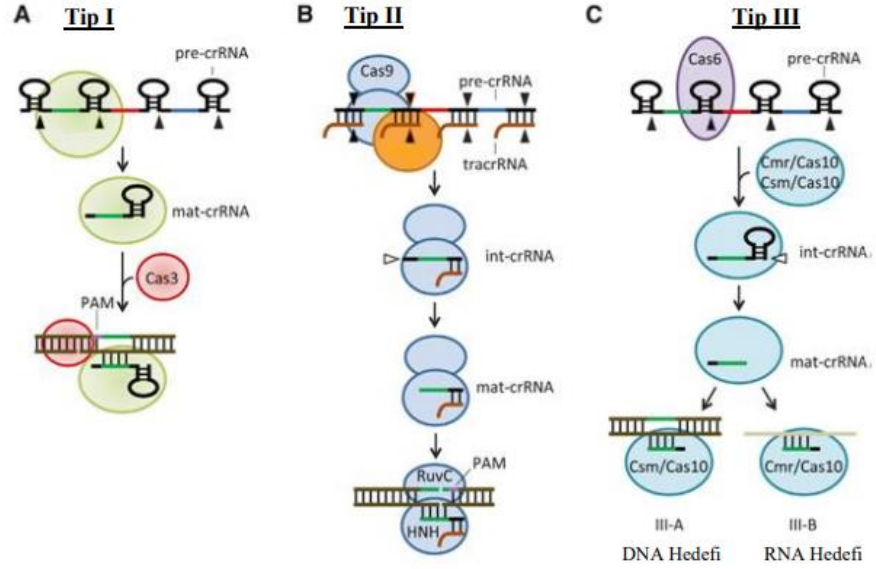
Bu korunmuş dizilerin işlevlerini ve rollerini anlamak çok önemlidir. 2000'li yılların başında CRISPR ayırıcı bölgeleri ile bakteriyofajlar, arkeal virüsler ve plazmidler arasındaki sekans benzerliklerinin keşfi, CRISPR'ın bir bağışıklık sistemini temsil edebileceği fikrini gündeme getirmiştir. (Mojica et al., 2005), daha sonra CRISPR yapısının ve bununla ilişkili proteinin bağışıklık savunma yeteneklerine sahip olabileceğini ve viral önlemede önemli roller oynayabileceğini öne sürmüştür.

1.8. Farklı CRISPR/Cas9 Sistemleri

Belirli nükleazların varlığına bağlı olarak Cas proteinini CRISPR/Cas sistemlerini üç türe ayırılır: tip I, tip II ve tip III. Cas1 ve Cas2 proteinleri, her üç CRISPR/Cas sisteminde de bulunur (Makarova et al., 2011). crRNA'ya bağlanan ve bölünmeyi başlatan efektör kompleksi, CRISPR/Cas sistemleri arasında değişiklik gösterir. Tip I sistem hem bakterilerde hem de arkelerde her yerde bulunur ve Cas3 proteininin endonükleaz aktivitesi yardımıyla DNA dizilerini hedefler. Sadece bakterilerin tip II CRISPR/Cas sistemine sahip olduğu bildirilmiştir. Cas9, bu sistemdeki Cas1 ve Cas2'ye ek olarak nükleazdır. Cas9, pre-crRNA'yı crRNA'ya dönüştürebilen ve ardından hedef lokasyonda bölünmeyi tetikleyebilen çok işlevli bir proteindir (Şekil 1.5).

Protospacer bitişik motiflerinin (PAM'ler) dahil edilmesi ve tracrRNA'nın DNA bölünmesine dahil edilmesi, tip II sisteminin farklı yönleridir. Tip II, yalnızca dört protein seti (Cas1, Cas2, Cas9 ve Cas4/Csn2) gerektiren en temel sistemdir. RAMP'lere ek olarak Cas10 ve Cas6 proteinlerinin dahil edilmesi, tip III sistemi ayırt eder. CrRNA işleme ve DNA bölünmesinde yer alan Cas10 proteini. CrRNA işlemeye

Cas6 ve diğer RAMP proteinleri de yardımcı olur. Bu sistem, bakterilerde de tespit edilmiş olmasına rağmen, arkelerde en sık görülür. Genel olarak, bu bulgular bakteri ve arkea'nın CRISPR/Cas sisteminin mekanik ve işlevsel çeşitliliğini göstermektedir (Makarova et al., 2011).



Şekil 1.5. CRISPR/Cas9 sistem tiplerinin crRNA biyogenez ve hedeflendirme mekanizması (Barrangou ve Marraffini, 2014)

1.9. Bitkilerde Genom Düzenleme İçin Kullanılan CRISPR/Cas9 Vektörleri

Diğer hayvan model sistemlerinde olduğu gibi hedef hücrede Cas9 ve sgRNA ekspresyonu bitki genomlarını değiştirmek için yeterlidir. Bitkiler, bitkiye özgü bir RNA polimeraz III promotörü olarak *AtU6* (Arabidopsis), gRNA ve Cas9 ekspresyonu için *TaU6* (Buğday) ve *OsU6* veya *OsU3* (Pirinç) kullanır. gRNA ve Cas9 varyantlarının üretimi için ticari vektörler veya bitkilerde genom düzenleme için Cas9 mevcuttur. Addgene, 30'dan fazla boş gRNA klonlama sitesi içeren bir ikili vektör sistemi sunan, kar amacı gütmeyen küresel bir vektör kaynağıdır. Bu kaynağa ek olarak, Takara ve Genscript gibi ticari işletmeler, CRISPR ikili vektör sistemleri sağlar (Jaganathan et al., 2018).

1.10. Bitki Islahında CRISPR/Cas9 Uygulamaları

İklim değışikliğı ve dünyanın hızlı nüfus artışı, dünya ölçeğinde tarımsal üretkenliğı ve gıda güvenliğini etkileyen iki önemli sorundur (Scheben et al., 2017). Çeşitli biyotik stresörler (bakteriler, virüsler, mantarlar, böcekler, nematodlar vb.) ve abiyotik stresler (kuraklık, tuz, sıcak, soğuk, sel vb.) mahsul üretkenliğini engeller ve küresel gıda güvenliğini tehlikeye atar. Mahsul çiftçileri, iklime dayanıklı, strese dayanıklı, daha kaliteli ve verimli mahsuller yaratmaya çalışıyor. Sonuç olarak, CRISPR/Cas9 sistemi, birçok önemli agronomik özelliğın oluşumunda kilit rol oynayan bitki genlerinin işlevsel genomik çalışmasında geniş bir uygulama yelpazesi sunar. Özellikle belirli genlerin susturulması, hastalık direnci, çeşitli abiyotik streslere karşı tolerans, besin kullanımı ve verim artışı gibi daha iyi özellikleri destekleyebilir. Sonuç olarak, CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme, bitki ıslahı için önemli bir umut vaat ediyor (Zaidi et al., 2016).

1.11. CRISPR/Cas9 Sisteminin Avantajları

CRISPR/Cas9'un bir genom düzenleme yöntemi olarak tanıtılmasından önce, ZFN'ler ve TALEN'ler en sık kullanılan genom düzenleme teknolojileriydi. ZFN ve TALEN hedeflemesi, DNA bağlayıcı proteinlerin DNA dizisi tanımasına dayanır, ancak CRISPR/Cas9 teknolojisi, yeni bir RNA kılavuzlu hedefleme stratejisi kullanır. CRISPR/Cas9 teknolojisi, bu yeni yaklaşımın bir sonucu olarak önceki genom düzenleme teknolojilerine göre daha uyarlanabilir, geliştirmesi ve devreye alması daha kolay ve daha ucuz olduğunu göstermiştir. Bilimsel topluluğun ZFN'leri ve TALEN'leri genom düzenleme araçları olarak yaygın şekilde kullanmasının önündeki en büyük engellerden biri, protein tasarımı ve üretiminin karmaşıklığı ve zorluğudur. gRNA tabanlı mutasyon üretimi ise hedef DNA dizisi ile basit bir Watson-Crick bazı eşleşmesine dayanır ve yeni bir hedefi saptamak için sgrna'daki sadece 20-nt'nin değıştirilmesi gerekir (Samanta et al., 2016).

Birden fazla gende mutasyona sahip bitkilerde, tek gen mutasyonları oluşturmanın faydalarına ek olarak, CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak büyütülebilir. Çeşitli mutasyonlara sahip bitkiler yaratma kapasitesi, gen ailesi üyeleri ile farklı genetik yollar arasındaki epistatik bağlantıları incelemek ve bunların işlevlerini belirlemek için çok önemlidir. Çok sayıda gende mutasyon oluşturmak için ZFN veya TALEN kullanmanın verimsiz, emek yoğun ve zaman alıcı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, CRISPR/Cas9'un çeşitli lokuslarda ve çeşitli genleri hedefleyen

birçok grnada yüksek verimli multipleks vektörler oluşturmak için kullanılabileceği ortaya çıkmıştır (Cong et al., 2013; Li et al., 2013; Mali et al., 2013; Qu et al., 2013).

Bir ila dört gRNA modülüne sahip bir vektör seti, yakın zamanda bitkilerde multipleks genom düzenleme için bir araç olarak oluşturulmuştur (Xing et al., 2014). Bu vektörün mısır ve Arabidopsis bitkilerinde multipleks genom düzenlemesi için kullanılması dikkate değer bir etkinlik ve özgüllük sergilemiştir (Xing et al., 2014). Aynı anda çok sayıda gRNA barındıran vektörler de benzer şekilde büyük kromozomal silmeler oluşturmak için kullanılabilir (Zhou et al., 2014). CRISPR/Cas9 teknolojisi, etkili multipleks genom düzenlemesi yapma kapasitesine ek olarak, bitki genom mühendisliğindeki çeşitli zorlukları da çözmüştür. CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisi kullanılarak, birkaç bitki türünde homozigot mutant çizgiler tek bir nesilde oluşturulabilir (Zhang et al., 2014).

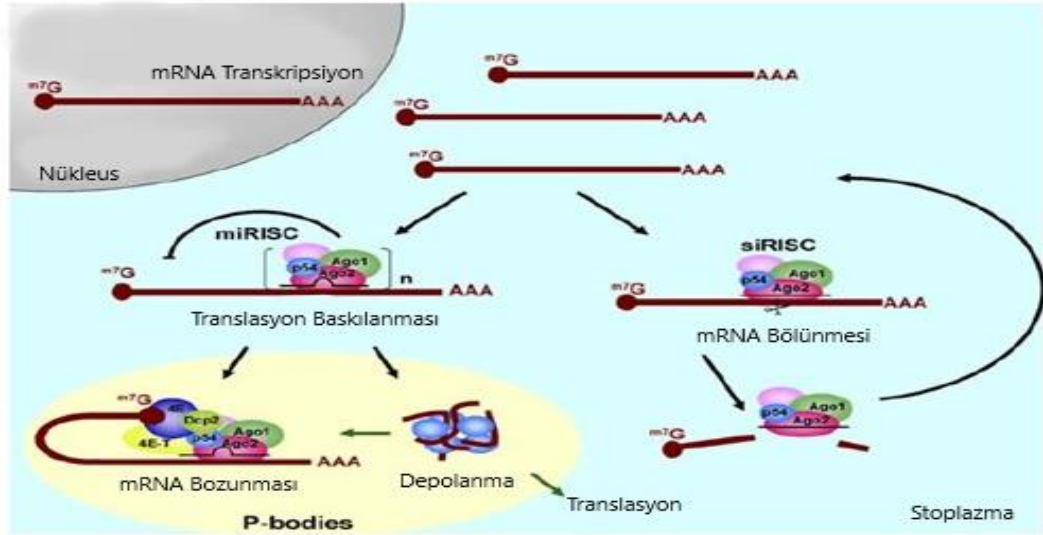
CRISPR/Cas9 tarafından üretilen DSB'ler, belirli "nakavt" genlerin HDR aracılı düzenlemesine izin veren umut verici bir araçtır; CRISPR/Cas9 aracılı HDR, birden fazla kuruluş tarafından rapor edilmiştir (Puchta & Fauser, 2014). CRISPR/Cas9 araştırmasının mevcut odak noktası, genom düzenlemenin özgüllüğünü ve verimliliğini anlamaktır. CRISPR/Cas9 verimliliği, hedef alanın düzenine, konumuna ve uygunluğuna göre belirlenir; Chip-Seq çalışması, sgRNA güdümlü Cas9'un tercihen açık kromatin bölgelerine bağlandığını ortaya çıkardı (Kuscu et al., 2014; Wu et al., 2014). CRISPR/Cas9 teknolojisini kullanırken dikkate alınması gereken bir diğer faktör de hedef dışı mutasyonların yaratılmasıdır. Bununla birlikte, bitkilerde tam genom dizileme analizleri, geri çaprazlama ile ortadan kaldırılacak, yalnızca birkaç hedef dışı değişiklik bulunmuştur (Zhang et al., 2014).

1.12. AGOS7

Pek çok ökaryotta, Argonaute ailesinin en az bir üyesi küçük RNA'larla birleşmektedir ve mRNA bölünmesini katalize etmektedir (Tomari & Zamore, 2005). Argonaute proteinleri, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunan çok alanlı proteinlerdir (Hall, 2005). Bu protein ailesi, hem PAZ hem de PIWI alanlarının varlığı ile karakterize edilmektedir (Cerutti et al., 2000). Ökaryotlarda RNA susturulmasındaki rolleri iyi bilinirken, prokaryotlardaki işlevleri daha az belirlenebilmiştir (Hall, 2005). Argonaute proteinleri, RNA susturma yollarının efektör kompleksindeki anahtar bileşenleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Hutvagner & Simard, 2008).

Bitki ve hayvan hücrelerinde, belirli AGOS7 (AGO7) proteinlerinin, çok sayıda RNA bozunma enziminin yoğunlaştığı P-cisimleri adı verilen sitoplazmik odaklarda biriktiği belirtilmiştir (Pomeranz et al., 2010). RNA interferans, Dicer adı verilen bir RNase III enzimi tarafından çift zincirli RNA'nın küçük engelleyici RNA'lara (siRNA) kesilmesi ile başlamaktadır. Bu siRNA'lar daha sonra, bir multiprotein-RNA nükleaz kompleksi olan, RNA- indükleyici baskılama kompleksine (RISC) bağlanır. RISC, siRNA'ları komplementer mRNA'yı bulmak için kullanır ve hedef mRNA'yı endonükleolitik olarak keser. Neticede spesifik mRNA'nın azalması uygun proteinlerin azalmasına yol açar (Şekil 1.6.). mRNA Ökaryotların çoğunda, stres granülleri olarak adlandırılan ikinci bir ribonükleo protein granül seti bulunmaktadır. Bunlar, çevrilmemiş mRNP'lerin sitoplazmik kümelerini temsil eder ve mRNA'ların depolama, yeniden başlatma veya P cisimlerine transfer yoluyla bozunma için hedeflendiği sıralama bölgeleri olarak hizmet ettikleri öne sürülmüştür (Erickson & Lykke-Andersen, 2011). Oluşumları ısı, oksidatif veya UV stresi gibi stres koşulları altında meydana geldiğinden dolayı, deformasyon poli-some'ların yoğun bir şekilde parçalanmasıyla tetiklenmektedir. P-cisimleri, mRNA bozunma makinesinin bileşenlerini içerirken, stres granülleri, transkripsiyon başlatma makinesinin bileşenlerini içermektedir. Bitkilerde, bu proteinlerin antiviral savunma, heterokromatin düzenlemesi ve büyüme ve gelişmenin düzenlenmesi gibi çeşitli biyolojik süreçlere katıldığı gösterilmiştir (Hutvagner & Simard, 2008).

Küçük RNA'lar, çok çeşitli ökaryotlarda gelişimsel zamanlamayı ve morfogenezini düzenlemektedir. Yaprak morfolojisinin genetik analizi, ilk *argonaute* (AGO) geninin klonlanması da dahil olmak üzere, RNA sessizleştirmenin diğer bazı yönlerinin keşfedilmesine de yol açmıştır (Bohmert et al., 1998). AGO proteinleri küçük RNA'ları bağlar ve küçük RNA kılavuzluğunda düzenleyici değişiklikleri etkilemektedirler. Tüm kara bitkilerinde birkaç miRNA gen ailesi korunmaktadır (Cuperus et al., 2011) ve bu ailelerin çoğundan gelen miRNA, gelişim programlarını kontrol eden TF'leri bastırmaktadır ve bu durum da AGO-miRNA-TF devrelerinin, kara bitki evriminin başlarında bitki gövdesi için çekirdek düzenleyici ağlara gömüldüğünü düşündürmektedir (Rubio-Somoza & Weigel, 2011).



Şekil 1.6. miRNA ve siRNA'yı içeren insan RISC fonksiyonu için bir model (Chu ve Rana, 2006)

Arabidopsis thaliana genomu, stres direnci, virüslere ve transpozonlara karşı savunmada işlev gören 10 adet AGO genini içermektedir (Zhang et al., 2015). AGO7 ve AGO 10 son derece özelleşmiştir ve her birinin sınırlı adaksiyel ve vasküler ifadesi (Chitwood et al., 2009) ve ayrıca sırasıyla miR390 ve miR166 olmak üzere tek bir ana bağlanma partneri bulunmaktadır (Montgomery et al., 2008; Zhu et al.). AGO7, TAS3 kodlamayan transkriptlerinden aşamalı siRNA'ların üretimini tetiklemektedir (Allen). ARF3, ARF4 ve muhtemelen ARF2 üzerindeki etkiler, AGO7/TAS3/SGS3/RDR6/DCL4 yolunun ana çıkış yönü olarak karşımıza çıkmaktadır (Adenot et al., 2006). AGO7 eyleminin, taşıRNA hareketinin gelişmekte olan yaprak primordiasında kademeli bir birikim modeli oluşturacak şekilde TAS3 taşıRNA'ların üretimini sınırladığı düşünülmektedir (Chitwood et al., 2009; Schwab & Voinnet, 2009). Bu gradyan, polaritenin sağlam bir şekilde korunmasına katkıda bulunabilecek karşıt bir gradyan veya keskin bir sınır oluşturarak ARF hedef mRNA'nın modellenmesine katkıda bulunur (Skopelitis et al., 2012). TAS3 yolu, yosun (Plavskin et al., 2016), mısır (Dotto et al., 2014), domates (Yifhar et al., 2012), nilüfer (Yan et al., 2010) ve yonca (Zhou et al., 2013) dahil olmak üzere şimdiye kadar incelenen tüm bitkilerde yaprak gelişiminde önemli rollere sahiptir.

Bu çalışmada; tütün bitkisinde bulunan AGO genlerinin tespit edilmesi ve CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak AGO7 geninin susturulması amaçlanmıştır. Yapılan çalışma, sistemin uygulanabilirliği ve bu genin tanımlanması, ilgili moleküler mekanizmaların aydınlatılabilmesin için yapılacak olan çalışmalar katkıda bulunacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali ve Doku Kültürü Ortamının Hazırlanması

Transformasyon uygulamalarında eksplant olarak, model bir organizma olan tütün bitkisinin (*Nicotiana tabacum*) *Petite havana* çeşidi kullanılmıştır. Tohum sterilizasyonu için, 2 ml'lik mikrosantrifüj tüp içerisine alınan *Petite havana* tohumları üzerine %20'lik sodyum hipoklorit kullanılıp 20 dk boyunca sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyonun gerçekleştiği 20 dakikalık süre içerisinde 5'er dakika ara ile alt üst edilen mikrosantrifüj tüpü içerisinde bulunan tohumlar, sterilizasyon tamamlandıktan sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlanan steril destile su ile 5-6 kez yıkanmıştır. Sterile edilen tütün tohumları çimlendirme işleminin yapılması için pH: 5.8'e ayarlanan ve içerisinde (MS (4,4 g/L) + Sükroz (30 g/L) + Fitajel (2,8 g) pH:5,8) bulunan ortama ekilmiştir. MS besiyerine ekilen tütün tohumları, 25 °C' de 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanan fotoperiyotta bitki büyütme kabini içerisinde çimlendirilmeye bırakılmıştır. Transformasyon gerçekleştirilene kadar bitkiler 20-25 gün arayla yeni hazırlanan MS besi ortamına aktararak alt kültüre alınmıştır.

2.2. Kullanılan Bakteri Suşları ve Plazmidler

Gen aktarım uygulamalarında *Escherichia coli* (*Dh5α*) ve *Agrobacterium tumefaciens* (*AGL1*) bakteri suşu ile pKIR1.1 (Şekil 2.1) (Addgene plazmit # 85808) plazmiti kullanılmıştır.

2.3. Besi Ortamı Bileşenleri ve Kullanılan Stok Solüsyonlar

Deneylerde kullanılmış olan besiyer içerikleri ve hazırlanma aşamaları, kullanılan stok solüsyonlar Ek 2'de belirtilmiştir.

2.4. Bitki İfade Vektörünün Oluşturulması

2.4.1. gRNA Dizaynı

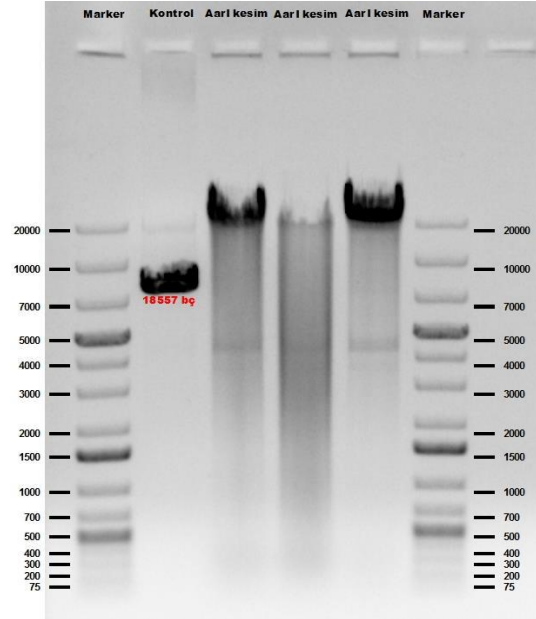
NCBI blast aracı kullanılarak *Arabidopsis thaliana*'ya ait *AGO7* geninin nükleotit sekanslarının tütün bitkisindeki homoloğu bulunmuştur. Bulunan homolog tek kopya gen *NtAGO7* olarak tanımlanmıştır. gRNA dizaynı, Benchling (<https://www.benchling.com/>) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *NtAGO7* geninin hedefleyen iki adet gRNA'lar GC içerikleri gen üzerindeki lokasyonları ve hedef dışı olasılıklara göre tasarlanmıştır.

2.4.2. AarI Enzimi ile pKI1.1R Plazmitinin Kesimi ve Defosforilasyonu

Tablo 2.1. pKI1.1R plazmiti AarI enzimile kesim protokolü

Hazırlanan karışım PCR cihazında 37°C'de 6-7 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra hızlı bir şekilde tüpler buz üzerine alınır. Kesim ürünleri üzerine 1 µl FastAP tamponu ve 1 µl FastAP enzimi eklenerek PCR 37°C'de 10 dakika, 75°C'de 5 dakika, 4°C'de sonsuz olacak şekilde ayarlanıp kesim ürünleri

defosforile edilmiştir. Kesim ürününden ve kontrol plazmitten 3 µl ve %1 SDS içeren 6x loading dye'den 3 µl alınarak bir tüpte karıştırılır. Kesim işleminin kontrolü için karışım %0.4'lük Agaroz jelde 90 voltta 45 dakika yürütülür (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. pKI1.1R (18.557 bp) plazmidinin AarI enzim kesimi

2.4.3. *AarI* Enzimi ile Kesilen pKI1.1R Plazmitinin Jelden Ekstraksiyonu

“NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up” (MG) kiti kullanılarak jelden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Bisturi yardımı ile uv ışık altında kesim yapılan plazmit 1.5'lik ependorf tüpe alınıp tartılmıştır. Her 100 mg agaroz jel için %2 buffer NTI eklenmiştir. 50 °C'de agaroz jel tamamen çözünene kadar bekletilmiştir ve bu süreçte 2-3 dakikada bir hafifçe vortekslenmiştir. Çözündükten sonra örnekler NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column'a transfer edilmiştir. 11,000 x g'de 30 s santrifüj edildikten sonra koleksiyon tüpünde kalan sıvı atılmıştır. NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column'a 700 µl NT3 buffer eklenerek 11,000 x g'de 30 s santrifüj edilerek koleksiyon tüpünde kalan sıvı atılmıştır. Bu adım tekrarlanmıştır. Koleksiyon tüpü içerisinde buffer NT3 kalıntısını tamamen uzaklaştırmak için NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column'a 700 µl NT3 buffer eklenerek 11,000 x g'de 60 s santrifüj edilmiştir. NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column 1.5 ml'lik steril ependorf tüpüne alınmıştır. Üzerine 50 µl nükleaz free su eklenerek 11,000 x g'de 60 s santrifüj edilmiştir. Elde edilen plazmitin konantrasyonu NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer'de ölçülmüştür.

Tablo 2.2. pKI1.1R AarI Kesim Ürünü NanoDrop ölçüm bilgileri

Örnek Adı	260/280	260/230	DNA Konsantrasyonu
pKI1.1R AarI Kesim Ürünü	2.06	2.18	56 ng/μl

2.4.4. sgRNA Primerlerinin Çift İplikli Yapılması

Tasarlanan gRNA'lar tek iplikli primer olarak sentezlettirilmektedir. Bu primerler klonlamada kullanılabilmesi için çift iplikli hale getirilmelidir. Sentezleme sırasında eğer defosforile sentez edilmemiş ise T4 Polynucleotide Kinase enzimi ile defosforil edilerek aşağıdaki protokol takip edilir.

Tablo 2.3. pKI1.1R AarI Kesim Ürünü NanoDrop ölçüm bilgileri

Bileşenler	Miktar
Oligomer FWD (100 μm)	1 μl
Oligomer RVS (100 μm)	1 μl
10x T4 Ligaz Buffer (Thermo)	1 μl
Nükleaz	6.5 μl
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μL) (Thermo)	0.5 μl
Toplam	10 μl

Tablo 2.4. sgRNA Primerlerinin Çift İplikli Yapılması için gerekli koşullar

Sıra	Sıcaklık	Süre
1	37 °C	30 dakika
2	95 °C	5 dakika
3	Sıcaklığın düşürülmesi	Her 5 derecede 1 dakika
4	25 °C	5 dakika
5	4 °C	Store

2.4.5. gRNA'nın pKI1.1R Vektörüne Ligasyonu

pKI1.1R plazmitine çift iplikli gRNA'ların ligasyonu için aşağıdaki protokol kullanılmıştır (Tablo 2.5 ve Tablo 2.6).

Tablo 2.7. Çift iplik yapılan gRNA'ların AarI enzimi ile kesim yapılan pKI1.1R plazmitine ligasyon için gereken bileşenler

Bileşenler	Miktar
pKI1.1R Plazmit (AarI kesim ürünü)	3 µl (50ng)
gRNA çift iplikli yapıları (250 kat seyreltilmiş)	1 µl
10x T4 Ligaz Buffer (Thermo)	2 µl
Nükleaz	6.5 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
Toplam	10 µl

Tablo 2.8. Çift iplik yapılan gRNA'ların AarI enzimi ile kesim yapılan pKI1.1R plazmitine ligasyon için gereken koşullar

Sıra	Sıcaklık	Süre
1	22 °C	30 dakika
2	4 °C	1 gece

2.5. Ligasyon Ürününün *E. Coli* Bakterisine Transformasyonu

2.5.1. Kompetan *E. Coli* Dh5a Bakterilerinin Hazırlanması

Kompetant *E.coli*'nin hazırlanabilmesi için ilk olarak tablo 2.7. ve tablo 2.8. de gösterilen tampon 1 ve tampon 2 çözeltileri hazırlanmıştır.

Tablo 2.9. Tampon 1

Bileşenler	Miktar
Potasyum Asetat	30 mM
RuCl ₂	100 mM
CaCl ₂	10 mM
Gliserol	8.6 ml
dH ₂ O	50 ml'e tamamlanır
Filtre ile steril edilerek 4 °C'de depolanır.	

Tablo 2.10. Tampon 2

Bileşenler	Miktar
MOPS	10 mM
RuCl ₂	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Gliserol	8.6 ml
dH₂O	50 ml'e tamamlanır

Tampon 2 50 ml'ye tamamlanıp iyice çözündürüldükten sonra pH'sı KOH çözeltisi ile 6.5' ayarlanıp filtre sterilizasyonu yapılmıştır. Escherichia coli (*E. coli*) DH5a bakterisi gliserol stoğundan 50 µl alınarak LA içeren petri kaplarına çizgi ekim

tekniki ile ekimi yapılmıştır. Oluşan tek kolonilerden alınarak 10 ml LB besi ortamı içeren 50 ml'lik falkona ekimi yapıldı ve 16 saat 37 °C 200 rpm'de 1 gece boyunca bakterilerin büyümesi için inkübatöre bırakıldı. Sabah saatlerinde bakteriler kültürden 2 µl alınarak 100 ml LB' ye ekimi yapıldı ve 37°C 200 rpm' de O.D600 0.4- 0.7 gelene kadar inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra 100 ml'lik erlendeki bakteri kültürünü 50 ml'lik iki falkona bölüp 15 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra 4°C'de 5 dk 3500 rpm'de santrifüj yapılarak bakterilere çöktürülür. Üst kısımda kalan sıvı dökülüp pellet üzerine buzda bekletilen tampon1'den 5 ml falkon tüpüne eklenir ve bakteri çözünene kadar pipetaj yapılmıştır. 4°C sıcaklıkta 5 dk boyunca 3500 rpm'de santrifüj yapılarak bakterilerin çöktürülme işlemi gerçekleştirilmiştir. Üstte kalan sıvı faz atıldıktan sonra üzerine buzda bekletilen tampon 2'den 2 ml her bir falkona eklenir ve nazikçe pipetaj yapılarak çözündürülmüştür. Son olarak 1.5 ml'lik ve soğutulmuş ependorf tüplere toplam hacim 100 µl' yi tamamlayacak şekilde bölünmüştür ve 30 dk boyunca buz içerisinde bekletilmiştir. Ependorf tüpler uygun bir kap içeresine alınarak sıvı azot ile dondurulmasından sonra -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.5.2. Ligasyon Ürününün *E. Coli* Transformasyonu

200 ml LA besi ortamı hazırlanarak otoklav yapılır ve sonrasında 100 mg/L spektinomisin eklenerek petrilere dökülmüştür. -80 °C'den çıkarılan kompetan *E.coli* bakterisi buz üzerinde 30 dk bekletilmiştir. 100 µl kompetan *E.coli* bakterisi ve 10 µl ligasyon ürünü 1.5 ml'lik ependorf tüpe eklenmiştir. Tüpün alt ucuna nazikçe 3-5 kez vurularak karışması sağlanmış ve 20-30 dk boyunca buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 42°C'ye ayarlanan su banyosu içerisinde 45 sn bekletilerek ardından hızlı bir şekilde buz üzerine alınmıştır. 2 dk inkübasyon sonrasında bakteriler 900 µl SOC besi ortamı içeren 2 ml'lik ependorf tüp içerisinde 37°C sıcaklıkta 60 dakika boyunca inkübasyon yapıldıktan sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı atılır ve pellet üzerine 100 µl LB eklenere pellet çözölmüştür. 100 mg/L LA besi ortamına bakteriler spreader yardımı ile yayılarak 37°C'de 17 saat inkübe edilmiştir ve süre sonunda oluşan koloniler gözlemlenmiştir.

2.5.3. Koloni PCR

Ligasyon ürününün *E. Coli*'ye transformasyonunun kontrolü için gelişen tek kolonilerden seçim yapılarak koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR bileşenleri tablo

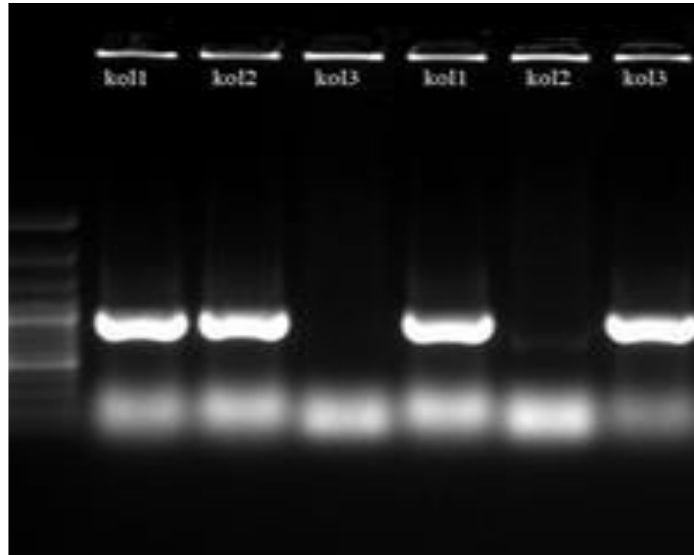
2.9.’da PCR koşulları ise 2.10. ‘da gösterilmiştir. Transformasyonun kontrolü için karışım %0.4’lük Agaroz jelde 90 voltta 45 dakika yürütülür (Şekil 2.4.).

Tablo 2.11. Koloni PCR için kullanılan bileşenler

Bileşenler	Miktar
NEB 2x Taq DNA Master Mix	12.5 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
Nükleaz free su	10.5 µl
DNA (koloni pipet ucu ile bulaştırılmıştır)	-
Toplam	25 µl

Tablo 2.12. Koloni PCR koşulları

Sıra	Sıcaklık	Süre	
1	95 °C	3 dk	
2	95 °C	30 sn	30 döngü
3	55 °C	30 sn	
4	68 °C	1 dk	
5	68 °C	5 dk	
6	4 °C	store	



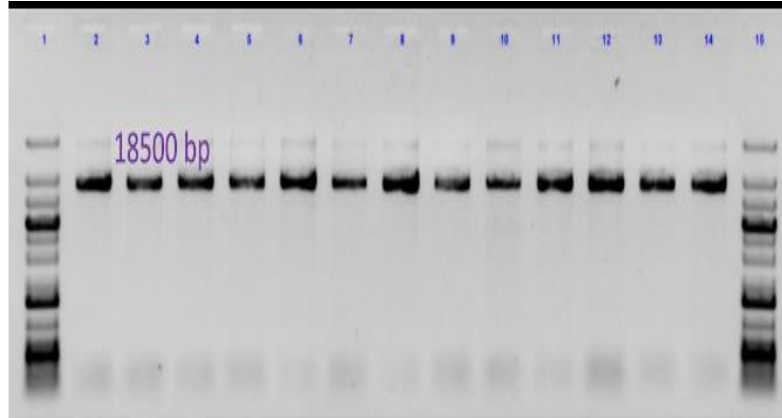
Şekil 2.4. pKI1.1R sekans primerleri ile yapılan koloni PCR sonucu

2.5.4. Plazmit Stok Hazırlanması

25 ml LB besi ortamı içeren steril falkon tüp içerisine koloni PCR ile doğrulaması yapılan kolonilerden alınarak ekim yapılmıştır. Tüpler 1 gece boyunca 37°C'de 220 rpm'de çalkalamalı inkübatör içerisinde büyümeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 5000 g'de 5 dk santrifüj edilerek bakterilerin çökmesi sağlanmıştır. Üstte kalan sıvı faz atıldıktan sonra 2 ml LB besi ortamı eklenerek pellet çözölmüştür. Çözöndükten sonra 500 µl olacak şekilde 2 ml'lik ependorf tüplere transfer edilmiştir. Tüpler tekrar aynı koşullarda santrifüj edilerek bakterilerin çökmesi sağlanmıştır. Pellet 200 µl LB besi ortamı ile çözölererek üzerine 800 µl steril gliserol eklenmiştir. Vorteks ile iyice karışması sağlanarak - 80 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.5.5. Plazmit İzolasyonu

PCR sonucu doğrulanan kolonilerden plazmit izolasyonu yapmak için, içerisine 100 mg/L Spectinomycin eklenmiş 10 ml sıvı LB besi ortamına bakteriler ekilerek 37 °C 200 rpm'de 1 gece boyunca büyümesi için inkübasyona bırakılmıştır. İzolasyon işlemi için Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep kit kullanılmıştır ve ilgili firmanın protokolü takip edilmiştir. Plazmitlerin konsantrasyonu için NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer kullanılarak ölçüm yapılmıştır ve daha sonra %0.4'lük agaroz jelde yürütölerek plazmitler kontrol edilmiştir (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. pKI1.1R-AGO7gRNA vektörünün sekans ile doğrulanması

Klonlanan gRNA'ların plazmit içerisine aktarılıp aktarılmadığını kontrol edilmesi için plazmid dizileme yapılmıştır. 100 ng/µl konsantrasyonda 30 µl hacimde hazırlanan plazmitler, CRISPR seq forward ve reverse primerleri kullanılarak hizmet alımı şeklinde sanger dizileme ile gerçekleştirilmiştir. NCBI Blast programı

kullanılarak dizilenen sekanslar ile gRNA'lar alignent yapılarak varlıkları kontrol edilmiştir.

2.6. pKI1.1R-AGO7 Vektörünün *Agrobacterium Tumefaciens*'e (AGL1)

Transformasyonu

2.6.1. Kompetan *Agrobacterium Tumefaciens* (AGL1) Bakterilerinin Hazırlanması

10 ml sıvı LB besi ortamına boş *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) ekimi yapılarak 28 °C sıcaklıkta 200 rpm de çalkalanarak 1 gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem sonunda büyüyen bakteriler 500 ml LB ortamına alınmıştır. OD600: 0.5-0.8'e gelene kadar 28 °C'de 250 rpm'de büyümeye bırakılmıştır. OD istenilen aralığa gelince buz üzerine alınmıştır. Daha sonra 10 dakika boyunca 4000 g'de 4 °C sıcaklıkta santrifüj işlemi yapılmıştır. Üstte kalan sıvı atıldıktan sonra kalan pelletin üzeri 10 ml distile soğuk su ile tamamlanıp ve yavaş bir biçimde pipetaj yapılarak pellet çözünmüştür. 500 ml soğuk su eklendikten sonra 10 dakika boyunca 4000 g'de 4 °C santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem iki tekrarlı olarak yapılmıştır. Süpernatant dökülerek kalan pellet üzerine 50 ml soğuk steril su eklenerek pipetaj yapılarak çözünmüştür. 4000 g'de 4 °C'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılarak kalan pellet üzerine 5 ml %10 luk soğuk distile gliserol ile çözündürülmüştür. Sıvı azotla soğutulmuş buz üzerine 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpler alınmıştır ve kompetant hücreler 50 µl olacak şekilde tüplere dağıtılmıştır. Son olarak üzerlerine sıvı azot dökülüp -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.6.2. Elektrokompetan *Agrobacterium Tumefaciens* (AGL1) Bakterilerine pKI1.1R-AGO7 Plazmitinin Transformasyonu

Elektroporasyon (Biorad) cihazı kullanılarak pKI1.1R-AGO7 plazmiti *A. tumefaciens* (AGL1) bakterilerine transforme edilmiştir. Bu işlemde kullanılacak olan küvetlerin daha önceden buz üzerine alınıp soğuması sağlanmıştır. Transformasyondan önce kompetan *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) çözünmesi için 30 dakika boyunca buz üzerinde bekletilmiştir. 1.5 ml hacimli ependorf tüplerine 50 µl bakteri ve 10 µl ligasyon ürünü eklenerek tüpün alt ucu nazıkçe 3-5 kez vurulmuş, bakteri ve plazmitin karışması sağlanmıştır. İşlem öncesi soğutulan Gene Pulser®/MicroPulser™ Electroporation Cuvettes, 0.1 cm gap küvetine içerisine karışım alınmıştır. Transformasyon Biorad Gene Pulser®/Micropulser™ cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Transformasyon işleminden sonra küvet üzerine 900 µl sıvı LB besi ortamı eklenip 2 ml'lik ependorf tüp içerisine alınmıştır. Inkübasyon 28°C'de 3

saat gerçekleştirilmiştir. Spektinomisin (100 mg/ml), carbenicillin (50 mg/ml) ve rifampisin(10 mg/ml) antibiyotikleri bulunan katı LB hazırlanmıştır. Ortam üzerine 100 µl bakteri spreader yardımı ile yayılarak 28 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir ve tek koloniler gözlemlenmiştir.

2.6.3. Koloni PCR

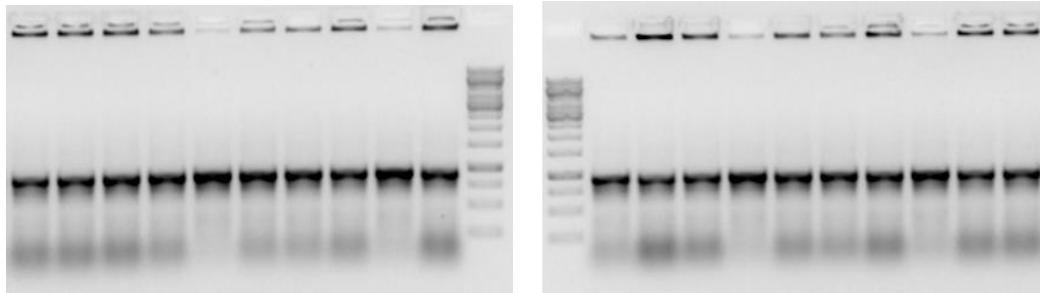
Transformasyon işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için tek kolonilerle seçim yapılarak PCR yapılmıştır. Koloni PCR bileşenleri çizelge 2.11.’de PCR koşulları ise 2.12. ‘de gösterilmiştir. PCR örnekleri kontrol için %0.4’lük Agaroz jelde 90 voltta 45 dakika yürütülerek görüntülüne yapılmıştır (Şekil 2.6.).

Tablo 2.13. Koloni PCR için kullanılacak bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
NEB 2x Taq DNA Master Mix	12.5 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
Nükleaz free su	10.5 µl
DNA (koloni pipet ucu ile bulaştırılmıştır)	-
Toplam	25 µl

Tablo 2.14. Koloni PCR koşulları

Sıra	Sıcaklık	Süre
1	95 °C	3 dk
2	95 °C	30 sn
3	55 °C	30 sn
4	68 °C	1 dk
5	68 °C	5 dk
6	4 °C	store



Şekil 2.6. pKI1.1R sekans primerleri ile yapılan koloni PCR sonucu

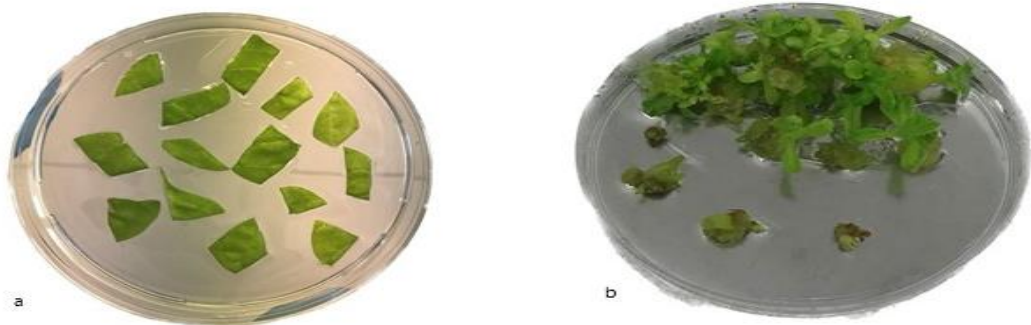
2.7. *Agrobacterium* Aracılığıyla Tütün Transformasyonu

2.7.1. *Agrobacterium Tumefaciens* (AGL1) Bakterilerinin Büyütülmesi

50 ml sıvı LB içersine karbenisilin (100 mg/l), spektinomisin (100 mg/l) ve rifamisin (10 mg/l) antibiyotikleri eklenmiştir. Bu ortam içersine AGO7 genimizi içeren *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) bakterileri eklenerek 28°C’de 200 rpm de 1 gün süresince büyütülmüştür.

2.7.2. *Agrobacterium Tumefaciens* ile Tütün Yapraklarının İnokülasyonu

Steril ortamda 2 ay boyunca büyütülen tütün yaprakları gen aktarım işleminde kullanılmıştır. 1 gün önceden ekimi yapılan bakteri ortamına 0.5-1 cm² çapında tütün yaprakları kesilerek inkübasyon için kültür içersinde 30 dakika bekletilmiştir. İnkuübasyon işlemi bittikten sonra katı MS (MS, BA(1mg/l), NAA (0.1mg/l)) ortamına bakterili tütün yaprakları aktarılmıştır. Petrilerin çevresi aliminyum folyo ile kaplanarak 3 gün süre boyunca karanlık ortamda büyümeye bırakılmıştır. Sonrasında fazla bakterilerin uzaklaştırılması için sıvı MS ortamına timentin (160 mg/L) eklendikten sonra yapraklar yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra eksplantların kurutulması için steril kurutma kağıdı üzerine alınmıştır. Kuruyan bitki eksplantları seleksiyon ortamına (katı MS (MS, BA(1mg/l), NAA (0.1mg/l), timentin (160mg/l), higromisin (50 mg/l))) aktarılmıştır. Rejenerasyonun gerçekleşmesi için bitkiler iklim kabini içersinde 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Gözlemler sonucunda gen aktarımı gerçekleşmiş olan sürgün adaylarının köklendirilmesini sağlamak üzere timentin (160mg/l) ve higromisin (50 mg/l) içeren köklendirme (MS) ortamına alınmıştır. Köklendirme ortamında yaklaşık 2 ay bekleyen bitkiler sağlıklı kök oluşumu gözlemlendikten sonra steril edilmiş toprak içeren saksılara alınarak serada olgunlaşmaya bırakılmıştır.



Şekil 2.7. a, Gen aktarımı gerçekleşmiş ve besi ortamında 2 gün inkübe edilmiş tütün eksplantları b. Transform olmuş tütünlerin yaklaşık 1 ay sonra oluşturduğu kallus ve sürgünler



Şekil 2.9. Köklendirme ortamındaki bitkilerin yaklaşık 4-6 hafta sonraki görüntüsü



Şekil 2.8. Sera ortamında aday transgenik bitkiler

2.8. Genom Düzenlenmiş Tütün Bitkilerinde Analizler

2.8.1. Tütün Bitkilerinden Genomik DNA İzolasyonu

Transgenik tütün bitkilerinde DNA analizi için DNA izolasyon kiti (Hibrogen, # MG-GDNA-01-50) kullanılmıştır. Kitin protokolüne uygun şekilde adımlar takip edilmiştir. Tütün bitkisinden alınan 100 g bitki örneği sıvı azot yardımı ile steril havanlarda homojenize edilmiştir ve daha sonra 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. İşleme başlamadan önce 60 °C'de bekletilmiş olan BL Tamponundan 650

μ l ve RNaz A'dan 10 μ l (10 mg/ml) tüp içerisine eklenmiştir. Etkin bir lizis aşaması olması için örnekler iyice vortekslenmiştir. Ardından 60 °C'de 20 dakika inkübasyona bırakılır ve bu süre boyunca 2-3 dakikada bir örnekler alt üst edilir. İnkübasyon süresi sonunda örneklerin üzerine 400 μ l BB tamponu eklenir ve homojen bir karışım için nazikçe alt üst edilir. 15 dakika boyunca oda sıcaklığında 1400 rpm'de santrifüj edilir ve sonrasında dikkatli şekilde pipet yardımıyla üst fazdan 400 μ l alınarak temiz 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. Üzerine 400 μ l BB tamponu eklenir ve yavaşça alt üst edilir. Homojen karışımdan 750 μ l alınarak kit içerisinde bulunan kolona transfer edilir. 1200 rpm'de 3 dk 4 °C'de santrifüj edilir ve toplama tüpüne biriken sıvı atılır. Kolon üzerine 500 μ l BY tamponu eklenir ve 1200 rpm'de 1 dk 4 °C'de santrifüj edilir. Toplama tüpüne biriken sıvı uzaklaştırılır. Bu basamak iki terkarlı olacak şekilde yapılır. Filtreli tüpün membranının tamamen temizlenmesi için hiçbir solüsyon eklenmeden boş bir şekilde 12000 rpm'de 3 dk oda sıcaklığında santrifüj edilir. Toplama tüpü içerisinde biriken sıvı ile birlikte atılır. Filtreli tüp steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınır ve membran üzerine 50 μ BTE tamponu eklenir. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilir ve 12000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir. İzole edilmek istenilen DNA tüplerdedir. Örnekler streç film ile sarılarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonu NanoDrop® ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) cihazında ölçülmüştür.

2.8.2. Higromisin Primerleri Kullanılarak PCR Kontrol

pKI1.1R-AGO7 vektörünün transgenik bitkilerde varlığının kontrolü için higromisin primerleri kullanılarak PCR işlemi yapılmıştır. Kullanılan plazmit içerisinde seçici direnç geni higromisin olduğu için transgenik bitkilerde higromisin varlığının olması istenmektedir. PCR içeriği ve PCR protokolü çizelge 2.13. ve 2.14. de verilmiştir. PCR örnekleri kontrol için %0.4'lük Agaroze jelde 90 voltta 45 dakika yürütülerek görüntülüne yapılmıştır (Şekil 2.10.).

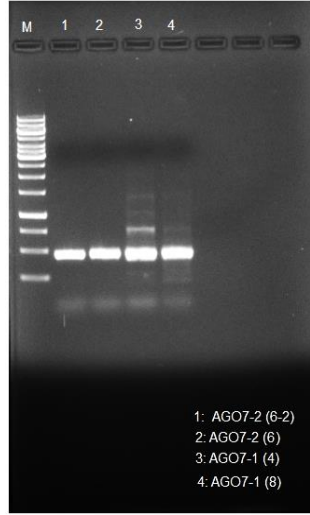
Tablo 2.15. PCR için kullanılacak olan bileşenler ve miktarları

Bileşeler	Miktar
DNA	1 μ l
5X Phusion HF Buffer	5 μ l
10 mM dNTPs	0.5 μ l
Higromisin Forward	1.25 μ l
Higromisin Reverse	1.25 μ l
Phusion DNA Polymerase	0.25 μ l

DMSO	0.75 µl
Nükleaz Free Su	15 µl
Toplam	25 µl

Tablo 2.16. PCR Koşulları

Sıra	Sıcaklık	Süre
1	98 °C	2 dk
2	98 °C	10 sn
3	61 °C	30 sn
4	72 °C	20 sn
5	72 °C	5 dk
6	4 °C	∞



Şekil 2.10. Higromisin primerleriyle yapılan PCR'ın elektroforez sonucu

2.8.3. VirD Primerleri Kullanılarak PCR Kontrol

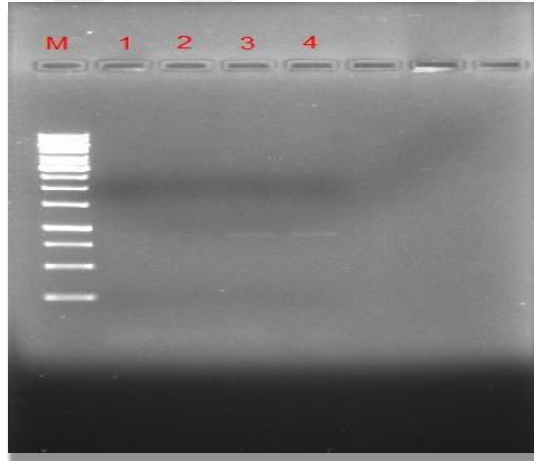
Higromisin primerleri ile yapılan PCR sonucu pozitif çıktıktan sonra varlığını gösteren vektörün; bakteri kontaminasyonundan kaynaklı olup olmadığının kontrolü için VirD primerleri kullanılarak PCR işlemi yapılmıştır. PCR içeriği ve PCR protokolü çizelge 2.15. ve 2.16. de verilmiştir. PCR örnekleri kontrol için %0.4'lük Agaroz jelde 90 voltta 45 dakika yürütülerek görüntülüne yapılmıştır (Şekil 2.11.).

Tablo 2.17. PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşeler	Miktar
DNA	1 µl
Taq 2X Master Mix	12.5 µl
VirD Forward	0.5 µl
VirD Reverse	0.5 µl
Nükleaz Free Su	10.5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 2.18. PCR koşulları

Sıra	Sıcaklık	Süre
1	95 °C	3 dk
2	95 °C	30 sn
3	55 °C	30 sn
4	68 °C	1 dk
5	68 °C	5 dk
6	4 °C	∞



Şekil 2.11. VirD primerleriyle yapılan PCR'ın elektroforez sonucu

2.8.4. Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Sekans ile Doğrulanması

Transgenik olduğu doğrulanan bitkilere, CRISPR/Cas9 sistemi ile hedef aldığımız gen bölgelerine uygun primerler ile PCR yapıldı. PCR ürünleri sanger dizileme ile dizilettiirildi. Sonuçlar, ICE-synthego programlarına yüklenerek kontrol ettirildi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Transgenik Tütün Hatlarının Üretilmesi

İlk olarak *A. Tumefaciens* (AGL1) suşu içerisine Biorad markasına ait elektroporasyon cihazı kullanılarak pKI1.1R vektörü transfer edilmiştir. Transformasyon sonrasında seçici antibiyotikler içeren katı YEB besi ortamı 28 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu oluşan kolonilerden seçim yapılarak koloni PCR ve ardından agaroz jel elektroforez yapılmıştır. Görüntüleme sonucunda pKI1.1R vektörüne sahip olan suşlar tütüne gen aktarımında kullanılmıştır.

AGO geninin bulunduğu pKI1.1R vektörünü içeren *A. tumefaciens* (AGL1) suşu seçici antibiyotikleri içermekte olan sıvı LB besi ortamında 28 °C’de 200 rpm’de büyütülmüştür. Steril laboratuvar koşullarında yetiştirilen tütün bitkisi steril kabin içerisine alınarak küçük parçalara ayrılmıştır ve *A. tumefaciens* (AGL1) ile birlikte bir beher içerisinde karıştırılarak muamele edilmiştir. Transformasyon sonrasında eksplantlar katı MS (MS, BA (1 mg/L), NAA (0.1 mg/L)) besi ortamına alınarak petrilerin etrafı alüminyum folyo ile sarılarak karanlık ortamda 3 gün boyunca ko-kültüvasyona bırakılmıştır. 3 günün sonunda eksplantlar üzerinde bulunan fazla bakteriyi uzaklaştırmak için timentin (160 mg/L) içeren sıvı LB besiyerinde yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi 2 kez tekrar edilmiştir. Yıkama sonrası bitki yapraklarının kuruması steril kurutma kağıtları üzerine alınmıştır. Bitki rejenerasyonunun gerçekleşmesi ve kallus oluşumu için eksplantlar timentin (160mg/l), higromisin (50 mg/l), BA(1mg/l) ve NAA (0.1mg/l) içeren katı MS ortamına alınmıştır. Bu süreçte gerekli olduğu yerlerde bitki besi ortamı yenilenmiştir.



Şekil 3.1. a) Ko-kültivasyondan sonra bitki yaprakları b) Fazla bakteriyi uzaklaştırmak için sıvı MS ile yıkama işlemi



Şekil 3.2. Yıkama işlemi sonrası kurutma kağıdı üzerinde bitki yapraklarının kurutulması

Yaklaşık olarak 5 hafta sonunda elde edilen bitkicikler kök oluşturması için higromisin (50 mg/L) ve timentin (160 mg/L) içeren MS besi ortamına alınmıştır. Kök oluşumu gözlendikten sonra transgenik bitkiler steril toprak bulunan saksılara ekimi yapılmıştır. Tütün bitkisinin üzeri poşetle örtülerek 3 gün boyunca Hoagland çözeltisi ile sulama yapılmıştır. Daha sonra poşetler çıkartılarak 24 °C’de fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan iklim odasında Hoagland çözeltisi ile sulama yapılarak bitkiler büyütülmüştür.

3.2. Transgenik T₀ Bitkilerinde Moleküler Analizler

Köklendirme ortamında yetişen transgenik T₀ bitkilerden örnekler alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA’lar kullanılarak AGO genine özgü primerlerle PCR yapılmıştır ve içerisinde AGO geninin bulunduğu hatlar tespit edilmiştir. Bu DNA’lar için sekanslama BM Laboratuvar Sistemleri (Ankara) firmasına hizmet alımı olarak yaptırılmıştır. DNA dizileme için Sanger yöntemi kullanılmıştır.

ICE-Synthego mutasyon analizi sonucunda AGO7 genini hedef alan gRNA’nın 4 bitkiden 1’inde çalıştığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.3. AGO7 geninin ICE-Synthego aracı kullanılarak yapılan mutasyon kontrolü sonuçları

3.3. Transgenik Tütün Bitkilerinde Fenotipik Analizler

Tütün bitkisinde gen mutasyonlarının CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak başarılı olup olamayacağını test etmek için *AGO* geninin ilgili eksonları hedef alınarak gRNA dizayn edilmiştir. *Agrobacterium* aracılı gen aktarım yöntemi kullanılarak bu genler tütün bitkisine aktarılmıştır. Transgenik tütün bitkisi ile kontrol tütün bitkisi arasında fenotipik ve morfolojik farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 3.4.). Bitki rejenerasyon süresi uzamıştır. Gen transfer edilen tütün bitkisi yapraklarında morfolojik farklılıklar gözlemlenmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.4. Sera ortamında yetişen transgenik tütün bitkisi



Şekil 3.5. CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak tütün bitkilerinde hedeflenen gen düzenlemesi
a, transgenik olmayan doğal bir tütünün T0 bitkisi b, tütün bitkisinde AGO7'nin
hedeflenmiş mutajenezi

4. SONUÇ

Klasik bitki ıslahı tekniklerinin daha fazla zaman, iş gücü, emek ve maddi kaynak gerektirmesi dolayısıyla minimum süre içerisinde etkili olabilecek alternatif bir çözümün gerekliliği ortaya çıkmıştır. Ayrıca küresel nüfustaki hızlı artış, iklim değişiklikleri, tarım arazilerinin azalması, biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin artması tarımsal üretim için önemli engeller arasında yer almaktadır. Tarımsal üretim ve gıda güvenliğinin, güvence altına alınması için biyotik ve abiyotik streslere daha fazla tolerans gösteren ürünlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada genom düzenleme teknolojileri, biyotik ve abiyotik stres koşulları altındaki ürünlerin yüksek verimde üretilmesine yardımcı olma potansiyeline sahip olup söz konusu teknolojilerden ZFN, TALEN ve CRISPR/Cas teknolojisi ile hedef lokusa ait DNA dizilerine ekleme, çıkarma, değiştirme ve modifikasyonlar yapılmasına imkan sağlanmaktadır.

SSN'lerle genom düzenleme hem temel hem de uygulamalı bitki biyolojisi araştırmaları için yeni fırsatlar sunan kritik bir tekniktir. CRISPR/Cas9 sistemi genom düzenleme için nispeten basit, uygun fiyatlı ve güçlü bir araçtır. CRISPR/Cas9 sisteminin özel bir avantajı, tek bir CRISPR dizisinde birden fazla sgRNA kullanılarak genom içindeki çeşitli hedeflerin aynı anda düzenlenmesini sağlamaktır. Bitkilerde CRISPR/Cas9 uygulanması tarımsal araştırmaların ön planındadır (Belhaj vd, 2015; Weeks vd, 2015).

Bu tez çalışmasında, CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak tütün bitkisinin genomunda hedeflenen bölgenin mutagenizi gerçekleştirilmiştir. *AGO7*'nin susturulması ve mutasyona uğratılması epidermiste hücre duvarı bileşenlerinin biriktirilmesine yol açmıştır. Yeniden modellenmesinde yer alan genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek organ morfogenezinin koordinasyonunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu değişikliklerle birlikte *AGO7* ile modüle edilen hatlarda gözlenen fenotipik değişikliklerin altında yatan hücre morfolojisinde gözlenen değişikliklere katkıda bulunabilir. Gelecekte, *AGO7*'nin yakın substratlarının tanımlanması, ilgili moleküler mekanizmalar anlamamıza ve gen işlevi çalışmalarını kolaylaştırmak için etkili bir araç olarak kullanılabilecektir.

KAYNAKÇA

- Adenot, X., Elmayan, T., Lauressergues, D., Boutet, S., Bouché, N., Gascioli, V., & Vaucheret, H. (2006). DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Current Biology*, 16(9), 927-932.
- Alagoz, Y., Gurkok, T., Zhang, B., & Unver, T. (2016). Manipulating the biosynthesis of bioactive compound alkaloids for next-generation metabolic engineering in opium poppy using CRISPR-Cas 9 genome editing technology. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Allen, E. Xie,, Gustafson, AM, and Carrington, JC (2005). MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 121, 207-221.
- Bitinaite, J., Wah, D. A., Aggarwal, A. K., & Schildkraut, I. (1998). Fok I dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10570-10575.
- Boch, J., & Bonas, U. (2010). Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual review of phytopathology*, 48, 419-436.
- Bogdanove, A. J., Schornack, S., & Lahaye, T. (2010). TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current opinion in plant biology*, 13(4), 394-401.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., & Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *The EMBO journal*, 17(1), 170-180.
- Çamaş, N., Çalışkan, Ö., Odabaş, M., & Ayan, A. (2009). Organik kökenli gübre dozlarının Esendal tütün çeşidinin verimi ve kalitesi üzerine etkileri. *Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi (19-22 Ekim 2009, Hatay) Bildirileri*, 251, 255.
- Cerutti, L., Mian, N., & Bateman, A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends in biochemical sciences*, 10(25), 481-482.
- Chitwood, D. H., Nogueira, F. T., Howell, M. D., Montgomery, T. A., Carrington, J. C., & Timmermans, M. C. (2009). Pattern formation via small RNA mobility. *Genes & Development*, 23(5), 549-554.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., & Marraffini, L. A. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- Cuperus, J. T., Fahlgren, N., & Carrington, J. C. (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant Cell*, 23(2), 431-442.
- Dotto, M. C., Petsch, K. A., Aukerman, M. J., Beatty, M., Hammell, M., & Timmermans, M. C. (2014). Genome-wide analysis of leafbladeless1-regulated and phased small RNAs underscores the importance of the TAS3 ta-siRNA pathway to maize development. *PLoS Genetics*, 10(12), e1004826.
- Erickson, S. L., & Lykke-Andersen, J. (2011). Cytoplasmic mRNP granules at a glance. *Journal of cell science*, 124(3), 293-297.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D.-L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., & Mao, Y. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell research*, 23(10), 1229-1232.
- Griffiths, A. J., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., & Gelbart, W. M. (2000). Quantifying heritability. In *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition. WH Freeman.

- Gupta, R. M., & Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *The Journal of clinical investigation*, 124(10), 4154-4161.
- Hall, T. M. T. (2005). Structure and function of argonaute proteins. *Structure*, 13(10), 1403-1408.
- Harrison, M. M., Jenkins, B. V., O'Connor-Giles, K. M., & Wildonger, J. (2014). A CRISPR view of development. *Genes & Development*, 28(17), 1859-1872.
- Hutvagner, G., & Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 22-32.
- 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.
- Jaganathan, D., Ramasamy, K., Sellamuthu, G., Jayabalan, S., & Venkataraman, G. (2018). CRISPR for crop improvement: an update review. *Frontiers in plant science*, 9, 985.
- Jansen, R., Embden, J. D. v., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., & Weeks, D. P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic acids research*, 41(20), e188-e188.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Jung, J. H., & Altpeter, F. (2016). TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol. *Plant molecular biology*, 92(1), 131-142.
- Kaya, H., Numa, H., Nishizawa-Yokoi, A., Toki, S., & Habu, Y. (2017). DNA methylation affects the efficiency of transcription activator-like effector nucleases-mediated genome editing in rice. *Frontiers in plant science*, 8, 302.
- Kim, Y.-G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1156-1160.
- Kuscu, C., Arslan, S., Singh, R., Thorpe, J., & Adli, M. (2014). Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nature biotechnology*, 32(7), 677-683.
- 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(8), 688-691.
- Lloyd, A., Plaisier, C. L., Carroll, D., & Drews, G. N. (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(6), 2232-2237.
- Luo, S., Li, J., Stoddard, T. J., Baltes, N. J., Demorest, Z. L., Clasen, B. M., Coffman, A., Retterath, A., Mathis, L., & Voytas, D. F. (2015). Non-transgenic plant genome editing using purified sequence-specific nucleases. *Molecular plant*, 8(9), 1425-1427.
- Mahfouz, M. M., Li, L., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., Fang, X., & Zhu, J.-K. (2011). De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with

- novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2623-2628.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Wolf, Y. I., & Yakunin, A. F. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467-477.
- 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.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., & Hinkley, S. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology*, 29(2), 143-148.
- Mladenov, E., & Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2), 61-72.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174-182.
- Mojica, F. J., & Rodríguez-Valera, F. (2016). The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *The FEBS journal*, 283(17), 3162-3169.
- Montgomery, T. A., Howell, M. D., Cuperus, J. T., Li, D., Hansen, J. E., Alexander, A. L., Chapman, E. J., Fahlgren, N., Allen, E., & Carrington, J. C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell*, 133(1), 128-141.
- Pacher, M., & Puchta, H. (2017). From classical mutagenesis to nuclease-based breeding—directing natural DNA repair for a natural end-product. In (Vol. 90, pp. 819-833): Wiley Online Library.
- Plavskin, Y., Nagashima, A., Perroud, P.-F., Hasebe, M., Quatrano, R. S., Atwal, G. S., & Timmermans, M. C. (2016). Ancient trans-acting siRNAs confer robustness and sensitivity onto the auxin response. *Developmental cell*, 36(3), 276-289.
- Pomeranz, M. C., Hah, C., Lin, P.-C., Kang, S. G., Finer, J. J., Blackshear, P. J., & Jang, J.-C. (2010). The Arabidopsis tandem zinc finger protein AtTZF1 traffics between the nucleus and cytoplasmic foci and binds both DNA and RNA. *Plant physiology*, 152(1), 151-165.
- Prado, J. R., Segers, G., Voelker, T., Carson, D., Dobert, R., Phillips, J., Cook, K., Cornejo, C., Monken, J., & Grapes, L. (2014). Genetically engineered crops: from idea to product. *Annu Rev Plant Biol*, 65(1), 769-790.
- Puchta, H. (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of Experimental Botany*, 56(409), 1-14.
- Puchta, H., & Fauser, F. (2013). Gene targeting in plants: 25 years later. *International Journal of Developmental Biology*, 57(6-7-8), 629-637.
- Puchta, H., & Fauser, F. (2014). Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *The Plant Journal*, 78(5), 727-741.
- Qu, Y., Zhang, N., Chang, J., Jin, X., Wen, Y., Si, H., & Wang, D. (2013). Cloning and functional analysis of light-inducible, and stem and leaf-specific expression promoter ST-LS1 in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 21(7), 828-837.

- Ramirez, C. L., Foley, J. E., Wright, D. A., Müller-Lerch, F., Rahman, S. H., Cornu, T. I., Winfrey, R. J., Sander, J. D., Fu, F., & Townsend, J. A. (2008). Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature methods*, 5(5), 374-375.
- Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. (2014). *Campbell biology* (Vol. 9). Pearson Boston.
- Rubio-Somoza, I., & Weigel, D. (2011). MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends in plant science*, 16(5), 258-264.
- Samanta, M. K., Dey, A., & Gayen, S. (2016). CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes. *Transgenic research*, 25(5), 561-573.
- Scheben, A., Wolter, F., Batley, J., Puchta, H., & Edwards, D. (2017). Towards CRISPR/Cas crops—bringing together genomics and genome editing. *New Phytologist*, 216(3), 682-698.
- Schwab, R., & Voinnet, O. (2009). miRNA processing turned upside down. *The EMBO journal*, 28(23), 3633-3634.
- SEYDİOĞULLARI, M., & Veriler, T. Ü. İ. Türkiye’de tütün üretimi ve alternatif politikalar.
- Skopelitis, D. S., Husbands, A. Y., & Timmermans, M. C. (2012). Plant small RNAs as morphogens. *Current opinion in cell biology*, 24(2), 217-224.
- Songstad, D., Petolino, J., Voytas, D., & Reichert, N. (2017). Genome editing of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36(1), 1-23.
- Tomari, Y., & Zamore, P. D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development*, 19(5), 517-529.
- Wu, X., Scott, D. A., Kriz, A. J., Chiu, A. C., Hsu, P. D., Dadon, D. B., Cheng, A. W., Trevino, A. E., Konermann, S., & Chen, S. (2014). Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nature biotechnology*, 32(7), 670-676.
- 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(1), 1-12.
- Xu, X., Hulshoff, M. S., Tan, X., Zeisberg, M., & Zeisberg, E. M. (2020). CRISPR/Cas derivatives as novel gene modulating tools: possibilities and in vivo applications. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3038.
- Yan, J., Cai, X., Luo, J., Sato, S., Jiang, Q., Yang, J., Cao, X., Hu, X., Tabata, S., & Gresshoff, P. M. (2010). The REDUCED LEAFLET genes encode key components of the trans-acting small interfering RNA pathway and regulate compound leaf and flower development in *Lotus japonicus*. *Plant physiology*, 152(2), 797-807.
- Yifhar, T., Pekker, I., Peled, D., Friedlander, G., Pistunov, A., Sabban, M., Wachsman, G., Alvarez, J. P., Amsellem, Z., & Eshed, Y. (2012). Failure of the tomato trans-acting short interfering RNA program to regulate AUXIN RESPONSE FACTOR3 and ARF4 underlies the wiry leaf syndrome. *The Plant Cell*, 24(9), 3575-3589.
- Zaidi, S. S.-e.-A., Tashkandi, M., Mansoor, S., & Mahfouz, M. M. (2016). Engineering plant immunity: using CRISPR/Cas9 to generate virus resistance. *Frontiers in plant science*, 7, 1673.
- Zhang, H., Xia, R., Meyers, B. C., & Walbot, V. (2015). Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Current opinion in plant biology*, 27, 84-90.
- Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., & Xu, N. (2014). The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant biotechnology journal*, 12(6), 797-807.

- Zhang, X., Wang, J., Cheng, Q., Zheng, X., Zhao, G., & Wang, J. (2017). Multiplex gene regulation by CRISPR-ddCpf1. *Cell discovery*, 3(1), 1-9.
- Zhou, C., Han, L., Fu, C., Wen, J., Cheng, X., Nakashima, J., Ma, J., Tang, Y., Tan, Y., & Tadege, M. (2013). The trans-acting short interfering RNA3 pathway and no apical meristem antagonistically regulate leaf margin development and lateral organ separation, as revealed by analysis of an argonaute7/lobed leaflet1 mutant in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 25(12), 4845-4862.
- Zhou, H., Liu, B., Weeks, D. P., Spalding, M. H., & Yang, B. (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic acids research*, 42(17), 10903-10914.
- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S., Liou, L., Barefoot, A., Dickman, M., & Zhang, X. 2011. The Arabidopsis Argonaute 10 specifically recruits miR166/165 to maintain shoot apical meristem. *Cell*, 145, 242-256.



Ek 1. Besi Ortamı Bileşenleri ve Kullanılan Stok Solüsyonlar

- 1.** 100 mg/ml Spektinomisin: 1gr spektinomisin 10 ml steril saf suda çözülerek filtre ile steril edilir. -20 °C’de 6-12 ay depolanabilir.
- 2.** 50 mg/ml Carbenicilin: 0,5 gr carbenicilin 10 ml steril saf suda çözülerek filtre ile steril edilir. -20 °C’de 6-12 ay depolanabilir.
- 3.** 10 mg/ml Rifamisin: 0,1gr rifamisin 10 ml DMSO’da çözülerek filtre ile steril edilir. -20 °C’de 6-12 ay depolanabilir.
- 4.** 30 mg/ml Gentamisin: 0,3 gr Gentamisin 10 ml steril saf suda çözülerek filtre ile steril edilir. -20 °C’de 6-12 ay depolanabilir.
- 5.** 50 mg/ml Higromisin 0,5gr higromisin 10 ml steril saf suda çözülerek filtre ile steril edilir. -20 °C’de 6-12 ay depolanabilir.
- 6.** 360 mg/ml Timentin: 3,6 gr timentin 10 ml steril saf suda çözülerek filtre ile steril edilir. -20 °C’de 6-12 ay depolanabilir.
- 7.** 2 mg/ml BA: 0,02 gr BA 10 ml steril saf suda çözülerek filtre ile steril edilir. -20 °C’de 6-12 ay depolanabilir.
- 8.** 2 mg/ml NAA: 0,02 gr NAA 10 ml steril saf suda çözülerek filtre ile steril edilir. 20 °C’de 6-12 ay depolanabilir.

ÖZ GEÇMİŞ

Ayşenur Efşan YARAR, Ordu Başöğretmen Anadolu Lisesi’ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji bölümünden 15.06.2019 tarihinde mezun oldu. 2020 yılında OMÜ LEE Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0003-3115-7943

Yayınlar:

1. Ayşenur Efşan YARAR, Musa KAVAS, Crispr/Cas9 sistemi kullanılarak Tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisinde AGO7 geninin susturulması, The 12th International Scientific Research Congress 12/2021, Çevrimiçi.