

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**DOMATESTE SU KULLANIM ETKİNLİĞİNİN CRISPR/CAS9 YÖNTEMİ İLE
ARTIRILMASI**

Nana Ama Bissawaa BISSAH

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2025

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**DOMATESTE SU KULLANIM ETKİNLİĞİNİN CRISPR/CAS9 YÖNTEMİ İLE
ARTIRILMASI**

Nana Ama Bissawaa BISSAH

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2025

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOMATESTE SU KULLANIM ETKİNLİĞİNİN CRISPR/CAS9 YÖNTEMİ İLE
ARTIRILMASI**

**Nana Ama Bissawaa BISSAH
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı tarafından
desteklenmiştir**

HAZİRAN 2025

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOMATESTE SU KULLANIM ETKİNLİĞİNİN CRISPR/CAS9 YÖNTEMİ İLE
ARTIRILMASI**

Nana Ama Bissawaa BISSAH
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 01/07/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nedim MUTLU (Danışman)

Prof. Dr. Yalçın KAYA

Doç. Dr. Hasan PINAR

ÖZET

DOMATESTE SU KULLANIM ETKİNLİĞİNİN CRISPR/CAS9 YÖNTEMİ İLE ARTIRILMASI

Nana Ama Bissawaa BISSAH

Yüksek Lisans, Tarımsal Biyoteknoloji

Danışman: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Haziran 2025; 110 sayfa

Domates (*Solanum lycopersicum*), dünya çapında önemli bir sebzedir. Ancak, giderek artan sıcak ve kurak koşullar altında sığ kök sistemi ve yüksek terleme ihtiyacı nedeniyle, su stresine karşı oldukça hassastır. Tarımsal sulamanın Türkiye'nin su rezervlerine önemli yük getirdiğinin bilinmesi, domates gibi tarımsal ürünlerin su kullanım verimliliğini (WUE) artırmak, verim istikrarını ve su kaynaklarının korunmasını sağlamak amacıyla bitki ıslah stratejilerinde bir zorunluluk haline gelmiştir. Bu çalışmada, CRISPR/Cas9 gen düzenleme sistemi, absisik asit (ABA) düzenlemesinden bağımsız olarak reaktif oksijen türleri (ROS) sinyal yolları aracılığıyla stoma kapanmasının düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen Rho benzeri bir GTPaz olan domates SIROP9 genini hedeflemek için kullanılmıştır. SIROP9'un ekson 4'ünü hedeflemek için yüksek spesifikliğe sahip bir kılavuz RNA (gRNA) tasarlanmış ve ikili vektör pco-Cas9'a klonlanmıştır. Yapı, *Agrobacterium tumefaciens* suşu EHA105'e başarıyla aktarılmış ve *Agrobacterium* aracılı transformasyon yoluyla domatese aktarılmıştır.

Çalışmada kullanılan 267 domates genotipi düşük rejenerasyon verimliliği ve glufosinat seleksiyonuna aşırı duyarlılık sergilese de, seçim koşulları optimize edilerek transgenik hatlar elde edilmiştir. PCR ve Sanger dizileme, dört farklı T₀ bitkisinde CRISPR kaynaklı mutasyonların varlığını doğrulamış, ve indel analizi, SIROP9 kodlama dizisini bozan hem biallelik hem de kimerik mutasyonların varlığını ortaya çıkarmıştır. T₀ bitkilerinden olgunlaşmamış meyvelerin embriyo kültürü yoluyla elde edilen T₁ bitkileri ve olgun meyvelerden elde edilen T₁ tohumları başarıyla çoğaltılmıştır. T₁ generasyonunda yapılacak mutasyon analizleri sonucu homozigot mutant bitkiler belirlenecek ve tohumları çoğaltılacaktır. Bu bitkilerden, Çalışma, SIROP9'da başarılı hedefli mutagenезin kanıtını sunarak, kuraklığa dayanıklılığı ve WUE'si iyileştirilmiş domates hatlarının geliştirilmesi için zemin hazırlamaktadır. SIROP9 mutasyonunun su kullanım verimliliği, kuraklığa dayanıklılık ve genel verimlilik üzerindeki işlevsel etkisini doğrulamak için daha fazla fizyolojik karakterizasyon, çok nesilli ve tekerrürlü saha denemeleri ve su kullanım parametreleri önerilmektedir.

ANAHTAR KELİMELE: *Agrobacterium* transformasyon, CRISPR/Cas9, Domates, Gen düzenleme, Kuraklık stresi, SIROP9, Stoma düzenleme, Su kullanım etkinliği

JÜRİ: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Yalçın KAYA

Doç. Dr. Hasan PINAR



ABSTRACT

IMPROVING THE WATER USE EFFICIENCY OF TOMATO CROPS USING CRISPR/CAS9 METHOD

Nana Ama Bissawaa BISSAH

MSc in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Nedim Mutlu

June 2025; 110 pages

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is a globally significant horticultural crop, yet its shallow root system and high transpirational demand render it highly susceptible to water stress, particularly under the increasingly hot and dry conditions characteristic of Mediterranean regions in Turkey. With the rate at which irrigation is putting a strain on Turkey's water reserves, improving the water use efficiency (WUE) of tomato has thus become a necessity in crop improvement strategies with the aim of ensuring yield stability and resource conservation. In this study, the CRISPR/Cas9 gene-editing system was employed to target the SIROP9 gene, a Rho-like GTPase that has been suspected to function in the regulation of stomatal closure through reactive oxygen species (ROS) signaling pathways independent of the regulation of abscisic acid (ABA). A highly specific guide RNA (gRNA) was designed to target exon 4 of SIROP9 and cloned into the binary vector pco-Cas9. The construct was successfully transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 and introduced into the 267 tomato genotype via *Agrobacterium*-mediated transformation.

Although the tomato 267 genotype exhibited low regeneration efficiency and hypersensitivity to glufosinate selection, transgenic lines were recovered by optimizing selection conditions. PCR and Sanger sequencing confirmed the presence of CRISPR-induced mutations in four independent T₀ plants, with indel analysis revealing both biallelic and chimeric mutations that disrupted the SIROP9 coding sequence. Notably, the edited T₀ plants have undergone maturity and produced fruit. From T₀ plants, both T₁ plantlets obtained via embryo culture of immature fruits and T₁ seeds from mature fruits were successfully generated, demonstrating the viability of both recovery routes. The study provides evidence of successful targeted mutagenesis in SIROP9, laying the groundwork for the development of tomato lines with improved drought tolerance and WUE. Further physiological characterization, multigenerational field trials, and water-use parameters are recommended to validate the functional impact of SIROP9 disruption on water-use efficiency, drought tolerance and overall productivity.

KEYWORDS: *Agrobacterium*-mediated transformation, CRISPR/Cas9, Drought stress, Gene editing, SIROP9, Stomatal regulation, Tomato, Water use efficiency

COMMITTEE: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Yalçın KAYA

Assoc. Prof. Dr. Hasan PINAR

ÖNSÖZ

CRISPR/Cas9 teknolojisini kullanarak ekonomik açıdan önemli bir ürünün (domates, *Solanum lycopersicum*) su kullanım verimliliğini artırmaya odaklanan bu araştırma ile, küresel ısınma karşısında ortaya çıkan iki büyük küresel sorun olan Türkiye'deki su rezervleri üzerindeki baskıyı azaltmaya ve kuraklık koşullarına dayanmaya yardımcı olacak stabil mutant bitkiler geliştirmek için zemin hazırladım.

Her şeyden önce, yüksek lisans programımı başlatıp tamamlayabilmem için bana sağlık, güç ve azim bahşeden Tanrı'ya şükranlarımı sunarım. Beni kızı gibi gören, iyi bir araştırmacı olmam için beni teşvik eden ve hedeflerime ulaşmam için bana motivasyon sağlayan danışmanım Prof. Dr. Nedim Mutlu'ya son derece minnettarım. Onun sayesinde bilgi ve deneyim kazandım ve literatüre katkıda bulunabildim.

Bu zorlu süreçte bana ölçülemez bir yardımda bulunan Dr. İnanç Soylu'ya da minnettarım. Onun katkıları ve önerileri benim çalışmam için çok önemliydi. Ayrıca, ihtiyaç duyduğumda yardım, öneri ve destek sunan MUTLU Laboratuvarı'nın tüm üyelerine de teşekkür ederim. Onlar sayesinde takım çalışması hakkında çok şey öğrendim. Bana tavsiyeler ve cesaret verici sözlerle destek olan arkadaşlarıma da çok teşekkür ederim. Ayrıca, beni Türkiye'ye getirerek tüm bu harika insanlarla tanışmamı, harika şeyler öğrenmemi ve harika araştırmalara katılmamı sağlayan bursu verdiği için Türkiye Hükümeti'ne de minnettarım.

Son olarak, ama en önemlisi, bu zorlu süreç boyunca her şekilde bana büyük destek olan çekirdek aileme içten teşekkürlerimi sunuyorum. Gülüşler ve gözyaşları boyunca her adımda benimle birlikte oldular. Onlara “Tanrı sizi bolca kutsasın” diyorum. Ayrıca, beni hatırlayan ve dualarında yer veren herkese minnettarım. Bugün ayakta durabilmemin sebebi budur.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	iv
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1. Su Kullanım Verimliliği.....	4
2.2. Türkiye'de Mahsullerin Su Verimliliği	5
2.3. Bitki GTPazlarının Rho'su/Bitki Proteinlerinin Rho'su	7
2.4. Domates (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	9
2.4.1. Domatesin kökeni, dağılımı ve tanımı	9
2.4.2. Domates üretimi	10
2.4.3. Domates üretimini etkileyen faktörler	12
2.5. Domateste SIROP Genleri.....	14
2.6. SIROP9 ve WUE'yi İyileştirmedeki Rolü	15
2.7. WUE'de ROP9, ABA ve RBOH Etkileşimi	16
2.7.1. Absisik asit aktivasyonu	16
2.7.2. ROP'lar ve ABA etkileşimi.....	17
2.7.3. SIROP9'un ABA varlığında Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretimi üzerindeki önerilen etkisi.....	18
2.8. CRISPR/Cas9 Düzenleme Yöntemi	19
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Biyoinformatik Çalışmalar ve Analizler	23
3.1.1. SIROP9 dizisinin ve ortologlarının bulunması	23
3.1.2. SIROP homologlarının çoklu dizi hizalaması (MSA)	23
3.1.3. Yüksek düzeyde spesifik SIROP9 gRNA'nın tasarlanması, seçilmesi ve sipariş edilmesi	23
3.1.4. SIROP9 gen primer tasarımı ve siparişi	24

3.1.5. Kaset 1 ve 52256/ pco-CAS9 plazmid tasarımı.....	24
3.2. Gen Klonlama.....	27
3.2.1. Kompetent <i>Escherichia coli</i> bakteri hücrelerinin hazırlanması	27
3.2.2. Kaset 1 ve 52256 plazmidlerinin çoğaltılması ve amplifikasyonu	28
3.2.3. Plazmid izolasyonu/ekstraksiyonu	29
3.2.4. İzole Kaset 1 plazmidinin Bsa1 kesimkesimi	30
3.2.5. Jel Elektroforezi ve Kaset 1'in kesimi	31
3.2.6. JEL izolasyonu/saflaştırılması	31
3.2.7. Jelden izole edilmiş Kaset 1 plazmidi ve SIROP9 gRNA oligolarının ligasyonu.....	32
3.2.8. E. coli'ye bağlanmış ürünün ısı şoku, doğrulama ve çoğaltma.....	33
3.2.9. Sanger sekansı pozitif- kaset 1 ve 52256 plazmidinin EcoRI ve Pac1 kesimi.....	36
3.2.10. SIROP9-1 gRNA'nın kısıtlı 52256 plazmidi ile ligasyonu ve ligasyon doğrulaması	38
3.2.11. DH5α E.coli bakterisine bağlanmış ürünlerin (SIROP9-1 gRNA + 52256 plazmid) ısı şoku.....	39
3.2.12. Kolonilerin çoğaltılması ve stok hazırlanması	41
3.2.13. Çoğaltılmış kolonilerde SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidine bağlanmasının doğrulanması için PCR.....	42
3.2.14. İzole edilmiş ROP9-1 gRNA + 52256 plazmidinin EHA 105 suşuna elektroporasyonu	43
3.2.15. Ortaya çıkan agrobacterium kolonilerinin çoğaltılması ve koloni PCR doğrulaması	46
3.3. Bitki Doku Kültürü - Agrobacterium Aracılı Transformasyon.....	47
3.3.1. Tohumların çimlendirme ortamına hazırlanması	47
3.3.2. Tohumların sayımı ve sterilizasyonu.....	48
3.3.3. Tohumların çimlendirme ortamına ekilmesi	49
3.3.4. Kotiledon yapraklarının alınması ve Pre-culture ortamına aktarılması.....	49
3.3.5. Agrobakteri hazırlanması, OD ölçümü ve hazırlık, transformasyon (agrobakteri ile enfeksiyon).....	51
3.3.6. Primary rejenerasyon ortamına aktarılma.....	52

3.3.7. Sekonder rejenerasyon ortamına aktarılması.....	54
3.3.8. Köklendirme ortamına transfer.....	55
3.3.9. Antibiyotik ve vitaminlerin hazırlaması	56
3.4. Bitkiciklerin Toprağa Alışma (Aklimatizasyon) Süreci.....	58
3.5. Transgenik ve Mutant Hatların Belirlenmesi	59
3.5.1. Genomik DNA ekstraksiyonu	59
3.5.2. BASTA PCR.....	61
3.5.3. Ligasyon kontrol PCR	62
3.5.4. SIROP9 PCR.....	63
3.5.5. Dizileme için hazırlık	64
3.5.6. Dizileme.....	64
3.6. Yeni Nesil (T1) Mutant Bitkilerin / Tohumların elde edilmesi.....	65
4. BULGULAR.....	67
4.1. Biyoinformatik Analiz ve Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar.....	67
4.1.1 BLAST ve çoklu dizi hizalama (MSA)	68
4.1.2. Spesifik SIROP9 gRNA.....	70
4.1.3. SIROP9 gen primeri.....	72
4.2. Gen Klonlamasından Elde Edilen Sonuçlar	73
4.2.1. Bsa1 ile Kaset 1 plazmid kesimi.....	73
4.2.2. SIROP9 gRNA oligosu ile bağlanmış Kaset 1 plazmidinin E. coli'ye ısı şokundan koloni oluşumu.....	73
4.2.3. E. coli'ye SIROP9 gRNA oligosu ile bağlanmış Kaset 1 plazmidinin ısı şokundan elde edilen koloni sonuçları.....	74
4.2.4. Kaset 1 ve 52256 plazmidi içeren SIROP9 gRNA'nın EcoRI ve Pac1 ile restriksiyonu	75
4.2.5. SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidi ile ligasyonunun doğrulanması	76
4.2.6. E. coli'ye SIROP9-1 gRNA ile bağlanmış 52256 plazmidinin ısı şokundan koloni oluşumu.....	76
4.2.7. E. coli'ye SIROP9-1 gRNA ile bağlanmış 52256 plazmidinin ısı şokundan elde edilen koloni sonuçları.....	77
4.2.8. Elektroporasyondan elde edilen koloniler	78
4.2.9. Elektroporlanmış plazmid kolonilerinin sonuçları	78

4.3. Doku Kùltürü Yoluyla Agrobacterium Transformasyonundan Elde Edilen Sonuçlar.....	79
4.4. Transgenik Hatların Belirlenmesi	80
4.4.1. Transgenik bitkileri belirlemek için BASTA3 PCR sonuçları	80
4.4.2. Transgenik bitkilerin spesifik taraması için Ligasyon Kontrol F ve SIROP9 gRNA R	81
4.4.3. Transgenik bitkinin dizileme için hazırlanması.....	82
4.5. Mutant Hatların Belirlenmesi ve Analizi	84
4.6. Mutant Hatların Bir Sonraki Nesle Devamı	91
5. TARTIŞMA	93
6. SONUÇLAR	97
7. KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Domateste Su Kullanım Etkinliğinin CRISPR/Cas9 Yöntemi İle Artırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

...../...../20....

Nana Ama Bissawaa BISSAH

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

G	: Gram
X	: Kat
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
V	: Volt
kg	: Kilogram
ha	: Hektar
ml	: Mililitre
L	: Litre
g	: Gram
ng	: Nanogram
mg	: Miligram

Kısaltmalar

aa	: Amino Asit
ABA	: Absisik Asit
ABI1	: Absisik Aside Duyarsız1
ABI2	: Absisik Aside Duyarsız2
BLAST	: Temel Yerel Hizalama Arama Aracı
bp	: Baz Çifti
Cas	: CRISPR İle İlişkili
CRISPR	: Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar
crRNA	: CRISPR RNA
DNA	: Deoksiribonükleik Asit

DSB	: Çift Sarmal Kırılma
GDP	: Guanosin difosfat
GEF'ler	: Guanin nükleotid değişim faktörleri
gRNA	: Kılavuz RNA
GTP	: Guanosin trifosfat
GTPaz	: Guanosin Trifosfataz
HDR	: Homoloji Yönlendirmeli Onarım
MSA	: Çoklu Sıra Hizalaması
MT	: Mikrotübül
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme
nt	: Nükleotid
OD	: Optik Yoğunluk
PAM	: Protospacer Bitişik Motif
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PP2Cs	: Protein Fosfataz 2Cs
RBOH	: Solunum Patlaması Oksidaz Homologu
RNA	: Ribonükleik Asit
RNP	: Ribonükleoprotein
ROP	: Bitki Rho
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPM	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
sgRNA	: Tek Kılavuz RNA
SnRK2s	: SNF1 İle İlişkili Protein Kinazlar Tip 2
T-DNA	: Transfer DNA
tracrRNA	: Trans-aktive Edici crRNA

UV	: Ultraviyole
VDP	: Su Buharı Açığı
WUE	: Su Kullanım Verimliliği

Tezde ondalık ayırıcı olarak virgöl (,) kullanılmıştır (Örn. “21,01”).



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Türkiye'de su kullanımı (Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı 2023'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)	5
Şekil 2.2. İklim değişikliğinin olumsuz etkileri nedeniyle tarım sektöründe su stresi düzeyleri (Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı 2023'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)	6
Şekil 2.3. Tarımda Kullanılan Su Birimi Başına Üretilen Ekonomik Değer (Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı 2023'ten düzenlenerek alıntılanmıştır).....	6
Şekil 2.4. GTP/GDP döngüsü (Smokvarska ve Martinière 2021'den düzenlenerek alıntılanmıştır)	7
Şekil 2.5. ROP aktivasyonundan sonra aşağı akış tepkileri (Feiguelman vd. 2018'den düzenlenerek alıntılanmıştır).....	8
Şekil 2.6. Domatesin önerilen kökeni, evcilleştirilmesi ve dağılımı (Esquinas-Alcázar ve Nuez 1995'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)	10
Şekil 2.7. Dünyanın en büyük 10 domates üreticisi (FAO 2023d'den alıntı ve düzenleme)	11
Şekil 2.8. Türkiye'de domates üretimi (FAO 2023a)	11
Şekil 2.9. Türkiye'deki başlıca domates üretim şehirlerinin haritası (Demircan 2023'ten alıntı ve düzenleme)	12
Şekil 2.10. Kuraklık stresinin bitkiler üzerindeki etkisi	13
Şekil 2.11. SIROP genleri ve Arabidopsis ortologları arasındaki çeşitlilik üzerine bir filogeni çalışması (Puli vd. 2024'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)	14
Şekil 2.12. SIROP9 ile AtROP10 ve 11 arasındaki ortolojiyi vurgulayan filogenetik ağaç (Puli vd. 2024'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)	15
Şekil 2.13. Solanaceae familyası üyeleri arasında SIROP9'un evrimsel ilişkisi (Puli vd. 2024'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)	16
Şekil 2.14. Stomatal kapanmayı indükleyen ABA sinyal iletimini temsil eden diyagram (Ng vd. 2014'ten düzenlenerek alıntılanmıştır).....	17
Şekil 2.15. ROP'un ABA ile etkileşimi (Li vd. 2016'dan düzenlenerek alıntılanmıştır)	18

Şekil 2.16. SIROP9, ABA ve RBOH etkileşiminin şematik özeti (Puli vd. 2024'ten düzenlenerek alıntılanmıştır).....	19
Şekil 2.17. CRISPR/Cas 9 gen düzenleme sisteminin şematik diyagramı (Janik vd. 2020'den düzenlenerek alıntılanmıştır)	21
Şekil 3.1. Her bir içeriğin konumunu gösteren tasarlanmış Kaset 1 gen dizisi	25
Şekil 3.2. Kaset 1 plazmid temsili haritası.....	25
Şekil 3.3. ADDGENE pFGC-pcoCas9 vektör temsili haritası (http://n2t.net/addgene:52256 ; RRID: Addgene_52256) a) Çoklu Klonlama Bölgelerinin Varlığı; b) Sadece bu çalışma için kullanılan restriksiyon enziminin varlığı	26
Şekil 3.4. Bsa1 kesimkesimi için önerilen içerikler.....	30
Şekil 3.5. Bsa1 ile kesimkesimden sonra bant parçası eksizyonu	31
Şekil 3.6. Kaset1 plazmidine bağlanan gRNA oligolarının önerilen işlevselliği	33
Şekil 3.7. <i>E. coli</i> hücrelerine ısı şoku ve çoğaltma prosedürü a) Kompetent hücrelerin buz üzerinde çözündürülmesi; b) Çoğalmaya izin vermek için bakterilere broth eklenmesi; c) Hücrelerin çalkalayıcı inkübasyonu; d) Çoğaltılmış hücrelerin peletlenmesi; e) Süpernatantın boşaltılması; f) Peletin yeniden süspansiyonu; g) Yeniden süspanse edilmiş peletin YEP plateine pipetlenmesi; h) Yayma; i) Platelerin gece boyunca inkübasyonu	34
Şekil 3.8. Koloni PCR için kolonilerin toplanması	35
Şekil 3.9. Stok Hazırlama a) Broth içinde pozitif <i>E. coli</i> çoğalması; b) Hazırlanan stokların Aliquot'ları	36
Şekil 3.10. Plazmidlerin EcoR1 ve Pac1 ile kısıtlanmasından sonra bant parçasının çıkarılması	37
Şekil 3.11. DH5α <i>E.coli</i> bakterilerine bağlanmış ürünlerin (ROP9-1 gRNA + 52256 plazmid) ısı şoku a) Bakterilerin buz üzerinde çözülmesi; b) Isı şoku sırasında ısıtma işlemi; c) Bakterilerin çoğalmasını kolaylaştırmak için bakteri suyu eklenmesi; d) Bakterilerin 37°C'de çalkalayıcı inkübasyonu; e) Bakterilerin peletlenmesi; f) Kan50 plakasına yayılması	40
Şekil 3.12. YEP besiyerinde koloni çoğaltma ve stok hazırlama a) YEP besiyeri; b) 50 ml'lik tüplere YEP ölçümü; c) Plakadan koloni toplama; d) Kolonileri YEP	

besiyerine yerleştirme; **e)** Bakterilerin eğimli yerleştirilmesi; **f)** 37°C'de inkübasyon; **g)** Çoğaltılmış bakteriler; **h)** Stok alikotları; **i)** Plazmid kalite kontrolü..... 41

Şekil 3.13. Elektroporasyon prosedürleri **a)** Buz üzerinde elektroporasyon küveti; **b)** Şok kapsülüne sabitlenmiş küvet; **c)** Elektroporasyon makinesinin ayarlanması ve pulslama; **d)** Şok kapsülünün makineden çıkarılması; **e)** Elektroporlanmış örneğe YEP eklenmesi; **f)** Elektroporlanmış örneğin 28°C'de inkübe edilmesi; **g)** Kan50 + Rif25 seçilebilir YEP plakası; **h)** Çoğaltılmış elektroporlanmış bakterilerin plakaya yayılması; **i)** 28°C'de 2 günlük inkübasyon 45

Şekil 3.14. Agrobacterium koloni çoğalması **a)** Seçilen koloniler YEP broth içine yerleştirilmiştir; **b)** Kolonilerin 28°C'de 225RPM'de bir gece boyunca çoğaltılması 46

Şekil 3.15. Tohum sayımı ve sterilizasyon **a)** 267 tohumun sayımı; **b)** Sterilizasyon solüsyonu ile sterilizasyon 49

Şekil 3.16. Tohum ekilmesi 49

Şekil 3.17. Ön kültür için eksplant hazırlama **a)** Çimlenme ile oluşan kotiledon yaprakları; **b)** Kotiledon uçlarının çıkarılması; **c)** Eksplant yerleştirme yönteminin gösterimi; **d)** Ön kültür ortamına yerleştirilen eksplant 50

Şekil 3.18. Stoktan bakteri çizgisinin temsili..... 51

Şekil 3.19. **a)** Bakteriler stoktan çoğaltıldıktan sonra plaka üzerinde çoğaltılır; **b)** Bakteriler YEP broth içinde çoğaltıldıktan sonra plaka üzerinde çoğaltılır; **c)** Bakterilerin mikroskop görüntüsü; **d)** Liquid co-culture ile hazırlanan bakteri çözeltisi 52

Şekil 3.20. Transformasyona izin vermek için eksplantların bakteriyel solüsyonda inkübasyonu 52

Şekil 3.21. Dönüştürülmüş eksplantlarda kallus oluşumu ve dönüştürülmemiş olanların kahverengileşmesi 10 gün sonra 53

Şekil 3.22. Domatesin ikincil rejenerasyonunun farklı aşamaları 55

Şekil 3.23. Kök ortamı transferi için rejenere sürgünün düğüme yakın kesilmesi 56

Şekil 3.24. Bitkilerin toprağa alışması **a)** Kökleri yeterince iyi olan bitkilerin seçilmesi; **b)** Saksıların plastik kaplarla tamamen örtülmesi; **c)** Kapların yarıya kadar açılmasıyla kademeli olarak alıştırılması; **d)** Kapların tamamen çıkarılması **e)** Bitkilerin belirli bir uzunluğa kadar büyütülmesi; **f)** Bitkilerin yeni saksılara aktarılması; **g)** Bitkilerin daha uzun büyüdüklerinde sabitlenmesi; **h)** Daha büyük saksılara aktarılması 59

Şekil 3.25. CTAB protokolü kullanılarak DNA ekstraksiyon yöntemi	60
Şekil 3.26. T1 bitkileri için embriyo kültürü prosedürü a) Meyvelerin toplanması ve etiketlenmesi; b) Meyvelerin boyutunun ölçülmesi; c) Olgunlaşmamış tohumların çıkarılması; d) Hipoklorit uygulaması; e) Embriyoların çıkarılması ve hormonsuz tabağa yerleştirilmesi; f) Embriyonun ilk çimlenmesi; g) Embriyonun ileri çimlenmesi; h) Saksıya alma ve streç filmle örtme	65
Şekil 3.27. T1 tohum toplama a) Olgun meyvelerin toplanması; b) Meyvelerin boyutunun ölçülmesi; c) Tohumların çıkarılması; d) Tohumların sayılması ve kurutulması.....	66
Şekil 4.1. Domates genomundaki SIROP9 geninin NCBI'deki özellikleri.....	67
Şekil 4.2. Phytozome üzerinde SIROP9 geninin transkript dizisi	67
Şekil 4.3. Phytozome'da SIROP9 geninin kodlama ve peptit dizisi	68
Şekil 4.4. SolGenomics üzerinde SIROP9'un intron ve ekzon bölgelerinin sayısı.....	68
Şekil 4.5. SIROP9 geninde intron ve ekzonların konumlandırılması	68
Şekil 4.6. SIROP9 ile karşılaştırıldığında diğer SIROP9 Homologlarının Benzerlik İndeksi	69
Şekil 4.7. Tüm SIROP homologlarının MSA'sı	70
Şekil 4.8. CRISPRdirect üzerinde son derece spesifik SIROP9 uygulanabilir gRNA ...	71
Şekil 4.9. SIROP9'a özgü gRNA	71
Şekil 4.10. SIROP9 geninin ekzon 4'ünde gRNA varlığı	71
Şekil 4.11. Primer3 Plus'tan SIROP9 gen primerleri	72
Şekil 4.12. gRNA'yı çevreleyen SIROP9 gen primerleri a) SIROP9 genini çevreleyen dizinin gösterimi; b) SIROP9 genini çevreleyen dizinin doğrusal gösterimi	73
Şekil 4.13. Bsa1 ile kesim sonrası Kaset 1 plazmidinin jel görüntüsü	73
Şekil 4.14. DH5α E.coli suşuna bağlanmış kaset 1 plazmidinin ısı şokundan sonraki koloniler a) Ligasyon yapılmış plazmidten E. coli'ye koloniler; b) Ligasyon yapılmamış plazmidten E. coli'ye koloniler	74
Şekil 4.15. Kaset 1'e dahil edilen SIROP9 gRNA'nın pozitif bantlarını gösteren jel görüntüsü.....	75

Şekil 4.16. Kaset1'de SIROP9 gRNA'nın varlığını gösteren Sanger dizileme sonuçları a) Koloni 1; b) Koloni 2.....	75
Şekil 4.17. EcoRI ve PacI ile kesiminden sonra gRNA dahil kaset 1 ve 52256 plazmidinin jel görüntüsü.....	76
Şekil 4.18. SIROP9-1 gRNA ve 52256 plazmid ligasyon doğrulanması	76
Şekil 4.19. DH5α e.coli suşuna bağlanmış 52256 plazmidinin ısı şokundan sonraki kolonileri	77
Şekil 4.20. 52256 plazmidine dahil edilmiş SIROP9-1 gRNA'nın pozitif bantlarını gösteren izole edilmiş plazmidlerin jel görüntüsü	77
Şekil 4.21. Elektroporasyondan sonra oluşan kolonilerin görüntüsü (Plakanın üst ve alt görünümü).....	78
Şekil 4.22. Elektroporasyondan elde edilen Agrobacterium kolonilerinin jel görüntüsü.....	78
Şekil 4.23. Basta pozitifliği gösteren transgenik bitkiler a) Bitki 10 (P4) ve bitki 11 (P5); b) Bitki 27 (P11); c) Bitki 32 (P12)	81
Şekil 4.24. Bitki transgenitesinin Ligasyon Kontrol F ve SIROP9 gRNA R ile doğrulanması a) Bitki 10 (P4) ve bitki 11 (P5); b) Bitki 27 (P11); c) Bitki 32 (P12)	82
Şekil 4.25. SIROP9 primerleri ile genin amplifikasyonu a) Bitki 10 (P4) ve bitki 11 (P5); b) Bitki 27 (P11); c) Bitki 32 (P12)	84
Şekil 4.26. Transgenik hat olduğu belirlenen bitkiler.....	84
Şekil 4.27. Sanger dizilemesinden sonra elde edilen kromatogramlar	85
Şekil 4.28. Çerçeve kayması mutasyon sıklığının ve uyum modelinin (R^2) temsili grafiği a) Bitki 10 (P4); b) Bitki 17 (P5); c) Bitki 27 (P11); d) Bitki 32 (P12).....	87
Şekil 4.29. Yabancıl tip diziye karşı temsili indelleri gösteren dizilerin, karşılık gelen frekanslarla hizalanması a) Bitki 10 (P4); b) Bitki 17 (P5); c) Bitki 27 (P11); d) Bitki 32 (P12)	88
Şekil 4.30. Mutant bitkilerin 267 yabani tip domates ile Çoklu Dizi Hizalaması a) Bitki 10 (P4); b) Bitki 17 (P5); c) Bitki 27 (P11); d) Bitki 32 (P12).....	90
Şekil 4.31. Tam olgunlaşmış bitkilerin resmi a) Bitki 10 (P4); b) Bitki 17 (P5)	91

Şekil 4.32. SIROP9 mutantlarının yeni neslinin oluşturulması **a)** embriyo kültüründen P4 ve P4'ün T1 bitkileri; **b)** P5'in T1 tohumları.....92



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Bsa1 Restriksiyon enzimi tanıma bölgesi ile ROP9 gRNA dizisi	24
Çizelge 3.2. İleri ve Ters SIROP9 gen primer dizisi.....	24
Çizelge 3.3. Kaset 1 plazmidi için Bsa1 kesimkesim protokolü.....	30
Çizelge 3.4. SIROP9 gRNA oligo ileri ve geri ipliklerinin ligasyonu.....	32
Çizelge 3.5. SIROP9 gRNA oligosunun Kaset 1 plazmidine bağlanması	32
Çizelge 3.6. Koloni PCR'ı için prosedür.....	35
Çizelge 3. 7. Amplifikasyon için koloni PCR koşulları.....	36
Çizelge 3.8. Kaset1 ve 52256 plazmidinin EcoR1 ve Pac1 kesimsi.....	37
Çizelge 3.9. SIROP9-1 gRNA ve 52256 plazmidi için Ligasyon Protokolü	38
Çizelge 3.10. SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidine bağlanmasının başarısını doğrulamak için PCR	38
Çizelge 3.11. SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidine bağlanmasının başarısını doğrulamak için PCR koşulları	39
Çizelge 3.12. Bireysel kolonilerde SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidine bağlanmasının başarısını doğrulamak için PCR	42
Çizelge 3.13. Bireysel kolonilerde SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidine bağlanmasının başarısının doğrulanması için PCR koşulları.....	42
Çizelge 3.14. Elektroporasyon için gerekli malzemeler ve özellikleri	43
Çizelge 3.15. Agrobacterium kolonileri için koloni PCR.....	46
Çizelge 3.16. Agrobacterium koloni amplifikasyonu için koloni PCR koşulları	47
Çizelge 3.17. Tohum çimlendirme ½ MSO	48
Çizelge 3.18. Sterilizasyon Solüsyonu.....	48
Çizelge 3.19. Pre-culture (Ön kültür) ortamı (2Z) (pH:5,8)	50
Çizelge 3.20. Liquid co-culture ortamı %2 MSO pH: 5.8	51
Çizelge 3.21. Primary Rejenerasyon kültür ortamı (2Z) (pH:5,8).....	53

Çizelge 3.22. Sekonder Rejenerasyon kültür ortamı (1Z) (pH:5,8).....	54
Çizelge 3.23. Köklendirme kültür ortamı (pH:5.8).....	56
Çizelge 3.24. Modified Nitsch (MN) Vitamin (Stok 1000X) (pH:7,0)	57
Çizelge 3.25. Antibiyotik ve vitaminlerin hazırlanması	57
Çizelge 3.26. BASTA PCR protokolü	61
Çizelge 3.27. BASTA PCR protokolü için koşullar	61
Çizelge 3.28. Ligasyon kontrol PCR protokolü.....	62
Çizelge 3.29. Ligasyon kontrol PCR protokolü için koşullar	62
Çizelge 3.30. SIROP9 PCR protokolü	63
Çizelge 3.31. SIROP9 PCR protokolü için koşullar	64
Çizelge 4.1. Tüm SIROP homologlarının SolGenomics Gen Kimliği ve Kromozom numarası	69
Çizelge 4.2. Doku kültüründe 267 domates genotipinin tüm partilerinin kültür aşamaları	79
Çizelge 4.3. Her bir transgenik bitkinin adlandırılması	80

1. GİRİŞ

Tarımsal ürün üretimi sırasında karşılaşılan tüm sorunlar arasında, bitkilerin hayatta kalması için gereken suyun eksikliği, özellikle iklim dalgalanmalarındaki mevcut ve hızlı artışın yanı sıra nüfusun yıllar geçtikçe istikrarlı bir şekilde artmasıyla tatlı su kaynaklarının tükenmesi karşısında en büyük endişelerden biridir. İklimdeki bu sürekli değişim, kuraklık nöbetlerinin yoğunluğu ve hızı nedeniyle dünya çapında mahsul verimliliğine, gıda güvenliğine ve sürdürülebilir tarım uygulamalarına giderek daha fazla zarar verdiği için tarım sektöründe endişe konusu gibi görünmektedir (FAO 2021). Bunun ışığında, coğrafi olarak Doğu Trakya ve Anadolu bölgelerinin kesiştiği bir ülke olan Türkiye'nin, özellikle tarıma tahsis edilen su kaynaklarında kesimler yaşadığı teyit edilmiştir. Buna ek olarak, ülkenin büyük bir kısmı yarı kurak bölge kapsamına girdiğinden, tarım alanlarını daha da zorlayan sınırlı yağış ve yüksek evapotranspirasyon ile birçok zorlukla karşı karşıya kalmaktadır. Bu da sulama sistemleri üzerinde sıkı bir baskı oluşturmaktadır (Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı 2023). Ulusal strateji belgelerine göre, tarım, Türkiye'nin toplam su kullanımının %70'inden fazlasını tüketerek ülkenin su rezervlerine büyük bir darbe vurmaktadır ve sulama altyapısı, elektrik ve dağıtım sistemlerinin yüksek maliyeti artmaya devam ederek çiftçilere ekonomik bir yük getirmekte ve özellikle domates gibi yüksek su gereksinimi olan ürünler için su kıtlığı olan bölgelerde verimliliği sınırlamaktadır (Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı 2023).

Türkiye'de yetiştirilen diğer tüm ürünlerle karşılaştırıldığında domates (*Solanum lycopersicum*), sermaye açısından en yüksek gelir getiren ürünlerden biridir. Ülke 2023 yılı itibarıyla yaklaşık 79 bin kg/ha verimle yaklaşık 13 milyon ton domates üretmiştir (FAO 2023a, b). Bununla birlikte, Antalya gibi yüksek domates üretimiyle bilinen büyük şehirler (Gözener ve Dereli 2018), Akdeniz ikliminin etkisi altındadır. Bu nedenle, bazen 40°C'yi aşan aşırı sıcak ve nemli yazların yanı sıra sıcak hava dalgaları da yaşanmaktadır (Sensoy vd. 2016). Ancak domates bitkisi, çok fazla su gerektiren sık kök yapısı nedeniyle, su stresi koşulları söz konusu olduğunda çok hassastır çünkü toprağın derinliklerinden su çekmesini sağlayacak kök derinliğinden yoksundur ve yine de çok yüksek bir transpirasyona sahiptir (Oliveira vd. 1996; Giardini vd. 1985; Patane ve Cosentino 2010; Alordzinu vd. 2021; Li vd. 2023). Sonuç olarak, bu bölgelerdeki su rezervleri üzerindeki baskıyı hafifletmek ve aynı zamanda verimi artırmak için domates bitkilerinin su kullanım verimliliğinin nasıl çözülebileceğine odaklanmaya ihtiyaç vardır.

Su kullanım verimliliği düşünüldüğünde, temel olarak bitkilerin topraktan aldığı su miktarı ve bu su alımının verim çıktısına nasıl yansıdığı anlamına gelir. Bu nedenle, domates bitkilerinin bu su kullanım verimliliğini verimi etkilemeyecek veya tehlikeye atmayacak şekilde iyileştirmek için, bitkilerin yapraklarından transpirasyonel su kaybının en aza indirilebileceği yollara dikkat etmek önemlidir (Wang vd. 2019). Bu, suyun kaybolma hızını sınırlamak için yapraklardaki stoma gözeneklerinin manipüle edilebileceği ve azaltılabileceği yollar bulunarak yapılabilir (Blum 2009). Stomalar aynı zamanda fotosenteze yol açan gaz alışverişinin gerçekleştiği yol olsa da, aynı zamanda su kaybının da gerçekleştiği yoldur. Bu nedenle, manipülasyonunu zor bir iş haline getirir (Puli vd. 2024). Fotosentezin gerçekleşmesi için stoma gözeneklerinin tamamen açık kalması gerekirken, transpirasyonun sınırlandırılması için stoma gözeneklerinin kapatılması gerekmektedir (McKown ve Bergmann 2018). Neyse ki, moleküler

biyolojideki son gelişmeler, hedeflenen genom düzenleme yoluyla bu iyileştirmeleri elde etmek için yeni olanaklar yaratmıştır.

En popüler kullanılan genom düzenleme yöntemlerinden biri CRISPR/Cas9'dur ve verim, kalite, biyotik ve abiyotik stres direnci ile bağlantılı genleri hassas ve kapsamlı bir şekilde değiştirerek çeşitli bitkilerin iyileştirilmesi için birçok şekilde uygulanmıştır (Chen vd. 2019). Bu nedenle, domates gibi çok çeşitli ürünlerde kuraklığa toleransla ilişkili genleri düzenlemek için eşit şekilde kullanılabilir. Bu düzenleme yöntemi, viral DNA'nın bir kısmını kopyalayarak virüsün tekrar saldırması halinde onu tanıyıp yok etmesini sağlayan bakterilerin bağışıklık sisteminin savunma mekanizmasından esinlenmiştir (Asmamaw ve Zawdie 2021). Bu sistemi uyarlayan bilim insanları, artık bir hedef DNA dizisinin hedeflenmesini, bölünmesini ve dolayısıyla düzenlenmesini kolaylaştırmak için sentetik bir gRNA oluşturabilmektedir (Jinek vd. 2012; Doudna ve Charpentier 2014). Sınıf II Cas proteininin ne kadar basit, karmaşık olmayan, spesifik ve uyarlanabilir olması nedeniyle, domates gibi bitkiler meyve olgunlaşması, abiyotik stres toleransı, raf ömrü, hastalık direnci gibi özellikler açısından başarıyla modifiye edilmiştir (Li vd. 2018; Zsögön vd. 2018; Wang vd. 2023). Bu nedenle, bitkilerin su kullanım verimliliğini artırmak için, stomaların açılıp kapanmasını etkileyen yolları kontrol eden genler de hedeflenmiştir (Osakabe vd. 2014).

Son zamanlarda su kullanım verimliliğini artırmada rol oynadığı doğrulanan genlerden biri, domateste ifade edilen SIROP9 adlı Rho benzeri GTPaz genidir. Filogeni çalışmaları ile bu genin *Arabidopsis* tip-II ROP'ların (ROP10/11) doğrudan ortoloğu olduğu ve aynı işlevi görme ihtimali olduğu görülmüştür (Puli vd. 2024). *Arabidopsis*'teki SIROP9 ortologlarının, kuraklık koşulları altında bitkinin su kullanım verimliliğini etkileyen absisik asit (ABA) sinyali yoluyla stomatal iletkenliği kontrol etmede önemli olduğu doğrulanmıştır (Li vd. 2012). İlginç bir şekilde, ROP, ABA ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) düzenleyici yolları arasında karmaşık bir etkileşim var gibi görünmektedir. Kuraklık stresi altında ABA, solunum patlaması oksidaz homologunun (RBOH) aktivasyonunu etkiler ve bu da bekçi hücrelerine ROS akışına neden olur. ROS ayrıca bekçi hücrelerindeki iyon kanallarını manipüle ederek stomaların kapanmasına yol açar (Sirichandra vd. 2009; Kim vd. 2010). Öte yandan, ROP9 da bu RBOH'un ifadesini bastırır ve böylece stoma gözeneklerinin açık kalmasına yol açan aşırı ROS üretimini önler. Bununla birlikte, su stresi altında, ROP geninin ifadesi imkansızdır (Puli vd. 2024). Bu nedenle, domates bitkisinde bu genin modifiye edilmesi, suyun terleme yoluyla bitkiden kaybedilme oranını ve ardından su kullanımının verimliliğini artırmak için potansiyel bir strateji sunmaktadır. Ayrıca, domates bitkilerinde CRISPR düzenleme yolunun istikrarlı olduğu kanıtlanmış olan *Agrobacterium* aracılı transformasyon, yerleşik ve güvenilir bir yöntemdir (Secgin vd. 2021).

Verilen tüm bilgilere dayanarak, bu çalışma esas olarak 267 domates genotipini kullanarak *Agrobacterium* aracılı CRISPR/Cas9 gen düzenleme yoluyla SIROP9 genine karşı mutasyona uğratılmış domates bitkileri oluşturmayı amaçlamıştır. Potansiyel olarak azaltılmış stoma gözenek boyutu ile hem sulanan hem de kuraklık koşullarında su kullanımı verimli olacaktır. Çalışma, ülkede yaygın olarak yetiştirilen bitkilerden biri olan domates bitkisinin sulama sistemlerine aşırı bağımlılığını ortadan kaldırarak Türkiye'nin sınırlı tatlı su rezervleri üzerindeki baskıyı azaltmaya yardımcı olacak bitkilerin elde edilmesine zemin hazırlamak için yapılmıştır. Böylece, domates üretimine

harcanan para, enerji ve zaman miktarı azalırken, bitkinin üretiminden elde edilen getiri de artacak.



2. KAYNAK TARAMASI

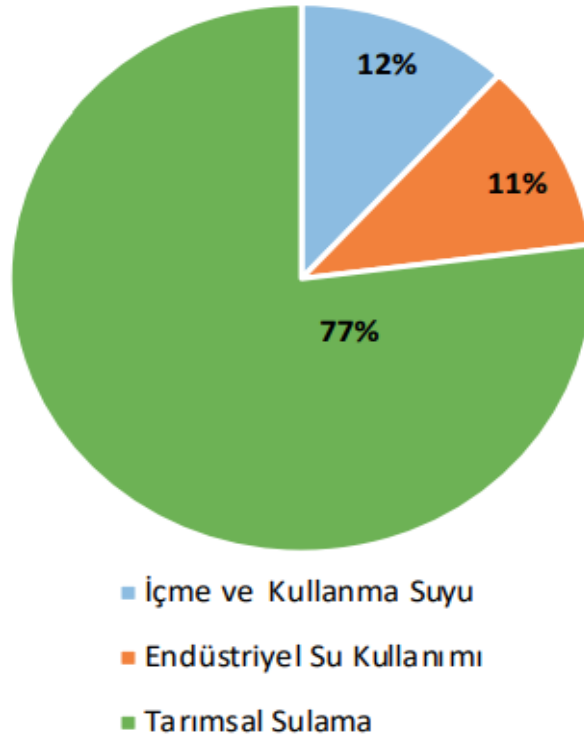
2.1. Su Kullanım Verimliliği

Su kullanım verimliliği (WUE), mahsulün kullandığı su birimi başına biyokütle veya tahıl olarak asimile edilen karbon miktarı olarak tanımlanmaktadır (Hatfield ve Dold 2019). Bu, su kullanım verimliliği ile bitkilerin topraktan ne kadar su emdiğini ve sonunda ne kadar verim verdiklerini karşılaştırdığımız anlamına gelmektedir. Ancak iklim ve hava koşullarında sürekli olarak meydana gelen dalgalanmalar (azalan yağışlar, aşırı kuraklık dönemleri) bu fenomeni önemli hale getirmektedir. Bitkiler topraktan su aldıklarında, bu suyun büyük bir kısmı terleme süreci nedeniyle bitkiden kaybolmaktadır. Wang vd. (2019) tarafından belirtildiği gibi, terleme gerçekleştiikten sonra, bitki köklerinin topraktan çektiği su miktarına bakılmaksızın, bu suyun %1'inden azı bitkinin gelişim süreçleri için bitkide kalmaya devam eder. Su kullanım verimliliği, bitkilerin sağladığı çıktı başına su tüketimi (toprak suyu alımı + bitki suyu alımı) ile ilişkiliyse ve bu su alımı terleme yoluyla hala kaybediliyorsa, su kullanım verimliliği bitkilerde günlük olarak meydana gelen terleme oranına ve bunun mahsul verimine nasıl etki ettiğine bağlıdır (Wang vd. 2019). Lobell vd. (2014) göre, küresel ısınmanın artmasıyla birlikte atmosferde su buharı miktarında azalma yaşanmaya başlamış ve bu durum bitkilerin yapraklarından çevreye ne kadar su kaybettiklerini doğrudan etkilemiştir. Böylece topraktan su terlemesi oranı, Su Buharı Açığı (VPD) ile doğrudan bağlantılı hale gelmiştir. Atmosferdeki VPD ne kadar yüksekse, bitkilerde terleme sıklığı o kadar artar ve bitki verimliliği için o kadar zararlı hale gelmektedir.

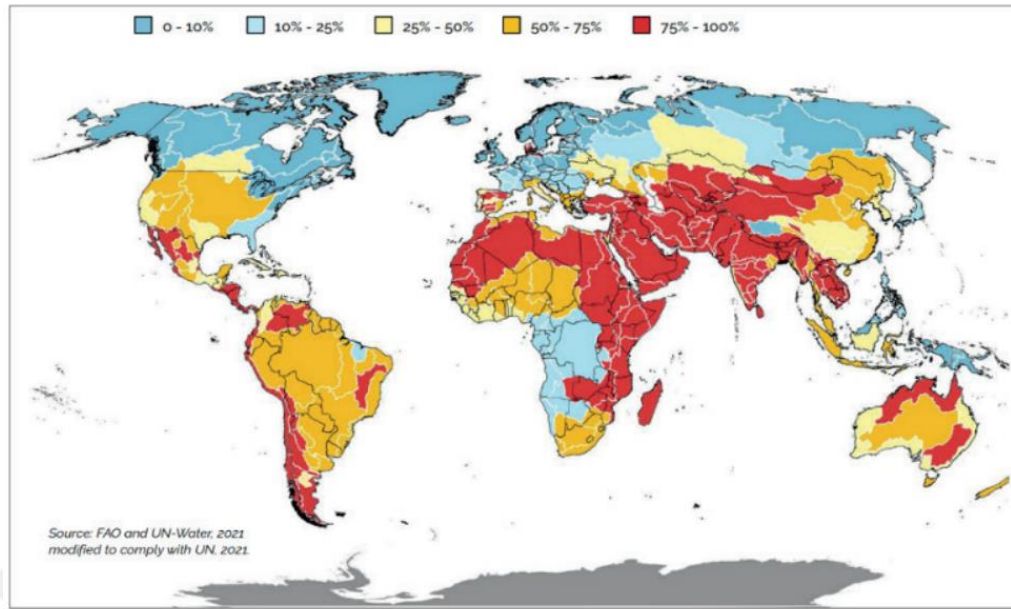
Terlemenin gerçekleşmesi için, süreci kolaylaştırmak üzere stoma adı verilen gözeneklerin varlığı gerekmektedir. Bu gözenekler, yaprakların hava alan kısmının epidermal bölgelerinde bulunmaktadır (Endo ve Torii 2019). Ancak stoma, terleme sürecinde rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda fotosentez sürecinden de sorumludur. Sonuç olarak, gaz alışverişi ve su kaybı gibi zıt iki işlevi birden yerine getirmektedir (Hetherington ve Woodward 2003; Shimazaki vd. 2007; Hu vd. 2011). Bu nedenle, VPD'nin yüksek olduğu yüksek sıcaklık koşullarında ve toprakta bulunan su miktarının topraktan çıkan su miktarıyla orantılı olmadığı aşırı kuraklık koşullarında, bitkinin savunma mekanizması, aşırı su kaybını önlemek için stoma gözeneklerinin çevresini azaltmaktır. Ancak bu, bitkinin karbondioksit alımını etkiler, çünkü bitki aynı girişi kullanmaktadır (McKown ve Bergmann 2018). Öte yandan, şeker üretimi için etkili bir fotosentezin gerçekleşmesi için stoma gözeneklerinin geniş açık kalması gerekmektedir (Puli vd. 2024). Bu ikilem, su kullanım verimliliğinin bitkilerin gelişimi ile ilgili önemli bir sorun haline gelmesinin nedenidir. Bitkiler iklim koşullarındaki değişiklikler, kuraklık stresi, sıcaklık stresi, su buharı kayıpları ve karbondioksit alımı ile nasıl başa çıkabilmektedir? (Lawson ve Blatt 2014; Grossiord vd. 2020). Atmosferdeki karbondioksit seviyeleri arttıkça, su kullanım verimliliği üzerinde olumlu bir etki yaratmaya başlar, çünkü fazla karbondioksit, bitkinin karbon ve nitrojen metabolizmasındaki değişiklikleri önlemek için stoma açıklıklarının azaltılması gerektiği anlamına gelmektedir (Thompson vd. 2017; Hatfield ve Dold 2019). Böylece, karbon miktarı bir eşiğe ulaşana kadar bitkinin su kullanımı oldukça verimli hale gelmektedir. Bu noktada, yaprak hayatta kalması için gerekli olan sıcaklık sınırına ulaşmakta ve ısı stresi yaşamaya başlamaktadır.

2.2. Türkiye'de Mahsullerin Su Verimliliği

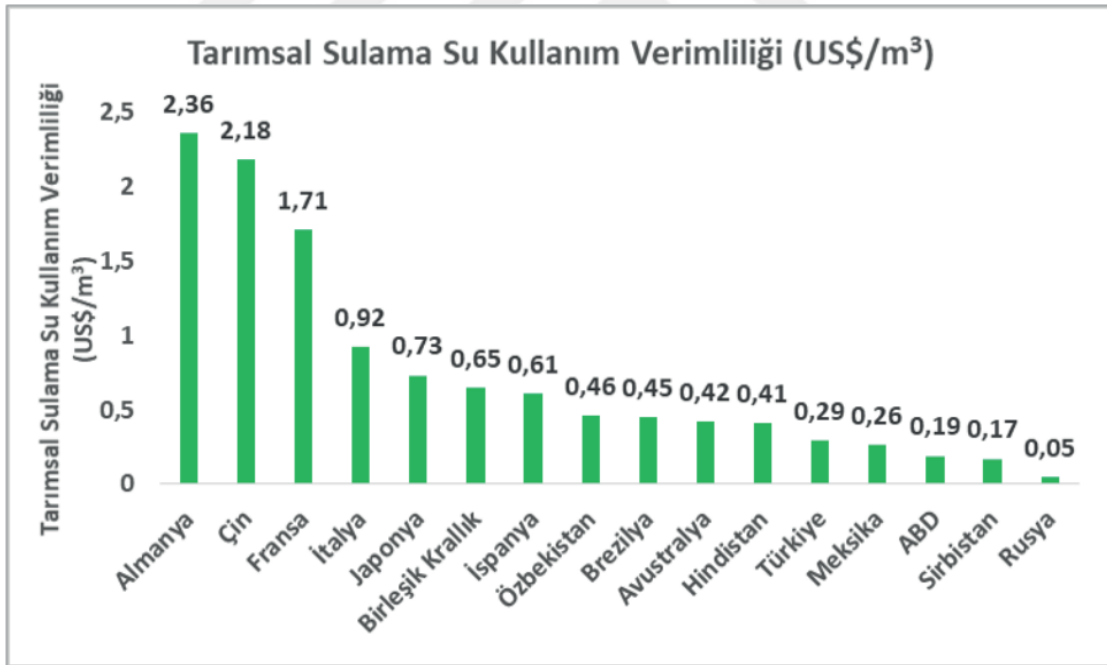
Türkiye'deki çiftçiler ve bitki yetiştiricilerinin isteklerinden biri, bitkilerin minimum su kullanımıyla elde edilen verimin artırılmasıdır. Türkiye, coğrafi konumu nedeniyle iklim değişikliğinin ülkenin birçok bölgesinde yarattığı etkiden dolayı tarımsal uygulamalar için sulamaya büyük ölçüde bağımlı olan ülkelerden biridir (Çakmak vd. 2009). Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı'na (2023) göre, Türkiye'deki su kullanımının yaklaşık %77'si sulamadan kaynaklanmaktadır ve toplam 44 milyar metreküp su kullanılmaktadır. Küçük ve büyük projeler için, sulama sistemlerinin geliştirilmesi için sırasıyla 1.750 ABD doları/hektar ile 3.000 ABD doları/hektar arasında bir miktar harcanmaktadır. İşletme ve yönetim maliyetleri ise hektar başına 50 ila 70 ABD doları arasında değişmektedir (Yazar vd. 2006). Ancak, bu kadar geniş bir arazi için sulama amacıyla bu kadar su harcanmasına rağmen, hükümet her metreküp için sadece 0,29 ABD doları kazanmaktadır. Bu da, ülkenin ne kadar çok girdiye rağmen ne kadar az ekonomik çıktı ürettiğini göstermektedir. Buna rağmen, ülke ne yazık ki çok fazla sıcaklık ve su stresi ile karşı karşıya olmasına rağmen, tarımda sulamaya bağımlılığın devam etmesi önerilmektedir (Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı 2023). Daha da kötüsü, ülkenin nüfusu giderek artarken, su kıtlığının yakın gelecekte ülke için büyük bir sorun olacağı tahmin edilmektedir (Arslan-Alaton vd. 2011; Baba ve Tirol 2023).



Şekil 2.1. Türkiye'de su kullanımı (Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı 2023'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)



Şekil 2.2. İklim değişikliğinin olumsuz etkileri nedeniyle tarım sektöründe su stresi düzeyleri (Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı 2023'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)



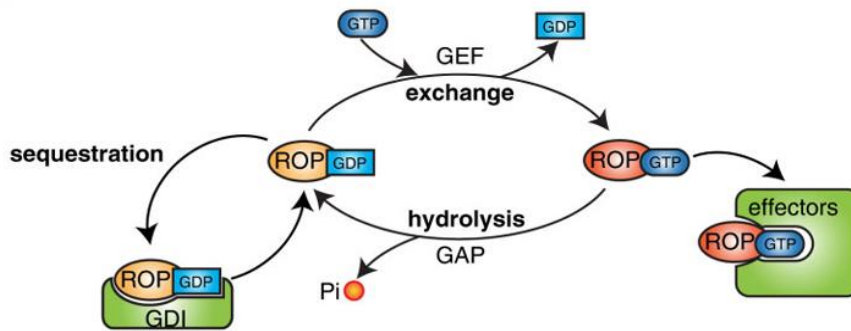
Şekil 2.3. Tarımda Kullanılan Su Birimi Başına Üretilen Ekonomik Değer (Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı 2023'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)

Yazar vd. (2006) araştırma çalışmasında belirtilen gerçeklere göre, Türkiye'de bulunan tatlı su miktarının ileriki yıllarda mahsul sulaması için yeterli olmayabileceği ve bunun sonucunda sulama sistemlerine daha bağımlı olan mahsul çeşitlerinden, bu sulama sistemlerine bağımlı olmayan mahsul çeşitlerine geçişin gerekli olabileceği ihtimali bulunmaktadır. Türkiye'nin Karadeniz bölgesi gibi bazı bölgeleri, yıl boyunca yağmur

alan ve yaz koşulları uygun olan şanslı bölgelerdir. Ancak, Anadolu'daki kıyı şehirleri gibi domates üretimi ile tanınan bölgeler, özellikle yaz aylarında çok daha sert hava koşullarıyla karşı karşıyadır. Bu nedenle, büyüme mevsiminde bu bölgeler, uzun süreli yüksek yağış sıklığı nedeniyle düzensiz yağışlar veya hiç yağış almamaktadır. Bu nedenle, yağışların bu kadar az olduğu ve sulama depolarının daha da az olduğu bu bölgedeki mahsullerin su kullanım kapasitesini artırmak için, bitkilerden su kaybını azaltmanın ve birim su başına verimi artırmanın bir yolu bulunmalıdır (Yazar vd. 2006). Türkiye'nin yarı kurak bölgelerinde bu tür su kıtlığı koşullarında bitki üretim oranını iyileştirmek için Yazar vd. (2006), kuraklığa dayanıklı ve su tasarrufu sağlayan özellikleri sayesinde su kullanımında yüksek verimlilik gösteren çeşitlerin yetiştirilmesinin uygun olacağını vurgulamıştır.

2.3. Bitki GTPazlarının Rho'su/Bitki Proteinlerinin Rho'su

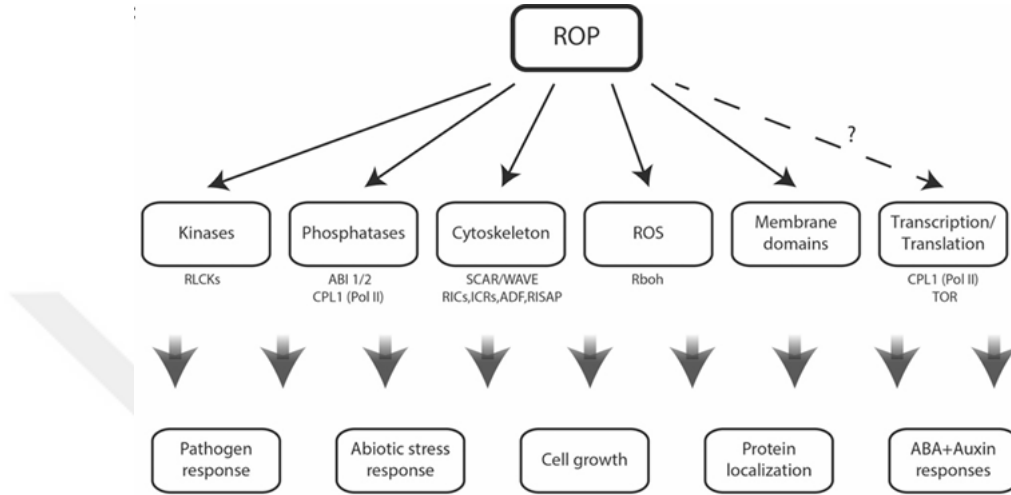
Bu bitki proteinleri, Rho tipi GTPazların küçük bir alt ailesinin bileşenleridir: diğer ökaryotik organizmalarda da bulunan bir protein grubudur (Zheng ve Yang 2000; Brembu vd. 2006; Eliáš ve Klimeš 2012). Bu bitki proteinleri genellikle 20 kDa'dan oluşur ve membran bağlanmaları için kısa N- ve C-terminal uzantıları olan ve proteinler arası etkileşimleri mümkün kılan bir GTPaz alanı (G alanı) içermektedir (Smokvarska ve Martinière 2021). İşlev açısından, bu ROP proteinleri, Guanosin trifosfatı (GTP) bağlama ve GTP/GDP döngüsü adı verilen bir döngü sürecinde Guanosin difosfata (GDP) hidrolize etme yetenekleriyle bilinmektedir (Bourne 1991). Bu döngüde, bağlanmış GDP uykuda kabul edilirken, GTP aşağı akış proteinlerini eşit şekilde yukarı doğru düzenleyebilen aktif durum olarak kabul edilip böylece hücrelerde bir tür dijital anahtar görevi görmektedir (Henis vd. 2009; Smokvarska ve Martinière 2021). ROP'lerin aktif olabilmesi için, GTP'nin katalizini ve nihai aktivasyonunu artıran guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler), hücre polaritesi için ROP'leri sitozol ve plazma membranı arasında döndürerek aktivasyon için hazır olana kadar herhangi bir membrana lokalize olmalarını önleyen guanosin nükleotid ayrışma inhibitörleri (GDI'lar) ve aktif GTP'yi hidroliz yoluyla uykuda olan durumuna geri getiren ROP'a özgü GAP'ler (GTPaz aktive edici proteinler) gibi dış faktörler gerekmektedir (Cherfils ve Zeghouf 2013; Feiguelman vd. 2018; Smokvarska ve Martinière 2021).



Şekil 2.4. GTP/GDP döngüsü (Smokvarska ve Martinière 2021'den düzenlenerek alıntılanmıştır)

Aktivasyondan sonra bu ROP proteinlerinin, aktin ve mikrotübül (MT) hücre iskeletinin organizasyonu ve dinamiğinde, endositoz ve ekzositozda, NADPH oksidaz ve

hücre içi kinaz kaskadlarının aktivasyonunda, vezikül trafiğinde, reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminde ve protein fosforilasyonunda, hücre büyümesi ve şekli, sitokinez, subselüler protein lokalizasyonu, patojenlere yanıtlarda, absisik asit (ABA) ve oksin sinyalleşmesi ve taşınması gibi birçok alanda rol oynadıkları bildirilmiştir (Feiguelman vd. 2018).



Şekil 2.5. ROP aktivasyonundan sonra aşağı akış tepkileri (Feiguelman vd. 2018'den düzenlenerek alıntılanmıştır)

Farklı bitkilerde, bazıları diğer bitkilerdeki ortologlarıyla uzak akrabalık gösteren birkaç farklı türde bitki Rho proteini bulunmaktadır (Puli vd. 2024). Örneğin, iyi çalışılmış bir model bitki olan *Arabidopsis thaliana*'da, hücre iskeleti organizasyonu, veziküler trafik ve hormon sinyalleşmesi gibi temel işlevlerin düzenlenmesinde rol oynayan 11 ROP geni tanımlanmıştır (Feiguelman ve Yalovsky 2018). *Oryza sativa* (pirinç) gibi monokotlarda 7 ROP geni bildirilmiştir (Chen vd. 2010). Benzer şekilde, *Zea mays* (mısır) ve *Brassica napus* (kanola) da sırasıyla 9 ve 11 ROP geni içermektedir (Wu vd. 2018). Solanaceae familyasına ait bitkilerde ROP ailesinin daha büyük bir genişleme gözlemlenmiştir. Örneğin, *Solanum lycopersicum* (domates) ve *Capsicum annuum* (biber) türlerinde 9'ar ROP geni bulunurken, *Solanum tuberosum* (patates) türünde 16 ROP geni tespit edilerek önemli bir artış gözlemlenmiştir (Zhang vd. 2020b). *Nicotiana tabacum* (ekili tütün) 14 ROP genine, *Nicotiana benthamiana* ise 13 ROP genine sahiptir (Zhang vd. 2020b). İlginç bir şekilde, *Solanum melongena* (patlıcan) sadece 5 gen tanımlanmış olan çok daha küçük bir ROP gen ailesine sahiptir (Zhang vd. 2020b). *Vitis vinifera* (asma) ve *Medicago truncatula* (barrelclover) gibi diğer bitki familyalarında ise her biri 7 ROP geni bulunmakta olup, bu da birkaç dikot soyunda nispeten korunmuş bir gen sayısını göstermektedir (Wu vd. 2018). *Hevea brasiliensis* (kauçuk ağacı) türünde 5 ROP geni olduğu bildirilmiştir, bu da diğer bazı çok yıllık türlerdeki gözlemlerle uyumludur (Wu vd. 2018). Buna karşın, bazal kara bitkileri daha az ROP geni içermektedir. Model bir yosun türü olan *Physcomitrium patens* 4 ROP genine sahipken, kara bitkilerinin en eski türlerinden biri olan *Marchantia polymorpha* sadece tek bir ROP geni içermektedir (Feiguelman vd. 2018).

2.4. Domates (*Solanum lycopersicum*)

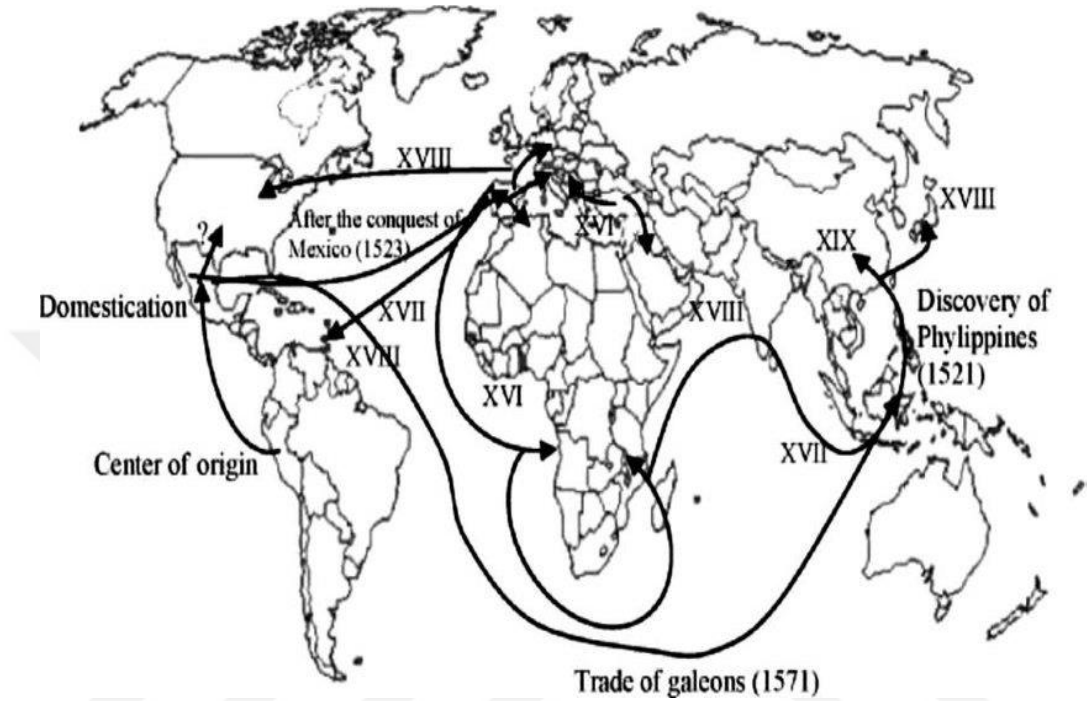
2.4.1. Domatesin kökeni, dağılımı ve tanımı

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), kökeni açısından Güney Amerika'nın bölgesini "başlangıç noktası" olarak kabul edilen dikotiledon bir bitkidir. Özellikle günümüz Peru, Ekvador ve Şili'nin kuzey kesimlerini kapsayan bölgelerde, yabani türü (*Solanum pimpinellifolium*) ilk kez tespit edildiği söylenmektedir (Jenkins 1948). Bu bölgelerin, çoğu domates çeşidinin yetiştirildiği birkaç yabani türün anavatanı olduğu söylenmektedir (Peralta vd. 2008). Ancak, Güney Amerika'nın domatesin evcilleştirildiği yer olduğu bilinmemektedir. Aksine, bu evcilleştirme, Orta Amerika'nın yerlilerinin domatesi temel gıda maddesi olarak yetiştirdiği Amerika'nın orta bölgelerinde, Meksika'da gerçekleşmiştir (Blanca vd. 2015).

Domatesin dünyaya nasıl yayıldığına dair birkaç teori vardır. Bunlardan biri, domatesin, Christopher Columbus'un Amerika'ya yaptığı yolculuktan kraliyet ailesine sunulmak üzere getirilen "incelenecek" etiketli ürünlerden biri olduğu yönündedir (Pardo-Tomás ve López Terrada 1993; van Andel vd. 2021). Diğer bir teori ise, 16. yüzyılın başlarında, Hernán Cortés adlı bir İspanyol sömürgeci, Aztek şehrini (bugünkü Mexico City) İspanya adına ele geçirdikten sonra bu ürünü Avrupa'ya taşıdığından sorumlu olduğu yönündedir (van Andel vd. 2021). Oradan yavaş yavaş Asya, Afrika ve sonunda dünyanın geri kalanına yayılmıştır (Şekil 2.6'da görüldüğü gibi). Bu süreçte, seçici yetiştirme, çok çeşitli iklimlere ve kullanımlara uyarlanmış çeşitli kültür bitkilerinin geliştirilmesine katkıda bulunmuştur (Peralta ve Spooner 2007). Bugün domates, dünyaya en yaygın dağılmış sebze bitkilerinden biridir. Çeşitli iklim ve toprak koşullarına uyum sağlama özelliği nedeniyle dünyanın neredeyse tüm bölgelerinde yetiştirilmektedir (Jones 2008). Çevresel koşullar büyüme ve verimi etkileyebilse de, modern ıslah ve yetiştirme teknikleri domatesin açık tarlalarda, seralarda ve kontrollü ortamlarda yetiştirilmesini mümkün kılmıştır (Blanca vd. 2015).

Diploid, dikotiledon bir bitki olan domates, toplam 24 kromozom ($2n = 2x = 24$) ile Solanaceae familyasına ait olmanın ve kendi kendine tozlaşma yeteneğine sahip olmanın gururunu yaşamaktadır. Bitki bazen belirli bir yüksekliğe kadar büyüyen, olgunlaşan, çiçek açan, meyve veren ve sonra ölen belirli bir bitki olarak kabul edilmektedir. Bazen de belirsizdir ve bu nedenle genellikle mevsim boyunca uzun bir süre boyunca büyüebilmektedir (Jones 2007). Kendini tozlaştıran bir bitki olan domates, erkek ve dişi üreme organlarını içermekte ve stamenler pistile yapışarak onu sarmaktadır (Peralta ve Spooner 2007; Costa ve Heuvelink 2018). Bitkinin meyveleri şekil, renk, boyut ve doku bakımından çeşitlilik gösterir ve likopen, potasyum, C vitamini ve birçok diğer besin maddesi bakımından zengindir ve çeşitli kronik hastalıklara karşı koruyucu etkiye sahiptir (Raiola vd. 2014). Kökleri iyi drene edilmiş, verimli, hafif tınlı ve dengeli pH (5,5-7,0) değerine sahip topraklara duyarlıdır. Ancak, genellikle toprağın 30-40 cm derinliğine kadar gelişebilirler ve genellikle toprağın sığ kısmında bulunurlar. Bu nedenle, su stresi koşullarında hassas bir bitki haline gelmektedir (Oliveira vd. 1996; Giardini vd. 1985; Patane ve Cosentino 2010; Alordzinu vd. 2021; Li vd. 2023). Bu nedenle, büyüme ve gelişmeyi desteklemek için yaşam döngüsü boyunca istikrarlı ve ılımlı atmosferik sıcaklıklara ihtiyaç duyarlar; ideal sıcaklık gündüzleri 20–25 °C ve geceleri 13–18 °C'dir. Genel olarak, 32 °C'yi aşan veya 10 °C'nin altındaki sıcaklıklar bitkilerin polen canlılığını ve meyve oluşumunu etkileyebilir (Costa ve Heuvelink 2018).

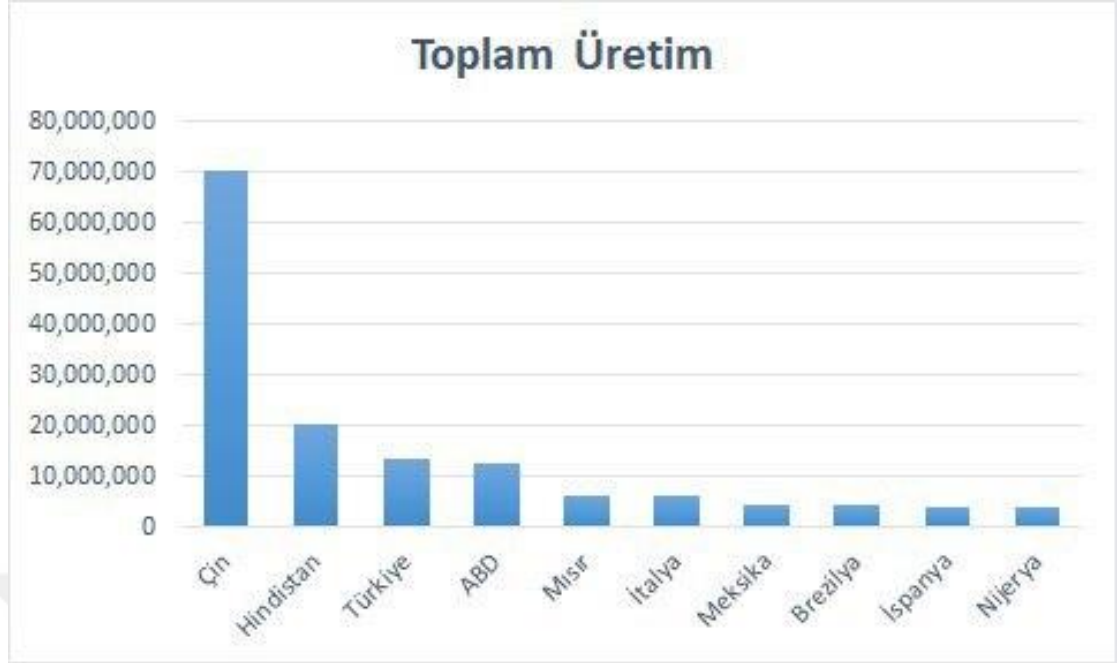
Ayrıca, kısa ömrü ve bugüne kadar domates bitkileri üzerinde yapılan kapsamlı araştırmalar sayesinde, genetik, fizyoloji ve mahsul iyileştirme alanlarında araştırma ve çalışma için model bitki olmasını sağlayan iyi tanımlanmış bir genom profiline sahiptir (Razdan 2006).



Şekil 2.6. Domatesin önerilen kökeni, evcilleştirilmesi ve dağılımı (Esquinas-Alcázar ve Nuez 1995'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)

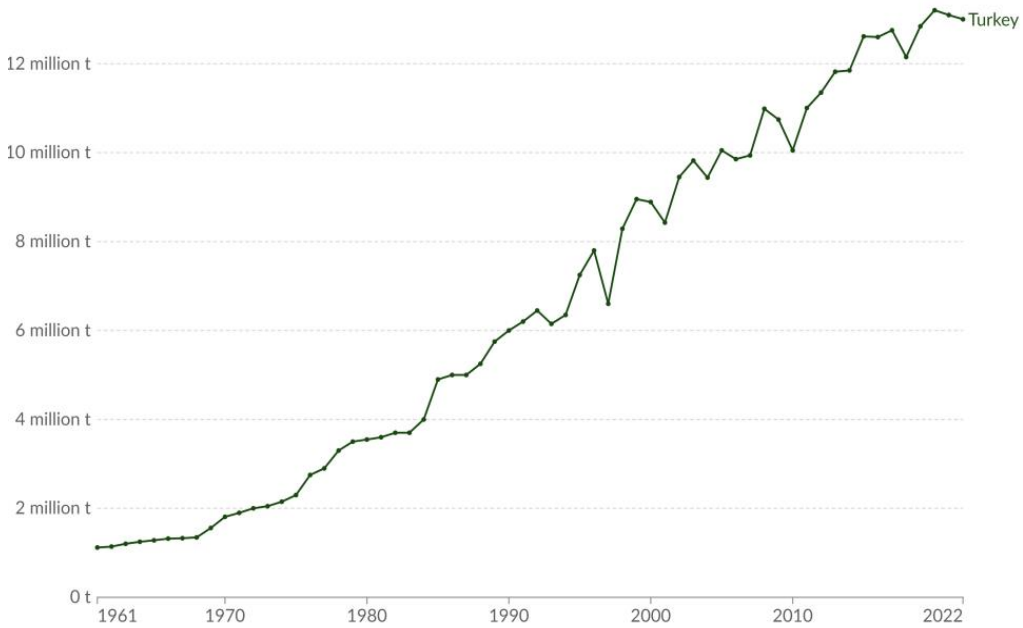
2.4.2. Domates üretimi

Domates, dünyanın birçok bölgesinde yetiştirilen ekonomik açıdan önemli bir bitkidir ve 2023 yılı itibarıyla toplam küresel üretimi 192 milyon tondur (FAO 2023c). Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO) göre, 2023 itibarıyla domates üretiminde önde gelen 5 ülke Çin, Hindistan, Türkiye, Amerika Birleşik Devletleri ve Mısır'dır. Çin yaklaşık 70 milyon ton, Hindistan 20 milyon ton, Türkiye 13 milyon ton, Amerika Birleşik Devletleri yaklaşık 12 milyon ton ve Mısır 6 milyon ton domates üretmektedir (FAO 2023d). Domates yetiştiriciliğindeki istikrarlı artış, ıslah, sulama ve haşere yönetimi teknolojilerindeki gelişmelerin yanı sıra, domates salçası, sos ve konserve gibi işlenmiş domates ürünlerine olan talebin artmasına bağlanmaktadır (Costa ve Heuvelink 2018). Yetiştirme alanı açısından domates, özellikle Akdeniz, subtropikal ve tropikal iklimlere sahip bölgelerde, küresel sebze yetiştirme arazilerinin önemli bir bölümünü kaplamaktadır. Sera yetiştiriciliğinin yaygınlaşması, özellikle Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da iklimi değişken olan ülkelerde yıl boyunca üretime olanak sağlamıştır (Heuvelink 2005).



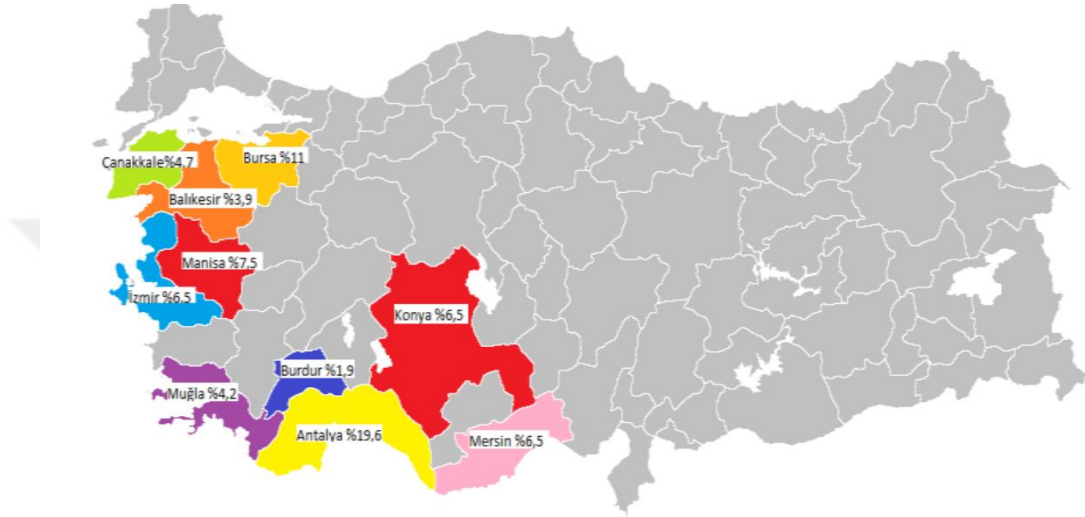
Şekil 2.7. Dünyanın en büyük 10 domates üreticisi (FAO 2023d'den alıntı ve düzenleme)

Türkiye, küresel domates üretiminde önemli bir konuma sahiptir ve 2023 yılında tahmini 13,3 milyon metrik ton domates hasadı ile dünya çapında üçüncü sırada yer almaktadır (FAO 2023a, d). Bu miktar, hem açık tarla hem de sera yetiştiriciliğini yansıtmakta olup hem de üretimin büyük bir kısmı domates salçası, püresi ve kurutulmuş domates ürünleri gibi işleme amaçlıdır (Gözener ve Dereli 2018).



Şekil 2.8. Türkiye'de domates üretimi (FAO 2023a)

Türkiye'de Antalya, Bursa ve Manisa sırasıyla en fazla domates üretimi yapılan yerlerdir. Antalya, Bursa ve Manisa, %19,5, %11 ve %7,5'lik oranlarla İzmir, Konya, Mersin ve diğer yerler arasında en fazla domates üretimi yapılan yerler olarak öne çıkmaktadır. Bu iller, yüksek güneş ışınımı, ılıman kışlar ve uzun büyüme mevsimleri ile karakterize edilmektedir (Demircan 2023). Özellikle Antalya, ülkenin yüksek değerli taze ihracat pazarının önemli bir payını oluşturan sera domates üretiminin merkezi olarak bilinmektedir (Brumfield ve Ozkan 2016).



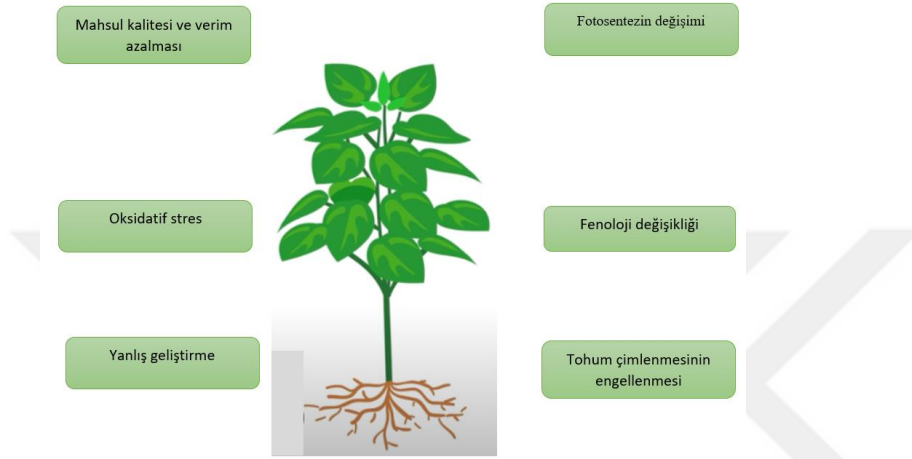
Şekil 2.9. Türkiye'deki başlıca domates üretim şehirlerinin haritası (Demircan 2023'ten alıntı ve düzenleme)

Yurtiçi tüketime ek olarak, Türkiye özellikle Avrupa ve Rusya'ya taze ve işlenmiş domates ürünleri ihraç eden önemli bir ülkedir. Domates ihracatından elde edilen gelirler tarım ekonomisine önemli katkı sağlamaktadır ve bu ürünün ulusal önemini daha da vurgulamaktadır (Bashimov 2016).

2.4.3. Domates üretimini etkileyen faktörler

Domates taze bir meyve olduğundan, üretimi genel olarak biyotik ve abiyotik stres olarak sınıflandırılabilir. Çeşitli stres faktörlerinden etkilenmektedir. Tuzluluk, su basması, sıcaklık dalgalanmaları, besin dengesizlikleri ve kuraklık, domates üretimini önemli ölçüde etkileyen abiyotik stres örnekleridir. Biyotik stresler ise zararlı böcekler ve patojenler gibi canlılardan kaynaklanan streslerdir. Bu stresler %5 ila %80'in üzerinde değişen önemli kayıplara neden olur. Örneğin, Bozbuga vd. (2022), dünya tarım ürünlerinin en az %12'sinin patojen istilası ve %20'sinin zararlı böcek saldırısı nedeniyle her yıl kaybedildiğini belirtmiştir. Kuraklık, zamanlaması, süresi ve şiddetine bağlı olarak domates üretiminde %70'e varan verim kayıplarına neden olabilir (Farooq vd. 2009; Krishna vd. 2022).

Abiotik stresler arasında en zararlı olan kuraklık, domatesin hayatta kalması, gelişimi ve verimliliğinden sorumlu olan önemli süreçleri ciddi şekilde etkilemektedir. En önemli etkilerinden biri, bitkide reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve birikimi yoluyla hücrel homeostazı bozmaktır (Krishna vd. 2022). Enzim inaktivasyonu, bozulmuş membran yapısı ve hormonal dengesizlik, kuraklığın domatesi etkileme yollarıdır (Turan vd. 2023). Bu, yaprak yüzeyinin azalmasına, mineral emiliminin, fotosentezin, büyümenin durmasına, çiçek dökülmesine ve meyvelerin küçülmesine yol açarak, sonunda domatesin verimini ve üretkenliğini önemli ölçüde etkilemektedir.



Şekil 2.10. Kuraklık stresinin bitkiler üzerindeki etkisi

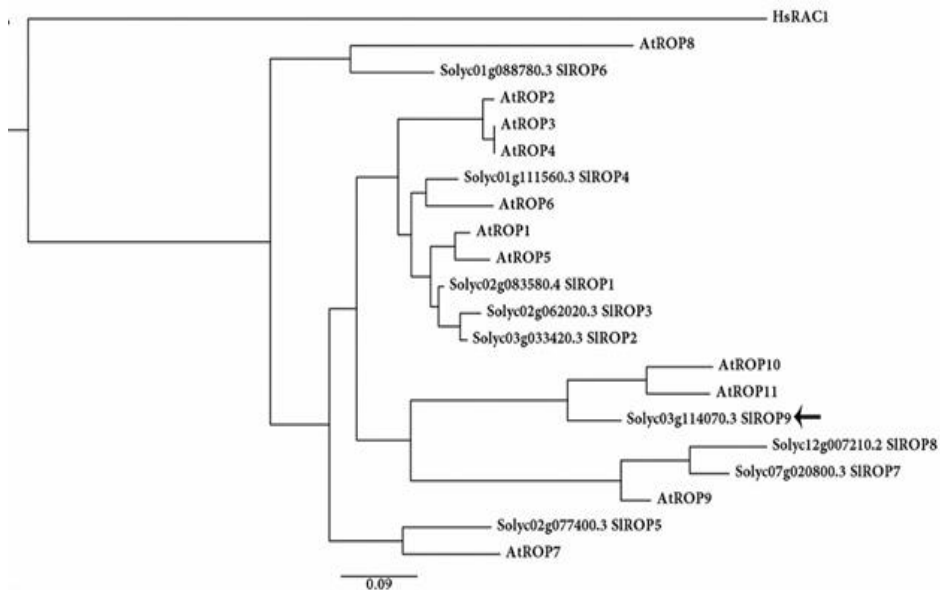
Domates bitkisine önemli zararlar veren bir diğer önemli abiyotik stres, sıcaklık dalgalanmalarıdır. Bu stres genellikle sıcaklık 30°C'yi aştığında (ısı stresi) veya 10°C'nin altına düştüğünde ortaya çıkmaktadır (Khan vd. 2024). Singh vd. (2017) göre, ısı stresi domates dahil çeşitli bitkilerde farklılık gösteren bir dizi morfo-anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler arasında fotosentetik enzim aktivitesinin bozulması, membran bütünlüğünün kaybı, kloroplastlarda elektron taşınımının bozulması ve CO₂'ye karşı stoma iletkenliğinin azalması yer almaktadır. Domates, büyüme döngüsü boyunca ısı stresine duyarlıdır, bu nedenle bu bozulmalar verimlilik, sağlık, meyve kalitesi ve verimi önemli ölçüde etkilemektedir. Örneğin, çimlenme sırasında yüksek sıcaklıklar çimlenmeyi azaltabilir, çiçeklenme sırasında ise polen üretimini ve fotosentezi bozmaktadır. Tuzluluğun diğer etkileri arasında yaprak alanının azalması, yaprakların kıvrılması, kloroz (sararma) ve büyümenin durması sayılabilir; bunların tümü bitkinin sağlığını ve verimliliğini bozmaktadır. Düşük sıcaklık stresi altında domates, çimlenme gecikmesi, soğuktan kaynaklanan hasar veya vejetatif büyümenin yavaşlaması gibi etkilerle zarar görür (Rajametov vd. 2021).

Tuzluluk, domates üretiminde ekonomik ve niceliksel kayıplara neden olan bir başka abiyotik stres faktörüdür. Tuzluluk, domates üzerinde özellikle Na- ve Cl- kaynaklı iyon toksisitesi, ozmotik stres ve besin dengesizliği yoluyla etki etmektedir (Ors vd. 2021). Bunlar, su emilimini ve besin alımını olumsuz etkileyerek tohum çimlenmesi, vejetatif büyüme, meyve tutumu, fide büyümesi gibi önemli gelişim aşamalarını etkilemektedir. Sonuç olarak, domatesin meyve kalitesini, verimini ve sağlığını etkilemektedir ve en aza indirmektedir (Seth vd. 2024). Tuzluluktan farklı olarak, domates su basmasına karşı oldukça duyarlıdır (Yin vd. 2023). Çiçeklenme, meyve

tutumu yüzdesi ve klorofil içeriğinin azalmasını etkiler. Yin vd. (2023), su basmasının ilk aşamada domatesleri meyve sayısını azaltarak etkilediğini, ancak sonunda meyve ağırlığının azalmasına ve verimin önemli ölçüde düşmesine yol açtığını gözlemlemiştir.

2.5. Domateste SIROP Genleri

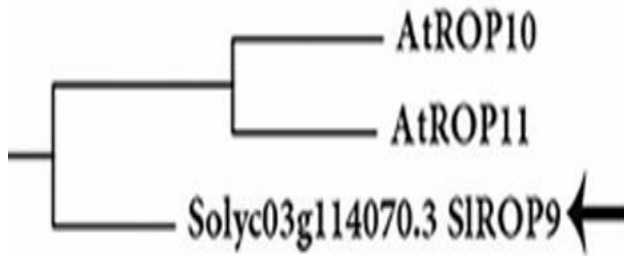
Domates bitkisi, SIROP 1-9 olarak adlandırılan 9 ROP geninden oluşur. Bu genler bitkinin farklı bölgelerinde eksprese edilir ve çeşitli roller oynar; bunların bazıları bilimsel literatürde henüz tanımlanmamıştır (Wang vd. 2022). Puli vd. (2024) göre, bu SIROP genleri farklı kromozomlarda bulunmaktadır: SIROP4 ve SIROP6 kromozom 1'de, SIROP1, SIROP3 ve SIROP5 kromozom 2'de, SIROP2 ve SIROP9 kromozom 3'te, SIROP7 kromozom 7'de ve SIROP8 kromozom 12'de. Her bir SIROP geninin hangi tipte olduğunu belirlemek için: terminal ucunda prenilasyon bölgesi olarak sistein bulunan CaaL adı verilen korunmuş alifatik amino asit kutusu motifinden oluşan Tip I mi, yoksa terminal ucunda bu korunmuş alifatik amino asit kutusu motifi bulunmayan, ancak sisteinin S-asilasyon geçirdiği bir GC-CG kutusu bulunan Tip II mi olduğunu belirlemek için Wang vd. (2022), tüm SIROP genlerinin C-terminalinin protein dizisini analiz etmiş ve hepsinin C-terminal polibazik bölgeye (PBR) sahip olduğunu, ancak SIROP4-9'un CaaL motifinin bozulmamış olması nedeniyle Tip I'e, SIROP1-3'ün ise tam bir CaaL motifine sahip olmaması nedeniyle Tip II'ye ait olduğunu fark etmişlerdir. Ayrıca, geçici ekspresyon sistemleri de tüm bu SIROP genlerinin büyük olasılıkla plazma membranında eksprese edildiğini göstermiştir. Puli vd. (2024) tarafından yapılan bir filogeni çalışmasında, bu SIROP homologlarının bazılarının evrim açısından yakından ilişkili olduğu, bazılarının ise o kadar yakından ilişkili olmadığı gösterilmiştir. SIROP homologları arasında var olan çeşitliliğin yanı sıra, onların çalışmasında SIROP genleri ile *Arabidopsis* gibi diğer bitkilerdeki diğer ROP genleri arasında da bir miktar benzerlik vardı. Bu ortologların bazıları belirgin bir yakınlık gösterdi.



Şekil 2.11. SIROP genleri ve Arabidopsis ortologları arasındaki çeşitlilik üzerine bir filogeni çalışması (Puli vd. 2024'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)

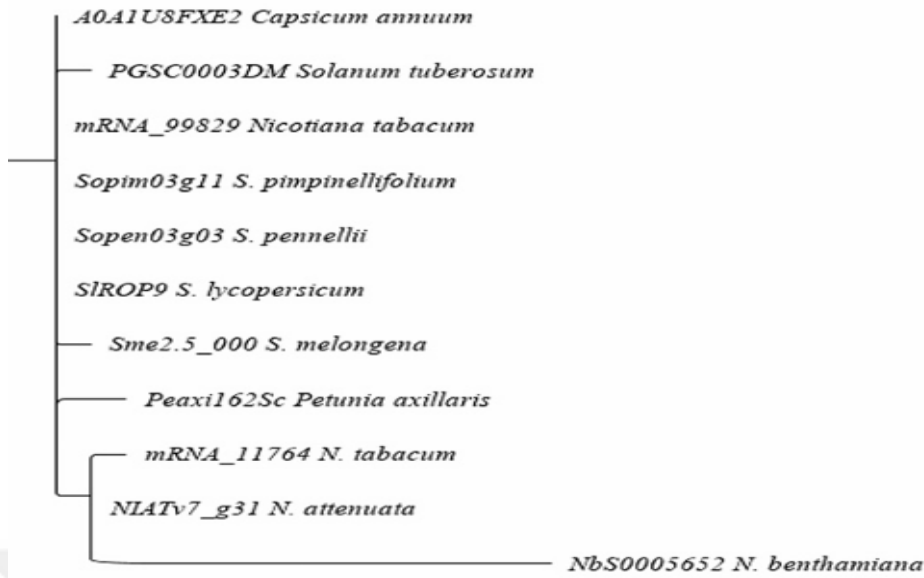
2.6. SIROP9 ve WUE'yi İyileştirmedeki Rolü

SIROP9 geni, domates genomunun üçüncü kromozomunda bulunur ve literatürde yapılan geçici gen ekspresyon çalışmalarına göre, domates bitkisinin plazma zarında baskın olarak eksprese olduğu söylenmektedir. Bu da sinyal iletiminde bir rol oynama olasılığını vurgulamaktadır (Puli vd. 2024). Puli vd. (2024) tarafından yapılan evrimsel çalışmalara dayanarak, SIROP9 geninin tüm SIROP genleri arasında *Arabidopsis* ROP 10 ve ROP 11 ile ortolog olan tek homolog gen olduğu tespit edilmiştir. Bu At ROP 10 ve 11'lerin, bitkilerin koruyucu hücrelerinde ağırlıklı olarak eksprese edildiği ve stoma iletkenliği ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Li vd. 2012). AtROP11 ile, iyi belgelenmiş karakterizasyon yoluyla absisik asit hormonu (ABA) için bir aşağı düzenleyici olduğu gözlemlenmiştir. Burada, genin varlığı veya ekspresyonu ABA sinyalini baskılar ve sonuç olarak hormonun sorumlu olduğu ana düzenlemelerden biri olan stoma iletkenliğini etkilemektedir (Li vd. 2012; Yu vd. 2012). Aslında, Li vd. (2012) tarafından bu AtROP11 geni için elde edilen mutantlar, farklı ABA konsantrasyonları uygulandığında bitkinin stoma gözeneklerinin boyutunda ilerleyici bir azalma göstermiştir. Bu, genin bitkilerin terleme yoluyla su kaybını azaltmak için nasıl kullanılabileceğini göstermiştir. Ek olarak, (Zheng vd. 2002) tarafından yapılan deneylerde AtROP10 geninin AtROP11'e benzer şekilde davrandığı görülmüştür. Araştırmalarında, AtROP10'un null mutantlarının ABA varlığına daha duyarlı olduğu ve stoma yoluyla bitkiden transpirasyon yoluyla kaybedilen su miktarında azalma gözlemlendiği görülmüştür. Bununla birlikte, SIROP9'un AtROP10 ve AtROP11 ile yakın benzerliği, SIROP9'un stoma iletkenliğinde rol oynama ve dolayısıyla su kullanım verimliliğini artırmaya yardımcı olma olasılığını göstermektedir (Puli vd. 2024).



Şekil 2.12. SIROP9 ile AtROP10 ve 11 arasındaki ortolojiyi vurgulayan filogenetik ağaç (Puli vd. 2024'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)

Ek olarak, SIROP9 geninin, amino asit dizileri açısından Solanaceae familyası arasında yüksek düzeyde koruma (yüzde 99'dan fazla) sergilediği görülmüştür, bu da genin işlevselliğinin muhtemelen familyanın tüm üyelerinde ifade edilebileceğini kanıtlamaktadır (Puli vd. 2024). Puli vd. (2024) tarafından gen nakavtları yoluyla elde edilen domates mutantları da verimde herhangi bir olumsuz etki olmaksızın mükemmel bir su kullanım verimliliği sergilemiştir. Sonuçlarında, mutantlar stoma açıklıklarının azalması, yüksek yaprak sıcaklıkları ve terlemeyi ve dolayısıyla su kullanım verimliliğini azalttığına işaret eden diğer faktörleri göstermiştir.



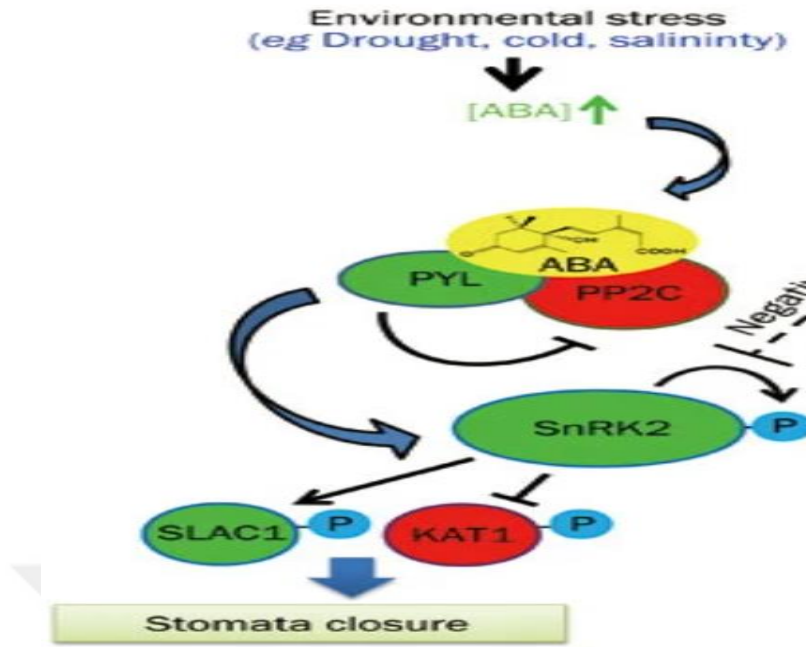
Şekil 2.13. Solanaceae familyası üyeleri arasında SROP9'un evrimsel ilişkisi (Puli vd. 2024'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)

2.7. WUE'de ROP9, ABA ve RBOH Etkileşimi

2.7.1. Absisik asit aktivasyonu

Absisik asit (ABA), bitkilerde bulunan ve bitkinin maruz kaldığı abiyotik stres koşullarıyla ilişkili olan ve bu streslerin etkisini hafifletmeye yardımcı olan bir hormondur (Ng vd. 2014). Bitkilerin ABA yardımıyla yüksek tuzluluk, aşırı sıcaklık ve su kıtlığı gibi streslerle başa çıkma yöntemlerinden bazıları, dormancy, stoma kapanması ve çözünen madde birikimi yoluyla çimlenmeyi yavaşlatmaktır (Nguyen vd. 2023). Su kullanım verimliliği ile ilişkisi açısından, araştırmalar, ABA üretimine daha duyarlı olacak şekilde yaratılan mutant bitkilerin, yabani tiplerine kıyasla kuraklık stresine karşı daha iyi tolerans gösterdiğini ortaya koymuştur (Saez vd. 2006; Ng vd. 2014). ABA'nın bu rolü ilk olarak Imber ve Tal (1970) tarafından gözlemlenmiştir. Bu araştırmacılar, ABA hormonu ile tedavi edilmeyen domates mutant bitkilerinin su stresi koşullarında solma belirtileri gösterdiğini fark etmişlerdir. Bu bulgu, kuraklık stresi altında ABA seviyelerinde önemli bir artış olduğunu gösteren diğer bulgularla birleştiğinde, ABA'nın terleme yoluyla su kaybını önlemek için stoma koruyucu hücrelerin düzenlenmesinde oynayabileceği rol üzerine çalışmaların önünü açmıştır (Cutler vd. 2010).

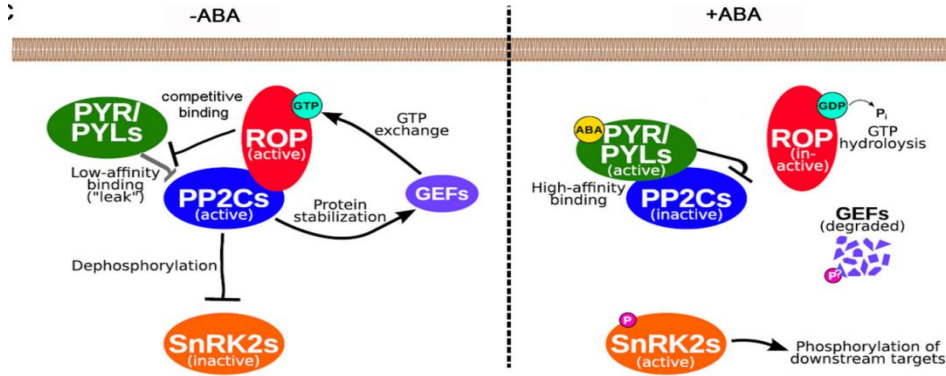
Bu hormonun stoma açıklıklarını azaltma işlevini yerine getirebilmesi için, bitki su eksikliği ile karşı karşıya kaldığında reseptörleri devreye girmektedir (Kim vd. 2010). Bitkiler su eksikliği nedeniyle strese girdiğinde, ABA hormonunun ekspresyonu artar ve bu da A grubu protein fosfataz 2C'lerin (PP2C'ler) yukarı regülasyonunu engelleyen PYL ABA reseptörlerini aktive etmektedir (Ng vd. 2014). Böylece, (SNF1) ile ilişkili protein kinazlar tip 2 (SnRK2'ler) serbest kalmakta ve koruyucu hücrelerde SLAC1 ve KAT1 gibi S tipi anyon kanallarını fosforile ederek koruyucu hücrelere anyon akışını tetiklemekte, bu da ozmotik basıncı düzenler ve stoma gözeneklerinin kapanmasını sağlamaktadır (Geiger vd. 2009; Brandt vd. 2012; Mega vd. 2019).



Şekil 2.14. Stomatal kapanmayı indükleyen ABA sinyal iletimini temsil eden diyagram (Ng vd. 2014'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)

2.7.2. ROP'lar ve ABA etkileşimi

Arabidopsis'te yapılan araştırmalar, AtROP11 GTPaz'ın absisik aside duyarsız 1 (ABI1) ve absisik aside duyarsız 2 (ABI2) PP2C tipi fosfatazlarla bir ilişkisi olduğunu, bunlara bağlanabildiğini veya bunlardan bağımsız olabildiğini göstermiştir (Yu vd. 2012; Li vd. 2016). Bitki stresli koşullardan uzak olduğunda, ABA'nın yukarı regülasyonuna gerek yoktur ve bu nedenle bitkide ABA ekspresyonu pratik olarak minimum düzeydedir. Bu nedenle, PYL PP2C'lere bağlanabilse de, bağlanma ve dolayısıyla inhibisyon zayıftır ve bu da AtROP11'in PP2C'lere gizlice ama agresif bir şekilde bağlanmasına olanak tanır (Dupeux vd. 2011; Waadt vd. 2014; Li vd. 2016). Li vd. (2016) göre bu, PP2C'leri aktive eder ve bu da hem SnRK2'leri inhibe eder hem de sonuç olarak ABA'nın aşağı akış tepkilerini bloke eder ve RopGEF'lerin bozulmasını önleyerek ROP'u aktif durumda tutar. Ancak, kuraklık koşullarında bitkide ABA hormonu akışı olduğunda, PYL'nin PP2C'lere bağlanması o kadar güçlüdür ki, AtROP11'in bağlanmasına yer kalmaz. Bu, hem PP2C'lerin hem de AtROP11'in tamamen inhibe edilmesine neden olur ve böylece SnRK2'lerin ABA'nın aşağı akış sinyallerini kolaylaştırmasına izin vermektedir (Thomas vd. 2007; Thomas vd. 2009; Li vd. 2016).



Şekil 2.15. ROP'un ABA ile etkileşimi (Li vd. 2016'dan düzenlenerek alıntılanmıştır)

2.7.3. SIROP9'un ABA varlığında Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretimi üzerindeki önerilen etkisi

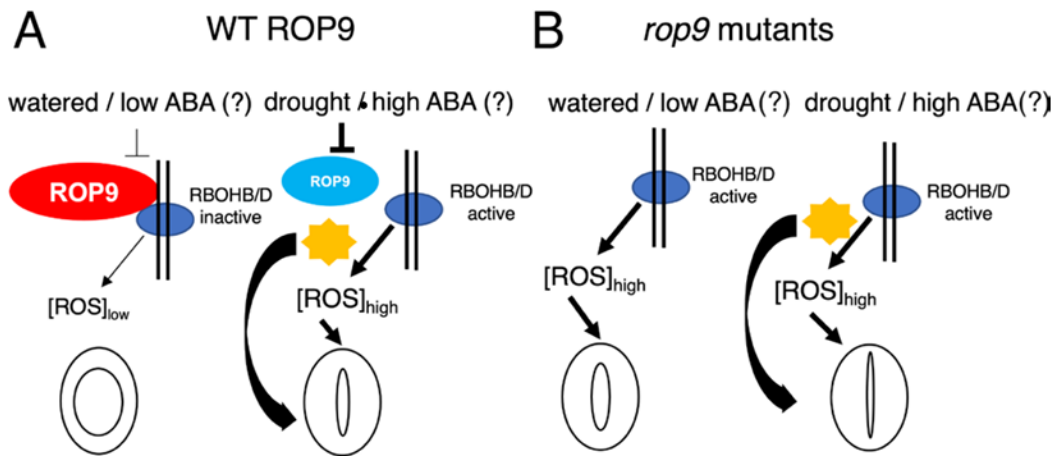
Genellikle solunum patlaması homologu (RBOH)/NADPH oksidazlar tarafından üretilen ve sinyal verilen reaktif oksijen türleri, su eksikliği koşullarında bitkilerin stoma iletkenliğinin bir nedeni olarak dikkate alınması gereken ana stres sinyallerinden ve fizyolojik efektör faktörlerden biridir (Kwak vd. 2003; Suzuki vd. 2011). Bu solunum patlaması oksidaz homologu, Kaur vd. (2018) tarafından NADPH'den oksijene elektron transferinin katalizörü olarak tanımlanmıştır. Bu, süperoksit anyonlarının (O_2^-) oluşumuna neden olur. Kuraklık stresi koşulları başladığında, bitki ABA hormonu üretir ve bu da RBOH'nin aktivasyonunu sinyalleştirir. Arabidopsis'te (RBOHD ve RBOHF) iki RBOH'nin su eksikliği stresi altında koruyucu hücrelerde sinyalleri indüklemekten sorumlu olduğu bulunmuştur. Bu da hücrelerde hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimini tetikler (Kwak vd. 2003; Miller vd. 2009).

Geiger vd. (2009) araştırmalarında, bitki ve çevresinde su kıtlığı olduğunda, terleme yoluyla aşırı su kaybını önlemek için bitki tarafından ABA hormonu yukarı doğru düzenlenir ve bu da reseptörlerinin PP2C'lere bağlanmasına ve ardından PP2C'lerin inaktivasyonuna neden olur. Bu inaktivasyon SnRK2'nin aktivasyonuna yol açarken, bu kinazın işlevlerinden biri RBOHF/D'yi fosforile etmektir. Bu da koruyucu hücrelerde hidrojen peroksit gibi ROS üretiminin başlamasına yol açmaktadır (Sirichandra vd. 2009). Plazma zarında bulunan kalsiyum kanalları daha sonra H_2O_2 tarafından manipüle edilerek sitozolde Ca^{2+} konsantrasyonunun ($[Ca^{2+}]_n$) artmasına neden olur ve bu da anyon kanallarının aktivasyonu ve K^+ kanallarının inhibisyonu yoluyla stoma gözeneklerinin kapanmasına yol açmaktadır (Pei vd. 2000; Kim vd. 2010).

Özellikle, rop9 mutantlarında gözlemlenen gelişmiş stoma kapanmasının koruyucu hücrelerdeki ROS seviyelerinin artmasıyla ilişkili olup olmadığını inceleyen Puli vd. (2024), SIROP9 genini sekans analizi için kullanarak SIRBOHB, SIRBOHD ve SIRBOHG'nin *Arabidopsis* AtRBOHD ve AtRBOHF'ye en yakın olduğunu fark ettiler. Bunlar, daha önce stoma fonksiyonlarıyla bağlantılı olduğu görülen *Arabidopsis*'teki iki RBOH'dur (Kwak vd. 2003; Miller vd. 2009). Puli vd. (2024), GFP etiketli ROP9 ve mCherry floresan etiketli RBOHB'nin kolokalizasyon çalışmalarını gerçekleştirmek için *N. benthamiana*'yı referans olarak kullanmıştır. Daha önceki filogeni analizlerinde, ROP9 geninin *N. benthamiana* ve domates arasında yüksek düzeyde amino asit koruma ve sonuç olarak fonksiyonel koruma gösterdiği ortaya konmuştur. Kolokalizasyon çalışmalarının

sonuçları, iki protein arasında etkileşim olduğunu göstermiştir. Buna dayanarak, SIROP9 ve SIRBOHB'nin stoma koruma hücrelerinde yukarı doğru düzenlendiği ve SIROP9'un SIRBOHB'yi bloke ederek ROS oluşumunu engelleyerek etkileşime girebileceği sonucuna varmışlardır. Ayrıca, ROP proteininin C-terminaline bir probun bağlandığı floresan prob tasarımları, ABA tedavileri altında mutantların koruyucu hücrelerinin plazma zarından sitoplazmaya probun geri çekildiğini göstermiştir. Bu, ABA'nın varlığının SIROP9'un ekspresyonunu inhibe ettiğini doğrulamıştır.

Ancak, ROS'un DCF floresan analizinde, SIROP9 geni inaktive edildiğinde, normal koşullar altında bile ROS ekspresyonunun artabileceğini bulmuşlardır. Bu da, SIROP9'un inaktivasyonunda ABA'nın üretilen ROS üzerinde sadece ek bir etki yarattığı sonucuna götürmüştür (Puli vd. 2024).



Şekil 2.16. SIROP9, ABA ve RBOH etkileşiminin şematik özeti (Puli vd. 2024'ten düzenlenerek alıntılanmıştır)

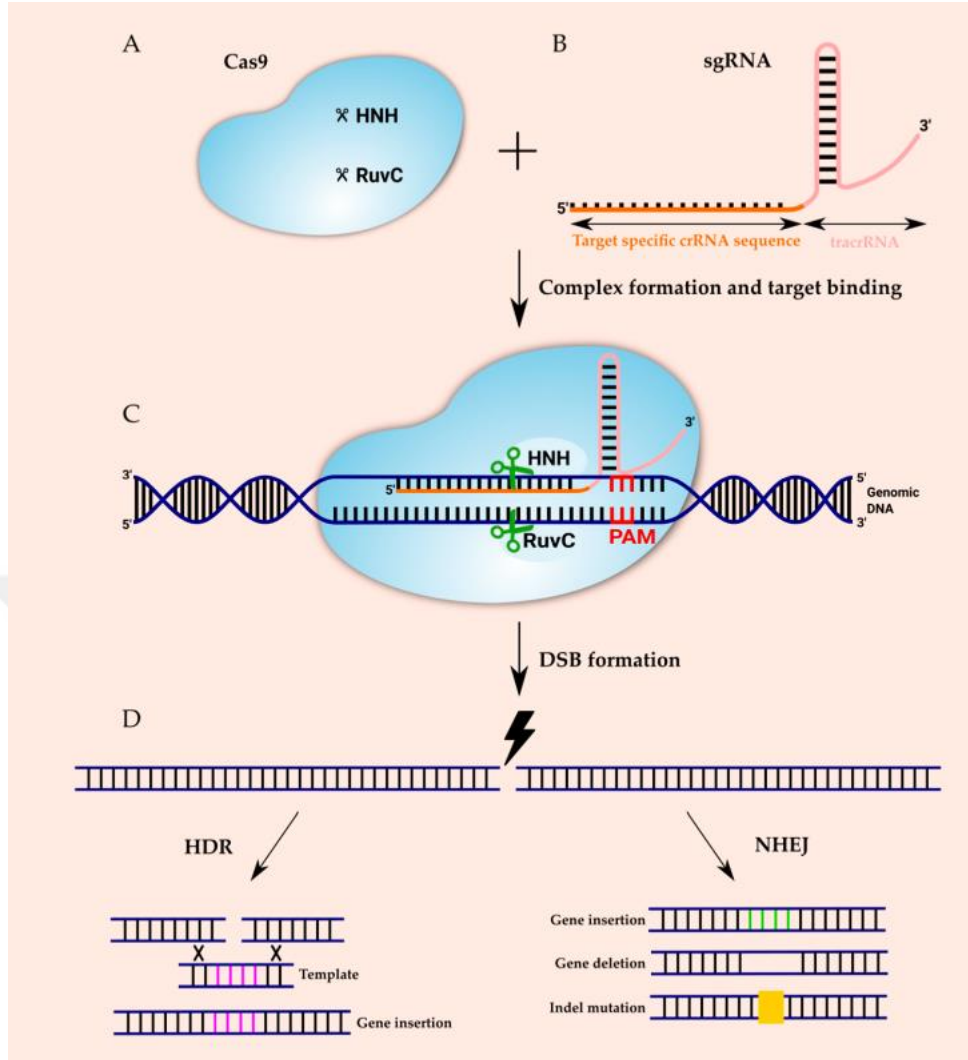
2.8. CRISPR/Cas9 Düzenleme Yöntemi

CRISPR/Cas9, bakteri ve arkeler tarafından kullanılan adaptif bağışıklık mekanizmasına dayanan bir gen düzenleme aracıdır (Hille ve Charpentier 2016). Bu Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) başlangıçta bakterilerdeki adaptif bağışıklık sisteminin bir parçası olarak tanımlanmış olsa da, bu sistem prokaryotların viral DNA fragmanlarını kendi genomlarına entegre ederek önceki saldırıların bir "hafızasını" oluşturarak viral enfeksiyonlara karşı savunma yapmalarını sağlamaktadır (Asmamaw ve Zawdie 2021). Bu prosedürü kullanarak bakteriler 3 ana adımda kendilerini savunurlar. İlk olarak, tekrarlayan dizilerin tam ortasında bulunan CRISPR lokusuna bir ara parça ekler. Ardından bu ara parça, tekrarlayan dizi ile birlikte transkripsiyona uğrayarak bir RNA dizisi oluşturur ve bu dizi daha sonra hem ara parçayı hem de tekrarlayan diziyi içeren crRNA (CRISPR RNA) birimlerine ayrılır. Son olarak, kesim proteinini kodlayan ve CRISPR lokusunun hemen yanında bulunan Cas geni, virüs başka bir saldırıda bulunduğu virüsün DNA'sında bir kesik oluşturmaktadır. Bu kesik, viral DNA'ya bağlanan crRNA'daki hafıza ara parçasının yardımıyla yapılır ve böylece Cas proteini kesilecek yeri belirler (Rath vd. 2015). Bakterilerin bu bağışıklık sistemini referans

noktası olarak kullanarak, bu kavram CRISPR ile ilişkili proteinle birlikte, DNA dizilerinin belirli ve verimli bir şekilde düzenlenebildiği bitkiler ve hayvanlarda uygulanabilir olduğu düşünülmüştür (Doudna ve Charpentier 2014).

Cas proteinlerinin doğası, CRISPR/Cas sisteminin 2 ana sınıfa ayrılmasını sağlar: I, III ve IV tiplerinden oluşan Sınıf I ve II, V ve VI tiplerinden oluşan Sınıf II. Sınıf II, çok daha karmaşık çok alt birimli Cas proteinine sahip diğer sınıfa kıyasla, tek Cas proteini ile nispeten daha az karmaşık olduğundan, genetik mühendisliğinde kullanımı için yoğun bir şekilde incelenmiştir (Liu vd. 2020; Asmamaw ve Zawdie 2021). CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak gen düzenlemesi yapılabilmesi için, hedef DNA'nın bir bölümünü tamamlayan bir kılavuz RNA (gRNA) ve *Streptococcus pyogenes*'ten elde edilen bir protein olan Cas9 proteini (SpCas-9) gereklidir. Bu proteinler, hedef DNA'da temiz bir çift sarmal kırılma oluşturarak gen düzenlemesini mümkün kılar (Mei vd. 2016; Asmamaw ve Zawdie 2021). Cas9 proteinini özel kılan, gRNA'ya bağlanmayı mümkün kılan tanıma lobu (REC) ayrıca RuvC ve HNH alanlarından oluşan nükleaz lobu, her bir DNA iplikçikini (sırasıyla tamamlayıcı olmayan ve tamamlayıcı iplikçik) bağımsız olarak keser ve ayrıca hedef DNA bağlanmasını başlatan Protospacer Adjacent Motif (PAM) alanıdır (Nishimasu vd. 2014; Asmamaw ve Zawdie 2021). Benzer şekilde, Mei vd. (2016) göre, gRNA da hedef DNA'ya tamamlayıcı bir şekilde bağlanmasını sağlayan iki bileşene sahiptir (18-29bp crRNA) ve Cas9 endonükleazın bağlanabileceği bir döngü iskeleti görevi görmektedir (tracrRNA) (Asmamaw ve Zawdie 2021). gRNA'nın bu özellikleri, gen düzenleme için sentetik tek gRNA (sgRNA) manipülasyonuna ve oluşturulmasına olanak tanımaktadır. Sentetik bir gRNA oluşturulduktan sonra, aksi takdirde inaktif olan Cas9 endonükleazı, önceden tanıdığı hedef DNA dizisine yönlendirerek, 3bp-NGG PAM bölgesinin yaklaşık 3 baz çifti yukarısında, çıkıntısız temiz bir çift sarmal kırılma indüklemek için kullanılabilir (Ceasar vd. 2016; Asmamaw ve Zawdie 2021).

Çift sarmallı kırılma hedef sekansa uygulandıktan sonra, organizmanın hücreleri neden olan hasarı onarmak için çaba gösterir ve bu süreçte ya homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ya da homolog yönlendirmeli onarım (HDR) mekanizması devreye girmektedir (Liu vd. 2019; Asmamaw ve Zawdie 2021). CRISPR/Cas9 düzenleme sisteminde NHEJ'ye kıyasla daha az kullanılan homoloji yönlendirmeli onarım, kırılma noktasına belirli bazları eklemek için bir kılavuz olarak harici bir DNA şablonu (ilgi şablonu) kullanmaktadır (Yang vd. 2020; Asmamaw ve Zawdie 2021). Öte yandan NHEJ, enzimatik bir prosedür kullanarak kırığın her iki tarafındaki iki kesik ucu zorla birleştirerek DSB'yi onaran daha popüler bir düzenleme şeklidir. Bunu yaparken, genin tüm çerçeve kaymasını değiştirebilecek bir silme veya eklemeyi tetikleyebilmekte veya anlamsız bir mutasyon tetikleyebilmektedir (Yang vd. 2020; Asmamaw ve Zawdie 2021). Bu nedenle, CRISPR/Cas9 düzenleme yönteminin kullanılması, sessiz mutasyonlar, hedef dışı mutasyonlar ve çerçeve kayması mutasyonları gibi istenmeyen mutasyonlara yol açabilmektedir (Peng vd. 2016). Bu nedenle, CRISPR ile ilgili bu olumsuz sonuçları azaltmak için baz düzenleyiciler ve yüksek doğruluklu Cas9 varyantları gibi modifikasyonlar yapılmıştır (Kleinstiver vd. 2016).



Şekil 2.17. CRISPR/Cas 9 gen düzenleme sisteminin şematik diyagramı (Janik vd. 2020'den düzenlenerek alıntılanmıştır)

CRISPR/Cas9 düzenleme yöntemi, tarım sektöründe bitkilerde hastalık direnci, kuraklık ve ısı toleransı, verim artışı, raf ömrü ve besin kalitesinin iyileştirilmesi gibi modifiye özellikler yaratmak ve mahsul gelişimini iyileştirebilecek diğer faktörleri geliştirmek için uygulanan, yaygın olarak kabul gören bir düzenleme sistemi haline gelmiştir (Chen vd. 2019). Bitkilerde CRISPR'ın bu uygulamasında, kullanılabilen teslimat yöntemleri, DNA ile kaplanmış altın veya tungsten parçacıklarının bitkinin hücrelerine atışıldığı biyolistik teslimat veya parçacık bombardımanı yöntemidir (Svitashev vd. 2016). DNA içermeyen genom düzenleme yöntemlerinin kullanımı da son zamanlarda, kolayca parçalanabilen CRISPR/Cas9 ribonükleoproteinlerin (RNP'ler) elektroporasyon yoluyla, protoplast aracılığıyla transfeke edilerek veya doğrudan bitki hücrelerine bombardıman yoluyla aktarılması şeklinde bir aktarım yöntemi olarak benimsenmiştir (Woo vd. 2015; Malnoy vd. 2016).

Son zamanlarda, DNA içermeyen genom düzenleme yöntemleri, transgenik olmayan düzenlenmiş bitkiler üretme potansiyeli nedeniyle dikkat çekmiştir. Bu stratejide, önceden birleştirilmiş CRISPR/Cas9 ribonükleoproteinler (RNP'ler) elektroporasyon, protoplast transfeksiyonu veya parçacık bombardımanı yoluyla doğrudan bitki hücrelerine aktarılmaktadır. RNP'ler hızla parçalandığı ve genomla bütünleşmediği için, bu yaklaşım istenmeyen genetik değişiklik riskini önemli ölçüde azaltmakta ve birçok ülkede düzenleyici onay için bir yol sunmaktadır (Woo vd. 2015; Malnoy vd. 2016). Ancak en yaygın kullanılan aktarım yöntemi *Agrobacterium* aracılı dönüşüm yöntemidir. Bu yöntem, bakterinin DNA'sının bir kısmını (T-DNA) bitkinin genomuna yerleştirme konusundaki doğal yeteneğine büyük ölçüde dayandığı için çoğunlukla kullanılmaktadır (Gelvin 2003). Bu sistemde, T-DNA bölgesinde ilgi konusu geni içeren ikili bir vektör, *Agrobacterium*'a elektroporasyon yoluyla aktarılmakta ve onu dönüştürmektedir. Daha sonra, bu dönüştürülmüş bakteri, eksize edilmiş eksplantlarla birlikte kültürlenmekte, böylece bakteri eksplantı enfekte edebilmekte ve sonunda ilgilenilen geni içeren T-DNA kısmını bitki genomuna salabilmektedir (Hiei vd. 1994). Bu teknik, özellikle *Arabidopsis thaliana*, domates (*Solanum lycopersicum*) ve tütün (*Nicotiana tabacum*) gibi dikotiledon bitkiler olmak üzere çok çeşitli bitkilerde uygulanmıştır (Gao vd. 2015; Secgin vd. 2021; Rönspies vd. 2022).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Biyoinformatik Çalışmalar ve Analizler

Burada, genle ilgili tüm bilgiler çeşitli Gen veri tabanlarından elde edilmiştir. Bu, doğru ve başarılı gen klonlamasının gerçekleşmesi için genle ilgili gerekli ayrıntılara sahip olmak için yapılmıştır. Bununla SIROP9 dizisi, SIROP9 homolog dizileri, intron ve ekzon sayısı, kromozom numarası, geni çoğaltacak primerler, CRISPR/Cas9 düzenlemesini kolaylaştırmak için gRNA, plazmid tasarımı ve diğer biyoinformatik ayrıntılar tanımlandı ve tasarlandı.

3.1.1. SIROP9 dizisinin ve ortologlarının bulunması

National Center for Biotechnology Information- NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) ve Sol Genomics (<https://solgenomics.net/>) sitelerinde SIROP9'un genomik dizisi, mRNA dizileri ve protein dizileri bulunmuş, indirilmiş ve dizilerdeki benzerlikler için tüm sitelerde karşılaştırılmıştır.

Daha sonra SIROP 9 dizisinin bulunduğu aynı sitede (Sol Genomics), ROP9 geninin başka homologları olduğu için farklı kromozomlarda farklı yüzdelerde ROP 9'a benzer dizileri bulmak için genin genomik dizisi kullanılarak BLAST yapılmıştır.

3.1.2. SIROP homologlarının çoklu dizi hizalaması (MSA)

Genomik sekans ve amino asit sekansının MSA'sı Uniprot (www.uniprot.org) ve Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) üzerindeki Çoklu Sekans Hizalama aracı kullanılarak yapılmıştır. Bu gerekliydi çünkü homolog genler genellikle hepsinde mevcut olan korunmuş bölgelere sahiptir. Dolayısıyla, CRISPR/Cas9 düzenlemesi için gRNA tasarlandıktan sonra, düzenleme için seçilen gRNA'nın diğer homologlarda bulunmaması zorunludur. Buna uyulmaması, SIROP9 olmayan diğer tüm homolog genlerin de düzenlenebileceği ve hedeflenen amaçtan, yani Su Kullanım verimliliğinden farklı beklenmedik bir mutasyon üretebileceği anlamına gelmektedir.

3.1.3. Yüksek düzeyde spesifik SIROP9 gRNA'nın tasarlanması, seçilmesi ve sipariş edilmesi

Bir gene (SIROP9) özgü bir gRNA tasarlamak için CRISPRdirect'te (<http://crispr.dbcls.jp/>) bulunan algoritma kullanılmıştır. Oldukça spesifik bir gRNA dizisi tasarlanırken aşağıdaki kriterlere uyulmuştur:

- 20merde T-dimer yok
- 40-60% GC içeriği
- NGG PAM dizisi
- 1 20mer'de
- 1 12mer'de

- >1500 8mer'de

Bu kriterlere dayanarak, domatesin ve muhtemelen diğer Solanaceae familyasının CRISPR/Cas9 düzenlemesi için kullanılacak ve daha sonra Su Kullanım verimliliğini artırmak için kullanılabilecek oldukça spesifik bir gRNA seçildi. En uygun gRNA seçildikten sonra, bunun ters ipliği “Reverse Complement” sitesinden elde edilmiştir. Daha sonra, gRNA'nın hem ileri hem de ters ipliği, sırasıyla 5' çıkıntılarında (ATTG ve CAAA) Bsa1 restriksiyon enzimi tanıma bölgesi ile tasarlanmış ve sipariş edilmiştir (Çizelge 3.1). Bsa1 tanıma bölgesine de sahip olduğu için gRNA'nın yukarı regülasyonu için kullanılacak plazmide bağlanmasına izin verecek şekilde tasarlanmıştır

Çizelge 3.1. Bsa1 Restriksiyon enzimi tanıma bölgesi ile ROP9 gRNA dizisi

Primer Adı	Primer Dizilim
ROP9 GRNA F	5' ATTGTTAAGGCCACTGAGCTACCG 3'
ROP9 GRNA R	3' AATTCCGGTGACTCGATGGCCAAA 5'

3.1.4. SIROP9 gen primer tasarımı ve siparişi

İlk olarak, gRNA bölgesi SIROP9'un genomik dizisine yerleştirildi. gRNA'nın 300bp yukarı akışından 300bp aşağı akışına kadar olan bölge seçildi, kopyalandı ve Primer3 Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin>) web sitesine yapııştırıldı. Daha sonra primerler, Primer minimum 18, maksimum 22 ve optimal aynı; Primer Sıcaklığı minimum 54°C, maksimum 60 ve optimal 57°C; Sıcaklık farkı 0,1°C; GC içeriği minimum %40, maksimum %60 ve optimal aynı; Maksimum poli X 2; ve Ürün boyutu minimum 400bp faktörleri ile tasarlanmıştır.

Çizelge 3.2. İleri ve Ters SIROP9 gen primer dizisi

Primer Adı	Sekans 5'-3'
SIROP9 F	ACAACTTCAGCGCCAATGT
SIROP9 R	GTGCCAGCTAATACCACCG

3.1.5. Kaset 1 ve 52256/ pco-CAS9 plazmid tasarımı

Bu çalışmada, klonlama için iki ana plazmid kullanılmıştır. Kaset 1 plazmidini olarak adlandırılan bir plazmid (723bp) SIROP9 gRNA oligolarının upregülasyonu ve ekspresyonu için kullanılmıştır. gRNA oligo dizisini yukarı-regüle etmek için bir Kaset 1 plazmidini tasarlanmıştır (Şekil 3.1). Bir promotör (Arabidopsis thaliana U6-26) bir terminator (Arabidopsis thaliana'dan U6-26 pol III terminatorü), gRNA'nın Cas9 enzimini DNA dizisinde doğru konuma yönlendirmesini sağlayan ve kompleksin düzgün çalışmasını sağlayan önemli bir bileşen olan tek gRNA iskelesi, gRNA'nın bağlanmasına

izin vermek için bir Bsa1 kesme ve tanıma bölgesi ve EcoR1 ve Pac1 kesme bölgeleri içeriyordu (Şekil 3.2.).

```
GAATTCGACTTGCCTTCCGCACAATACATCATTCTTCTTAGCTTTTTTCTTCTTCTTCGTTCT
ATACAGTTTTTTTTGTTTATCAGCTTACATTTTCTTGAACCGTAGCTTTCGTTTTCTTCTTTTT
AACTTCCATTCGGAGTTTTTGTATCTTGTTTCATAGTTTGTCCCAGGATTAGAATGATTAGG
CATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTTCATTCTTAAGATATGAAGATAATCT
TCAAAAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCCATTTATATGGGAAAGAACA
ATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAAAACAATCTTCAAAGTCCCACATCGCTTA
GATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGGGAGACCA
AGGTCCTCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGA
AAAAGTGGCACCAGAGTCGGTGC TTTTTTTTGCAAAATTTCCAGATCGATTTCTTCTTCTCT
GTTCTTCGGCGTTCAATTTCTGGGGTTTTCTTTCGT TTTCTGTAACCTGAAACCTAAATTTGA
CCTAAAAAAAATCTCAAATAATATGATTCAAGTGGTTTTGTACTTTTCAGTTAGTTGAGTTTG
CAGTTCCGATGAGATAAACCAATA TTAATTAA
```

Toplam boyut:723bp

GAATTC: EcoRI kesim bölgesi

CGACTTGCCTT: ArabidopsisthalianaU6-26

GTTTTAGAGC: single gRNA scaffold

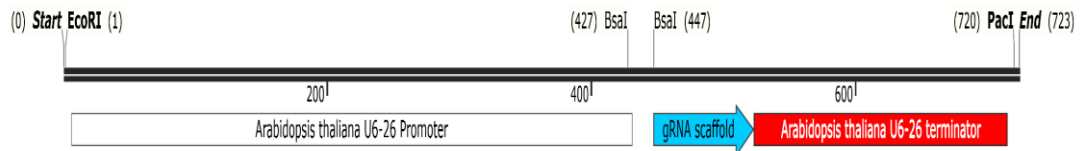
Gaaacaccggtg: gRNA'nın yerleştirileceği bölge

Gagacc – ggtctc : Bsa1 kesim bölgesi

TTTTTTTTGCAA: U6-26 pol III terminator from Arabidopsis thaliana |

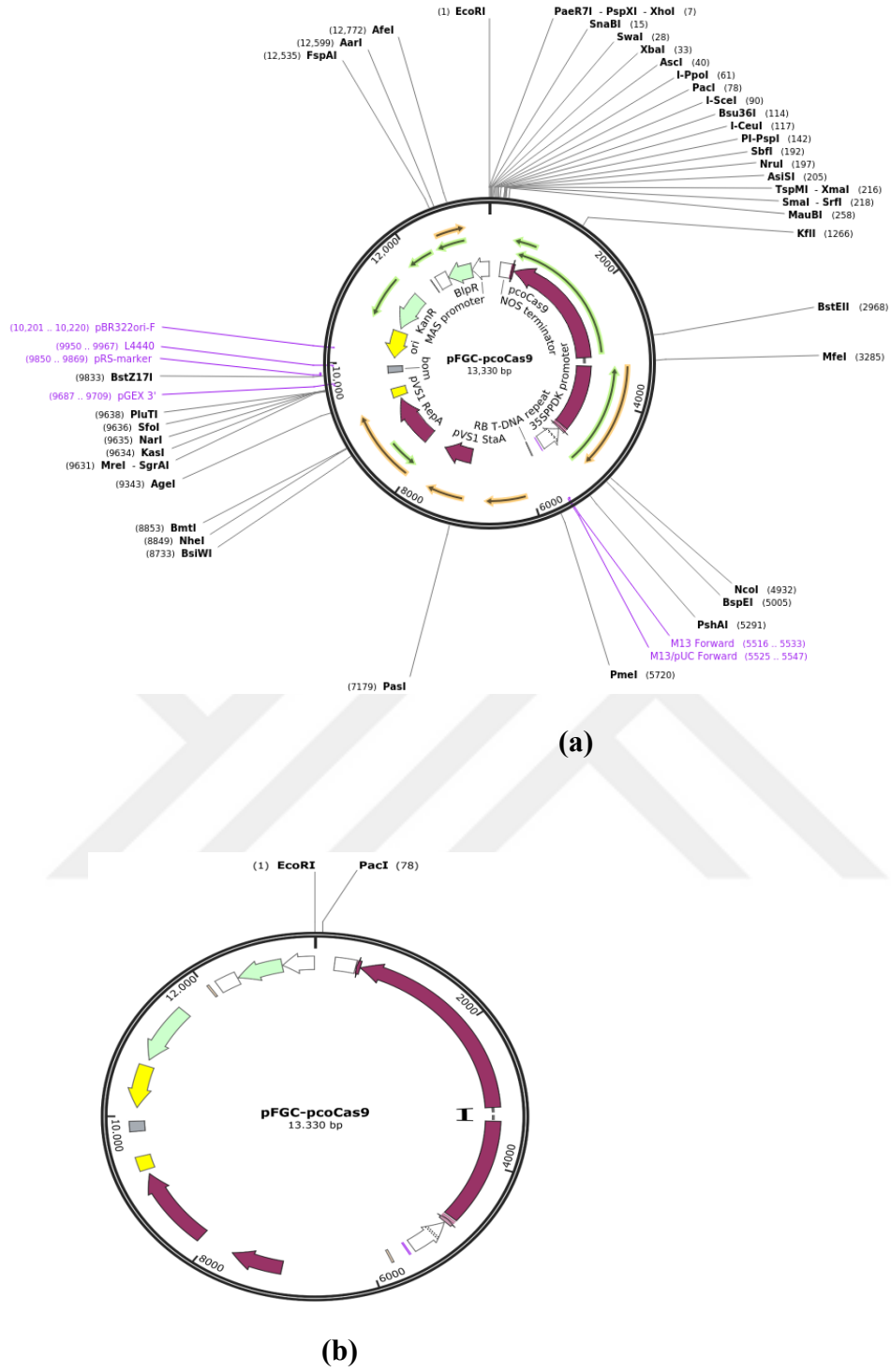
TTAATTAA: PacI kesim bölgesi

Şekil 3.1. Her bir içeriğin konumunu gösteren tasarlanmış Kaset 1 gen dizisi



Şekil 3.2. Kaset 1 plazmid temsili haritası

Diğer plazmid, 52256 plazmidi olarak da adlandırılan pcoCAS9, *Streptococcus pyogenes* türevi Cas9 endonükleazını içerir ve Cas9'un bitki ekspresyonuna izin vermekte ve Şekil 3.3a, b'de görüldüğü gibi kesim enzimleri Pac1 ve EcoRI kullanılarak gRNA eklenmesi için çoklu klonlama bölgeleri içermektedir.



Şekil 3.3. ADDGENE pFGC-pcoCas9 vektör temsili haritası (<http://n2t.net/addgene:52256>; RRID: Addgene_52256) **a)** Çoklu Klonlama Bölgelerinin Varlığı; **b)** Sadece bu çalışma için kullanılan restriksiyon enziminin varlığı

3.2. Gen Klonlama

Hem Kaset1 hem de 52256 plazmidleri (bir mikrosantrifüj tüpünün dibindeki küçük, görünmez beyaz pelet) daha sonra nükleaz içermeyen su veya TE tamponu (genellikle 10-50 µL) içinde yeniden hidratlandı, hafifçe vortekslendi ve kısa bir süre döndürüldü. Daha sonra, *E. coli* kompetent hücrelerinde (genellikle DH5α veya TOP10 hücreleri) ayrı ayrı çoğaltılmıştır.

3.2.1. Kompetent *Escherichia coli* bakteri hücrelerinin hazırlanması

Plazmidleri başarılı bir şekilde çoğaltmak için öncelikle kompetentkompetent *Escherichia coli* bakteri hücreleri hazırlanmıştır:

- *E. coli* suşu (örn. DH5α, TOP10)
- YEP broth (Yeast Extract Pepton)
 - 10 g/L yeast extract
 - 10 g/L pepton
 - 5 g/L NaCl
 - 121°C'de 20 dakika otoklavlanmış ve soğutulmuş
- Ice-soğuk steril su
- Glycerol (%15) - kriyoproteksiyon için
- Sterile mikrosantrifüj tüpleri, pipetler, santrifüj
- Buz, etanol ve kuru buz veya sıvı nitrojen (dondurma için)

Bu malzemelerle, ilk olarak tek bir *E. coli* kolonisi steril bir halka kullanılarak yeni streçlenmiş bir agar plakasından alınmış ve bir kültür tüpünde 5 mL steril YEP broth içine inoküle edilmiştir. Kültür, durağan faza ulaşması için 225 RPM'de çalkalanarak 37 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra bir gecelik kültür, 500 mL'lik bir Erlenmeyer şişesinde 100 mL taze, steril YEP broth içine 1 mL kültür aktararak 1:100 oranında seyreltilmiştir. Kültür, kimyasal yeterlilik için en uygun fizyolojik durum olan erken-orta log fazına karşılık gelen 0,4-0,6'lık 600 nm'de optik yoğunluğa (OD₆₀₀) ulaşana kadar 225 rpm'de çalkalanarak 37 °C'de büyütülmüştür.

Hedef OD değerine ulaşıldığında, şişe buza aktarıldı ve hücreleri soğuk şoka uğratmak ve membranları stabilize etmek için 15-20 dakika inkübe edildi. Kültür daha sonra hücreleri peletlemek için 4 °C ve 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant, yumuşak peleti bozmadan dikkatlice boşaltılmıştır. Hücre peleti 40 mL buz gibi soğuk 0,1 M CaCl₂ solüsyonu içinde nazikçe pipetlenerek yeniden süspanse edilmiştir. Bu tuz işlemi, hücre zarındaki negatif yükleri nötralize ederek DNA alımını kolaylaştırmıştır.

Süspansiyon, Ca^{2+} iyonlarının hücelere nüfuz etmesi ve hüceleri koşullandırması için yeterli süreyi sağlamak üzere 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir. Hüceler aynı koşullar altında (4 °C, 4000 rpm, 5 dakika) tekrar santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Pelet, %15 gliserol içeren 5-10 mL taze hazırlanmış buz gibi soğuk 0,1 M CaCl_2 içinde nazikçe yeniden süspanse edildi. Bu çözelti hüceleri stabilize etmiş ve uzun süreli saklama için kriyoprotektan görevi görmüştür. Kompetent hücre süspansiyonunun 50 µL hacmi, soğuk koşulları korumak için soğutulmuş pipet uçları kullanılarak steril 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine dağıtılmıştır. Alikotlar kuru buz/etanol veya sıvı nitrojen kullanılarak anında dondurulmuş, ardından saklanmak üzere derhal -80 °C'ye aktarılmıştır. Her tüp, ileride başvurmak üzere suş adı, hazırlanma tarihi ve “kimyasal olarak kompetent” ibareleriyle açıkça etiketlenmiştir.

3.2.2. Kaset 1 ve 52256 plazmidlerinin çoğaltılması ve amplifikasyonu

Plazmidleri kompetent bakteri hücelerine çoğaltmak ve çoğaltmak için, 1 litre Kanamisin (50mg/ml) seçilebilir YEP plakası aşağıdakiler ölçülerek hazırlanmıştır:

- 10 g/L yeast extract
- 10 g/L pepton
- 5 g/L NaCl (Belirli suşlar için gerekiyorsa)
- 5g/L Bakto agar

Bu daha sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlanmış ve 50°C'de 1 saat su banyosunda soğutulmuştur. 1000µl kan50 YEP besiyerine pipetlendi ve iyice döndürüldü. Karışım petri kaplarına dökülmüş, etiketlenmiş ve soğuyup kurumaya bırakılmıştır.

Ardından, daha önce -80 °C'de saklanan kompetent E. coli hüceleri, canlılığı ve kompetentliği korumak için yaklaşık 10-15 dakika boyunca buz üzerinde yavaşça çözdürülmüştür. 5 µL plazmid DNA, steril, önceden soğutulmuş bir mikrosantrifüj tüpünde 50 µL çözölmüş kompetent hücelere yavaşça eklenmiştir. Karışım daha sonra hücelerin kesilmesini önlemek için pipetlemeden karıştırmak üzere hafifçe fiske edilmiştir. DNA-hücre karışımı, DNA'nın bakteri hücresi membranına yapışmasını sağlamak için 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra tüp, DNA'nın membran boyunca alımını kolaylaştıran bir ısı şokuna neden olmak için 45-60 saniye boyunca 42 °C'lik bir su banyosuna yerleştirildi. Isı şokunun hemen ardından, membranı stabilize etmek ve hücre lizisini önlemek için hüceler 2 dakika boyunca buza döndürölmüştür. Soğuk inkübasyondan sonra, bakterilerin toparlanmasına ve antibiyotik direnç genini ifade etmesine izin vermek için tüpe 500 µL önceden ısıtılmış YEP ortamı (antibiyotiksiz) eklenmiştir. Plazmid ekspresyonunu ve hücre toparlanmasını kolaylaştırmak için kültür 37 °C'de 1 saat boyunca çalkalanarak (~225 rpm) inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından hüceler 4 °C'de 4000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenerek döndürölmüş hüceler peletlenmiştir. Süpernatantın yaklaşık 500 µL'si dikkatlice boşaltılmış ve pelet ile birlikte kalan sıvı pipetleme yoluyla nazikçe yeniden süspanse edilmiştir. Yeniden süspanse edilen kültür, steril bir yayıcı kullanılarak kanamisin (50

$\mu\text{g/mL}$) içeren bir YEP agar plakasına eşit şekilde yayılmıştır. Plaka, yoğunlaşmanın koloni oluşumunu engellemesini önlemek için gece boyunca 37°C 'de ters çevrilmiş bir konumda inkübe edilmiştir. Ertesi gün, iyi izole edilmiş tek bir koloni seçildi ve $5\ \mu\text{L}$ kanamisin stok çözeltisi ($50\ \text{mg/mL}$) ile desteklenmiş $5\ \text{mL}$ YEP broth içine inoküle edildi. Aşılanan kültür, dönüştürülen hücreleri ve plazmidi çoğaltmak için yaklaşık $225\ \text{rpm}$ 'de çalkalanarak 37°C 'de gece boyunca inkübe edilmiştir.

3.2.3. Plazmid izolasyonu/ekstraksiyonu

ThermoFisher Scientific Plazmid Ekstraksiyon Kiti (GeneJET Plazmid Miniprep Kiti) ve protokolü kullanılarak (Anonymous 1), daha önce seçici YEP besiyerinde bir gece boyunca büyütülen bakteri hücreleri $14.000\ \text{rpm}$ 'de 2 dakika boyunca santrifüjlenerek peletlendi. Elde edilen pelet, $250\ \mu\text{L}$ Resüspansiyon Solüsyonu (RNaz A içeren) içinde, tüm kümeleri parçalamak için aşağı yukarı pipetlenerek iyice yeniden süspansiyon edildi. Tam resüspansiyon, sonraki adımlarda homojen hücre lizisi sağlamak için gereklidir. Hücre süspansiyonu steril bir $1,5\ \text{mL}$ mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Herhangi bir hacim kaybını veya kontaminasyonu önlemek için özen gösterilmiştir. Süspansiyona $250\ \mu\text{L}$ Lizis Solüsyonu eklenmiş ve solüsyon viskoz ve hafif berrak hale gelene kadar tüp 4-6 kez nazikçe ters çevrilmiştir. Bu alkali lizis adımı hücre membranlarını bozmuş ve kromozomal DNA ve proteinleri denatüre etmiştir. Aşırı maruziyet plazmid hasarına yol açabileceğinden karışım vortekslenmemiş ve 5 dakikadan fazla inkübe edilmesine izin verilmemiştir.

Lizisin hemen ardından karışıma $350\ \mu\text{L}$ Nötralizasyon Solüsyonu eklenmiştir. Tam nötralizasyon sağlamak için tüp 4-6 kez ters çevrildi. Plazmid DNA'yı çözeltide bırakırken proteinlerin, hücre kalıntılarının ve genomik DNA'nın başarılı bir şekilde çöktüğünü gösteren beyaz bir çökelti oluştu. Nötralize edilmiş lizat 5 dakika boyunca tam hızda santrifüjlenmiştir. Bu adım, çökelmiş kalıntıları tüpün dibinde sert bir pelet halinde sıkıştırdı ve plazmid DNA'yı içeren berrak bir süpernatant bıraktı. Berrak süpernatant dikkatlice bir toplama tüpüne yerleştirilen bir GeneJET döndürme kolonuna aktarılmıştır. Peletin bozulmamasına veya sonraki uygulamaları engelleyebilecek beyaz çökeltilerin taşınmamasına dikkat edildi. Plazmid DNA'yı silika membrana bağlamak için kolon $13.000\ \text{rpm}$ 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Akış suyu atıldı ve kolon aynı toplama tüpüne geri konuldu.

$5500\ \mu\text{L}$ Yıkama Solüsyonu (kit talimatlarına göre etanol ile seyreltilmiş) kalan proteinleri ve tuzları uzaklaştırmak için kolona eklenmiştir. Kolon 30-60 saniye santrifüj edilmiş ve akış suyu atılmıştır. İkinci bir yıkama adımı, $500\ \mu\text{L}$ daha Yıkama Solüsyonu eklenerek ve ardından santrifüjlenerek gerçekleştirilmiştir. Bu, elüe edilen DNA'nın yüksek saflıkta olmasını sağlamıştır. Akışkan atıldıktan sonra, Yıkama Solüsyonunda kalan ve sonraki enzimatik reaksiyonlara müdahale edebilecek etanolün buharlaşması için kolonun oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmesine izin verilmiştir. Ardından kolon, kalan yıkama tamponu izlerini gidermek için 1 dakika daha santrifüjlenmiştir. GeneJET spin kolonu, elüsyona hazırlanmak üzere temiz, etiketli $1,5\ \text{mL}$ 'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.

$35\ \mu\text{L}$ Elüsyon Tamponu (nükleaz içermeyen su veya $10\ \text{mM}$ Tris-HCl, pH 8.5) DNA geri kazanımını en üst düzeye çıkarmak için doğrudan silika membranın merkezine eklenmiştir. Elüsyon tamponunun membranı tamamen doyurması ve bağlı plazmid

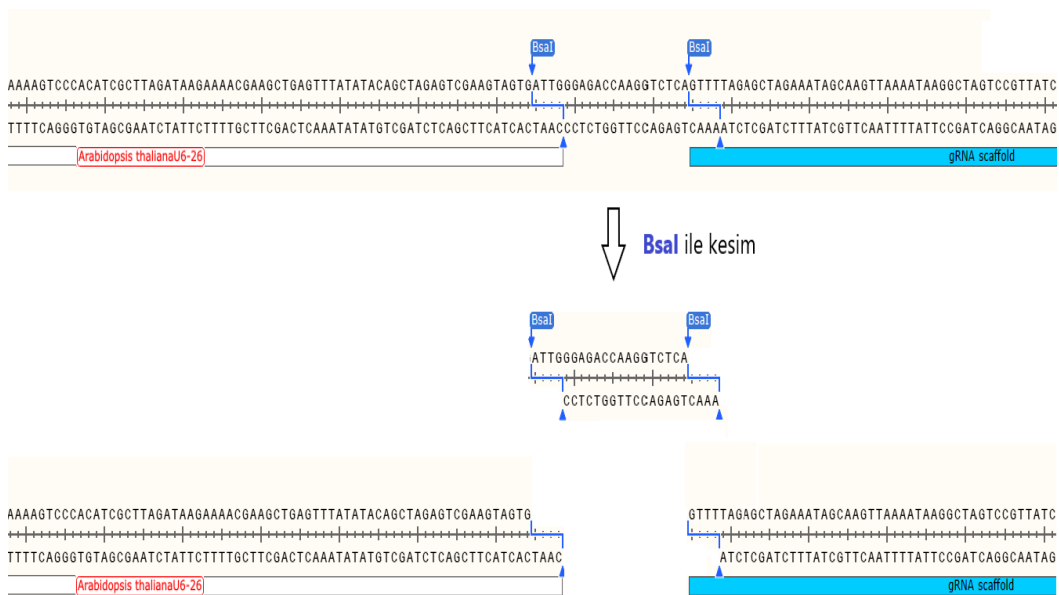
DNA'yı serbest bırakması için kolon oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. Tüp 2 dakika boyunca tam hızda santrifüjlenmiş ve artık saflaştırılmış plazmid DNA içeren eluat mikrosantrifüj tüpünün dibinde toplanmıştır. Kolon daha sonra atılmıştır. Plazmid DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı bir NanoDrop spektrofotometre kullanılarak değerlendirilmiştir. Yaklaşık 42 ng/ μ L'lik tipik bir verim elde edilmiştir ve A260/A280 oranları 1,8 ile 2,0 arasında olup iyi kaliteyi göstermektedir. Saflaştırılan plazmid DNA kısa süreli kullanım için -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.4. İzole Kaset 1 plazmidinin Bsa1 kesimkesimi

Aşağıdaki tamponlar ve enzimler buz üzerine yerleştirilmiştir. Kesim Kesim Çizelge 3.3'teki hacimler kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra mikrofüj tüpleri fiske edildi, döndürüldü ve 2 saat boyunca 37°C'de bir termosiklörde inkübe edildi.

Çizelge 3.3. Kaset 1 plazmid için Bsa1 kesimkesim protokolü

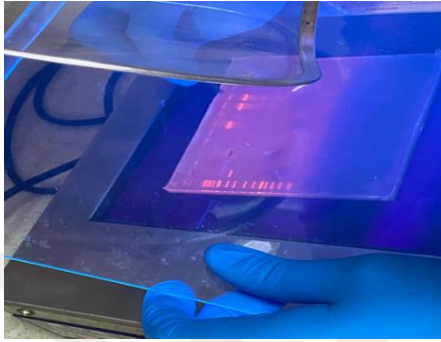
Bileşen	X1
X10 rCut Smart Tampon	5 μ L
Bsa1 HF enzim	1 μ L
Kaset 1 plazmid	10 μ L
dH ₂ O	34 μ L
Toplam	50 μ L



Şekil 3.4. Bsa1 kesimkesimi için önerilen içerikler

3.2.5. Jel Elektroforezi ve Kaset 1'in kesimi

Restriksiyon enzimi ile kesilen kasetin yaklaşık 6µl'si %1 agaroz jel (100µl) üzerinde 70 voltta çalıştırılmış ve yanında 1-2 saat boyunca kontrol ölçüsü olarak kesilmemiş bir kaset de kullanılmıştır. Enzim ile kesilmiş bant kesilmemiş banttı daha küçük bir ağırlığa sahip olmalıdır. Bu durum UV aydınlatıcı altında teyit edilmiştir. Onaylandıktan sonra, taşınabilir bir UV trans-illüminatör altında, kesilmiş plazmid çıkarıldı ve saflaştırma için steril bir 1,5 ml mikrofüj tüpüne yerleştirildi.



Şekil 3.5. Bsa1 ile kesimkesimden sonra bant parçası eksizyonu

3.2.6. JEL izolasyonu/saflaştırılması

Thermo Scientific GeneJET Jel Ekstraksiyon Kiti ve protokolü kullanılarak (Anonymous 2), ilgilenilen DNA parçasını içeren bir jel dilimi temiz bir neşter kullanılarak çıkarılmıştır. Örneği seyreltebilecek ve verimi düşürebilecek çevreleyen jel hacmini azaltmak için DNA bandına mümkün olduğunca yakın kesmeye özen gösterilmiştir. Jel dilimi dikkatlice önceden tartılmış 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. İlk tüp ağırlığı 1,0 g olarak kaydedilmiştir. Jel dilimi eklendikten sonra tüp yeniden tartılmış ve toplam 1,1 g olduğu görülmüştür. Jel diliminin ağırlığı, orijinal tüp ağırlığından 0,1 g (100 mg jele eşdeğer) çıkarılarak hesaplanmıştır. 100 µL Bağlama Tamponu hacmi doğrudan jel dilimine eklenmiştir. Bu 1:1 oranı (1 mg jel başına 1 µL), etkili DNA bağlama hazırlığı için agarozun tamamen kaplanmasını sağlamıştır. Jel ve Bağlama Tamponunu içeren tüp yaklaşık 10 dakika boyunca veya jel dilimi tamamen çözülene kadar 50-60 °C'de inkübe edilmiştir. Bu süre zarfında, erime sürecini kolaylaştırmak ve tamamen çözünmesini sağlamak için tüp periyodik olarak ters çevrilmiştir.

Jel tamamen çözüldükten sonra homojenliği sağlamak için karışım kısa bir süre vortekslenmiştir. Çözeltilinin sarı renk alması pH'ın silika kolon membranına DNA bağlanması için optimum aralıkta olduğunu doğrulamıştır. Daha sonra tamamen çözünmüş jel çözeltisine 1:1 oranında (1 mg ilk jel başına 1 µL) 100 µL hacminde %100 izopropanol eklenmiştir. Etkili DNA çökmesini teşvik etmek ve kolon bağlanmasına hazırlamak için tüp iyice karıştırılmıştır. Çözündürülmüş çözeltinin tüm hacmi dikkatlice GeneJET saflaştırma kolonuna aktarılmıştır. Yükleme, DNA bağlanma verimliliğini azaltabilecek köpüklenme veya sıçramayı önlemek için yavaşça yapıldı. Kolon, DNA'nın kolon membranına bağlanmasını sağlamak için maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Safsızlıklar ve bağlanmamış materyal içeren akışkan atılmış ve kolon aynı toplama tüpüne geri gönderilmiştir.

Kalan tuzları veya kirleticileri gidermek için kolona 700 µL Yıkama Tamponu hacmi eklenmiştir. Kolon 1 dakika boyunca tekrar santrifüjlenmiş ve akış suyu atılmıştır. Yıkama Tamponundan kalan etanolü ortadan kaldırmak için boş kolon 2 dakika daha son bir santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Bu, elüsyon adımı için kritik olan membran tamamen kurumasını sağlamıştır. GeneJET saflaştırma kolonu daha sonra saflaştırılmış DNA'nın elüsyonuna hazırlanmak üzere temiz bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Kolon membranının merkezine doğrudan 35 µL hacminde Elüsyon Tamponu eklenmiştir. Bu, DNA geri kazanımını en üst düzeye çıkarmış ve etkili olmasını sağlamıştır. Elüsyon Tamponunun membrana tamamen nüfuz etmesi ve DNA moleküllerini serbest bırakması için kolon oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kolon 1 dakika santrifüj edilmiştir. Saflaştırılan DNA mikrosantrifüj tüpüne elüe edildi ve artık aşağı yönde kullanım için hazırды. GeneJET saflaştırma kolonu elüsyondan sonra atılmıştır. Elüe edilen DNA örneği kullanıma hazırды.

3.2.7. Jelden izole edilmiş Kaset 1 plazmidi ve SIROP9 gRNA oligolarının ligasyonu

Ligasyon için, sipariş edilen gRNA ileri ve geri dizileri Çizelge 3.4'teki prosedürü izleyerek bir olarak birleştirilmiştir. Daha sonra, termosiklörde 95°C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve ardından oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.4. SIROP9 gRNA oligo ileri ve geri ipliklerinin ligasyonu

Bileşen	X1
ROP9 gRNA F (100µM)	1µL
ROP9 gRNA R (100µM)	1µL
NEB 2.1 Tampon	5µL
dH ₂ O	43µL
Toplam	50µL

Oligolar bir karışım olarak birleştirildikten sonra Çizelge 3.5'teki prosedür izlenerek Kaset 1 ile ligasyon için kullanılmıştır. Tüpler fiske edilerek döndürülmüş ve termosiklörde 25°C'de 2 saat inkübe edilmiştir.

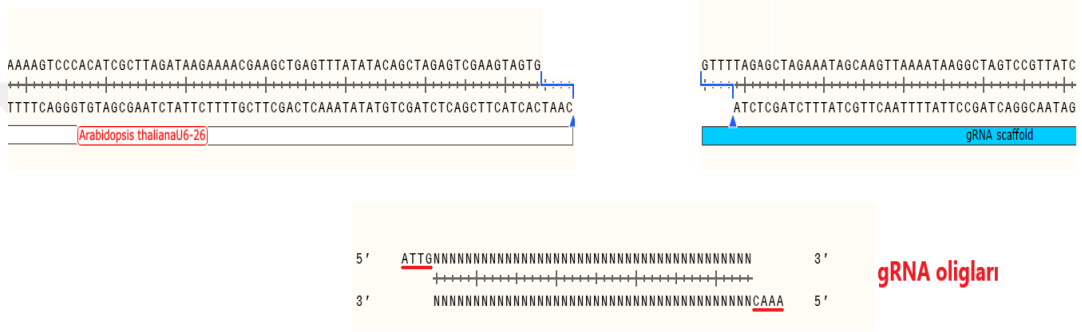
Çizelge 3.5. SIROP9 gRNA oligosunun Kaset 1 plazmidine bağlanması

Bileşen	X1
T4 Tampon (x10)	2µL

(Devamı arkada)

Çizelge 3.5'in devamı

ROP9 gRNA oligo (F & R mix)	2µL
Bsa1 cut Kaset 1(gel isolated)	5µL
T4 ligaz Enzimi	1µL
dH ₂ O	10µL
Toplam	20µL



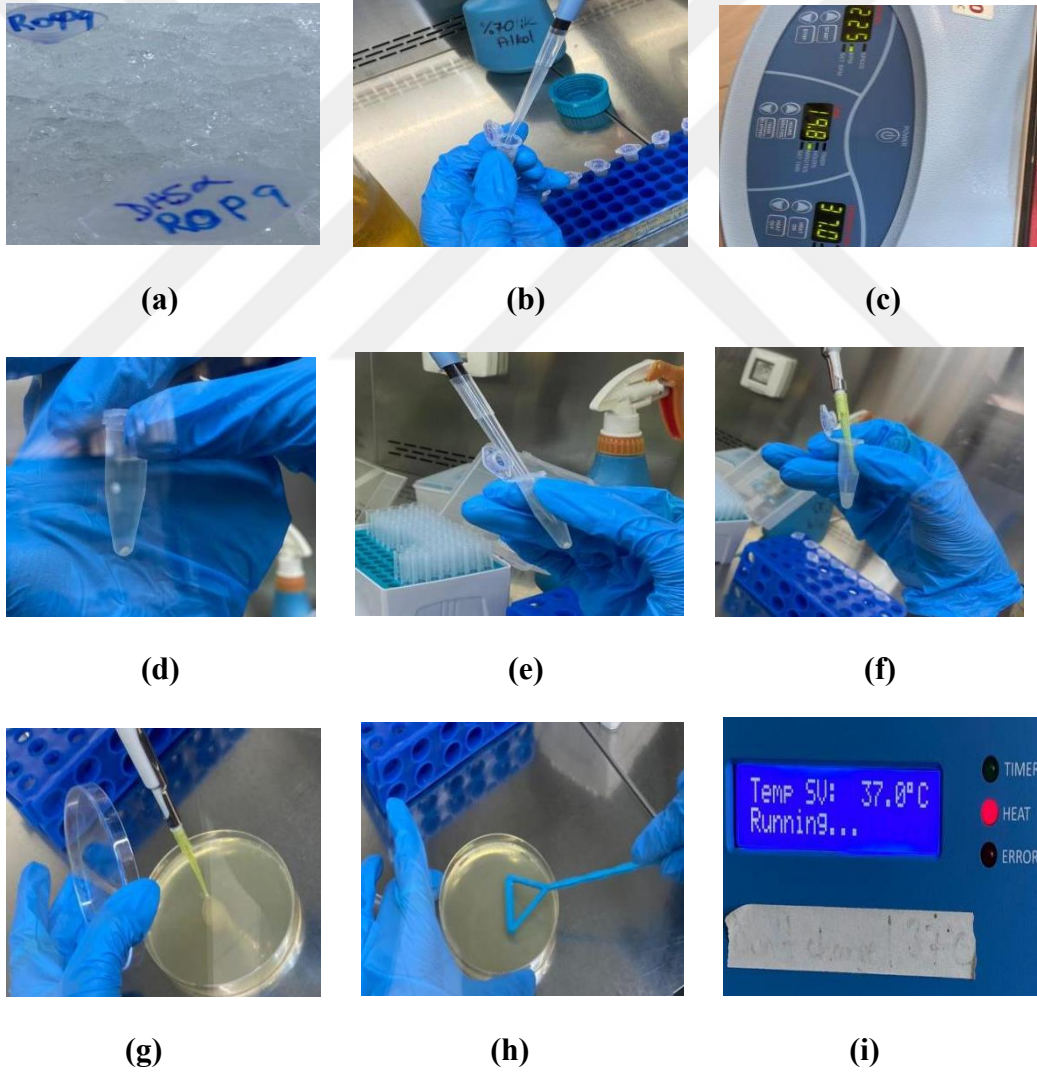
Şekil 3.6. Kaset1 plazmidine bağlanan gRNA oligolarının önerilen işlevselliği

3.2.8. E. coli'ye bağlanmış ürünün ısı şoku, doğrulama ve çoğaltma

Bağlanan ürünleri kompetent bakteri hücrelerine aktarmak için, bağlama ürünlerinden toplam 20 µL'lik bir hacim termosiklörden alınmış ve DNA'yı stabilize etmek ve bozulmayı önlemek için hemen buz üzerine yerleştirilmiştir. Kimyasal olarak kompetent *E. coli* DH5α hücrelerinden 50 µL'lik alikotlar -80 °C dondurucudan çıkarılmış ve buz üzerinde çözündürülmüştür (Şekil 3.7a). Kompetentliği korumak için hücrelere nazikçe dokunulmuştur. Her DH5α tüpü, uygun takibi sağlamak ve aşağı akış analizi sırasında karışmaları önlemek için ilgili ligasyon ürününe göre açıkça etiketlenmiştir. Bağlanan her ürünün 20 µL hacminin tamamı, 50 µL çözölmüş kompetent DH5α hücresi içeren ilgili tüplere dikkatlice pipetlendi. Tüpler, DNA ve hücrelerin kaymaya neden olmadan veya transformasyon verimliliğini azaltmadan eşit şekilde karışması için hafifçe fiske edilmiştir. Kalite kontrolü için, DH5α hücrelerinin ayrı bir alikotuna 9 µL sınırlandırılmamış ve bağlanmamış Kaset 1 plazmid DNA'sı eklenerek pozitif bir kontrol dahil edilmiştir. Arka plan büyümesini ve antibiyotik seçim bütünlüğünü değerlendirmek için bir DH5α alikotuna DNA eklenmeyerek negatif bir kontrol de oluşturulmuştur. Tüm transformasyon tüpleri daha sonra 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilerek DNA'nın bakteri hücre membranlarıyla birleşmesi ve ısı şoku sırasında alım için hazırlanması sağlanmıştır.

İnkübasyondan sonra tüpler ısı şokunu tetiklemek için 50-60 saniye süreyle 42 °C'lik bir su banyosuna aktarılmıştır. Bu adım, bakteri membranlarında geçici gözenek oluşumunu kolaylaştırarak plazmid DNA'sının alımını mümkün kılmıştır. Isı şokundan

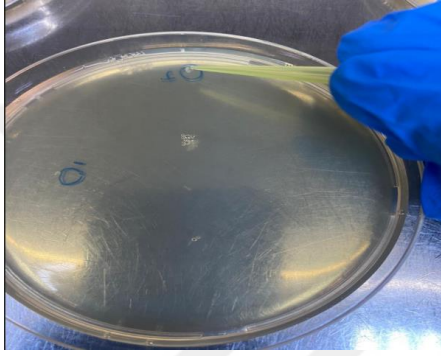
hemen sonra, bakteri membranlarını stabilize etmek ve hücre canlılığını artırmak için tüpler 2 dakika boyunca tekrar buz üzerine yerleştirilmiştir. Bakteriyel iyileşmeyi ve antibiyotik direnç genlerinin ifadesini desteklemek için her tüpe 500 μ L hacminde YEP ortamı (antibiyotiksiz) eklenmiştir (Şekil 3.7b). Plazmid yapılar üzerinde taşınan kanamisin direnç geninin ekspresyonunu sağlamak için kültürler 37 °C'de 1 saat boyunca çalkalanarak (~225 rpm) inkübe edilmiştir (Şekil 3.7c). Toparlanmanın ardından tüpler 4 °C'de, 4000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek bakteriler topak haline getirilmiştir (Şekil 3.7d). 500 μ L süpernatant, bakteri hücrelerini konsantre etmek için dikkatlice boşaltılırken küçük bir hacimde ortam bırakılmıştır (Şekil 3.7e). Elde edilen peletler, kalan besiyerinde nazikçe yeniden süspanse edilmiş ve kaplama için eşit hücre süspansiyonu sağlanmıştır (Şekil 3.7f). Yeniden süspanse edilen kültürler, steril yayıcılar kullanılarak kanamisin (50 μ g/ml) ile desteklenmiş YEP agar plakalarına eşit şekilde yayılmıştır (Şekil 3.7g, h). Yoğunlaşmanın agar yüzeyine damlamasını önlemek ve iyi ayrılmış bakteri kolonilerinin oluşmasına izin vermek için plakalar bir gece boyunca 37 °C'de ters çevrilmiş bir pozisyonda inkübe edilmiştir (Şekil 3.7i).



Şekil 3.7. *E. coli* hücrelerine ısı şoku ve çoğaltma prosedürü **a)** Kompetent hücrelerin buz üzerinde çözündürülmesi; **b)** Çoğalmaya izin vermek için bakterilere broth eklenmesi; **c)**

Hücrelerin çalkalayıcı inkübasyonu; **d)** Çoğaltılmış hücrelerin peletlenmesi; **e)** Süpernatantın boşaltılması; **f)** Peletin yeniden süspansiyonu; **g)** Yeniden süspansiyon edilmiş peletin YEP plateine pipetlenmesi; **h)** Yayma; **i)** Plakelerin gece boyunca inkübasyonu

Ertesi gün, bağlanmış plakalarda görülen koloniler plate üzerinde numaralandırıldı ve yeterince genişledikten sonra koloni PCR'ı için kullanıldı. Bunu yapmak için 20µl dH₂O mikrofüj tüplerine pipetlendi ve mevcut koloni sayısına göre etiketlendi. Steril bir kabinde, her koloniden çok küçük bir parça almak için bir pipet ucu kullanılmış ve iyice çalkalanarak ilgili tüplere yerleştirilmiştir (Şekil 3.8.). Birkaç dakika sonra koloniler çözündükten sonra koloni PCR'ı için hazır hale gelmiştir. Daha sonra Çizelge 3.6. kullanılarak Koloni PCR'ı yapıldı ve Çizelge 3.7.'deki kriterlere göre termosiklorde inkübe edildi.



Şekil 3.8. Koloni PCR için kolonilerin toplanması

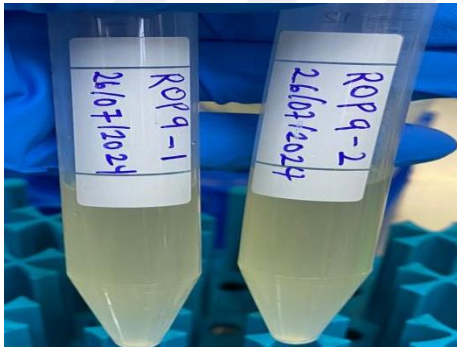
Çizelge 3.6. Koloni PCR'ı için prosedür

Bileşen	X1	X5
X10 Tampon	2µl	10µl
MgCl ₂ (25mM)	1,6µl	8µl
dNTP (10mM)	0,4µl	2µl
Kaset Kontrol F (10mM)	0,5µl	2,5µl
Kaset Kontrol R (10mM)	0,5µl	2,5µl
dH ₂ O	4,8µl	24µl
Taq Polimeraz	0,2µl	1µl
Örnek	10µl	-
Toplam	20µl	10dağıt

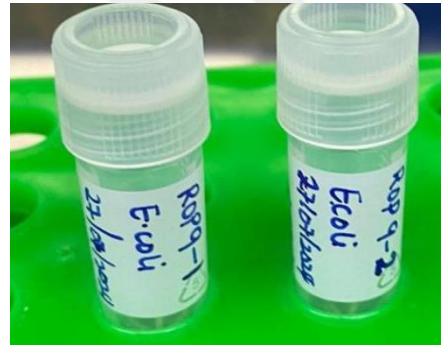
Çizelge 3. 7. Amplifikasyon için koloni PCR koşulları

İlk Denatürasyon	95°C	5 dakika	1 döngü
Son Denatürasyon	95°C	30 saniye	34 döngü
Tavlama	55°C	30 saniye	
İlk Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	5 dakika	1 döngü
Sonsuz bekletme	4°C	∞	-

PCR'dan sonra, 5µl PCR ürününe 5µl yükleme boyası eklenmiş ve jele yüklenmiştir. Bu jel 400bp'lik bantların varlığını kontrol etmek için 100 voltta 45 dakika boyunca çalıştırılmıştır. 400bp pozitif bantlar (gRNA varlığı) gösteren PCR örneklerinin kalan 15µl'si dizileme için gönderilmiştir. Ayrıca, pozitif bant gösterenler için, kalan kolonileri plate ten alındı ve 5µl kanamisin50 içeren 5ml sıvı LB broth içine konuldu. Bu, bir gece boyunca 37°C'de 225RPM'de çalkalayıcıya yerleştirildi. Bu stoklardan ertesi gün 900µl bakteri kriyotüplere pipetlenerek ve üzerine 900µl %10 gliserol eklenerek hazırlanmıştır (Şekil 3.9). Bunlar etiketlendi ve -80°C dondurucuya yerleştirildi.



(a)



(b)

Şekil 3.9. Stok Hazırlama a) Broth içinde pozitif E. coli çoğalması; b) Hazırlanan stokların Aliquot'ları

3.2.9. Sanger sekansı pozitif- kaset 1 ve 52256 plazmidinin EcoRI ve PacI kesimi

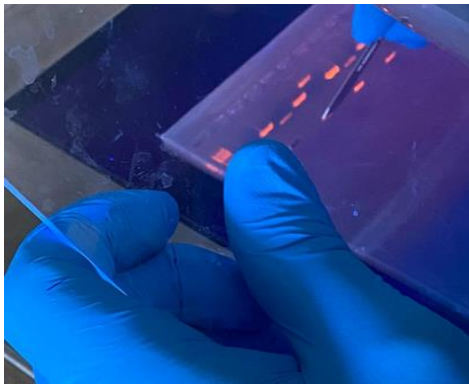
Sanger Sekanslama yapıldıktan sonra, gRNA ve normal 52256 plazmidlerinin varlığı kanıtlanan kolonilerin stokları -80°C dondurucudan alınmış ve 10ml LB broth içinde 10µl Kanamycin50 ile 37°C'de 225RPM'de bir gece boyunca çalkalayıcıda çoğaltılmıştır. Plazmid izolasyonu daha önce belirtildiği gibi yapıldı ve plazmid kalitesi nanodropta ölçüldü. Daha sonra Kaset 1 ve 52256'nın plazmid restriksiyonu Çizelge 3.8'de görüldüğü gibi EcoRI ve PacI ile yapılmıştır. Tüm enzimler, tamponlar ve plazmidler erimeleri için buz üzerine yerleştirildi. Ardından, aşağıdaki protokol

kullanılarak her iki plazmid için ayrı ayrı kesimi yapıldı.

Çizelge 3.8. Kaset1 ve 52256 plazmidinin EcoR1 ve Pac1 kesimsi

Bileşen	X1
X10 rCutSmart Tampon	5µl
EcoRI HF NEB enzim	1µl
Pac1 NEB enzim	1µl
Kaset 1/ 52256 plazmid	20µl
dH ₂ O	23µl
Toplam	50µl

Mikrofüj tüpleri fiske edilmiş, minifüjde döndürülmüş ve 37°C'de 10 dakika termosiklörde inkübe edilmiştir. PCR bittikten sonra, kısıtlanmış Kaset 1 ve 52256 plazmidleri (25µl), pozitif kontrol için 10µl kısıtlanmamış Kaset 1 ve 52255 plazmidlerine ek olarak 90 dakika boyunca 70 voltta jel üzerinde çalıştırılmıştır. Kısıtlanmış Kaset 1 plazmidi için 720bp'lik daha düşük bir bant parçasının pozitiflik göstermesi beklenirken, kısıtlanmış 52256 plazmidi için daha yüksek bir bant ağırlığı beklenir. Kaset 1'in daha küçük parçası, promotör ve terminatörün yanı sıra SIROP9 gRNA ve artık yukarı regüle edilebilen veya ifade edilebilen gRNA iskelesini (ROP9-1 gRNA) içerir. Jel üzerinde pozitiflik doğrulandıktan sonra, sırasıyla 52256 ve Kaset 1'in bu üst ve alt bantları jelden çıkarıldı ve Thermo Scientific Jel Ekstraksiyon Kiti (GeneJET Jel Miniprep Kiti) kullanılarak saflaştırıldı.



Şekil 3.10. Plazmidlerin EcoR1 ve Pac1 ile kısıtlanmasından sonra bant parçasının çıkarılması

3.2.10. SIROP9-1 gRNA'nın kısıtlı 52256 plazmidi ile ligasyonu ve ligasyon doğrulaması

Tüm mikrofüj tüpleri uygun şekilde etiketlenmiş ve enzimler, tamponlar, vektörler ve insertler çözümleri için buz üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra Çizelge 3.9'a göre 5:2 (Vektör: İnsert) şeklinde ligasyon yapılmıştır. Örnekler 25°C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bundan sonra ligasyonun çalışıp çalışmadığını görmek için doğrulama yapıldı.

Çizelge 3.9. SIROP9-1 gRNA ve 52256 plazmidi için Ligasyon Protokolü

Bileşen	X1
Vektör (52256 plazmid)	5µl
Insert (ROP9-1 gRNA)	2µl
10X T4 Tamponu	2µl
T4 Ligaz Enzimi	1µl
dH ₂ O	10µl
Toplam	20µl

Ligasyondan sonra, gerçekten çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için, 55°C'lik bir tavlama sıcaklığında hem 52256 plazmidin 5'ucuna hem de gRNA'nın 3'ucuna bağlanan primerlerle 1µl bağlanmış 52256 plazmid ve SIROP9-1 gRNA üzerinde bir PCR çalıştırılır (Çizelge 3.10; 3.11). Bu şekilde, ligasyon gerçekleşirse, uzamanın sonlanmasına neden olacak açık uç olmayacağından ürün kolayca çoğalabilir veya çoğaltılabilir. Aksi takdirde ligasyon çalışmadığında bu durum ortaya çıkacaktır. Daha sonra bu ürün %1'lik agaroz jelde 100 voltta 45 dakika boyunca çalıştırılmıştır. Ligasyonun başarılı olduğunu göstermek için bir bant bulunmalıdır. Bağlanan 52256 plazmidinin ve SIROP9-1 gRNA'nın kalan 19µl'si daha sonraki bir tarihte ısı şoku için saklanmıştır.

Çizelge 3.10. SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidine bağlanmasının başarısını doğrulamak için PCR

Bileşen	X1
X10 Tampon	2µl
MgCl ₂	1,6µl

(Devamı arkada)

Çizelge 3.10'un devamı

dNTP (10mM)	0,4µl
Ligasyon Kontrol F	0,5µl
ROP9 gRNA oligo R	0,5µl
Taq Polimeraz	0,2µl
Örnek (Ligatlar)	1µl
dH ₂ O	13,8µl
Toplam	20µl

Çizelge 3.11. SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidine bağlanmasının başarısını doğrulamak için PCR koşulları

İlk Denatürasyon	95°C	2 dakika	1 döngü
Son Denatürasyon	95°C	15 saniye	25 döngü
Tavlama	55°C	15 saniye	
İlk Uzama	72°C	1 dakika 30 saniye	
Son Uzama	72°C	5 dakika	1 döngü
Sonsuz bekletme	4°C	∞	-

3.2.11. DH5α E.coli bakterisine bağlanmış ürünlerin (SIROP9-1 gRNA + 52256 plazmid) ısı şoku

Bağlanan ürünlerin (ROP9-1 gRNA + 52256 plazmid) DH5α E.coli bakterilerine ısı şoku için, bağlanan ROP9-1 gRNA + 52256 plazmidinin toplam 19 µL hacmi 4 °C'deki depodan alındı ve transformasyondan önce bütünlüğünü korumak için hemen buz üzerine yerleştirildi. Kimyasal olarak kompetent E. coli DH5α hücrelerinden 50 µL'lik alikotlar - 80 °C dondurucudan çıkarılmış ve hücre kompetentliğini korumak için buz üzerinde çözdürülmüştür (Şekil 3.11.a). Çözdürülmüş kompetent hücreleri içeren transformasyon tüpleri, kolay tanımlama için ilgili bağlanmış yapıların adlarıyla açıkça etiketlenmiştir. 19 µL bağlanmış DNA'nın tamamı, kompetent hücreleri içeren uygun DH5α tüplerine dikkatlice pipetlenmiştir. DNA'nın bakteri süspansiyonu ile düzgün bir şekilde karışmasını sağlamak için tüpler hafifçe fiske edilirken, dönüşüm verimliliğini azaltabilecek kuvvetli çalkalamadan kaçınılmıştır. Kontrol amacıyla, DH5α hücrelerinden oluşan ayrı bir tüpe 10 µL sınırlandırılmamış, bağlanmamış 52256 plazmid

DNA eklenerek pozitif bir kontrol hazırlanmıştır. Kontaminasyon ve antibiyotik seçim etkinliğini izlemek için bir DH5 α tüpüne DNA eklenmeyerek negatif bir kontrol de oluşturulmuştur. Tüm tüpler 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilerek DNA moleküllerinin bakteri membranlarıyla etkileşime girerek onları ısı şokuna hazırlaması sağlanmıştır. Transformasyon tüpleri daha sonra 42 °C'lik bir su banyosuna aktarılmış ve geçici membran gözeneklerinden plazmid alımını kolaylaştırmak için 50-60 saniye boyunca ısı şokuna tabi tutulmuştur (Şekil 3.11b).

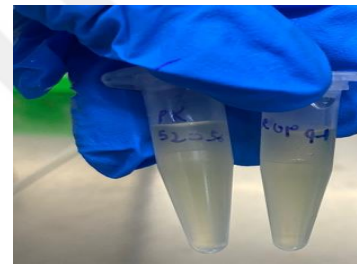
Isı şokunun hemen ardından, membranları stabilize etmek ve hücre canlılığını artırmak için tüpler 2 dakika boyunca tekrar buz üzerine yerleştirilmiştir. Bakteriyel iyileşmeyi ve antibiyotik direnç genlerinin ifadesini desteklemek için her tüpe 500 μ L YEP ortamı (antibiyotiksiz) eklenmiştir (Şekil 3.11c). Dönüşüm karışımları, kanamisin direncinin fenotipik ifadesine izin vermek için 37 °C'de 1 saat boyunca çalkalanarak (~225 rpm) inkübe edilmiştir (Şekil 3.11d). İnkübasyondan sonra kültürler 4 °C'de, 4000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek bakteriler topak haline getirilmiştir (Şekil 3.11e). 500 μ L süpernatant dikkatlice boşaltılmış ve geride küçük bir hacimde artık besiyeri bırakılmıştır. Elde edilen bakteri peletleri, kaplama için homojen bir süspansiyon elde etmek üzere kalan sıvı içinde nazikçe yeniden süspanse edilmiştir. Süspansiyonun tamamı steril teknikler kullanılarak 50 μ g/mL kanamisin (kan50) ile desteklenmiş YEP agar plakalarına yayılmıştır (Şekil 3.11f). Plakalar, koloni oluşumunu teşvik etmek ve yoğunlaşmanın agar yüzeyini bozmasını önlemek için bir gece boyunca 37 °C'de ters çevrilmiş bir pozisyonda inkübe edilmiştir.



(a)



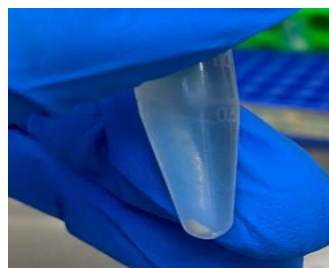
(b)



(c)



(d)



(e)

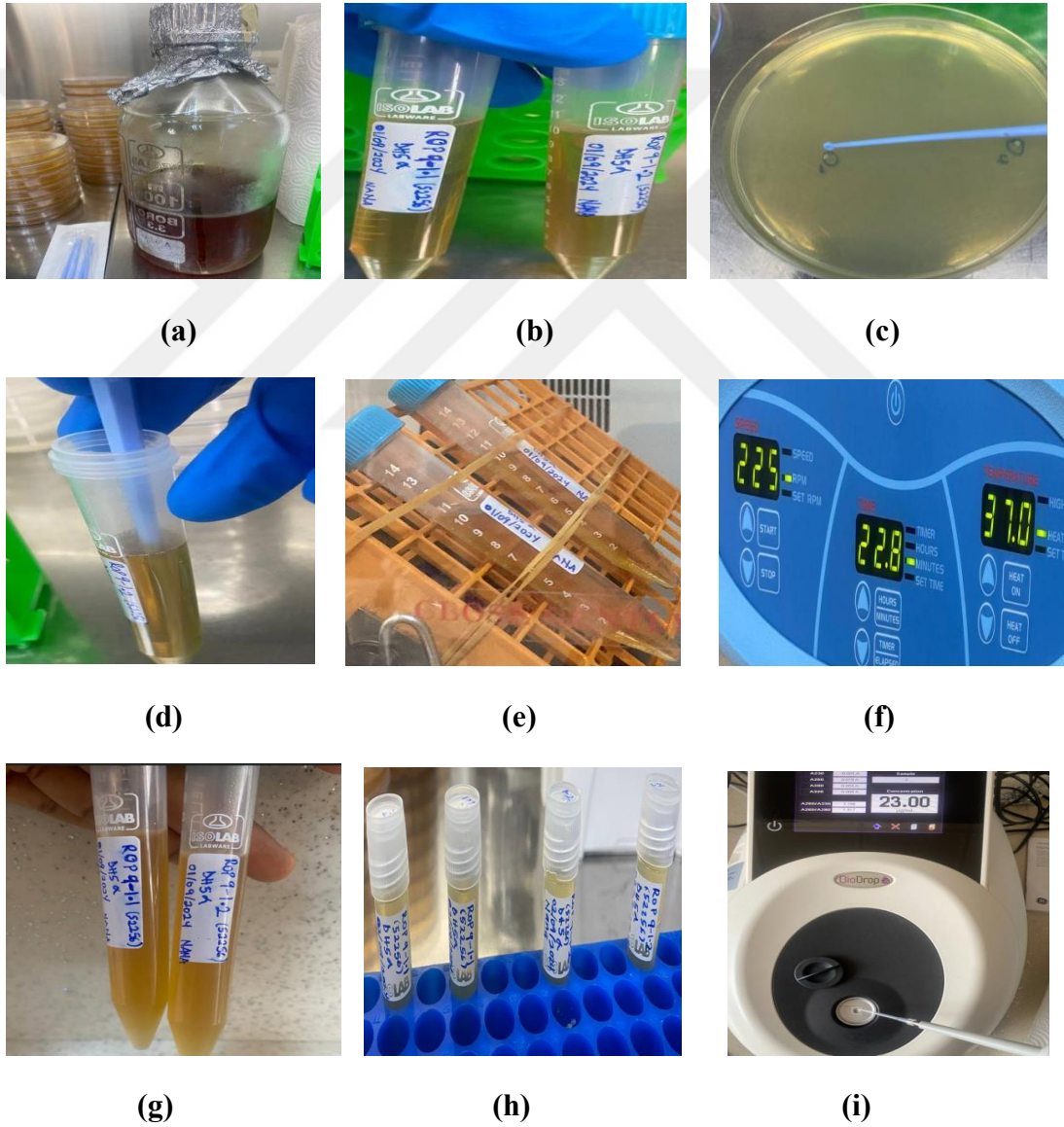


(f)

Şekil 3.11. DH5 α E.coli bakterilerine bağlanmış ürünlerin (ROP9-1 gRNA + 52256 plazmid) ısı şoku **a)** Bakterilerin buz üzerinde çözülmesi; **b)** Isı şoku sırasında ısı işlemi; **c)** Bakterilerin çoğalmasını kolaylaştırmak için bakteri suyu eklenmesi; **d)** Bakterilerin 37°C'de çalkalayıcı inkübasyonu; **e)** Bakterilerin peletlenmesi; **f)** Kan50 plakasına yayılması

3.2.12. Kolonilerin çoğaltılması ve stok hazırlanması

Ortaya çıkan koloniler etiketlenmiş ve steril bir kabin altında, mevcut her koloniden pipet ucu veya streaking çubuğu ile büyük bir parça alınmış ve 10 μ l kanamisin (50mg/ μ l) içeren 10ml YEP broth içinde iyice çalkalanmıştır. Ardından bir gece boyunca 37°C'de 225 RPM'de çalkalayıcıda inkübe edilmiştir (Şekil 3.12a, b, c, d, e, f). Kolonilerin her biri bulanık çözelti verecek şekilde başarıyla çoğaldıktan sonra, çözeltinin birkaç stoğu %10 gliserol ile hazırlandı, etiketlendi ve saklanmak üzere -80°C dondurucuya yerleştirildi. Kalan çözelti ile plazmid izolasyonu yapıldı ve her biri için 35 μ l'lik bir elute (ROP9-1 gRNA + 52256 plazmid) elde edildi. Daha sonra izole edilen her plazmidin saflığı bir nanodropta ölçülmüştür. Daha sonra ortaya çıkan her kolonide ROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidine başarılı bir şekilde bağlandığını doğrulamak için PCR yapıldı (Şekil 3.12g, h, i).



Şekil 3.12. YEP besiyerinde koloni çoğaltma ve stok hazırlama **a)** YEP besiyeri; **b)** 50 ml'lik tüplere YEP ölçümü; **c)** Plakadan koloni toplama; **d)** Kolonileri YEP besiyerine

yerleştirme; e) Bakterilerin eğimli yerleştirilmesi; f) 37°C'de inkübasyon; g) Çoğaltılmış bakteriler; h) Stok alikotları; i) Plazmid kalite kontrolü

3.2.13. Çoğaltılmış kolonilerde SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidine bağlanmasının doğrulanması için PCR

SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidine bağlanmasının kolonilerde başarılı olduğunu doğrulamak için, izole edilen plazmidlerden 1µl PCR için kullanıldı (Çizelge 3.12.) ve belirli koşullarda bir termosiklörde çalıştırıldı (Çizelge 3.13.). Daha sonra %1'lik agaroz jelde 100 voltta 45 dakika boyunca çalıştırılmıştır. Tüm PCR ürünleri için 1900bp'lik bir bant ağırlığı beklenmiştir.

Çizelge 3.12. Bireysel kolonilerde SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidine bağlanmasının başarısını doğrulamak için PCR

Bileşen	X1	X6
X10 Tampon	2µl	12µl
MgCl ₂	1,6µl	9,6µl
dNTP (10mM)	0,4µl	2,4µl
Ligasyon Kontrol F	0,5µl	3µl
ROP9 gRNA oligo R	0,5µl	3µl
Taq Polimeraz	0,2µl	1,2µl
Örnek (İzole plazmidler)	1µl	-
dH ₂ O	13,8µl	82,8µl
Toplam	20µl	19 dağıt

Çizelge 3.13. Bireysel kolonilerde SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidine bağlanmasının başarısının doğrulanması için PCR koşulları

İlk Denatürasyon	95°C	2 dakika	1 döngü
Son Denatürasyon	95°C	15 saniye	25 döngü
Tavlama	55°C	15 saniye	
İlk Uzama	72°C	1 dakika 30 saniye	

(Devamı arkada)

Çizelge 3.13'ün devamı

Son Uzama	72°C	5 dakika	1 döngü
Sonsuz bekletme	4°C	∞	-

3.2.14. İzole edilmiş ROP9-1 gRNA + 52256 plazmidinin EHA 105 suşuna elektroporasyonu

Elektroporasyonun yapılabilmesi için, elektro-kompotent *Agrobacterium tumefaciens* bakterisine (EHA105 suşu) ihtiyaç vardır, çünkü bu bakteri gerekli plazmidin/genlerin bitkiye bulaştırılmasında vektör görevi görmektedir. Bu, Çizelge 3.14'te bulunan maddeler ve özellikleri ile hazırlanmıştır.

Çizelge 3.14. Elektroporasyon için gerekli malzemeler ve özellikleri

Malzeme	Spesifikasyon
<i>A. tumefaciens</i> EHA105	Gliserol stoğu veya plaka kültürü
YEP broth	10 g/L maya özütü, 10 g/L pepton
Steril distile su	Buz gibi soğuk
%10 Gliserol Ster	Buz gibi soğuk, steril
il kültür tüpleri/şişeleri	50 mL konik + 1,5 mL mikrotüpler
Çalkalamalı inkübatör	28°C'de ayarlanmış
Santrifüj	Soğutulmuş (4°C)
Buz	Ezilmiş veya pul haline getirilmiş
Spektrofotometre	OD ₆₀₀ okumaları için

Kompotent hücreler daha sonra aşağıdaki adımlar kullanılarak hazırlanmıştır:

i. Kültür Başlatma

Tek bir *A. tumefaciens* EHA105 kolonisi 25 µg/ml Rifampicin antibiyotik seçilebilir YEP agar üzerine ekildi ve 28°C'de 48 saat inkübe edildi. İzole edilen tek bir koloni daha sonra toplanmış ve 15 mL'lik steril bir kültür tüpünde 5µl 25 µg/ml Rifampisin antibiyotiği içeren 5 mL steril YEP broth içine aşılanmıştır. Kültür, 16-18 saat boyunca 200 rpm'de çalkalanarak 28°C'de inkübe edilmiştir.

ii.Kültürün Ölçeklendirilmesi

Bir gecelik kültürün bir mililitresi 250 mL'lik bir Erlenmeyer şişesinde 100 mL taze YEP broth içine aktarılmıştır. Flask, OD₆₀₀ orta log fazına karşılık gelen yaklaşık 0,5-0,7'ye ulaşana kadar 28°C'de 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir.

iii.Hücrelerin Soğutulması ve Hasat Edilmesi

Kültür şişesi hemen bir buz banyosuna aktarılmış ve hücreleri soğuk şoka uğratmak için 15-20 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Kültür daha sonra önceden soğutulmuş 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmış ve 4°C'de 10 dakika boyunca 4.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant, peletin bozulmasını önlemek için dikkatlice atılmıştır.

iv.Yıkama Adımları

Hücre peleti 50 mL buz gibi soğuk steril damıtılmış su içinde nazikçe yeniden süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon 4°C'de 10 dakika boyunca 4.000 rpm'de tekrar santrifüjlenmiştir. Bu yıkama adımı, ortam bileşenlerinin ve tuzların tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için iki kez daha tekrarlanmıştır.

v. Gliserol ile Son Yıkama

Son su yıkamasından sonra, pelet 20 mL buz gibi soğuk %10 gliserol içinde yeniden süspansiyon edildi ve aynı koşullar altında santrifüjlendi. Nihai pelet 1-2 mL buz gibi soğuk %10 gliserol içinde nazikçe yeniden süspansiyon edilmiştir.

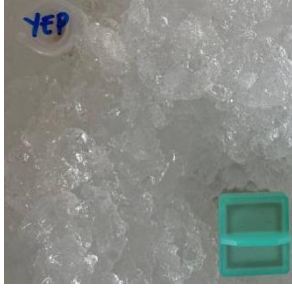
vi.Alikotlama ve Saklama

Elektrokompetan hücreler önceden soğutulmuş 1,5 mL steril mikrosantrifüj tüplerine 50-100 µL hacimlerde alikotlanmıştır. Alikotlar sıvı nitrojen ve kuru buz-etanol banyosu kullanılarak hızlı dondurulmuş ve ileride kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

Bundan sonra, EH105 elektro-kompetent hücreleri -80°C'den alınıp etiketlendiğinde ve çözülmeleri için buz üzerine yerleştirildiğinde elektroporasyon yapılmıştır. ROP9-1 gRNA bağlanmış 52256 plazmidi de elektroporasyon kuvetiyle birlikte buz üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 3.13a). Elektroporasyonun doğru olması için ideal plazmid konsantrasyonu 60-80ng/µl arasında olmalıdır. Daha sonra bu ideal plazmidin 1µl'si 100µl EHA105 içine yerleştirilir. Plazmidin 2µl'si (30ng/µl) 100µl EHA105'e pipetlendi ve mikrofüj tüpleri fiske edildi. Toplam hacim (102µl) daha sonra yavaşça elektroporasyon kuvetine en alttan pipetlendi. Mevcut olan kabarcıklar patlatıldı ve bu işlem 1 saat boyunca buz üzerinde bırakıldı. Ardından, 900µl YEP broth steril bir kabin altında 1,5 ml'lik bir mikrofüj tüpüne pipetlendi.

Daha sonra elektroporasyon makinesi açıldı, şok kapsülü takıldı ve uygun ayarlar yapıldı. (Agrobacterium; Voltaj= 2500; Kapasitans= 25; Direnç= 400; Kuvet= 2mm). Daha sonra kuvet buzdan çıkarıldı, sıvıları kurutmak için kenarları iyice temizlendi ve kabarcıklar patlatıldı. Kuvet şok kapsülüne yerleştirildi, kapatıldı, pulslandı ve tekrar çıkarıldı. Hemen 900µl YEP kuvete pipetlendi ve ardından her şey 1,5 ml'lik mikrofüj

tüpüne yeniden pipetlendi. Bu, 28°C'de 1 saat boyunca 225RPM'de bir çalkalayıcıda inkübe edildi. Bir saat sonra, 14000RPM'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant boşaltıldı. Pelet kalan 100µl ile yeniden süspanse edildi ve hepsi Kanamycin 50+ Rifampicin 25 seçilebilir plakaya pipetlendi. Plaka üzerinde dairesel hareketlerle yayıldı ve 28°C'de 2 gün boyunca baş aşağı inkübe edildi. Koloniler bekleniyordu (Şekil 3.13b, c, d, e, f, g, h, i).



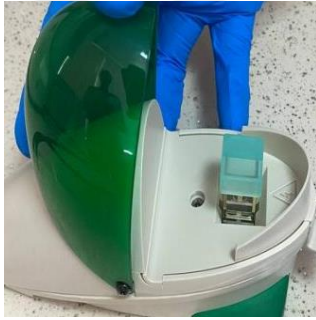
(a)



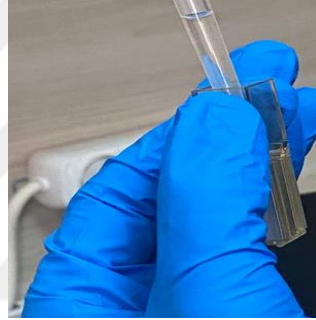
(b)



(c)



(d)



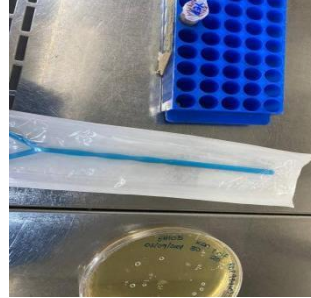
(e)



(f)



(g)



(h)

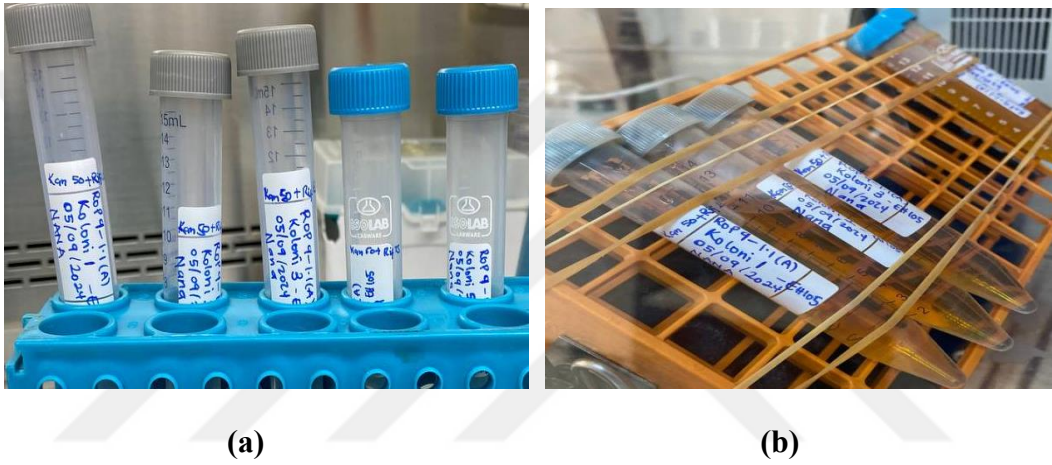


(i)

Şekil 3.13. Elektroporasyon prosedürleri **a)** Buz üzerinde elektroporasyon küveti; **b)** Şok kapsülüne sabitlenmiş küvet; **c)** Elektroporasyon makinesinin ayarlanması ve pulslama; **d)** Şok kapsülünün makineden çıkarılması; **e)** Elektroporlanmış örneğe YEP eklenmesi; **f)** Elektroporlanmış örneğin 28°C'de inkübe edilmesi; **g)** Kan50 + Rif25 seçilebilir YEP plakası; **h)** Çoğaltılmış elektroporlanmış bakterilerin plakaya yayılması; **i)** 28°C'de 2 günlük inkübasyon

3.2.15. Ortaya çıkan agrobacterium kolonilerinin çoğaltılması ve koloni PCR doğrulaması

Ortaya çıkan çok sayıda koloniden 5 tanesi seçildi ve çoğaltılmak üzere etiketlendi. Bunu yapmak için, 10µl Kanamycin 50 ve 10µl Rifampicin 25 içeren 10ml YEP'ye ayrı ayrı yerleştirildiler. Bunlar gece boyunca 28°C'de 225RPM'de bir çalkalayıcıda inkübe edilmiştir (Şekil 3.14a, b). Ertesi gün, koloni PCR'ı çoğaltılmış bakteri suyundan 10µl alınarak ve 90µl dH₂O eklenerek 1:10 oranına kadar sulandırılarak yapılmıştır. Bu daha sonra iyice fiske edilmiş ve koloni PCR'ı için örnek olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.15.; 3.16.). Bundan sonra, PCR örnekleri pozitif bantlar gösteren seçilmiş kolonileri tanımlamak için %1 agaroz jel üzerinde 80 voltta 1 saat boyunca çalıştırılmıştır. Pozitif koloniler daha sonra gelecekteki transformasyon amaçları için birkaç stok hazırlamak üzere kullanılmıştır.



Şekil 3.14. Agrobacterium koloni çoğaltması **a)** Seçilen koloniler YEP broth içine yerleştirilmiştir; **b)** Kolonilerin 28°C'de 225RPM'de bir gece boyunca çoğaltılması

Çizelge 3.15. Agrobacterium kolonileri için koloni PCR

Bileşen	X1	X7
X10 Tampon	2µl	10µl
MgCl ₂ (25mM)	1,6µl	8µl
dNTP (10mM)	0,4µl	2µl
Ligasyon Kontrol F (10mM)	0,5µl	2,5µl
ROP9 gRNA oligo R (10mM)	0,5µl	2,5µl
dH ₂ O	4,8µl	24µl

(Devamı arkada)

Çizelge 3.15'in devamı

Taq Polimeraz	0,2µl	1µl
Örnek	10µl	50µl
Toplam	20µl	10dağıt

Çizelge 3.16. Agrobacterium koloni amplifikasyonu için koloni PCR koşulları

İlk Denatürasyon	95°C	5 dakika	1 döngü
Son Denatürasyon	95°C	30 saniye	34 döngü
Tavlama	55°C	30 saniye	
İlk Uzama	72°C	1 dakika	1 döngü
Son Uzama	72°C	5 dakika	
Sonsuz bekletme	4°C	∞	-

3.3. Bitki Doku Kültürü - Agrobacterium Aracılı Transformasyon

Tohum çimlendirme ve Agrobacterium aracılı bitki transformasyonu için kullanılan bu protokol, her adımda özenli sterilizasyon ve dikkatli uygulamalar gerektirmiştir. Bitkilerin doku kültürü yoluyla başarılı bir şekilde dönüştürülmesi için birkaç adım izlenmiştir.

3.3.1. Tohumların çimlendirme ortamına hazırlanması

Çimlendirme ortamı MS tuzları, myo-inositol (büyüme arttırıcı olarak görev yapar ve hücre duvarı oluşumunu destekler), tiamin (karbonhidrat metabolizmasında önemli bir rol oynar), nikotinik asit (enerji üretimi ve genel metabolik fonksiyonlar için), sükroz (enerji sağlar ve ozmotik dengeyi korur) ve agar içeren yarı Murashig ve Skoog Ortamını (MSO) 5.8 pH'a ayarladıktan sonra otoklavlayarak (121°C, 20 dakika) steril hale getirildi (Çizelge 3.17.). Hazırlandıktan sonra petri veya magentalara dökülmeden önce çok sıcak olmamasına özen gösterildi. Ortam henüz çok sıcak olmadan, ancak akıcı haldeyken kaplara dikkatlice döküldü. Ortam döküldükten sonra kapakları açık bırakılarak oda sıcaklığında soğuması beklendi. Soğuma tamamlandıktan sonra kapaklar kapatıldı. Ortamın üst yüzeyinde yoğunlaşma oluşmaması için dikkat edildi.

Çizelge 3.17. Tohum çimlendirme ½ MSO

Ortam İçeriği	Miktarı
MS tuzu	2,15 g
Myoinositol	100 mg
Tiamin HCl (1 mg/ml)	2 ml
Nikotinik asit (0,5 mg/ml)	1 ml
Sükroz	10g
pH: 5,8	
Agar	8 g

3.3.2. Tohumların sayımı ve sterilizasyonu

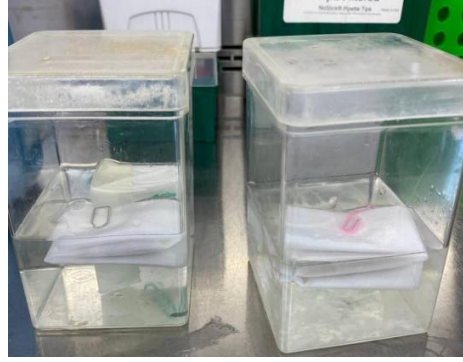
Önce 267 adı verilen bir domates çeşidinin tohumları bir filtre kağıdında sayıldı. Sonra tohumlar sterilizasyon işlemi için steril kabin içerisine alındı. Üzerlerine önceden hazırlanan sterilizasyon solüsyonu (Çizelge 3.18.) eklendi ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre boyunca tohumlar belirli aralıklarla hafifçe çalkalandı (Şekil 3.15.). Tohum içindeki embriyo görünür hale gelene kadar bu işleme devam edildi. Ardından sterilizasyon solüsyonu dikkatlice döküldü ve tohumlar steril saf su ile toplamda 6 kez yıkandı. Her yıkamada üzerlerinde kalan köpüklerin tamamen temizlenmesine özen gösterildi.

Çizelge 3.18. Sterilizasyon Solüsyonu

Ortam İçeriği	500 ml Ortam İçin
Çamaşır Suyu	250 ml
Steril Saf Su	250 ml



(a)

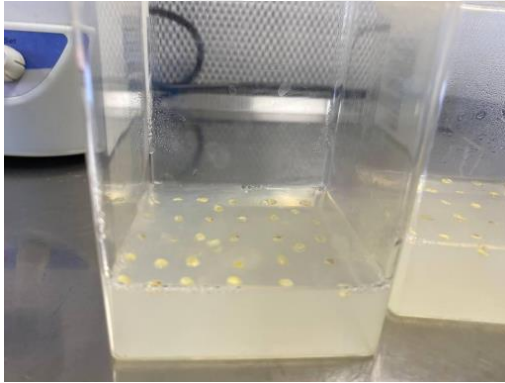


(b)

Şekil 3.15. Tohum sayımı ve sterilizasyon **a)** 267 tohumun sayımı; **b)** Sterilizasyon solüsyonu ile sterilizasyon

3.3.3. Tohumların çimlendirme ortamına ekilmesi

Steril hale getirilen tohumlar, soğumuş 1/2 MSO içeriğine sahip çimlendirme ortamına ekildi (Şekil 3.16.). Magentaların ağız kısımları tam oturuyorsa parafilm ile sarılmalarına gerek duyulmadı. Tohumlar, iklim odasında 7-8 gün süreyle, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında 25°C'de inkübasyona alındı.



Şekil 3.16. Tohum ekilmesi

3.3.4. Kotiledon yapraklarının alınması ve Pre-culture ortamına aktarılması

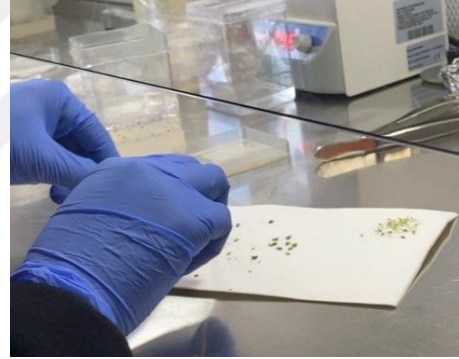
Çimlenen tohumlardan kotiledon yapraklar steril kabin içinde dikkatlice kesildi. Kesim sırasında yaprak dokusuna zarar vermemeye özen gösterildi. Yapraklar büyükse ikiye ayrıldı; küçükse bütün halde kare şeklinde bırakıldı. Kesilen yaprakların adaksiyal yüzeyi alta gelecek şekilde, pre-culture (Çizelge 3.19.) olarak adlandırılan ortama aktarıldı (Şekil 3.17a, b, c, d). Yerleştirme için pensin ucu hafif nemlendirilerek kullanıldı. Petri kapları 25°C'de, 16/8 saat fotoperiyot şartlarında iklim odasında 1 gün süreyle inkübasyona alındı.

Çizelge 3.19. Pre-culture (Ön kültür) ortamı (2Z) (pH:5,8)

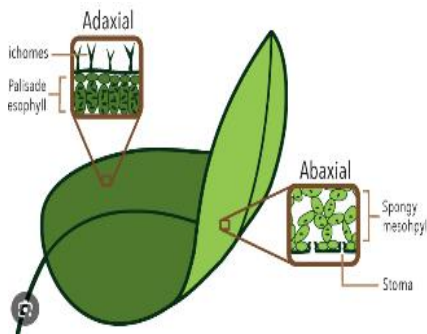
Ortam İçeriği	1 Litre ortam için
MS Tuzları	4,3 gram
Sükroz	20 g
Myo-inositol	0,1 g -100mg
Modified Nitsch Vitamin (Stok 1000X)	1 ml
(pH:5.8)	
Agar	7,5 g
Trans-Zeatin (otoklavdan sonra eklenmiştir) (Stok 1 mg/mL)	2000 µL – 2mL



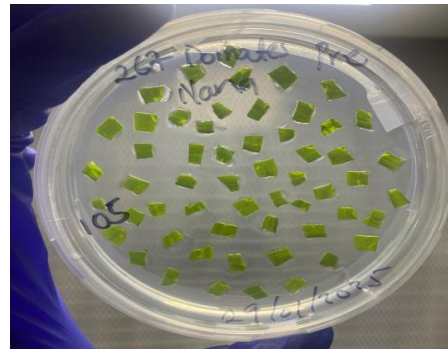
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 3.17. Ön kültür için eksplant hazırlama **a)** Çimlenme ile oluşan kotiledon yaprakları; **b)** Kotiledon uçlarının çıkarılması; **c)** Eksplant yerleştirme yönteminin gösterimi; **d)** Ön kültür ortamına yerleştirilen eksplant

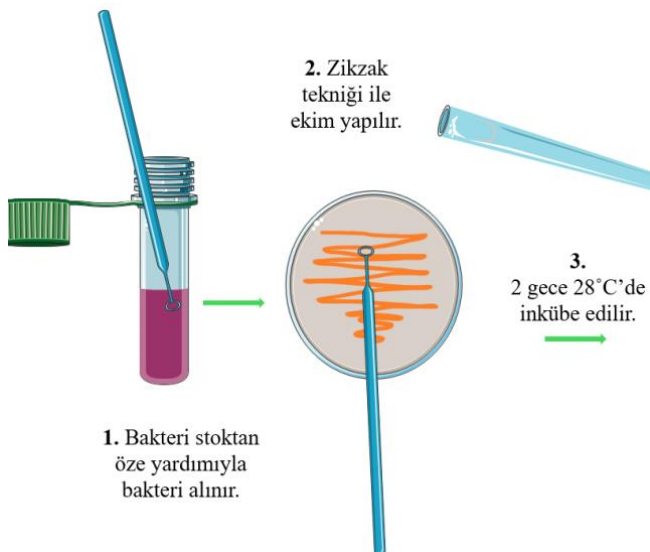
3.3.5. Agrobakteri hazırlanması, OD ölçümü ve hazırlık, transformasyon (agrobakteri ile enfeksiyon)

Aynı gün, transformasyon için EHA105 suşu içeren Agrobakteri stoklarından öze yardımıyla alınarak, antibiyotik seçici ortama (kanamisin ve rifampisin içeren) streake edildi. Petriler 28°C'de 2 gece inkübasyona alındı (Şekil 3.18.). Koloni oluşumu gözlenen petri kutularından tekrar öze ile alınan bakteriler, 5 mL veya 20 mL sıvı ortamlara aktarıldı ve 28°C, 225 rpm şartlarında gece boyu çalkalamalı inkübasyona alındı. Erlenlerin ağız kısımları gevşek şekilde kapatıldı.

Ertesi gün, sıvı ortamda üretilen Agrobakteri kültürleri OD600 nm değerinin 1.0 olması için 1:10 oranında seyreltilerek spektrofotometre ile ölçüldü. OD 1.0 değeri elde edildiğinde, bakteriler 4°C'de, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan pelet, 2 mL liquid co-culture ortamında (Çizelge 3.20.) çözdürüldü ve toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı (Şekil 3.19a, b, c, d).

Çizelge 3.20. Liquid co-culture ortamı %2 MSO pH: 5.8

Ortam İçeriği	1litre	500ml
MS Tuzları	4,3 gram	2,15 g
Sükroz	20 gram	10 g
Myo-inositol	0,1 gram – 100mg	0,05 g–50mg
Tiamin (1mg/mL)	400 µL	200 µL



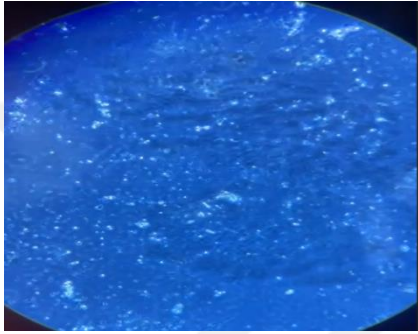
Şekil 3.18. Stoktan bakteri çizgisinin temsili



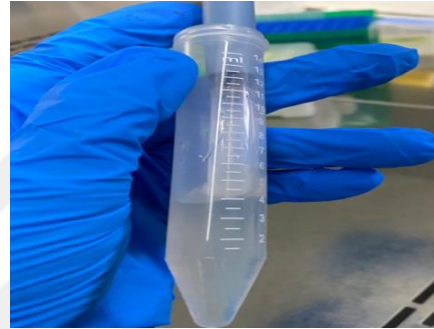
(a)



(b)



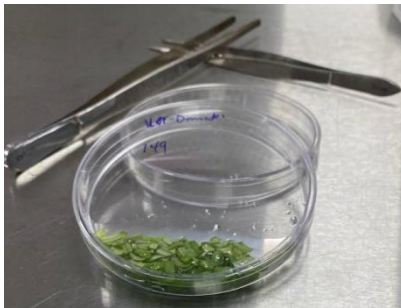
(c)



(d)

Şekil 3.19. a) Bakteriler stoktan çoğaltıldıktan sonra plaka üzerinde çoğaltılır; b) Bakteriler YEP broth içinde çoğaltıldıktan sonra plaka üzerinde çoğaltılır; c) Bakterilerin mikroskop görüntüsü; d) Liquid co-culture ile hazırlanan bakteri çözeltisi

Pre-culture ortamındaki kotiledon yapraklar, hazırlanan Agrobakteri sıvısı ile 1 saat süreyle karanlıkta inkübasyona alındı (Şekil 3.20.). Bu sürenin sonunda yapraklar tekrar pre-culture ortamına geri alınarak karanlık koşullarda iklim odasında 2 gün süreyle inkübasyona alındı.



Şekil 3.20. Transformasyona izin vermek için eksplantların bakteriyel solüsyonda inkübasyonu

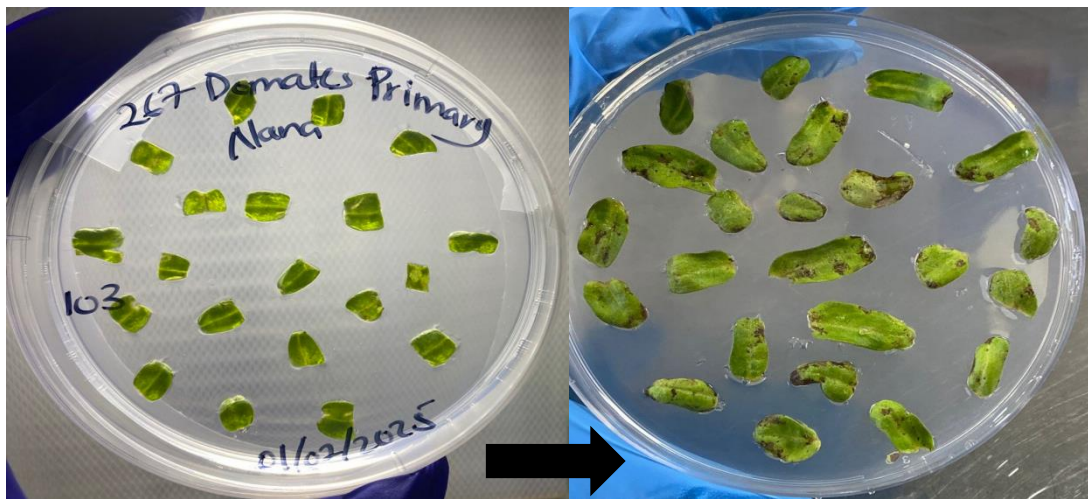
3.3.6. Primary rejenerasyon ortamına aktarılma

Karanlık inkübasyon tamamlandıktan sonra kotiledon yapraklar seleksiyon

maddelerini içeren Primary Rejenerasyon ortamına (Çizelge 3.21.) transfer edildi. Yapraklar petri kaplarına abaksiyal yüzeyleri alta gelecek şekilde yerleştirildi. Bu ortamlarda bitkiler 10-15 gün süreyle 25°C'de ve 16/8 saat fotoperiyot şartlarında inkübasyona alındı. Burada, başarılı bir şekilde dönüştürülmemiş eksplantların basta antibiyotik varlığında kahverengileşmeye ve ölmeye başlayacağı bir seçim eğrisi oluşmaya başlar. Kotiledonun kesilen kısımlarında kallus oluşumu bu aşamada başlar (Şekil 3.21.).

Çizelge 3.21. Primary Rejenerasyon kültür ortamı (2Z) (pH:5,8)

Ortam İçeriği	1 Litre ortam için
MS Bazal Tuzlar	4,3 g
Sükroz	20 g
Myo-inositol	0,1 g – 100 mg
Modified Nitsch Vitamin (Stok 1000X)	1 ml
(pH:5,8)	
Agar	7,5 g
Zeatin (otoklavdan sonra eklenmiştir) (Stok 1 mg/mL) 2Z	2 mL
Basta (otoklavdan sonra eklenmiştir) (Stok 10 mg/mL)	100 µL
Timentin (otoklavdan sonra eklenmiştir) (Stok 200 mg/mL)	1,25 mL



Şekil 3.21. Dönüştürülmüş eksplantlarda kallus oluşumu ve dönüştürülmemiş olanların kahverengileşmesi 10 gün sonra

3.3.7. Sekonder rejenerasyon ortamına aktarılması

Primary Rejenerasyon ortamında gelişen dokular, 10-15 gün sonra Sekonder Rejenerasyon ortamına (Çizelge 3.22.) alındı. Bu ortamlar 10 günde bir yenilendi. Doku gelişimi bu ortamda devam ettirildi. Bu aşamada, eksplantın eski bir besiyerinden yeni bir besiyerine aktarılması sırasında, kahverengileşen ve ölen eksplantlar aktarımdan muaf tutulur. Burada sadece sürgün oluşturan eksplantlar yeni bir ortama taşınır. İkincil rejenerasyon aşamasında, birincil rejenerasyon aşamasında oluşan kallus büyür ve bu kallustan sürgünler oluşmaya başlar. Bu sürgünler her transferde daha da büyüdü. Ayrıca transfer sırasında, sürgünlerin oluştuğu kallus, taze kalması ve ortamdan besin alabilmesi için sürekli olarak kesildi. Ayrıca, domates bitkisine benzemeyen sürgünlerden kurtulmak için sürgünler periyodik olarak kesildi ve köklendirme ortamına aktarılacak kadar büyüdüğünde sadece bir sürgünün mevcut olduğundan emin olundu (Şekil 3.22.).

Çizelge 3.22. Sekonder Rejenerasyon kültür ortamı (1Z) (pH:5,8)

Ortam İçeriği	1 Litre ortam için
MS Bazal Tuzlar	4,3 gram
Sükroz	20 gram
Myo-inositol	0,1 gram - 100mg
Modified Nitsch Vitamin (Stok 1000X)	1 ml
(pH:5,8)	
Agar	7,5 gram
Zeatin (otoklavdan sonra eklenilir) (Stok 1 mg/mL) 1Z	1 mL
Basta (otoklavdan sonra eklenilir) (Stok 10 mg/mL)	100 µL
Timentin (otoklavdan sonra eklenilir) (Stok 200 mg/mL)	1,25 mL



Şekil 3.22. Domatesin ikincil rejenerasyonunun farklı aşamaları

3.3.8. Köklendirme ortamına transfer

Sekonder Rejenerasyon ortamında yaklaşık 6-7 cm boya ulaşan bitkiler, köklendirme ortamına (Çizelge 3.23.) transfer edildi. En sağlıklı çekilde gelişen shoot'lar, kallustan dikkatlice ayrıldı. Bu ayırma işlemi nod'a ne kadar yakın yapılırsa o kadar etkili oldu (Şekil 3.23.). Ayrılan her bir shoot, tek başına köklendirme ortamına yerleştirildi ve kök oluşumu gözlemlenene kadar inkübasyona alındı. Bu ortama, köklerin yenilenmesine yardımcı olmak için oksin bileşeni olarak İndol Asetik Asit ve İndol Benzil Asit eklenmiştir. Sürgün, yeterli kök oluşana kadar alt kültüre alınmadan bu ortamda tutuldu.



Şekil 3.23. Kök ortamı transferi için rejenerere sürgünün düğüme yakın kesilmesi

Çizelge 3.23. Köklendirme kültür ortamı (pH:5.8)

Ortam İçeriği	1 Litre ortam için
MS tuzu	4,3 gram
Modified Nitsch Vitamin (Stok 1000X)	1 ml
Sükroz	30 gram
(pH: 5.8)	
Agar	8 gram
Basta (otoklavdan sonra eklenilir) (Stok 10 mg/mL)	100 µL
Timentin (otoklavdan sonra eklenilir) (Stok 100 mg/mL)	1,25 mL
IAA (otoklavdan sonra eklenilir) (Stok 1mg/mL)	100 µL
IBA (otoklavdan sonra eklenilir) (Stok 1mg/mL)	100 µL

3.3.9. Antibiyotik ve vitaminlerin hazırlaması

Bitki transformasyonu ve rejenerasyonunda kullanılan besiyerleri için aşağıdaki çizelgelerde görüldüğü gibi antibiyotik ve vitaminlerin çalışma çözeltileri hazırlanmıştır (Çizelge 3.24.; 3.25.). MN vitamini, amino asit sentezi ve solunum gibi birincil metabolik süreçler için gerekliydi. Trans-zeatin gibi antibiyotikler domates eksplantlarında hücre bölünmesini, sürgün oluşumunu ve organogenezi teşvik etmek için gerekliydi. Timentin ayrıca transformasyondan sonra Agrobacterium'dan bitki dokusuna zarar vermeden kurtulmak için de kullanılmıştır. Daha sonra, Glufosinate amonyum olarak da bilinen

Basta, dönüştürülmemiş eksplantları ortadan kaldırmak için seçici bir ajan olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.24. Modified Nitsch (MN) Vitamin (Stok 1000X) (pH:7,0)

Ortam İçeriği	50 mL için
Glisin	0,1 gram
Nikotinik Asit	0,5 gram
Piridoksin HCl	0,025 gram
Tiamin HCl	0,025 gram
Folik Asit	0,025 gram
d-biotin	0,002 gram

Çizelge 3.25. Antibiyotik ve vitaminlerin hazırlanması

Çözelti	Hazırlama Yöntemi	Stok Konsantrasyonu	Saklama Koşulları
Tiamin HCl	50 mg Thiamine HCl, 50 mL distile suda çözündürülür. Folyoya sarılır.	1 mg/mL	4 °C
Piridoksine HCl	25 mg Pyridoxine HCl, 50 mL distile suda çözündürülür. 1 mL'lik alikvotlar halinde saklanır.	0,5 mg/mL	-20 °C
Nikotinik Acid	25 mg Nicotinic Acid, 50 mL distile suda çözündürülür. 1 mL'lik alikvotlar halinde saklanır.	0,5 mg/mL	-20 °C
Trans-Zeatin	50 mg Trans-Zeatin üzerine birkaç damla 0.5 M HCl eklenir. Distile su ile 50 mL'ye tamamlanır. Filtreden geçirilir. 1 mL'lik alikvotlar halinde saklanır.	1 mg/mL	-20 °C
Timentin	10 g Timentin, 50 mL distile suda çözündürülür. Filtreden geçirilir. 1 mL'lik alikvotlar halinde saklanır.	200 mg/mL	-20 °C
Basta	500mg Basta'ya, 50 mL su eklenir.	10mg/mL	-20 °C

3.4. Bitkiciklerin Toprağa Alışma (Aklimatizasyon) Süreci

In vitro koşullarda yüksek nem ve düşük ışık altında gelişen bitkiciklerin, dış ortamın düşük nemli, doğal ışıklı ve steril olmayan koşullarına kademeli olarak alıştırılması. Bitkicikler, kökleri yaklaşık 1–3 cm, gövdeleri 5–7 cm boyuna ulaştığında seçildi. Steril kabin içinde çalışıldı. Bitkicikler steril pens ile dikkatlice çıkarıldı. Köklerinde kalan agar kalıntıları, steril saf su ile nazikçe yıkanarak temizlendi. Bitkiye zarar vermemeye özen gösterildi. Bitkicikler, önceden sterilize edilmiş nemli bir perlit:torf:vermikülit (1:1:1) karışımına dikildi. 6–8 cm çapındaki saksılar kullanıldı. Kökler, karışıma yerleştirilip çevresi hafifçe bastırıldı. Saksılar etiketlendi.

Her saksı, şeffaf plastik bardaklara kapatıldı ve bir büyüme odasına yerleştirildi. Bu sayede yaklaşık % 90–100 bağıl nem sağlandı. Bitkicikler, ışıklı ve 23–25°C sıcaklıkta tutuldu. Bitkiyi toprak ortamına aktardıktan sonraki ilk üç gün boyunca, bitkilerin kültür ortamında bulundukları koşulları taklit etmek amacıyla bitkilerin üzeri tamamen plastik bardaklarla kapatıldı. Üçüncü günden sonra ve 5 gün boyunca, plastik kaplar bitkileri normal büyüme koşullarına yavaşça alıştırmak için yarıya kadar açıldı. Bu beş gün geçtikten sonra, kapaklar tamamen çıkarıldı. Bitkilerin düzenli olarak sulanmasına özen gösterildi. Yaklaşık 2–3 haftalık bu alışma süreci sonunda bitkicikler, daha büyük saksılara (10–12 cm) perlit:torf:vermikülit (1:1:1) karışımına şaşırtıldı. Bitkiler önce gölgeli bir seraya alındı, 1–2 hafta sonra doğrudan güneş ışığına kademeli olarak alıştırıldı. İlk birkaç hafta boyunca hoagland solüsyonu adı verilen bir gübre uygulandı. Ayrıca, beyaz sineklerden ve diğer zararlılardan ve böceklerden kurtulmak için, bitkilere ihtiyaç duyulduğunda ilaçlama yapıldı (Şekil 3.24a, b, c, d, e, f, g, h).



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



(g)



(h)

Şekil 3.24. Bitkilerin toprağa alışması **a)** Kökleri yeterince iyi olan bitkilerin seçilmesi; **b)** Saksıların plastik kaplarla tamamen örtülmesi; **c)** Kapların yarıya kadar açılmasıyla kademeli olarak alıştırılması; **d)** Kapların tamamen çıkarılması **e)** Bitkilerin belirli bir uzunluğa kadar büyütülmesi; **f)** Bitkilerin yeni saksılara aktarılması; **g)** Bitkilerin daha uzun büyüdüklerinde sabitlenmesi; **h)** Daha büyük saksılara aktarılması

3.5. Transgenik ve Mutant Hatların Belirlenmesi

Bitkiler hiçbir ölüm riski veya potansiyeli olmadan tamamen alıştırdıktan sonra, hangilerinin başarılı bir şekilde transgenik bitkilere ve nihayetinde mutantlara dönüştürüldüğünü belirlemek için test edilmeye hazır hale geldiler. İlk aşama CTAB ekstraksiyon yöntemi (Doyle 1991) kullanılarak DNA'nın ekstraksiyonuydu.

3.5.1. Genomik DNA ekstraksiyonu

Örneklerin DNA'sını çıkarmak için, büyüme bölgelerinin bir parçası olmayan yeni gelişmiş yapraklar seçildi, bir çift pens ile kesildi ve steril su ile hafifçe yıkandı. Bunun amacı, DNA kalitesini ve daha sonraki sonuçları etkileyebilecek doku kültürü ortamının kalıntılarını uzaklaştırmaktır. Bu yapraklar 1,5 ml'lik mikrofüt tüplerine yerleştirilmiştir. Daha sonra 50ml santrifüt tüplerine 50ml CTAB dökülerek, içine 150µl 2-merkaptetanol pipetlenerek ve iyice çalkalanarak bir CTAB karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım

yaprak örneğinin üzerine 150µl pipetlendi. Daha sonra bir mikropestle yaprak örneği tamamen öğütüldü. Öğütülmüş yaprak örneğine 300µl CTAB karışımı eklenmiş ve mikrofüj tüpleri önceden 65°C sıcaklığa ayarlanmış sıcak su banyosunda 1 saat bekletilmiş, arada bir elle vorteksleme yapıldığından emin olunmuştur. Bir saat sonra örnekler sıcak su banyosundan çıkarılmış ve örneklerin üzerine 24:1 kloroform:izoamil alkol eklenmiştir. Ardından, yaklaşık 5-6 kez aşağı yukarı çevrilmiş ve ardından 14000 RPM'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. 20 dakika sonra iki faz oluşmuştur. Üstte DNA'mızı içeren şeffaf bir faz ve altta debris, protein özütleri ve diğer istenmeyen maddeleri içeren yeşil bir faz. Üst fazdan (süpernatant) 200µl yavaşça başka bir etiketli 1.5µl mikrofüj tüpüne pipetlendi. Buz gibi soğuk izopropanol, ekstrakte edilen süpernatantla (200µl) aynı miktarda (1:1) eklenmiştir. Bu, gece boyunca -20°C dondurucuda bırakılmıştır. Ertesi gün, DNA'yı peletlemek için örnekler 14000RPM'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Peletler iki farklı durumda buz gibi etanol ile yıkandı ve her yıkamadan sonra 14000RPM'de 15 dakika santrifüj edildi. DNA peletleri yaklaşık 3 saat boyunca havada kurumaya bırakılmış ve üzerine 100µl steril distile su eklenerek çözünmesi için 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından kullanıma hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.25. CTAB protokolü kullanılarak DNA ekstraksiyon yöntemi

3.5.2. BASTA PCR

DNA ekstrakte edildikten sonra 3 farklı PCR deneyi yapıldı. İlk PCR, transgenik bitkileri belirlemek için BASTA antibiyotik İleri ve Ters Primer ile yapıldı. Bu, BASTA sekansına bağlanacak ve amplifiye edilecek olanların transgenik olması gerektiği düşüncesiyle yapıldı, çünkü BASTA'nın varlığı başarılı bir şekilde dönüştürüldükleri ve şimdi plazmidimizi içerdikleri anlamına gelmektedir. Burada, pozitif kontrol olarak, 1:3000 oranında seyreltilmiş ROP9-1gRNA bağlanmış 52256 plazmidi (SIROP9-1.1 (A)) kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak da domates yaban tipi DNA örneği kullanılmıştır. Bu işlem Çizelge 3.26.'daki protokol ve Çizelge 3.27.'deki koşullar ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra %1'lik agaroz jelde 100 voltta 45 dakika boyunca yürütülmüştür.

Çizelge 3.26. BASTA PCR protokolü

Bileşen	X1	X10
X10 Tampon	1,5µl	15µl
MgCl ₂	1,5µl	15µl
dNTP (10mM)	0,4µl	4µl
Basta3 F	0,3µl	3µl
Basta 3 R	0,3µl	3µl
Taq Polimeraz	0,2µl	2µl
Örnek (DNA örnekleri)	3µl	-
dH ₂ O	7,8µl	78µl
Toplam	15µl	12 dağıt

Çizelge 3.27. BASTA PCR protokolü için koşullar

İlk Denatürasyon	95°C	5 dakika	1 döngü
Son Denatürasyon	95°C	30 saniye	29 döngü
Tavlama	60°C	30 saniye	
İlk Uzama	72°C	1 dakika	

(Devamı arkada)

Çizelge 3.27'nin devamı

Son Uzama	72°C	10 dakika	1 döngü
Sonsuz bekletme	4°C	∞	-

3.5.3. Ligasyon kontrol PCR

Bununla birlikte, BASTA PCR daha genel olduğundan ve ilgilenilen gene özgü olmadığından, ROP9 genine özgü başka bir PCR yapılmıştır. Burada, plazmidin sol sınırına bağlanan Ligasyon Kontrol Forward primeri ve ROP9 gRNA'nın 3'ucuna bağlanan bir ROP9- gRNA oligo Reverse primeri kullanılmıştır. Bu sayede daha yüksek bir doğrulama seviyesine ulaşılmıştır. Yine bununla birlikte, pozitif kontrol olarak 1:3000 oranında seyreltilmiş ROP9-1 gRNA bağlanmış 52256 plazmidi kullanılmıştır (SIROP9-1.1 (A)). Negatif kontrol olarak da domates yaban tipi DNA örneği kullanılmıştır. Bu işlem Çizelge 3.28.'deki protokol ve Çizelge 3.29.'daki koşullar kullanılarak yapılmış ve %1'lik agaroz jelde 100 voltta 45 dakika boyunca çalıştırılmıştır.

Çizelge 3.28. Ligasyon kontrol PCR protokolü

Bileşen	X1	X10
X10 Tampon	1,5µl	15µl
MgCl ₂	1,5µl	15µl
dNTP (10mM)	0,4µl	4µl
Ligasyon Kontrol F	0,3µl	3µl
ROP9 gRNA R	0,3µl	3µl
Taq Polimeraz	0,2µl	2µl
Örnek (DNA örnekleri)	3µl	-
dH ₂ O	7,8µl	78µl
Toplam	15µl	12 dağıt

Çizelge 3.29. Ligasyon kontrol PCR protokolü için koşullar

İlk Denatürasyon	95°C	5 dakika	1 döngü
------------------	------	----------	---------

(Devamı arkada)

Çizelge 3.29'un devamı

Son Denatürasyon	95°C	30 saniye	29 döngü
Tavlama	54°C	30 saniye	
İlk Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	10 dakika	1 döngü
Sonsuz bekletme	4°C	∞	-

3.5.4. SIROP9 PCR

BASTA PCR ve Ligasyon Kontrol PCR yapıldıktan sonra, sırasıyla 215bp ve 630bp'de pozitiflik veya bant varlığı gösteren bitki DNA'sı, SIROP9 Yönlü ve Ters Primerler gen primerleri ile başka bir PCR için kullanıldı. Bu, pozitif numunelerin sekanslama için gönderilebilmesi için gen bölgesini amplifiye etmek içindi. Bununla birlikte, domates vahşi tip numunesi pozitif kontrol olarak ve steril damıtılmış su negatif kontrol olarak kullanıldı. Burada beklenen bant ağırlığı 470 bp idi. PCR, Çizelge 3.30'daki protokol ve Çizelge 3.31'deki koşullar kullanılarak yapıldı.

Çizelge 3.30. SIROP9 PCR protokolü

Bileşen	X1	X10
X10 Tampon	1,5µl	15µl
MgCl ₂	1,5µl	15µl
dNTP (10mM)	0,4µl	4µl
SIROP9 F	0,3µl	3µl
SIROP9 R	0,3µl	3µl
Taq Polimeraz	0,2µl	2µl
Örnek (DNA örnekleri)	3µl	-
dH ₂ O	7,8µl	78µl
Toplam	15µl	12 dağıt

Çizelge 3.31. SIROP9 PCR protokolü için koşullar

İlk Denatürasyon	95°C	5 dakika	1 döngü
Son Denatürasyon	95°C	30 saniye	29 döngü
Tavlama	55°C	30 saniye	
İlk Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	10 dakika	1 döngü
Sonsuz bekletme	4°C	∞	-

3.5.5. Dizileme için hazırlık

Hedef geni veya ilgi konusu geni amplifiye etmek için SIROP9 primerleri ile PCR yapıldıktan sonra, 5 µl PCR numunesi %1 agaroz jel üzerinde 100 voltta 45 dakika boyunca çalıştırıldı ve UV transilluminatör altında incelendi. 470bp işaretinde tek bant gösterenler için, Thermo Scientific GeneJET PCR Saflaştırma Kiti ve protokolü kullanılarak PCR saflaştırması yapıldı (Anonymous 3). Bu, 1,5 ml mikrofüj tüpünde PCR numunelerine 1:1 oranında (1 µl PCR numunesi: 1 µl bağlama tamponu) 10 µl Bağlama Tamponu ekleyerek yapıldı. İyice karıştırmak için pipetleme ve yeniden pipetleme işlemi yapıldı. Ardından, çözeltiye 1:1 oranında 10 µl izopropanol eklendi ve 3 saniye boyunca vortekslenerek iyice karıştırıldı. Her şey spin kolonuna aktarıldı ve 14000 RPM'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Akış atıldı ve ardından spin kolonuna 700 µl Yıkama tamponu eklendi. Yine, 14000 RPM'de 1 dakika boyunca başka bir santrifüjleme işlemi yapıldı. Akış atıldı ve boş spin kolonu, kalan kalıntıları gidermek için 2 dakika boyunca santrifüjlendi. Daha sonra, spin kolonu yeni etiketlenmiş 1,5 ml'lik mikrofüj tüpüne yerleştirildi. Ardından, 35 µl elüsyon tamponu spin kolonunun tam ortasına pipetle aktarıldı. Bu, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve daha sonra 14000 RPM'de 1 dakika boyunca tekrar santrifüjlendi. Spin kolonu atıldı ve elüsyon, sekanslama için Ankara'daki BM laboratuvarına gönderildi.

SIROP9 F ve R primerleri kullanılarak amplifikasyonla üçlü bantlar gösteren PCR örnekleri için, kalan 10 µl PCR örnekleri 1 saat 30 dakika boyunca 80 voltta %1 agaroz jel üzerinde tekrar çalıştırıldı. Daha sonra taşınabilir bir UV transilluminatör altında, daha küçük bant ağırlığına sahip son iki bant, DNA'nın aşırı UV ışığına maruz kalması sonucu bozulmaması için mümkün olduğunca çabuk steril bir neşter kullanılarak jelden birlikte kesildi. Ardından Thermo Scientific GeneJET Jel Ekstraksiyon Kiti kullanılarak jel saflaştırması yapıldı.

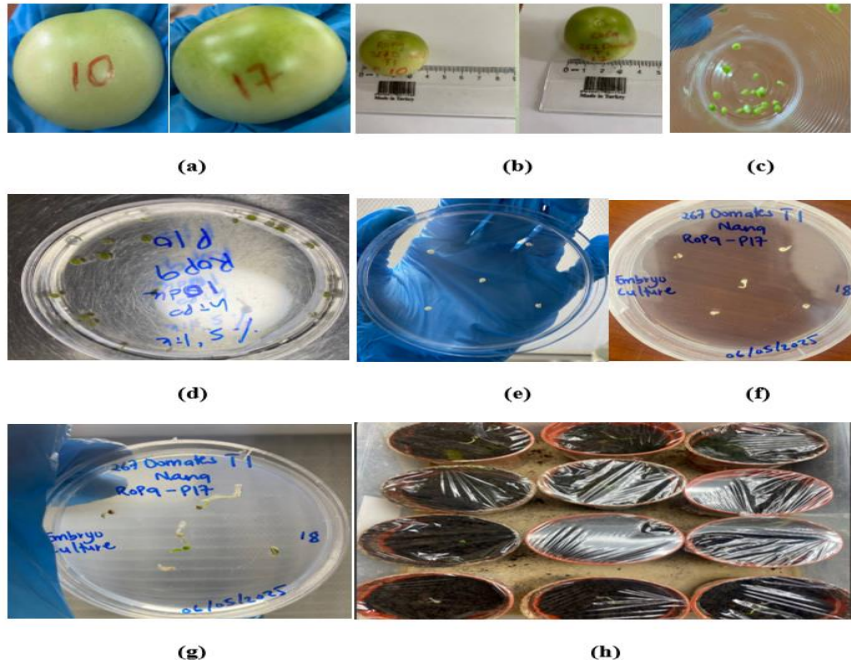
3.5.6. Dizileme

Dizileme işlemi için, PCR ile saflaştırılmış veya jel ile izole edilmiş numuneler 0,5 ml'lik mikrofüj tüpüne pipetlenmiştir. Ayrıca, PCR ile saflaştırılmış aynı çeşitten bir yabani tip domates DNA numunesi de hazırlandı ve etiketli 0,5 ml'lik mikrofüj tüpüne

pipetlendi. Ardından, SIROP9 Forward ve Reverse Primerleri, transgenik numunelerin ve yabancı tipin çift okunmasına (hem ileri hem de geri) yardımcı olmak için ayrı ayrı etiketlenmiş tüplere eklendi.

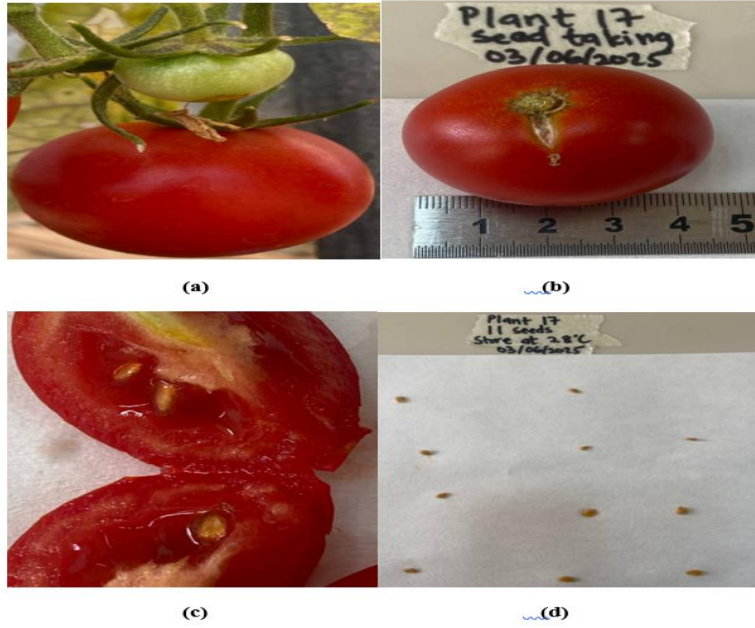
3.6. Yeni Nesil (T1) Mutant Bitkilerin / Tohumların elde edilmesi

Olgunlaşan, çiçek açan ve meyve veren bitkiler seçildi. Yeni nesil tohum ve bitkiler elde etmek için iki farklı yöntem uygulandı. İlk olarak, olgunlaşmamış veya olgunlaşmamış meyveler kopararak embriyo kültürü yapıldı. Bu meyveler yıkandı ve etanol ile silindi. Meyvelerin ölçümleri yapıldıktan sonra, meyveler steril bir neşter ile kesilerek açıldı. Meyvelerin içinden tohumlar forsepsle tek tek çıkarıldı, bir dakika boyunca %70 etanol ve ardından 5 dakika boyunca %5 hipoklorit içine yerleştirildi. Bu işlem, embriyonun çıkarılmasını kolaylaştırmak için tohum kabuğunu yumuşatmak amacıyla yapıldı. Steril filtre kağıdının üzerine, tohumların kabuğu forsepsle hafifçe bastırılarak embriyo nazikçe çıkarıldı. Embriyo daha sonra hormonsuz çimlenme ortamına yerleştirildi ve etiketlendi. Bu, iki gün boyunca karanlık ortamda tutuldu ve ardından embriyo çimlenmeye başlayana kadar ışık altında tutuldu. Daha sonra çimlenen embriyo kültür ortamından çıkarıldı ve torf dolu saksılara yerleştirildi. Saksılar, embriyonun çimlenme ortamındaki koşulları taklit etmek için şeffaf plastik sargı ile kaplandı ve etiketlendi. Birkaç gün sonra, embriyonun normal büyüme koşullarına alışmaya başlaması için plastik sargıya delikler açıldı. Daha sonra, plastik sargı kısmen açıldı ve ardından çimlenen embriyonun iklimlendirilmesi için tamamen açıldı. Bu fideler, mutant bitkiler için T1 fideleri olarak etiketlendi (Şekil 3.26.). Ayrıca, embriyo kültürünün yanı sıra, kalan meyvelerin olgunlaşmasına ve olgunlaşmasına izin verildi. Bu meyvelerden olgun tohumlar çıkarıldı, sayıldı ve 28 santigrat derecede bir fırında bir gece boyunca kurutuldu. Bu tohumlar, mutant bitkilerin T1 tohumları olarak etiketlendi (Şekil 3.27.).



Şekil 3.26. T1 bitkileri için embriyo kültürü prosedürü a) Meyvelerin toplanması ve etiketlenmesi; b) Meyvelerin boyutunun ölçülmesi; c) Olgunlaşmamış tohumların

ıkarılması; **d)** Hipoklorit uygulaması; **e)** Embriyoların çıkarılması ve hormonsuz tabağa yerleştirilmesi; **f)** Embriyonun ilk çimlenmesi; **g)** Embriyonun ileri çimlenmesi; **h)** Saksıya alma ve streç filmle örtme

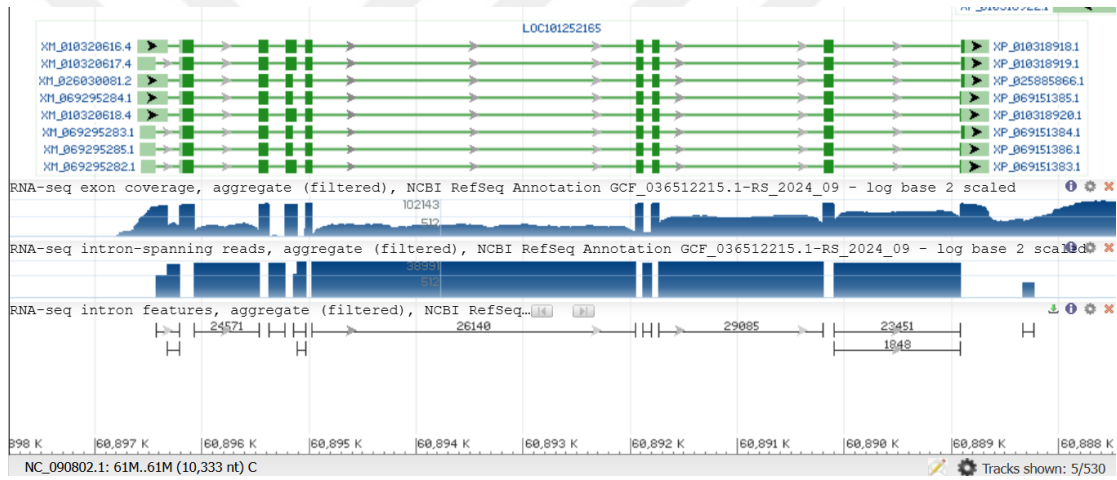


şekil 3.27. T1 tohum toplama a) Olgun meyvelerin toplanması; **b)** Meyvelerin boyutunun ölçülmesi; **c)** Tohumların çıkarılması; **d)** Tohumların sayılması ve kurutulması

4. BULGULAR

4.1. Biyoinformatik Analiz ve Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

Puli vd. (2024) tarafından yapılan çalışmalardan SIROP9 geninin genomik dizisi alındıktan sonra dizi National Center for Biotechnology Information- NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) adresinde blast edilmiş ve Şekil 4.1'de görüldüğü gibi SIROP9 gen dizisine ait bilgiler bu veri tabanından alınmıştır. Burada genin yapısı, ekzon ve intron sayısı ile domates kromozomu üzerindeki konumu belirlenmiştir. Ayrıntı vermek gerekirse, NCBI'da LOC101252165 gen kimliğine sahip SIROP9 geni, domates genomunun 3. kromozomunda bulunmaktadır. Solyc03g114070.2.1 ID'li genin bu bilgisinin doğruluğu SolGenomics (<https://solgenomics.net/>) ve Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) veri tabanlarında da teyit edilmiş ve toplam 8 intron ve 9 ekzon bölgesi olduğu görülmüştür. Özellikle genomda 64,118,342 ile 64,110,442 nükleotid (nt) arasında toplam 7901 nükleotid ile yer almaktadır. Genin transkript dizisi 1118 nükleotitten oluşurken, genin kodlama bölgesi 633 baz çiftinden ve toplam 211 peptit dizisinden oluşur (Şekil 4.2.; 4.3.)



Şekil 4.1. Domates genomundaki SIROP9 geninin NCBI'deki özellikleri



Şekil 4.2. Phytozome üzerinde SIROP9 geninin transkript dizisi

× CDS sequence [633] BLAST this sequence at: [Phytozome](#) [NCBI](#)

```
>S.lycopersicum ITAG2.4|Solyc03g114070.2.1 CDS
ATGGCCTCAAGTCTTCAAGATTCAATATGTGTCACGGTTGGTATGGGGCTGTGGCAAGACTTGTATGCTTATTGCTATACCAGTAACAAGTTTCCACTGACTATGTTCC
GACGGTGTTTGACAACTTCAGCGCAATGTGGTTGTAAGGGACACAGTAAATTTAGTCTTTGGGATACTGCAGGACAAGAAGATTATAACAGATTAAAGGCCACTGAGCTACG
SAGGAGCAGATGTTTTGTCCTAGCGTTCTCCTTGGTGAGTCGTGCAAGCTATGAAAACATACTTAAGAAGTGGATTCCCGAACTTCAGCATTATGCTCCTGGAATCCGGTGGA
TTAGCTGGCACCACAACTTGATCTTCGTGAGGATAAGCACCTCTTGGCTGATCATCTGGATTAGTCTCTGTCACCACTGCGCAGGAGAGGAGCTGCGGAACAAATTTGGTGTGC
CTATTATATCGAATGTAGCTCTAAACACACAGAAATGTGAAAGCTGTATTGATGCTGCAATCAAGGTCTGTCATCAAGCCACCACAAAAGCAAAAGGAGAGAGAAAAACAACGTC
GGGGATGTCATGAATGTGATGTGCGGAAGGAAGCTCGTTGTTAAAGTGA
```

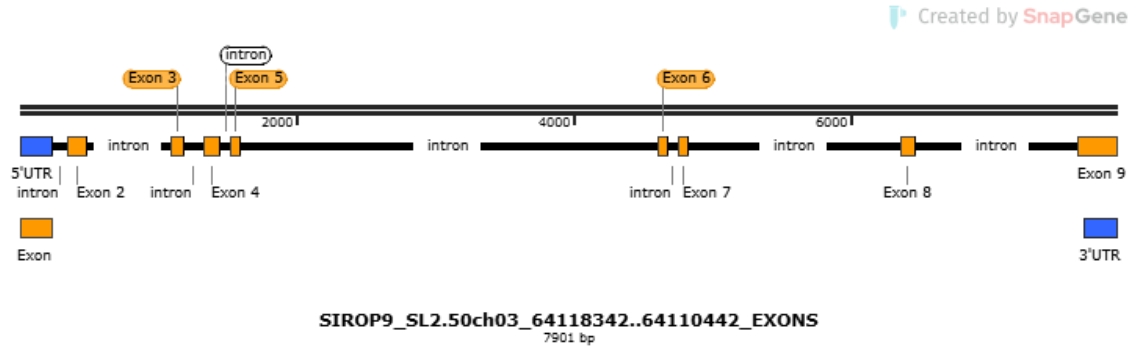
× Peptide sequence [211] BLAST this sequence at: [Phytozome](#) [NCBI](#)

```
>S.lycopersicum ITAG2.4|Solyc03g114070.2.1
MASSASRFIKCVTVGDGAVGRTCMILICYTSNKFPDYVPTVDFNFSANVVVEGTTVNLGLWDTASQEDYNRLRPLSYRGADVFLAFSLVSRASYENILKKWIPELQHYAPGIPV
LAGTKLDLREDKHLFADHPLVPVTTAQGEELRKQIGAAYYIECSSKTQONVKAIVEDAAIKVVIKPPQKQKEKKQRRGCLMNMVCMGRKLVCLK*
```

Şekil 4.3. Phytozome'da SIROP9 geninin kodlama ve peptit dizisi

Type	Name	Location	Length	Strand	Phase
exon	exon:Solyc03g114070.2.1.1	SL2.50ch03:64118113..64118342	230	-	n/a
exon	exon:Solyc03g114070.2.1.2	SL2.50ch03:64117868..64118000	133	-	n/a
exon	exon:Solyc03g114070.2.1.3	SL2.50ch03:64117169..64117256	88	-	2
exon	exon:Solyc03g114070.2.1.4	SL2.50ch03:64116905..64117014	110	-	n/a
exon	exon:Solyc03g114070.2.1.5	SL2.50ch03:64116762..64116825	64	-	2
exon	exon:Solyc03g114070.2.1.6	SL2.50ch03:64113674..64113738	65	-	n/a
exon	exon:Solyc03g114070.2.1.7	SL2.50ch03:64113524..64113589	66	-	n/a
exon	exon:Solyc03g114070.2.1.8	SL2.50ch03:64111893..64111987	95	-	1
exon	exon:Solyc03g114070.2.1.9	SL2.50ch03:64110442..64110708	267	-	n/a
intron	intron:Solyc03g114070.2.1.2	SL2.50ch03:64118001..64118112	n/a	-	n/a
intron	intron:Solyc03g114070.2.1.3	SL2.50ch03:64117257..64117867	n/a	-	n/a
intron	intron:Solyc03g114070.2.1.4	SL2.50ch03:64117015..64117168	n/a	-	n/a
intron	intron:Solyc03g114070.2.1.5	SL2.50ch03:64116826..64116904	n/a	-	n/a
intron	intron:Solyc03g114070.2.1.6	SL2.50ch03:64113739..64116761	n/a	-	n/a
intron	intron:Solyc03g114070.2.1.7	SL2.50ch03:64113590..64113673	n/a	-	n/a
intron	intron:Solyc03g114070.2.1.8	SL2.50ch03:64111988..64113523	n/a	-	n/a
intron	intron:Solyc03g114070.2.1.9	SL2.50ch03:64110709..64111892	n/a	-	n/a

Şekil 4.4. SolGenomics üzerinde SIROP9'un intron ve ekzon bölgelerinin sayısı



Şekil 4.5. SIROP9 geninde intron ve ekzonların konumlandırılması

4.1.1 BLAST ve çoklu dizi hizalama (MSA)

SIROP9 gen dizisi belirlendikten sonra, SIROP9'un ortologları ile genin kendisi

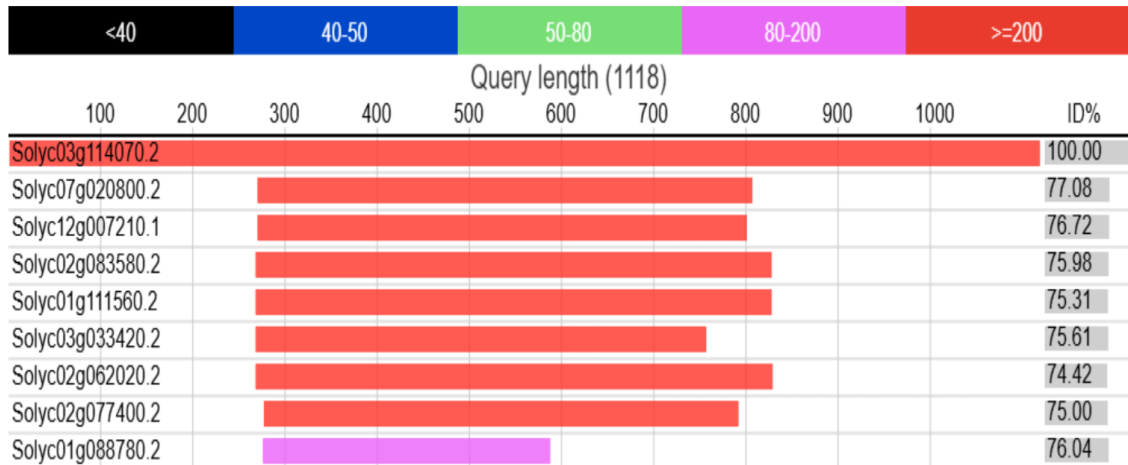
arasındaki benzerlik düzeyini belirlemek için SolGenomics üzerinde Blast yapılmıştır. Ayrıca homologların dizileri tanımlandı ve Çoklu Dizi Hizalamasını kolaylaştıracak şekilde alındı. Burada, kromozom 3 üzerinde bulunan SIROP2 dışında, diğer tüm SIROP'ların diğer kromozomlar üzerinde bulunduğu (Çizelge 4.1.) ve SIROP7'nin %77,08'lik benzerlik indeksi ile SIROP9'a en yakın benzerlikte olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6.).

Çizelge 4.1. Tüm SIROP homologlarının SolGenomics Gen Kimliği ve Kromozom numarası

Gen Adı	Sol Genomics'te Gen ID	Kromozomu
SIROP1	Solyc02g083580.2	2
SIROP2	Solyc03g033420.2	3
SIROP3	Solyc02g062020.2	2
SIROP4	Solyc01g111560.2	1
SIROP5	Solyc02g077400.2	2
SIROP6	Solyc01g088780.2	1
SIROP7	Solyc07g020800.2	7
SIROP8	Solyc12g007210.1	12
SIROP9	Solyc03g114070.2.1	3

Results

Basic



Şekil 4.6. SIROP9 ile karşılaştırıldığında diğer SIROP9 Homologlarının Benzerlik İndeksi

Daha sonra tüm homologlar için Çoklu Dizi Hizalaması (MSA) yapılmıştır (Şekil 4.7.). Bu MSA'dan elde edilen sonuçlar, daha sonra tasarlanan ve düzenleme için kullanılan gRNA'nın genellikle homolog dizileriyle tanımlanan korunmuş bölgelerde bulunmayacağını doğrulamak için gerekliydi. Bu, ilave teyit için Uniprot (www.uniprot.org) ve Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) araçları kullanılarak yapılmıştır.

Solyc07g020800.2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
--------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Şekil 4.7. Tüm SIROP homologlarının MSA'sı

4.1.2. Spesifik SIROP9 gRNA

Daha önce vurgulandığı gibi bir dizi kritere dayanarak, 580 olası yüksek spesifik gRNA dizisinden (Şekil 4.8.) 17'si CRISPRdirect'te seçilmiştir (<http://crispr.dbcls.jp/>). Bununla birlikte, SIROP geninin birkaç homoloğu olduğu için, SIROP9 olmayan başka herhangi bir homologda bulunabilecek bir tanesinin seçilmesinden kaçınmak için 17 gRNA'nın tüm homologlarda bulunup bulunmadığı çapraz kontrol edilmiştir (Şekil 4.9.). Daha sonra, önceden seçilen 17 gRNA dizisi de genin intron değil ekzon bölgelerinde varlığını doğrulamak için taranmıştır. Burada bulunan gRNA, SIROP9 geninin ekzon 4 bölgesinde yer almıştır (Şekil 4.10.). 5'-TTAAGGCCACTGAGCTACCG-3' dizilimine sahip gRNA, en yüksek özgüllüğe sahip olduğu için seçildi - 8mer'de sadece 93, içinde herhangi bir kesim bölgesi bulunmadı ve *Solanaceae* familyasındaki patates ve patlıcan gibi diğer bitkilerde bulundu ve uygulanabilirdi.

☒ show **highly specific** target only

Show entries

Search:

position start - end	+	-	target sequence 20mer+PAM (total 23mer)	sequence information				number of target sites		
				GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
219 - 241	-		CCAGTGAATTGAGTAGGAATCAT [gRNA]	35.00 %	63.80 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	577 [detail]
392 - 414	+		TTTCATCAATGTGTACGGT [TGG] [gRNA]	40.00 %	67.00 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	111 [detail]
398 - 420	+		AAATGTGTACGGTTGGTGA [TGG] [gRNA]	45.00 %	70.16 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	1358 [detail]
400 - 422	+		ATGTGTACGGTTGGTGA [GGG] [gRNA]	50.00 %	71.41 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	1467 [detail]
558 - 580	+		TGTTTGTCTAGATACGC [AGG] [gRNA]	40.00 %	66.34 °C	-	XbaI	1 [detail]	1 [detail]	115 [detail]
565 - 587	+		TGTCTAGATACGCAGGATT [TGG] [gRNA]	40.00 %	68.17 °C	-	XbaI	1 [detail]	1 [detail]	739 [detail]
751 - 773	+		GCTGCATTCTTCTCCACC [AGG] [gRNA]	55.00 %	74.65 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	346 [detail]
772 - 794	+		GGTCACAAAAGTAAGGAGGT [GGG] [gRNA]	45.00 %	70.42 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	868 [detail]
851 - 873	+		GGAATGTTAGTAGCTCAGTA [TGG] [gRNA]	40.00 %	67.68 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	236 [detail]
910 - 932	+		GAGGGTTTGATTCCACACCT [TGG] [gRNA]	50.00 %	72.76 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	669 [detail]
995 - 1017	+		ATGGTTAACTCGTGTGATC [AGG] [gRNA]	40.00 %	66.25 °C	-	HincII HpaI	1 [detail]	1 [detail]	920 [detail]
1080 - 1102	+		AAACCAGGACTATGTTCCGA [CGG] [gRNA]	45.00 %	70.85 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	362 [detail]
1264 - 1286	+		CATTCTCTACCCCTATAAGG [AGG] [gRNA]	45.00 %	70.20 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	4207 [detail]
1273 - 1295	-		CCCCTATAAGGAGGATAGGAAT [gRNA]	40.00 %	68.55 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	492 [detail]
1349 - 1371	+		TTAAGGCCACTGAGCTACCG [AGG] [gRNA]	55.00 %	76.14 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	93 [detail]
1366 - 1388	-		CCGAGGAGCAGATGTTTTGTCC [gRNA]	45.00 %	69.95 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	269 [detail]
1387 - 1409	-		CCTAGCGTTCTCTTGTGTGAGTC [gRNA]	55.00 %	74.49 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	148 [detail]
1538 - 1560	+		TTATGCTCTCGAATTCGG [TGG] [gRNA]	50.00 %	72.72 °C	-	ApoI EcoRI	1 [detail]	1 [detail]	243 [detail]
1545 - 1567	-		CCTGGAATTCGGTGTATTAGC [gRNA]	50.00 %	72.36 °C	-	ApoI EcoRI	1 [detail]	1 [detail]	492 [detail]
1548 - 1570	+		GGAATTCGGTGTATTAGC [TGG] [gRNA]	50.00 %	72.36 °C	-	ApoI EcoRI	1 [detail]	1 [detail]	247 [detail]

Showing 1 to 20 of 90 entries (filtered from 580 total entries)

First Previous 1 2 3 4 5 Next Last

Şekil 4.8. CRISPRdirect üzerinde son derece spesifik SIROP9 uygulanabilir gRNA

Solyc03g114070.2.1	ATGTCCTGTGATCATTTTTATAGACAAGAAGATTATAACAGATTAAAGGCCACTGAGCTA	1365
Solyc01g111560.2	ACGTACCATT--TCTGTATTGAAGCTCAAAAACCTTTAAAC---TCTTACAAATGAGGCC	1279
Solyc07g020800.2	-----	246
Solyc12g007210.1	-----	115
Solyc03g033420.2	-----	0
Solyc02g083580.2	-----	0
Solyc02g062020.2	-----	529
Solyc02g077400.2	-----	281
Solyc01g088780.2	-----	295
Solyc03g114070.2.1	CCGAGGAGCAGATGTTTTGTCTAGCGTTCTCCTTGGTGAAGCTGCAAGCTATGAAAA	1425
Solyc01g111560.2	ACGGCGATTAGAACATGTGATATTTG-----TGT-----TGAAAACTAAGGCAT	1323
Solyc07g020800.2	-----	246
Solyc12g007210.1	-----	115
Solyc03g033420.2	-----	0
Solyc02g083580.2	-----	0
Solyc02g062020.2	-----	529
Solyc02g077400.2	-----	281
Solyc01g088780.2	-----	295

Şekil 4.9. SIROP9'a özgü gRNA



Şekil 4.10. SIROP9 geninin ekzon 4'ünde gRNA varlığı

4.1.3. SIROP9 gen primeri

Primer3 Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin>) web sitesinde SIROP9 geni için gen primerleri tasarlanırken, en uygulanabilir primer, ileri ve geri diziler SIROP9 gRNA'yı çevreleyecek şekilde tasarlanmıştır (Şekil 4.12a, b). Elde edilen primer 990 baz çiftlik bir dizi boyutuna, 58,28°C sıcaklık ve %47,37 GC içeriğine sahip bir ileri iplikçiğe, 58,31°C sıcaklık ve %57,89 GC içeriğine sahip bir ters iplikçiğe sahipti (Şekil 4.11.). 40-60 arasındaki bir GC içeriği bazlar arasında çok daha iyi ve güçlü hidrojen bağları oluşmasını sağlamaktadır. Ancak, GC içeriğinin çok fazla olması primer-dimer oluşumuna neden olmaktadır (Behind the Bench Staff 2019).

Primer3 Output

PRIMER PICKING RESULTS FOR

Template masking not selected

No mispriming library specified

Using 1-based sequence positions

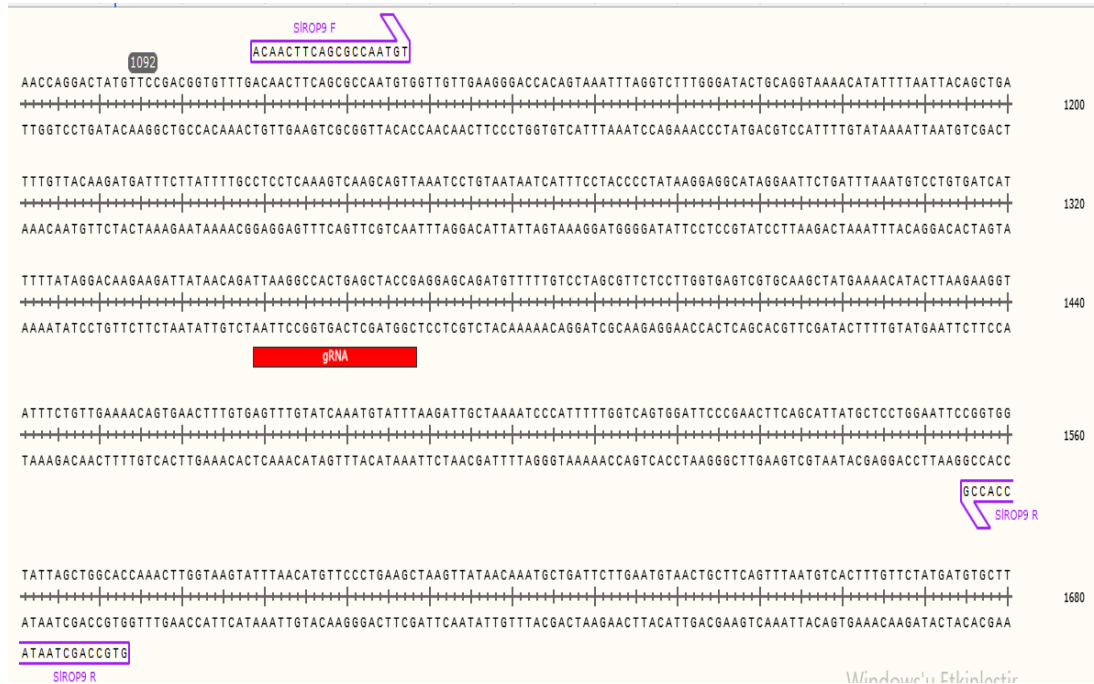
OLIGO	start	len	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin	seq
LEFT PRIMER	229	19	58.28	47.37	2.29	0.00	0.00	ACAACTTCAGCGCCAATGT
RIGHT PRIMER	693	19	58.31	57.89	0.00	0.00	0.00	GTGCCAGCTAATACCACCG

SEQUENCE SIZE: 990
INCLUDED REGION SIZE: 990

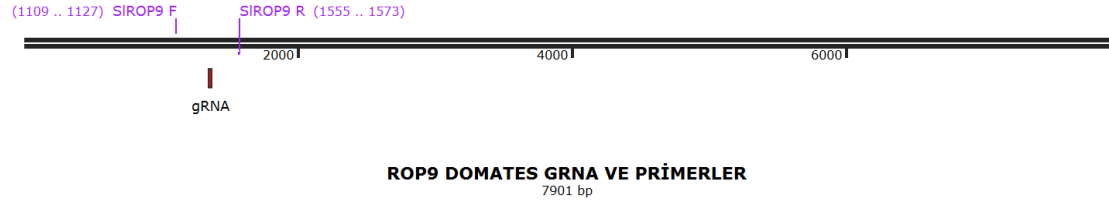
PRODUCT SIZE: 465, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

TARGETS (start len

Şekil 4.11. Primer3 Plus'tan SIROP9 gen primerleri



(a)



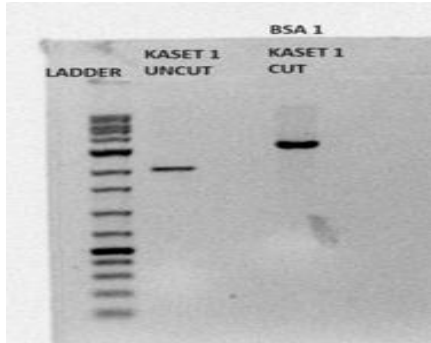
(b)

Şekil 4.12. gRNA'yı çevreleyen SIROP9 gen primerleri **a)** SIROP9 genini çevreleyen dizinin gösterimi; **b)** SIROP9 genini çevreleyen dizinin doğrusal gösterimi

4.2. Gen Klonlamasından Elde Edilen Sonuçlar

4.2.1. Bsa1 ile Kaset 1 plazmid kesimi

Kaset 1 plazmidi, gRNA oligolarının bağlanmasını kolaylaştırmak amacıyla Bsa1 ile kesildikten sonra, kaset1 plazmidi ile birlikte 100 voltta yürütülmüştür. Transillüminatör altında görüntülenen jel görüntüsünde, plazmidin başarılı bir şekilde kesildiği, doğrusal formunun 910bp bant genişliğinde bir bant fragmanına yol açtığı, kesilmemiş plazmidin ise 930bp olduğu görülmüştür. Bu ~20 bp fark, BsaI siteleri ile çevrili gRNA yer tutucu bölgesine karşılık gelmektedir. Sindirim sırasında bu bölgenin kaybolması, BsaI'nin her iki uçta da hassas bir şekilde kestğini ve 20 bp ekleme bölgesini serbest bıraktığını göstermektedir. Bu sonuç, sindirim adımının başarısını doğrulamakta ve plazmidin artık 20 bp gRNA oligonun yönlü ligasyonu için doğru yapışkan uçlara sahip doğrusal bir formda olduğunu teyit etmektedir. Restriksiyondan sonra temiz bir tek bant, klonlama verimliliğini azaltacak sindirilmemiş (dairese) veya kısmen sindirilmiş formların olmadığını göstermektedir. (Şekil 4.13.).

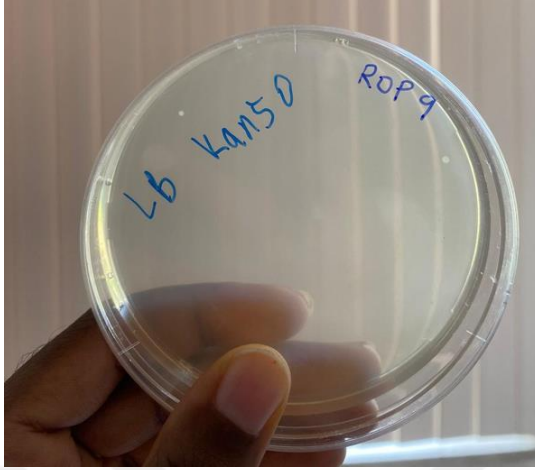


Şekil 4.13. Bsa1 ile kesim sonrası Kaset 1 plazmidinin jel görüntüsü

4.2.2. SIROP9 gRNA oligosu ile bağlanmış Kaset 1 plazmidinin E. coli'ye ısı şokundan koloni oluşumu

Arabidopsis thaliana'dan Arabidopsis thaliana U6-26 promotörü ve U6-26 pol III terminatörünün varlığı nedeniyle artık çoğaltılabilen gRNA dizisini içeren tamamen tamamlanmış bir plazmid çemberi oluşturmak için yapılan ligasyonla, bağlanan ürünün 20µl'si DH5α E.coli suşuna ısı şoku ile aktarıldı. Isı şoku uygulanmış numunenin kanamisin 50 seçilebilir plakasına yayılmasından bir gün sonra, plakada iki küçük koloni

gözlenirken, Kesilmemiş ve ligasyon yapılmamış kaset 1 plazmidi içeren E.coli olan pozitif kontrolde birkaç koloni vardı (Şekil 4.14.).



(a)

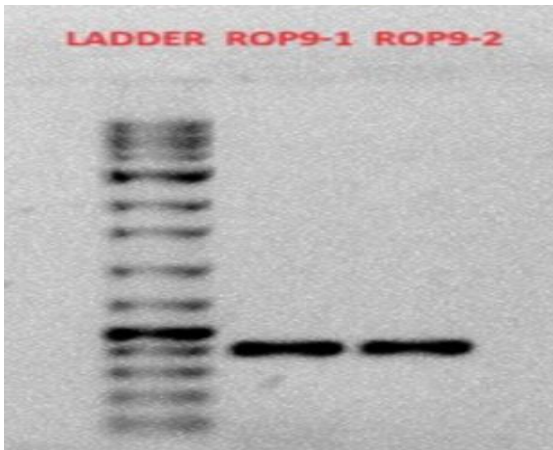


(b)

Şekil 4.14. DH5α E.coli suşuna bağlanmış kaset 1 plazmidinin ısı şokundan sonraki koloniler **a)** Ligasyon yapılmış plazmidten E. coli'ye koloniler; **b)** Ligasyon yapılmamış plazmidten E. coli'ye koloniler

4.2.3. E. coli'ye SIROP9 gRNA oligosu ile bağlanmış Kaset 1 plazmidinin ısı şokundan elde edilen koloni sonuçları

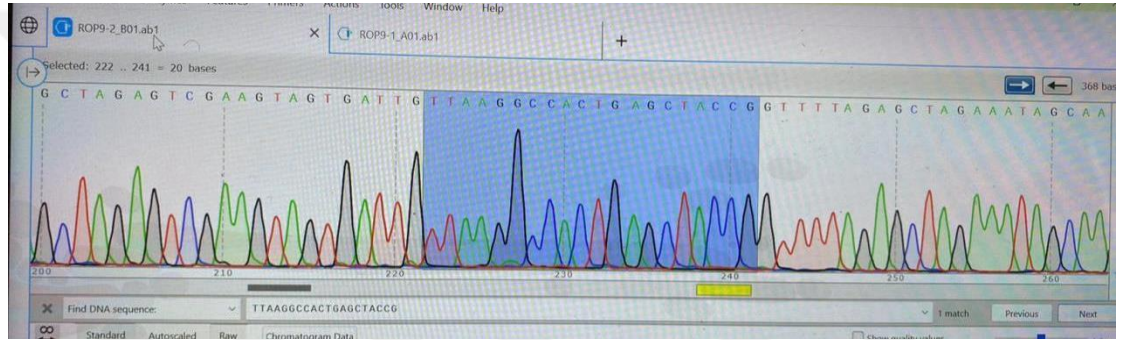
Çizelge 3.6 ve 3.7'deki protokol kullanılarak, plakada görülen ve uygun şekilde etiketlenen iki koloni için bir koloni PCR'ı yapılmıştır. Burada, 55°C sıcaklıkta kaset kontrol ileri ve geri primerleri kullanıldığında her iki koloni için 400bp'de bir bandın varlığı görülmüştür. Bu da E. coli kolonisinin kaset 1 plazmidine başarıyla bağlanmış gRNA içerdiğini göstermiştir (Şekil 4.15.). Ancak daha da emin olmak için, koloni PCR ürününün kalan 15µl'si, kaset 1 plazmidinde SIROP9 gRNA dizisinin varlığını iki kez doğrulamak için sanger dizilemesine gönderildi. Dizileme sonuçları, her iki koloninin de gRNA dizisinin varlığına sahip plazmidler içerdiğini kanıtlamıştır (Şekil 4.16.).



Şekil 4.15. Kaset 1'e dahil edilen SIROP9 gRNA'nın pozitif bantlarını gösteren jel görüntüsü



(a)

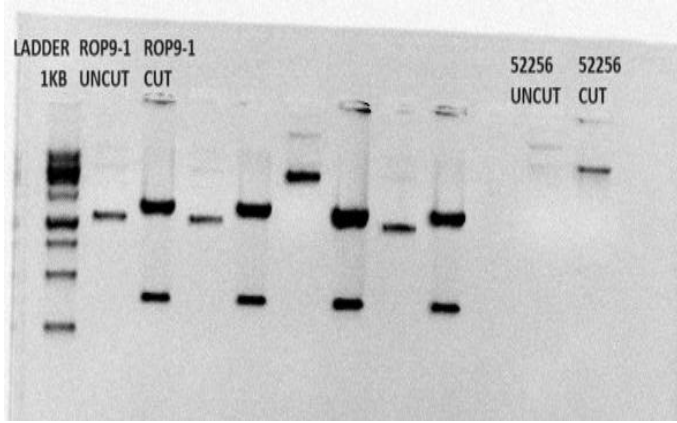


(b)

Şekil 4.16. Kaset1'de SIROP9 gRNA'nın varlığını gösteren Sanger dizileme sonuçları a) Koloni 1; b) Koloni 2

4.2.4. Kaset 1 ve 52256 plazmidi içeren SIROP9 gRNA'nın EcoRI ve PacI ile restriksiyonu

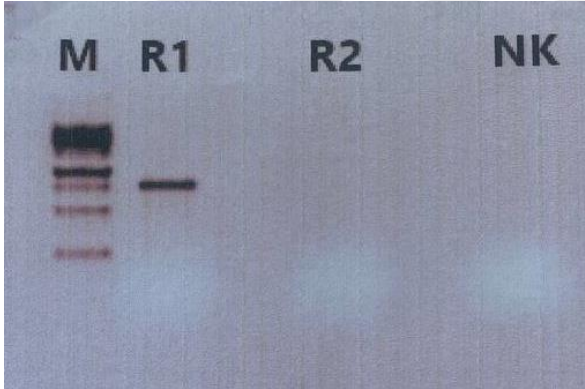
Sanger dizileme sonuçları her iki koloninin de pozitif olduğunu gösterdikten sonra, hazırlanan stoklardan plazmid izolasyonu yapıldı ve bu plazmidler nanodrop spektrometresinde kaliteleri için ölçüldü. İlk koloniden elde edilen plazmid 59ng/µl konsantrasyon gösterirken, ikinci kolonininki 57ng/µl idi. Daha sonra kaset 1 plazmidinin (ROP9-1) sadece 1. kolonisi ve 52256 (pco-CAS9) adlı ikinci bir plazmid üzerinde EcoRI ve PacI ile restriksiyon yapıldı. İkinci koloninin plazmidi yedek olarak -20°C dondurucuda tutulmuştur. Bu kesimin amacı, her iki plazmid için de bağlanmalarını kolaylaştıracak ortak bir çıkıntı oluşturmaktır. Her iki plazmidin kesilmemiş versiyonları pozitif kontrol olarak kullanıldı. Jel görüntüsü kesilmiş Kaset 1'in (şimdi promotör ve terminatör, SIROP9 gRNA ve bir gRNA iskelesi içeren) 720bp boyutundan daha düşük bir bant parçasına sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.17.). Bu Kaset 1 artık SIROP9-gRNA olarak anılmaktadır.



Şekil 4.17. EcoRI ve PacI ile kesiminden sonra gRNA dahil kaset 1 ve 52256 plazmidinin jel görüntüsü

4.2.5. SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidi ile ligasyonunun doğrulanması

SIROP9-1 gRNA'nın 52256 plazmidi ile ligasyonundan sonra, ısı şoku aşamasına geçmeden önce ligasyonun gerçekten çalıştığından emin olmak için bir PCR yapıldı. Bu PCR ile, jel görüntüsünde bir bandın varlığının bir sonucu olarak ligasyonun gerçekten işe yaradığı doğrulandı. Jel görüntüsünde 1900bp'lik bir bant parçası görüldü (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. SIROP9-1 gRNA ve 52256 plazmid ligasyon doğrulanması

4.2.6. E. coli'ye SIROP9-1 gRNA ile bağlanmış 52256 plazmidinin ısı şokundan koloni oluşumu

52256 plazmidinin ve SIROP9-1 gRNA'nın ligasyonu başarılı kabul edildikten sonra, 19µl bağlanmış ürünlerle ısı şoku yapıldı. Ligasyonun başarılı olması, plazmidin artık tüm bileşenleri (*Streptococcus pyogenes* türevi Cas9 endonükleaz, gRNA eklenmesi için çoklu klonlama bölgeleri, MAS promotörü, NOS terminatörü, kanamisin direnç geni, basta direnç geni, vb) içerdiği anlamına geliyordu. Ertesi gün, kanamisin50 plakasında iki küçük koloninin ortaya çıktığı görüldü (Şekil 4.19.).



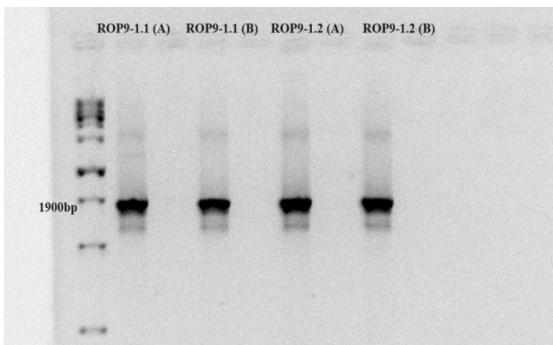
Şekil 4.19. DH5α e.coli suşuna bağlanmış 52256 plazmidinin ısı şokundan sonraki kolonileri

4.2.7. E. coli'ye SIROP9-1 gRNA ile bağlanmış 52256 plazmidinin ısı şokundan elde edilen koloni sonuçları

Plakada gözlenen iki koloni Kanamisin 50 içeren 10 ml YEP'de çoğaltılmış ve ertesi gün her iki koloniden ikişer alikotttan plazmid ekstrakte edilmiştir. İkinci alikotlar sadece yedek olarak alınmıştır. Hem koloni 1 hem de koloni 2'den izole edilen her bir plazmidin saflığının iyi konsantrasyonda olduğu kanıtlanmıştır:

- SIROP9-1.1(A)- 30ng/μl
- SIROP9-1.1(B)- 23ng/μl
- SIROP9-1.2(A)- 38ng/μl
- SIROP9-1.2(B)- 40ng/μl

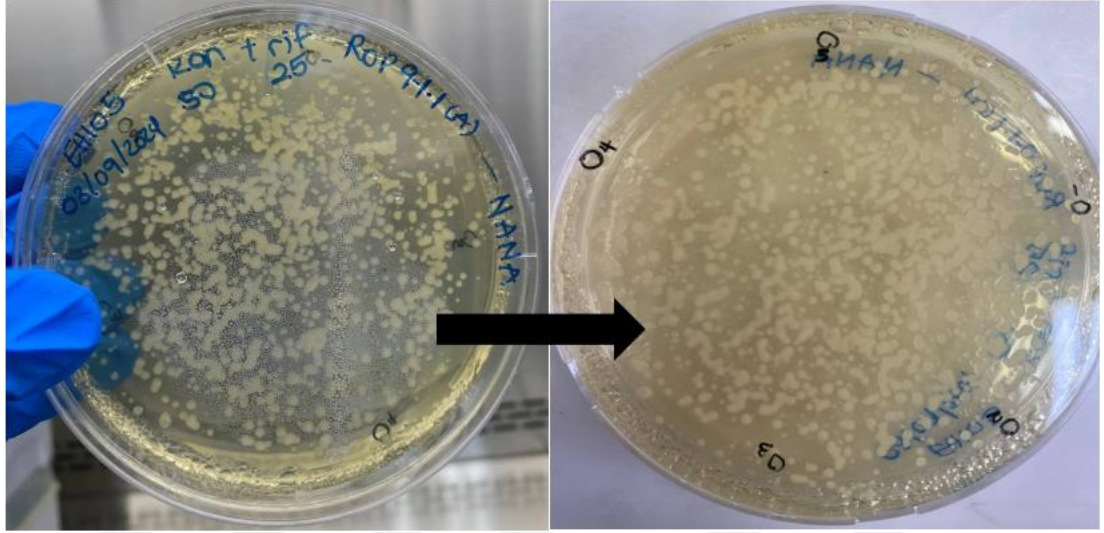
Daha sonra Çizelge 3.12. ve 3.13'teki protokol kullanılarak çıkarılan tüm plazmidlerde gRNA'nın 52256 ikili vektörüne dahil edildiğini doğrulamak için bir PCR yapılmıştır. Bir agaroz jel üzerinde çalıştırdıktan sonra, tüm plazmidlerde 1900bp bant boyutunda bir bant parçasının oluşması nedeniyle gerçekten de gRNA'nın mevcut olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.20.).



Şekil 4.20. 52256 plazmidine dahil edilmiş SIROP9-1 gRNA'nın pozitif bantlarını gösteren izole edilmiş plazmidlerin jel görüntüsü

4.2.8. Elektroporasyondan elde edilen koloniler

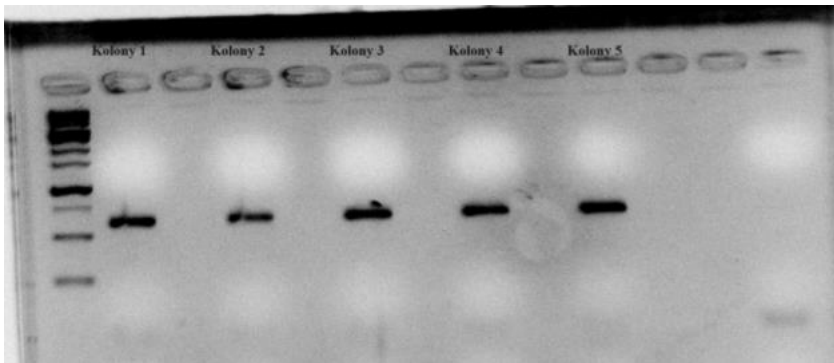
Kolonilerden izole edilen tüm plazmidlerin pozitif olduğunu gösteren jel görüntüsü ile SIROP9-1.1 (A) işlemin devamı için seçilirken diğer plazmidler ileriki amaçlar için saklandı. Bu plazmidin 2µl'si elektroporasyon için kompetent EH105 *Agrobacterium* suşuna pipetlendi. Bu elektroporasyon yapıldıktan sonra kanamisin 50 ve rifampisin 25 içeren bir plakaya yayıldı. *Agrobacteri*lerin çoğalması için gereken gün sayısı olan 2 gün sonra, plaka üzerinde birkaç koloni ortaya çıktı. Bu kolonilerden birbirinden biraz ayrılmış olan beş tanesi seçildi ve etiketlendi (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. Elektroporasyondan sonra oluşan kolonilerin görüntüsü (Plakanın üst ve alt görünümü)

4.2.9. Elektroporlanmış plazmid kolonilerinin sonuçları

Etiketlenmiş ve seçilmiş beş koloni, kanamisin 50 ve rifampisin 25 içeren 10 ml YEP broth içinde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan koloni besiyerinin her birinden 10µl, içine 90µl steril su pipetlenerek 1:10 oranında sulandırılmıştır. Bu daha sonra Çizelge 3.15. ve 3.16'daki protokoller izlenerek koloni PCR'ı için kullanılmıştır. Bu PCR'den alınan jel görüntüsü, tüm kolonilerin pozitif olduğunu ve SIROP9-1 grNA'ya da sahip olan 52256 ikili plazmidini içerdiğini göstermiştir (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. Elektroporasyondan elde edilen *Agrobacterium* kolonilerinin jel görüntüsü

4.3. Doku Kültürü Yoluyla Agrobacterium Transformasyonundan Elde Edilen Sonuçlar

Doku kültürü prosedürü çimlenmeden ön kültüre, Agrobacterium solüsyonu ile ko-kültüre, Basta 1 konsantrasyonu kullanılarak birincil ve ikincil seçime ve son olarak da köklenmeye kadar birkaç adımdan oluşmuştur. Deneyin bu doku kültürü kısmının başlangıcında, başarılı bir şekilde rejenere olmayan eksplantlardan kurtulmak için Basta 2 konsantrasyonu (1 litrede 200µl 10mg/ml) kullanılmıştır. Başlangıç aşamalarında bitkiler normal bir şekilde rejenerasyon göstermiştir. Ancak ikincil seçim aşamasında rejenerasyonun ikinci ila üçüncü aşamasında, eksplantlar, bitkilerin bulunduğu aşama göz önüne alındığında olmaması gereken yapraklarda sararmadan beyazlaşmaya kadar karakteristik semboller göstermeye başlamıştır. Bu durum, çalışmaya konu olan domates genotipi (267 domates) için sert bir seleksiyon yapıldığını doğrulamıştır. Rejenere olan tüm eksplantları kaybetmemek için basta konsantrasyonu 1'e getirilmiştir (1 litrede 100µl 10mg/ml). Bu noktadan sonra, bitkiler normal formlarına dönmeye başladıkça bitkilerde iyileşme görülmüştür.

267 domates genotipi için zaman içinde farklı noktalarda toplam 4 parti tohum çimlendirmesi yapıldı. İlk 2 parti 50 tohumluk bir başlangıç noktası ile yapılırken, ikinci ve üçüncü partilerde sırasıyla 100 ve 30 tohum vardı. Çimlenme ortalama olarak yaklaşık bir hafta sonra gerçekleştikten sonra, Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi transformasyon prosedürüne belirli sayıda eksplant ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.2. Doku kültüründe 267 domates genotipinin tüm partilerinin kültür aşamaları

Toplu	1	2	3	4
Çimlenme	50 tohum	50 tohum	100 tohum	30 tohum
Ön kültür	80 eksplant	134 eksplant	167 eksplant	120 eksplant
Ortak kültür	80 eksplant	134 eksplant	167 eksplant	120 eksplant
Birincil Seçim	78 eksplant	134 eksplant	159 eksplant	115 eksplant
İlk İkincil Seçim	47 eksplant	67 eksplant	90 eksplant	103 eksplant
Son İkincil Seçim	12 bitki	20 bitki	31 bitki	83 bitki
Köklenme	12 bitki	10 bitki	15 bitki	5 bitki

Yukarıdaki çizelgeden (Çizelge 4.2) bu çeşit için rejenerasyon ve transformasyon oranının çok düşük olduğunu göstermektedir. Transformasyondaki bu düşük verimlilik, her alt kültürlemeden sonra ölmeye devam eden birçok yanlış pozitifin varlığı nedeniyle gözlemlenmiştir. Bazı bitkiler seçilebilir antibiyotiğin bulunduğu köklendirme ortamına aktarıldıktan sonra da ölmüştür çünkü transgenik olmamalarına rağmen önceki kültürlerde rejenere olmuşlardır. Ayrıca, birincil seçimden ikincil seçime kadar olan aşamada yapraktan gerçek sürgünlere dönüşen eksplant sayısı çok düşüktü.

4.4. Transgenik Hatların Belirlenmesi

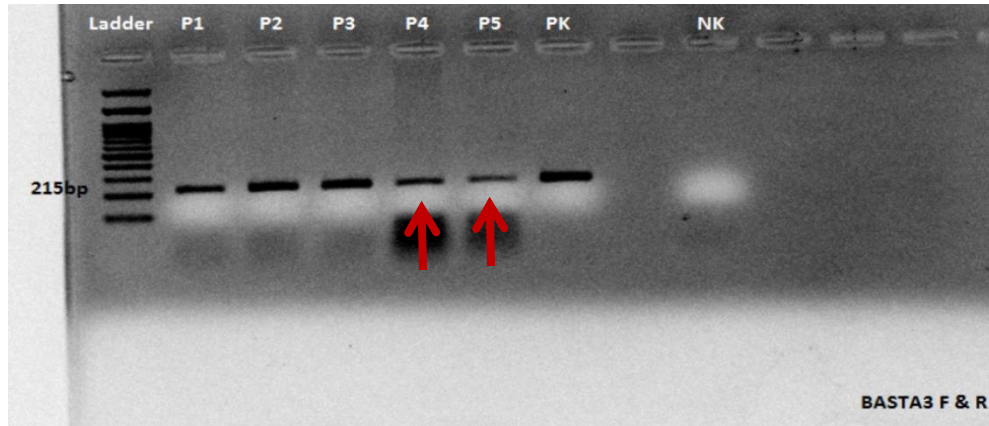
Köklendirme ortamında gelişip hayatta kaldıktan sonra perlit:torf:vermikülit (1:1:1) karışımında iklimlendirilen bitkiler transgeniklik açısından test edilmiştir. Parti 1 için dokuz, parti 2 için dört, parti 3 için altı ve parti 4 için beş bitki test edilmiştir. Her partiden, test edilen tüm bitkilerden, pozitif kontrol olarak SIROP9-1.1 (A) plazmidi ve negatif kontrol olarak yabani tip bir domates çeşidi ile Basta3 İleri ve Geri primerlerinin yanı sıra Ligasyon Kontrol İleri ve gRNA Geri primerleri kullanıldıktan sonra sadece 1 transgenik bitki gözlenmiştir. Her partiden test edilen bitkiye, aşamasına bağlı olarak farklı bir isim verilmiştir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Her bir transgenik bitkinin adlandırılması

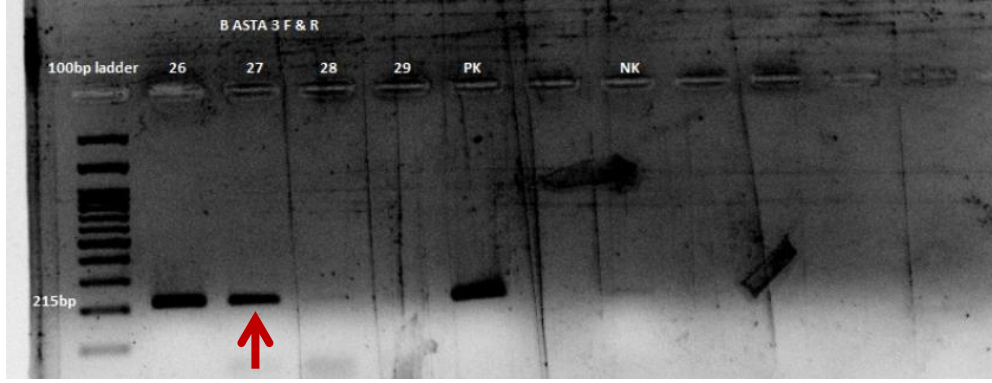
Parti numarası	Bitki adı	Saksı adlandırma	Sekans adı
1	267 Domates(47)- 2	Bitki 10	P4
2	267 Domates(67)- 7	Bitki 17	P5
3	267 Domates(90)- 4	Bitki 27	P11
4	267 Domates(103)- 21	Bitki 32	P12

4.4.1. Transgenik bitkileri belirlemek için BASTA3 PCR sonuçları

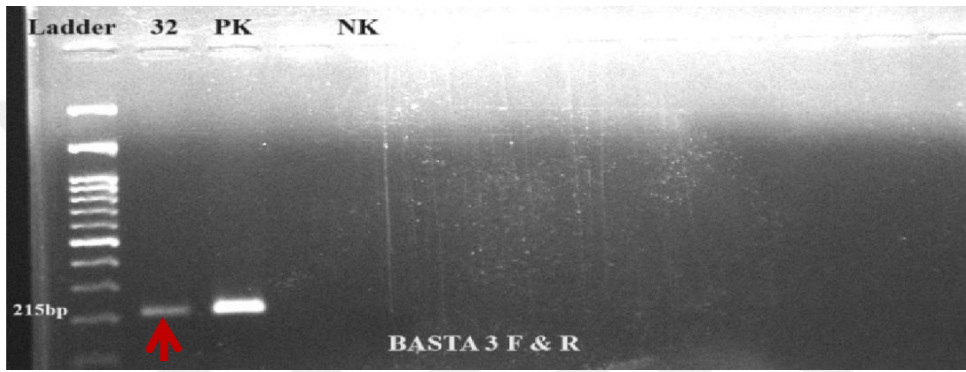
BASTA3 primerleri ile, Basta antibiyotiği laboratuvarında yaygın bir seçilebilir markır olarak kullanıldığından, bitkilerin taranması çok daha genel ve pek spesifik olmayabilmektedir. Bu sonuçlar sadece geniş bir tarama popülasyonunda transgenik bitkileri bulmak için zemin hazırladı. Basta3 pozitif bitkiler 215bp'lik bir bant parçası vermiştir. Şekillerdeki kırmızı oklar pozitif olan domates bitkilerini göstermektedir (Şekil 4.23a, b, c).



(a)



(b)

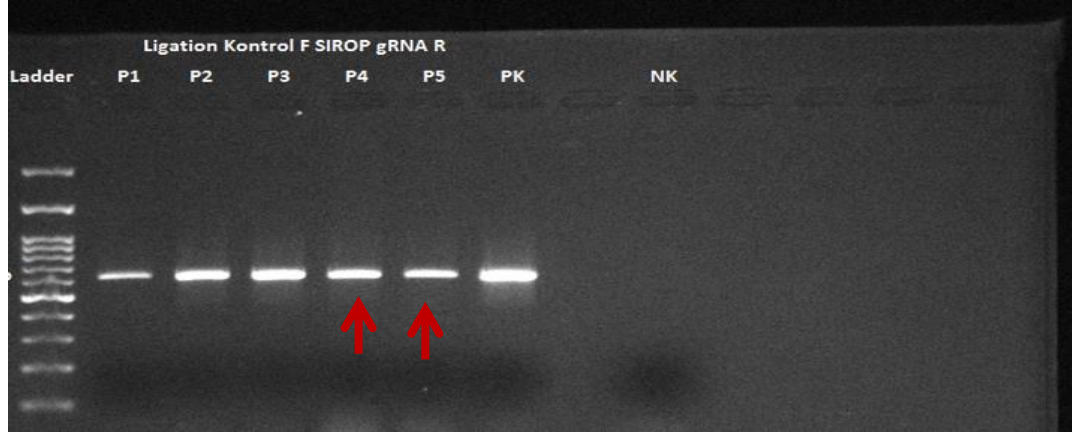


(c)

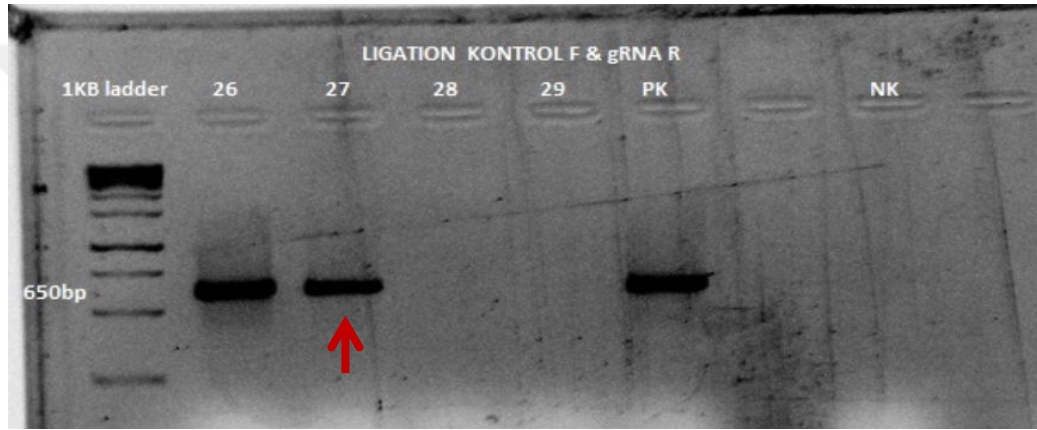
Şekil 4.23. Basta pozitifliği gösteren transgenik bitkiler a) Bitki 10 (P4) ve bitki 11 (P5); b) Bitki 27 (P11); c) Bitki 32 (P12)

4.4.2. Transgenik bitkilerin spesifik taraması için Ligasyon Kontrol F ve SIROP9 gRNA R

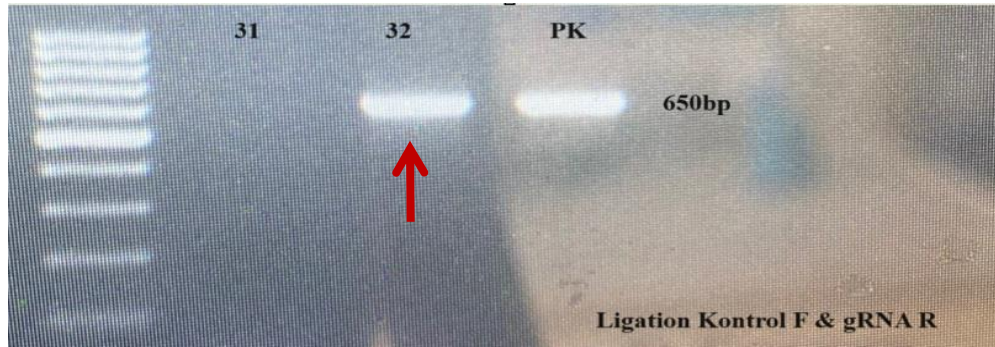
Transgenik bitkileri taramak için plazmidin omurga bölgesini hedef alan ligasyon kontrol ileri ve gRNA kaset bölgesini güçlendiren ROP9 gRNA ters primerleri kullanılarak, amaç plazmid ve gRNA arasındaki bağlantı boyunca bölgeyi hedeflemektir. Böylece, test edilen domates bitkilerinin genomunda hem plazmidin hem de gRNA'nın gerçek yöneliminde varlığının doğrulanması mümkün olmuştur. Bu sayede, gRNA'nın yanlış yerleştirilmesi veya bulunmaması durumunda amplifikasyon gerçekleşmeyeceğinden, gRNA olmadan sadece plazmid içermiş olabilecek yanlış pozitif bitkilerin seçilmesi imkansız hale gelmiştir. Basta PCR koşulları altında pozitif çıkan bitkiler, bu tarama koşulları altında da beklenen 650bp bant ağırlığı ile aynı şekilde pozitif çıkmıştır. Bu, mevcut bitkilerdeki transgenikliğin ikinci bir doğrulama seviyesiydi. Şekillerdeki kırmızı oklar pozitif olan (T0) 267 domates genotipini göstermektedir (Şekil 4.24a, b, c).



(a)



(b)



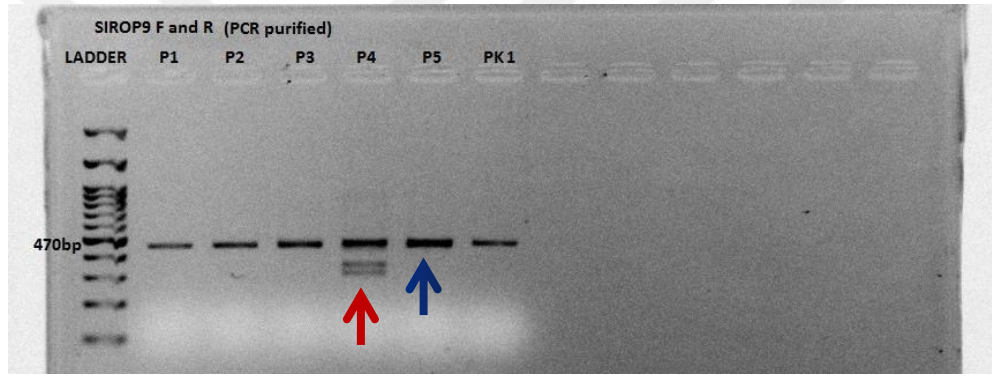
(c)

Şekil 4.24. Bitki transgenitesinin Ligasyon Kontrol F ve SIROP9 gRNA R ile doğrulanması **a)** Bitki 10 (P4) ve bitki 11 (P5); **b)** Bitki 27 (P11); **c)** Bitki 32 (P12)

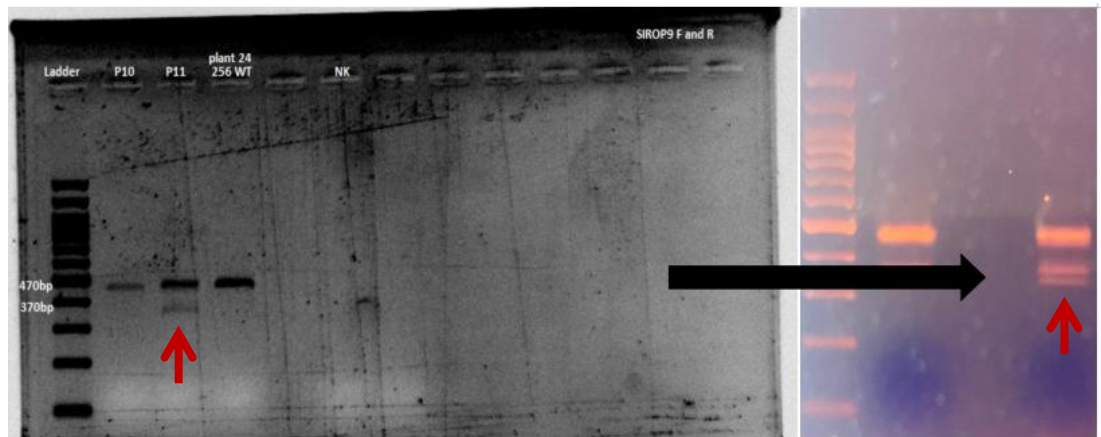
4.4.3. Transgenik bitkinin dizileme için hazırlanması

Bu bitkilerin transgenikliği belirlendikten sonra, SIROP9 geni hedef gRNA bölgesi her bitkide kendine özgü primerlerle çoğaltılarak dizileme için hazır hale getirilmiştir. Bu bitkilerden ikisi, bitki 17 (P5) ve bitki 32 (P12) amplifikasyondan sonra

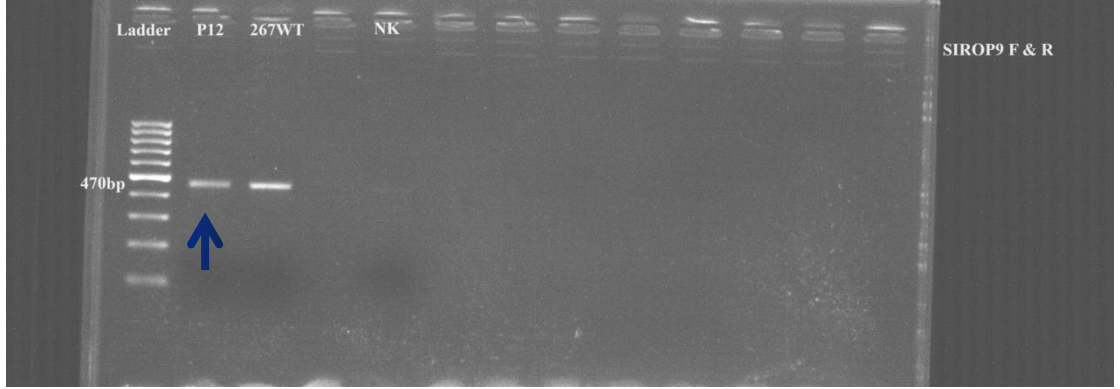
470bp'de tek bantlar gösterdi. Bu, bu bitkilerin agaroz jelde görünecek kadar büyük bir indel taşımadığı anlamına geliyordu. Bu örnekler PCR ile saflaştırıldı ve SIROP9 ileri ve geri primerleri ile sanger dizilimi için gönderildi. Şekillerdeki siyah oklar, homozigot mutasyon potansiyeli sergileyen T0 267 domatesi göstermektedir. Bununla birlikte, kalan iki bitki, bitki 10 (P4) ve bitki 27 (P11) 470bp'lik bir banda sahip olmanın yanı sıra yaklaşık 370bp'lik iki bant daha göstermiştir. Bu bitkiler için tekrarlanan deneyler hala aynı sonuçları vermiştir, yani bu PCR'dan kaynaklanan bir hata değildir. Çünkü bu iki bitkide kimerik bir mutasyon meydana geldiği varsayılmıştır. Normalde domates diploid bir bitki olduğundan her gen için iki alele sahiptir ve çift bandın varlığı heterozigot bi-alelik mutasyon - her alel için bir mutasyon veya heterozigot mono-alelik mutasyon - bir alel mutasyona uğramış ve diğeri yabancıl tip olarak kalmıştır. Bununla birlikte, bu bitkilerin üç bant vermesi, farklı ve bağımsız olarak düzenlenmiş çeşitli hücreler içermesi olasılığını artırmaktadır. Sonuç olarak, baz eşleşme sayısında açıkça büyük bir fark gösteren alt bantlar jel izole edildi ve mutasyon şansı veya olasılığı çok daha yüksek olduğu için dizileme için gönderildi. Şekillerdeki kırmızı oklar kimerik mutasyon gösteren 267 domatesini göstermektedir (Şekil 4.25.).



(a)



(b)



(c)

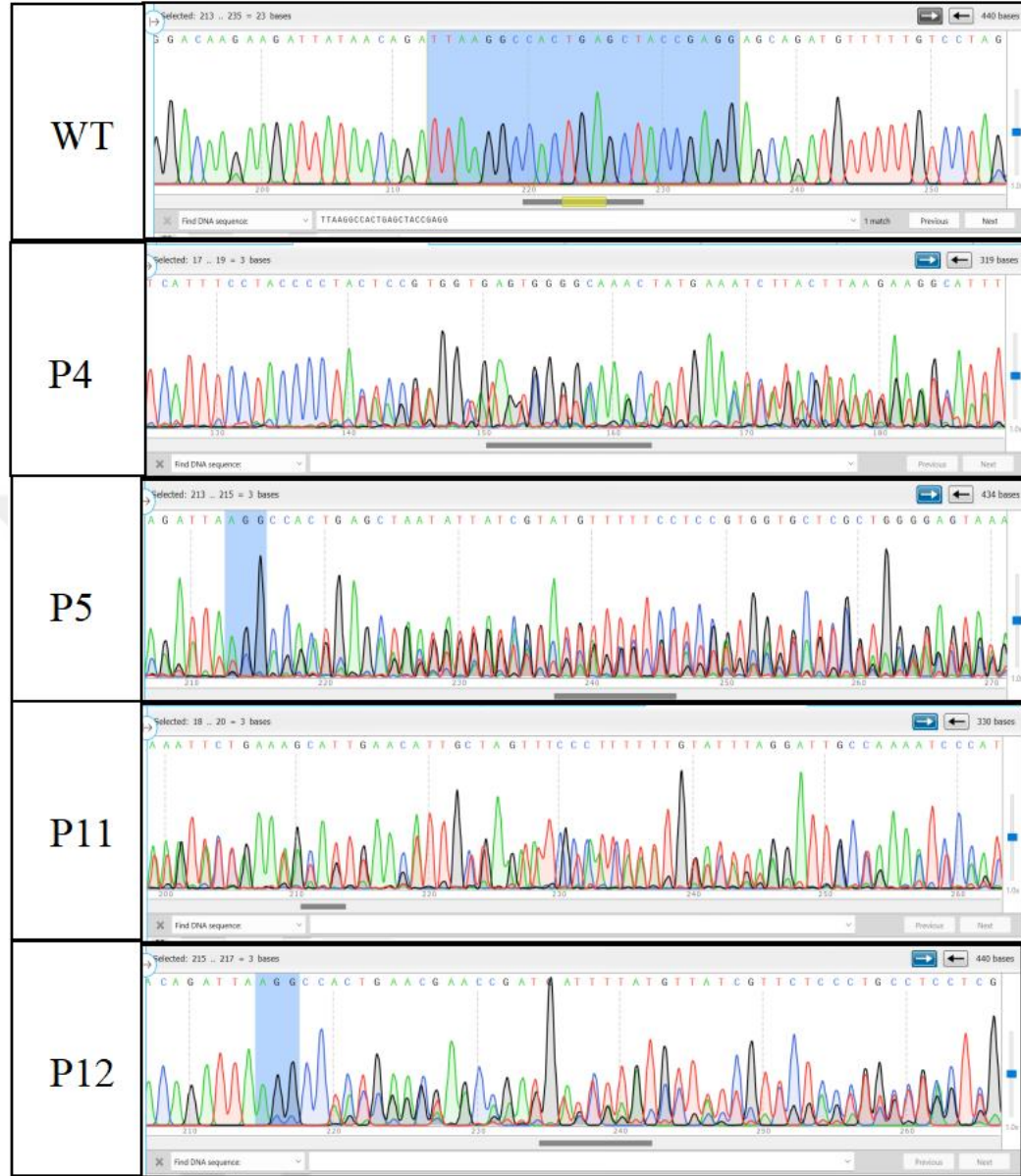
Şekil 4.25. SIROP9 primerleri ile genin amplifikasyonu **a)** Bitki 10 (P4) ve bitki 11 (P5); **b)** Bitki 27 (P11); **c)** Bitki 32 (P12)



Şekil 4.26. Transgenik hat olduğu belirlenen bitkiler

4.5. Mutant Hatların Belirlenmesi ve Analizi

Transgenik bitkiler sanger dizileme için gönderildikten sonra, kromatografi sonuçları gönderilen dört bitkide olası mutasyonlar olduğunu göstermiştir. Bu durum, kromatogramlarda özellikle bitki 17 (P5) ve bitki 32'de (P12) PAM dizisi (AGG) etrafında görülen üst üste binen piklerdeki bozulmalar ve bitki 10 (P4) ve bitki 27'de (P11) PAM dizisinin tamamen yokluğu nedeniyle belirtilmiştir. Ayrıca bu bitkilerde SIROP9 gRNA dizisinin kısmen ve tamamen yokluğu söz konusuydu. Ancak 267 yabancı tip kromatografisi hem gRNA dizisinin hem de PAM'ın varlığıyla bozulmamış pikler göstermiştir (Şekil 4.27.).

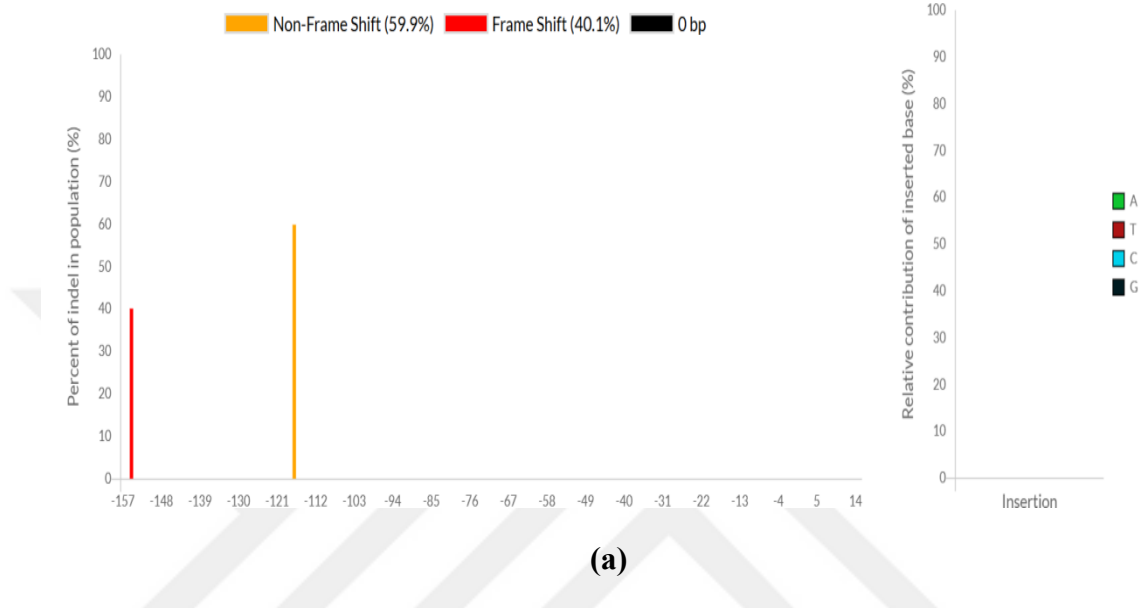


Şekil 4.27. Sanger dizilemesinden sonra elde edilen kromatogramlar

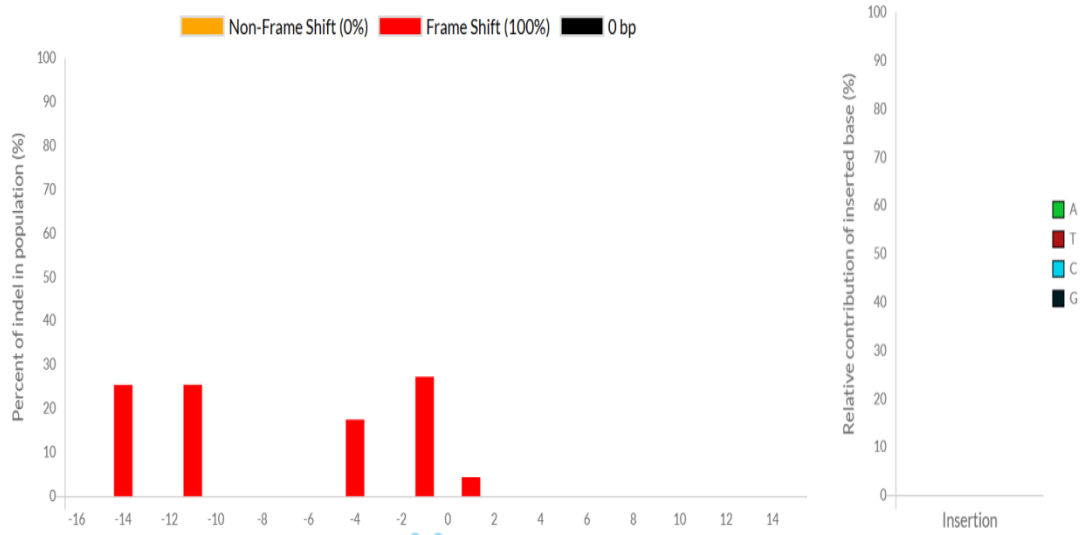
Sanger dizileme sonuçlarındaki bu ayrıntıları gözlemlerken, bitkilerde hangi olası indel düzenleme veya mutasyonun gerçekleşmiş olabileceğini belirlemek için önerilen bu mutantların dizilerini analiz etmek için Decodr (<https://decodr.org/>) adlı bir CRISPR/Cas9 gen düzenleme analiz aracı kullanılmış ve bu sonuçları doğrulamak için Synthego Ice (<https://ice.editco.bio/#/>) kullanılmıştır. Önerilen veya beklenen düzenleme sıklığının, tüm bitkiler için sanger sonuçlarına dayanarak meydana gelen gözlemlenen düzenlemeyle ne kadar iyi eşleştiğini belirleyen uyum modeli (R2) gözlemlenmiştir. Bitki 10 (P4), bitki 17 (P5) ve bitki 32 (P12) için %94, %91 ve %91 gibi yüksek bir oranın mevcut olduğu, bitki 27'nin (P11) ise %78 gibi orta bir değere sahip olduğu görülmüştür. P5 ve P11'de tespit edilen tüm önerilen mutasyonlar (indeller) çerçeve kaymalarına (%100) neden olurken, P12'de önerilen indellerin %90,2'si çerçeve kaymasına neden

olmuştur. Bununla birlikte, P4 önerilen mutasyonunun çoğunluğunun (59,9) okuma çerçevelerinde kaymaya yol açmadığını ve azınlığının (%40,1) kaymaya neden olduğunu göstermiştir. Okuma çerçevesinde kayma gösteren bitkilerin geni nakavt etme ve gen işlevini bozma olasılığı daha yüksektir (Şekil 4.28a, b, c, d).

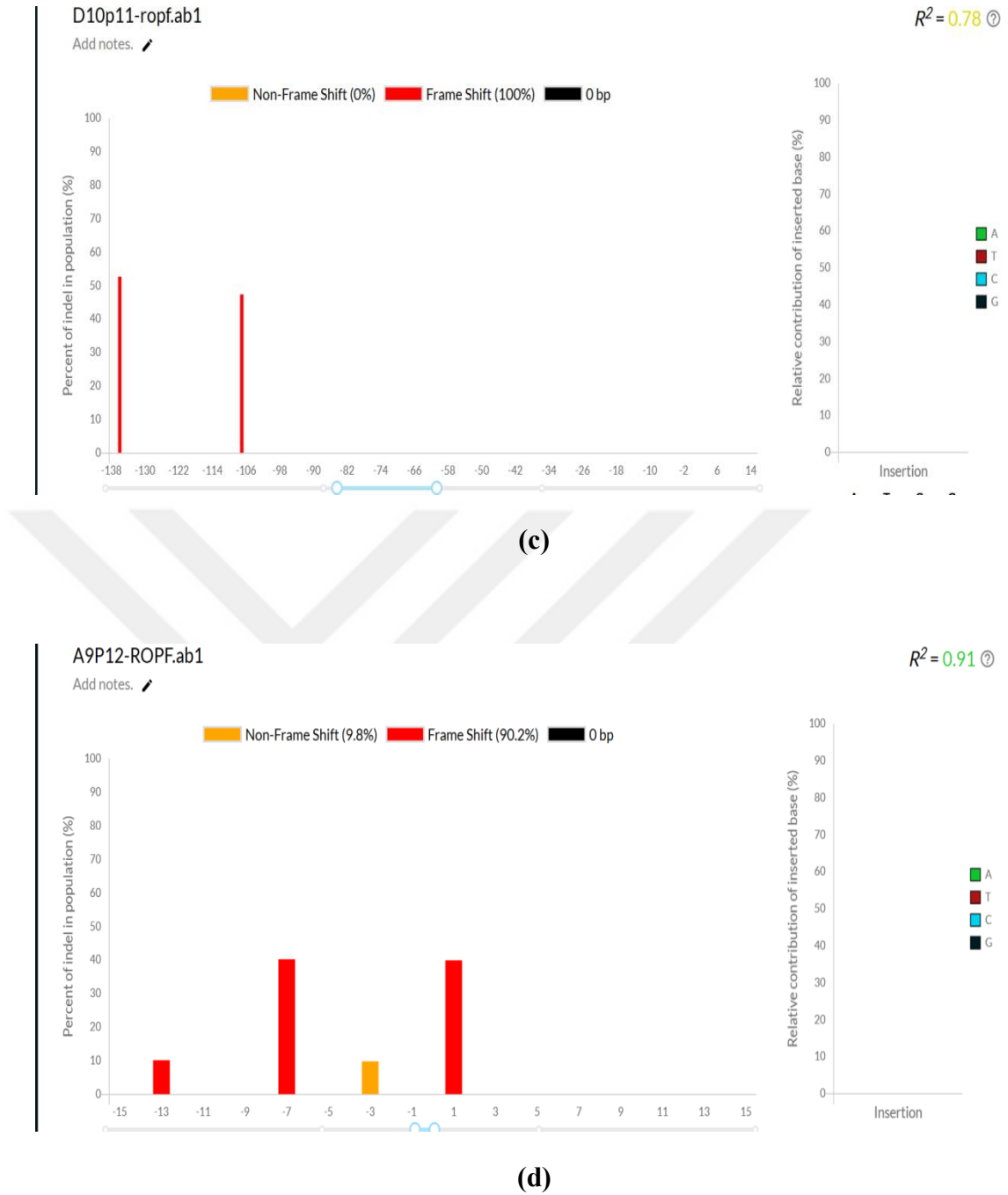
E9P4-ROP_F.ab1

 $R^2 = 0.94$?Add notes. 

F9P5-ROP_F.ab1

 $R^2 = 0.91$?Add notes. 

(b)

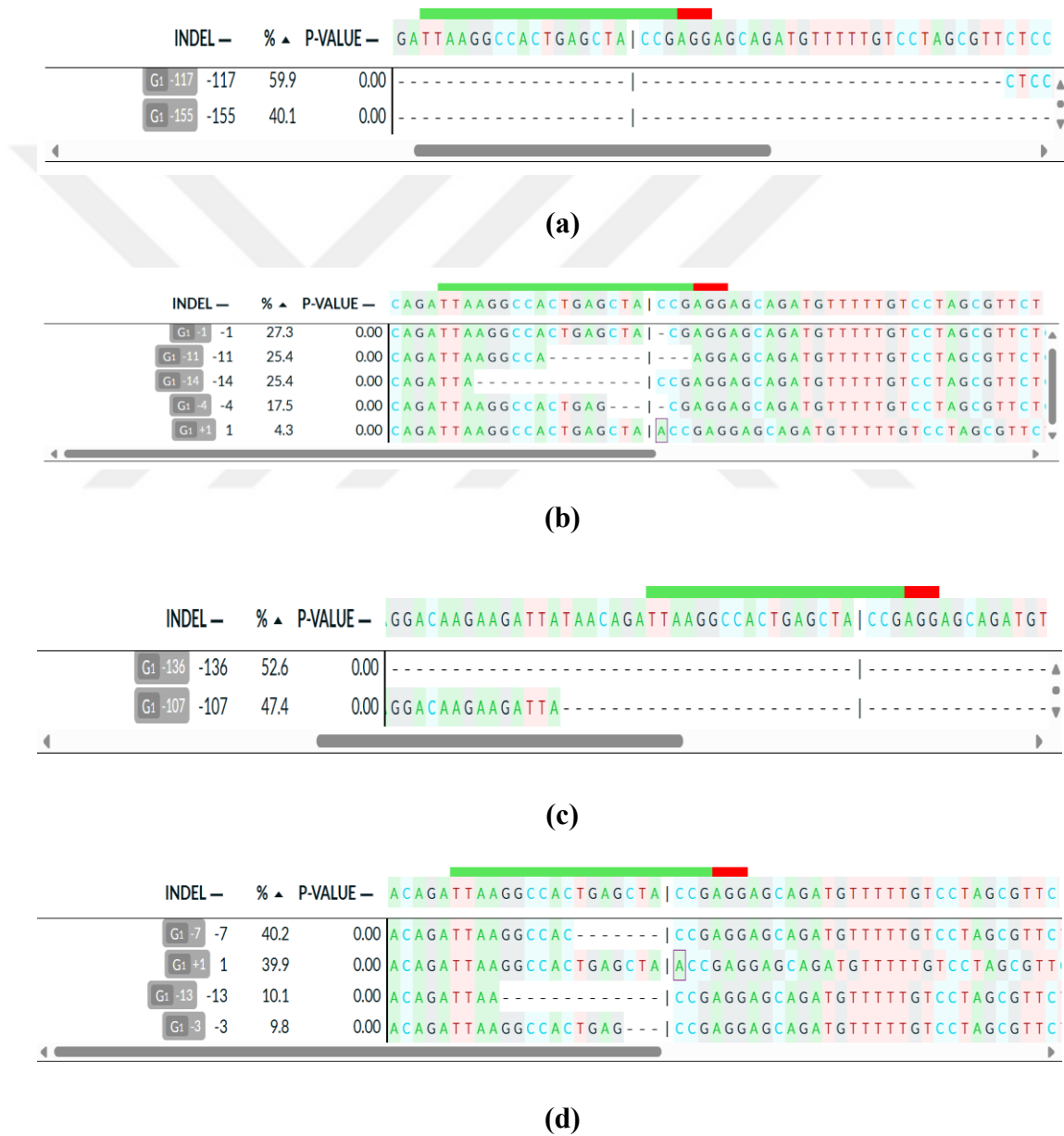


Şekil 4.28. Çerçeve kayması mutasyon sıklığının ve uyum modelinin (R^2) temsili grafiği
a) Bitki 10 (P4); **b)** Bitki 17 (P5); **c)** Bitki 27 (P11); **d)** Bitki 32 (P12)

Diğer tüm olasılıklara bakılmaksızın, P4 için en bol olası mutasyonun (%59,9) 117 nükleotidlik büyük bir delesyon olduğu görülmüştür. Ancak, bu mutasyonun okuma çerçevesinde hiçbir değişikliğe neden olmayacak bir mutasyon olduğu görülmüştür. Ancak aynı bitki için, mutasyon frekansı % 40,1 olan bir çerçeve kayması mutasyonuna neden olan 155 nükleotidlik bir delesyon önerilmiştir. P5 için, 1 baz çifti nükleotid çerçeve kayması delesyonu için %27'lik bir şans gösterirken, P11'inki okuma çerçevesinde bir kaymaya neden olan 136 nükleotidlik devasa bir delesyon için % 52,6'lık bir frekans ve 107'lik bir delesyon için % 47,4'lük bir şans göstermiştir. Son olarak, P12

de okuma çerçevesine müdahale eden 7 baz çifti delesyonunun % 40,2 mutasyon sıklığına sahip olduğunu göstermiştir.

Şekil 4.29'da görülen hizalama, yabancı tip (üst referans) diziyi mutant alellerle karşılaştırmaktadır. İndeller, delesyonları (eksik nükleotidler) temsil eden yatay çizgilerle açıkça gösterilirken, eklenen bazlar (ekstra “A” gibi) vurgulanır. Ayrıca, yabancı tip dizinin üzerindeki kırmızı yatay çizgi PAM dizisini (AGG) gösterirken, yeşil domates bitkileri için gRNA dizisini (TTAAGGCCACTGAGCTACCG) göstermektedir. Siyah dikey çizgiler, Cas9 enziminin çift sarmal kırılmasına neden olması önerilen bölgeyi göstermektedir (Şekil 4.29a, b, c, d).



Şekil 4.29. Yabancı tip diziyeye karşı temsili indelleri gösteren dizilerin, karşılık gelen frekanslarla hizalanması **a)** Bitki 10 (P4); **b)** Bitki 17 (P5); **c)** Bitki 27 (P11); **d)** Bitki 32 (P12)

Mutant bitkilerde mutasyonların nasıl meydana gelmiş olabileceğine dair bir fikir vermek amacıyla her bir bitki için 267 yabancı tipe karşı Çoklu Dizi Hizalaması da yapılmıştır. Bu işlem Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) ve gen klonlama için kullanılan gRNA kullanılarak yapılmıştır. Bu hizalama, Decodr ve Synthego Ice ile yapılan mutasyon dizisi analizinden elde edilen sonuçları kanıtlamıştır. Burada sonuçlar P4, P5, P11 ve P12'den sırasıyla 117, 1, 107 ve 7 nükleotidin silindiğini göstermiştir. Mavi vurgulu görüntüler PAM dizisini göstermektedir. Sarı vurgular silinen bölgeleri gösterirken yeşil gRNA dizisini göstermektedir (Şekil 4.30a, b, c, d)..

WT	GGGGGGGCCAGTAAATTTAGGTCTTTGGGATACTGCAGGTAACATATTTTAATTACAG	60
P4	--NNNGGNACNNNAATTTAGGTCTTTGGGATACTGCAGGTAACATATTTTAATTACAG	58

WT	CTGATTTGTTACAAGATGATTTCTTATTTTGCCTCCTCAAAGTCAAGCAGTTAAATCCTG	120
P4	CTGATTTGTTACAAGATGATTTCTTATTTTGCCTCCTCAAAGTCAAGCAGTTAAATCCTG	118

WT	TAATAATCATTTCTACCCCTATAAGGAGGCATAGGAATTCTGATTTAAATGTCCTGTGA	180
P4	TAATAATCATTTCTACCCCTACTCCGTGGTGAG-----	152

WT	TCATTTTATAGGACAAGAAGATTATAACAGATTAAAGGCCACTGAGCTACCGAGGAGCAG	240
P4	-----	152

WT	ATGTTTTTGTCTAGCGTTCTCCTTGGTGAGTCGTGCAAGCTATGAAAACATACTTAAGA	300
P4	-----TGGGGCAAACATGAAATCTTACTTAAGA	181

WT	AGGTATTTCTGTTGAAAACAGTGAACCTTTGTGAGTTTGTATCAAATGTATTTAAGATTGC	360
P4	AGGCATTTGTGTTGAAAATTGCGAACTTCCCATTTTGGATCAAGTGATTTAAATTTGC	241

WT	TAAAATCCCATTTTGGTCAGTGGATTCCCGAACTTCAGCATTATGCTCCTGGAATTCGG	420
P4	TAATATCCCTTTTGTGGTCCCGGGATTCCCAAATTCACAATTATGCTCCTGGAATTCGG	301

WT	GTGGTATTAGCTGGCACAAC	440
P4	GTGGTATTAGCTGGCACA--	319

(a)

WT	GGGGGGGCCAGTAAATTTAGGTCTTTGGGATACTGCAGGTAACATATTTTAATTACAG	60
P5	---NNNGCANNNTAATTTAGGTCTTTGGGATACTGCAGGTAACATATTTTAATTACCG	57

WT	CTGATTTGTTACAAGATGATTTCTTATTTTGCCTCCTCAAAGTCAAGCAGTTAAATCCTG	120
P5	CTGATTTGTTACAAGATGATTTCTTATTTTGCCTCCTCAAAGTCAAGCAGTTAAATCCTG	117

WT	TAATAATCATTTCTACCCCTATAAGGAGGCATAGGAATTCTGATTTAAATGTCCTGTGA	180
P5	GAATAATCATTTCTACCCCTATAAGGAGGCATAGGAATTCTGATTTAAATGGCCTGGGA	177

WT	TCATTTTATAGGACAAGAAGATTATAACAGATTAAAGGCCACTGAGCTACCGAGGAGCAG	240
P5	TCATTTTATAGGACAAGAAGATTATAACAGATTAAAGGCCACTGAGCTAATATTATCGTA	237

WT	ATGTTTTTGTCTAGCGTTCTCCTTGGTGAGTCGTGCAAGCTATGAAAACATACTTAAGA	300
P5	TGTTTTTCC--TCCGTGGTGCTCGCTGGGGAGTAAACAAACTAAAAAAGAATTTTATAGGA	296

WT	AGGTATTTCTGTTGAAAACAGTGAACCTTTGTGAGTTTGTATCAAATGTATTTAAGATTGC	360
P5	GAGGACTGCGGAGAACATTGGGGTGTTTTATGAGTTTAAATAAGAAGTAATAAACACTGT	356

WT	TAAAATCCCATTTTGGTCAGTGGATTCCCGAACTTCAGCATTATGCTCCTGGAATTCGG	420
P5	TTTCTCCTCGTTGTTCCCCCGAGCATCACCATGCTCCTGCAGGATCCTCGGGGTAATCTG	416

WT	GTGGTATTAGCTGGCACAAC	440
P5	GTGGAACAAGCTGCAACA--	434

(b)

WT	GGGGGGGCCAGTAAATTTAGGTCCTTTGGGATACTGCAGGTAAAACATATTTTAATTACAG	60
P11	-GNGNNNGTANNNAATTTAGGTCCTTTGGGATACTGCAGGTAAAACATATTTTAATTACAG	59
WT	CTGATTTGTTACAAGATGATTTCTTATTTTGCCTCCTCAAAGTCAAGCAGTTAAATCCTG	120
P11	CTGATTTGTTACAAGATGATTTCTTATTTTGCCTCCTCAAAGTCAAGCAGTTAAATCCTG	119
WT	TAATAATCATTTCCTACCCCTATAAGGAGGCATAGGAATTCTGATTTAAATGTCCTGTGA	180
P11	TAATAATCATTTCCTACCCCTATAAGGAGGCATAGGAATTCTGATTTAAATGTCCTGTGA	179
WT	TCATTTTATAGGACAAGAAGATTATAACAGATTAAAGGCCACTGAGCTACCGAGGAGCAG	240
P11	TAATCTTCTTGTCTTAAAAAAATTTCTGAAAGCATTGAACATTGCTAGTTT-----	229
WT	ATGTTTTTGTCTAGCGTTCTCCTTGGTGAGTCGTGCAAGCTATGAAAACATACTTAAGA	300
P11	-----	229
WT	AGGTATTTCTGTTGAAAACAGTGAACCTTTGTGAGTTTGTATCAAATGTATTTAAGATTGC	360
P11	-----CCCTTTTTTGTATTTAGGATTGC	252
WT	TAAAATCCCATTTTTGGTCAGTGGATTCCCGAACTTCAGCATTATGCTCCTGGAATTCCG	420
P11	CAAAATCCCATTTTTGGCCCCCTGGATTCCCGAAGTTATTAATTATGCCACTGGAATTCCG	312
WT	GTGGTATTAGCTGGCACAAC	440
P11	GTGGTATTAGCTGGCACA--	330

(c)

WT	GGGGGGGCCAGTAAATTTAGGTCCTTTGGGATACTGCAGGTAAAACATATTTTAATTACAG	60
P12	-GGGTGGNCAAGTAAATTTAGGTCCTTTGGGGTACTGCAGGTAAAACATATTTTAATTACAG	59
WT	CTGATTTGTTACAAGATGATTTCTTATTTTGCCTCCTCAAAGTCAAGCAGTTAAATCCTG	120
P12	CTGATTTGTTACAAGATGATTTCTTATTTTGCCTCCTCAAAGTCAAGCAGTTAAATCCTG	119
WT	TAATAATCATTTCCTACCCCTATAAGGAGGCATAGGAATTCTGATTTAAATGTCCTGTGA	180
P12	TAATAATCATTTCCTACCCCTATAAGGAGGCATAGGAATTCTGATTTAAATGTCCTGTGA	179
WT	TCATTTTATAGGACAAGAAGATTATAACAGATTAAAGGCCACTGAGCTACCGAGGAGCAG	240
P12	TCATTTTATAGGACAAGAAGATTATAACAGATTAAAGGCCACTGAACGAACCGA-----	233
WT	ATGTTTTTGTCTAGCGTTCTCCTTGGTGAGTCGTGCAAGCTATGAAAACATACTTAAGA	300
P12	-TGATTTTATGTTATCGTTCTCCCTGCCTCCTCGGGCAGGCTAGCAAAATATAAATACAA	292
WT	AGGTATTTCTGTTGAAAACAGTGAACCTTTGTGAGTTTGTATCAAATGTATTTAAGATTGC	360
P12	ACGTATTAATGTATTTTCAAGTGAACCTTTGTGAGTTTGTGTGATTGGAATTATGAATGT	352
WT	TAAAATCCCATTTTTGGTCAGTGGATTCCCGAACTTCAGCATTATGCTCCTGGAATTCCG	420
P12	TAGATTGCTATTTTGGTTTTTGGGTCCCCGAACCTCCGAATTATGCTCTTGGGATCCTG	412
WT	GTGGTATTAGCTGGCACAAC-----	440
P12	GAGGTAGGAAGTGATTAACAGTACACAAG	440

(d)

Şekil 4.30. Mutant bitkilerin 267 yabancı tip domates ile Çoklu Dizi Hizalaması **a)** Bitki 10 (P4); **b)** Bitki 17 (P5); **c)** Bitki 27 (P11); **d)** Bitki 32 (P12)

Bu bitkiler halen yetiştirme odasında ve serada yetiştirilmektedir. P11 ve P12 hala çiçek açacak ve sonunda meyve verecek kadar büyük değilken, P4 ve P5 büyük ölçüde büyümüş, çiçek üretmiş ve meyve verme aşamasındadır. Ancak, her bir bitki başına düşen meyve sayısı oldukça azalmıştır. Bitki 10 (P4) yaklaşık dört ay boyunca toprak ortamında kaldıktan sonra şimdiye kadar sadece 5 meyve üretmiş, bunlardan ikisi T1 bitkilerine erken ulaşmak için embriyo kültürü için kullanılmıştır. Bitki 17 de P4 ile yaklaşık aynı sürede 7 meyve üretmiş ve yine ikisi embriyo kültürü için kullanılmıştır (Şekil 4.31a, b).



(a)



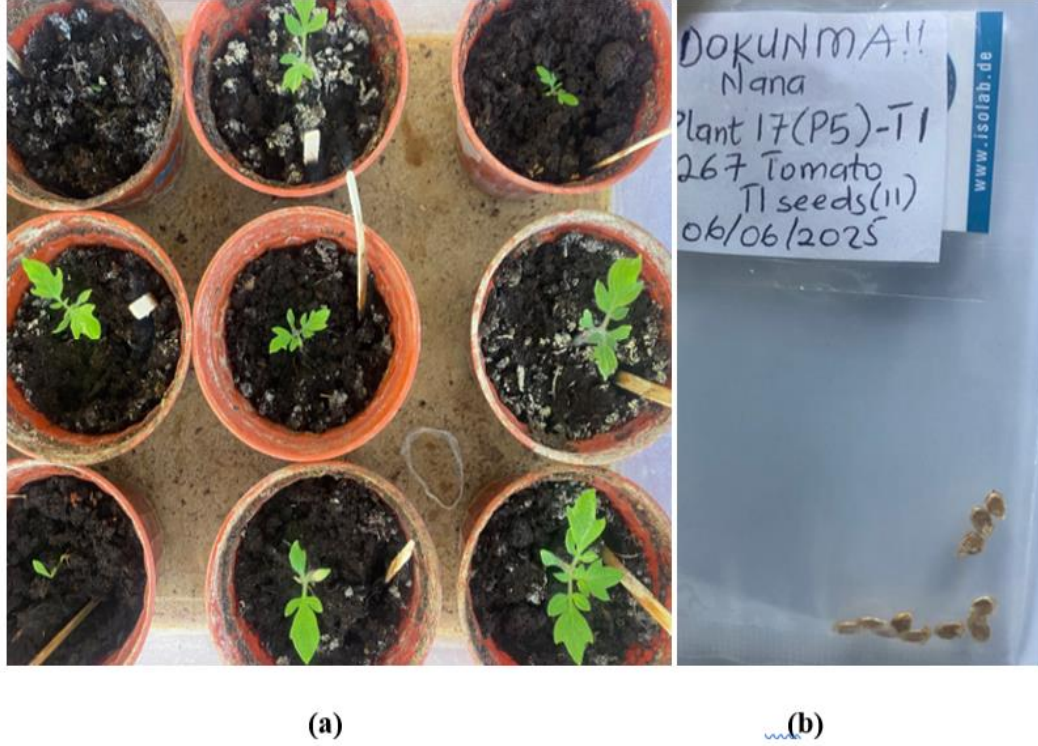
(b)

Şekil 4.31. Tam olgunlaşmış bitkilerin resmi **a)** Bitki 10 (P4); **b)** Bitki 17 (P5)

4.6. Mutant Hatların Bir Sonraki Nesle Devamı

P4 ve P5 olarak adlandırılan iki CRISPR/Cas9 ile düzenlenmiş mutant domates bitkisinin başarılı bir şekilde meyve vermesi sonrasında, olgunlaşmamış embriyo kültürü ve olgun tohum ekstraksiyonu olmak üzere iki yaklaşımla T₁ neslini kazanmak için çaba sarf edildi. P5'in iki olgunlaşmamış meyvesinden toplam 31 embriyo çıkarılırken, P4'ün iki olgunlaşmamış meyvesinden 27 embriyo elde edildi. Bu embriyolar, steril koşullar altında hormonsuz çimlenme ortamında kültürlendi. İlk karanlık inkübasyonun ardından ışığa maruz bırakıldıktan sonra, P5'ten 9 embriyo ve P4'ten 3 embriyo başarıyla çimlendi ve daha sonra toprakla doldurulmuş saksılarda iklimlendirildi. Hayatta kalan bu 12 fide, ilgili mutant hatlardan T₁ fideleri olarak etiketlendi ve daha ileri fenotipik değerlendirme

için gözlem altında tutulmaya devam edildi. Embriyo kültürüne ek olarak, P5'ten bir adet tam olgunlaşmış meyve olgun tohum ekstraksiyonu için kullanıldı. Toplam 11 tohum elde edildi, 28 °C'de bir gece boyunca kurutuldu ve saklandı. Bu tohumlar henüz çimlenmemiştir ve gelecekteki çoğaltma ve genotipik analiz için yedek materyal olarak saklanmaktadır.



Şekil 4.32. SIROP9 mutantlarının yeni neslinin oluşturulması **a)** embriyo kültüründen P4 ve P4'ün T1 bitkileri; **b)** P5'in T1 tohumları

5. TARTIŞMA

Bölüm 4'teki tüm sonuçlardan, diğer araştırmacılar tarafından elde edilen diğer çalışmalar ve sonuçlarla karşılaştırma yapılmıştır. SIROP9 geni üzerinde çalışan ancak farklı çeşitler ve gRNA dizileri kullanan Puli vd. (2024) tarafından yapılan çalışmaya bakıldığında, çalışmalarında temsil edilen kodlama dizisi, bu çalışma için kullanılan Sol Genomics ve NCBI'dan elde edilen diziden belirli bir nükleotid farklılık göstermektedir. Ancak, amino asit dizisi karşılaştırıldığında aynı olduğu görülmüştür.

Ayrıca, domateste sekiz başka homologu olan ROP geni ile, bu gende korunmuş bir fonksiyonel bölgede hedef dışı etkiye sahip olacak ve diğer ROP homolog genlerinin rollerini de etkileyebilecek bir gRNA dizisi tasarlamayı önlemek için, homologlar arasında korunmamış bölgeleri bulmak için çoklu dizi hizalaması yapılması gerekiyordu. CRISPR/Cas9 düzenleme yöntemini kullanarak soya fasulyesi genleri üzerinde başarılı çalışmalar yapan Jacobs vd. (2017) tarafından yapılan çalışmalar. Çalışmalarında, gen aileleri arasındaki dizilerin yüksek benzerliğinin, hedef dışı düzenleme riskine neden olabileceğinden, mutasyon indüklemeye zararlı olabileceğini vurgulamışlardır. Homolog genleri in silico araçları kullanarak hizalayarak, düşük hedef dışı potansiyele sahip olabilecek hedef bölgeler hakkında sonuçlara varmışlardır. Böylece, korunmuş alanlardan kaçınıldığı sürece, hedef dışı lokuslarda istenmeyen düzenleme izleri olmadan verimli mutasyonun mümkün olduğunu doğrulayan sonuçlar elde etmişlerdir. Bu, Manghwar vd. (2020) tarafından yapılan bir inceleme çalışmasında da doğrulandı. Bu çalışma, mevcut çok sayıda genom düzenleme aracını inceleyerek gRNA dizisinde özgüllüğün önemine dikkat çekti. İnceleme, tüm genom homoloji karşılaştırmalarına dayalı olarak tasarlanan bir gRNA'nın, özellikle büyük gen ailelerinde hedef dışı riskini en aza indirdiğini kanıtladı.

gRNA'lar genellikle, çerçeve kayması mutasyonunun bir sonucu olarak erken durdurma kodonlarına neden olabilecek tam bir nakavt indüklemeye olasılığını artırmak için CRISPR düzenlemesi sırasında ilk ekzonu hedef alacak şekilde tasarlanmaktadır (Li vd. 2013). Böylelikle, indellerin protein çevirisini erken aşamada bozması sonucunda genin işlevi verimli bir şekilde değiştirilebilir. Ancak, gRNA'nın dördüncü eksonda tasarlandığı bu çalışmada olduğu gibi, diğer bazı çalışmalarda da çeşitli nedenlerle sonraki ekzonlarda gRNA tasarımı aynı şekilde kullanılmıştır. Brooks vd. (2014), alternatif splicing olaylarını önlemek ve genin düzenleyici çevrilmemiş bölgelerini korumak için aşağı akış eksonlarını tercih etmişlerdir. Aşağı akış eksonları, genin SIROP9 geninin domatesteki diğer homologları gibi korunmuş bir katalitik alana sahip olması durumunda, çok daha iyi fenotipik özgüllüğe sahip işlevsel bir nakavt olasılığını artırmak için de hedeflenebilir (Zhou vd. 2014). Bununla birlikte, ekson dörtü hedefleyen bir gRNA tasarlanmasının ana nedeni, bu gRNA'nın patlıcan ve patates gibi diğer Solanaceae familyasındaki ROP9'a eşit derecede bağlanabilmesiydi.

Bu deneyde, DH5α E. coli suşu, plazmidlerin çoğaltılması için en çok kullanılan suştur. Ancak, bu suş kullanılarak gen klonlama işlemi sırasında her ısı şoku aşamasından sonra ortaya çıkan koloni sayısının, Şekil 4.14a ve 4.19'da görüldüğü gibi azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum muhtemelen DH5α suşunun, 13.330 bp ağırlığa sahip pco-Cas9 plazmid gibi büyük ağırlığa sahip plazmidlerin çoğaltılması için uygun bir suş olmaması nedeniyle meydana gelmiştir. Sambrook ve Russell (2001) göre, DH5α, büyük plazmidler ve karmaşık yapılarla çalışırken bazen transformasyona zarar verebilen

rekombinasyon aktivitesinden (recA1) yoksundur, bu da klonlamada verimlilikte düşüşe neden olur. Hanahan (1983) da çalışmasında, gen klonlaması için kullanılan plazmidin boyutunun transformasyon verimliliğiyle ters orantılı olduğunu göstermiştir. Yani, bir plazmidin ağırlığı 10 kb'den fazla olduğu sürece, verimlilikte yaklaşık 10 ila 100 kat azalma olur. Araştırmacılardan alınan bu bilgiler, bu çalışmada, iki farklı durumda ısı şokundan sonra plakalarda sadece iki tane oluşmasına rağmen, olumlu sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır.

Pco-Cas9 plazmidi, domates gibi dikotiledonlar için özel olarak tasarlanmış optimize edilmiş bileşenlerden oluştuğu için, gen düzenleme konusunda şu anda en çok tercih edilen ikili vektör haline gelmiştir. Örneğin, Cas9 adlı endonükleaz enzimini verimli bir şekilde ifade edecek şekilde tasarlanmıştır (Ordon vd. 2020). Bunun yanı sıra, *Agrobacterium tumefaciens* aracılı sistem kullanılarak bitki transformasyonu ile büyük ölçüde uyumlu olduğu gösterilmiştir ve transformasyon verimliliğini artırdığı söylenen yaklaşık 10-13 kb'lik nispeten kompakt bir boyuta sahiptir. Bu çalışma gibi, rejenerasyon sırasında transgenik dokuların seçim sürecinde titiz olduğu bilinen etkili bir bitki seçilebilir markırı (Basta direnci) içermektedir. Ordon vd. (2020), pCO-Cas9'u domateste birkaç geni düzenlemek için başarıyla kullanmış ve mutant hatların yüksek sıklıkta geri kazanıldığını bildirmiş, bunu hem Cas9 aktivitesinin verimliliğine hem de vektörün düzenleyici unsurları altında seçimin kolaylığına bağlamıştır. Ancak Klein vd. (2022) göre, pCO-Cas9'un kullanımı bitkinin meristematik bölgelerinde geç düzenleme olaylarını önlediği ve daha çok tek tip gen düzenlemesini teşvik ettiği söylenmiştir. Böylece, kimerik mutasyon olaylarının oluşumuna karşın, stabil hat gelişimi oluşturmada daha kolay olan biallelik veya homozigot mutasyonlar gibi mutasyonların oluşma potansiyeli ortaya çıkmıştır. Onların vardıkları sonucun aksine, bu çalışmada pco-Cas9 plazmidinin kullanılmasına rağmen, dört mutant bitkiden ikisinde %50 oranında kimerik olaylar oluşmuştur (Şekil 4.25a, b).

Kullanılan domates genotipi ile ilgili olarak, çoğu rejenerasyon çalışmasında kullanılan daha ideal domates çeşidi (Micro-Tom) aksine, bu deneyde kullanılan domates (267 genotipi) çok düşük bir rejenerasyon oranı göstermiştir. Bu durum, muhtemelen bu genotipin genetik yapısının transformasyon çalışmaları için oldukça uygun olmaması sonucudur. Micro-Tom çeşidi üzerine yapılan çalışmalar, bu çeşidin, Guo vd. (2012) tarafından optimize edilmiş genetik çalışmalar altında ortalama olarak sırasıyla %9,1 ve %3,9 gibi oldukça yüksek bir rejenerasyon ve transformasyon oranı bildirdiği çalışmalarda görüldüğü gibi, verimli bir rejenerasyon oranını teşvik etme yeteneğine sahip genetik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. 267 genotipindeki düşük rejenerasyon sıklığı, Bülbül (2021) tarafından yapılan çalışmada da doğrulanmıştır. Çalışmasında, daha kısa bir yaşam döngüsü ve daha hızlı bir rejenerasyon oranı sergileyen Micro-Tom çeşidine kıyasla, 267 genotiplerinin hem daha düşük bir transformasyon hem de rejenerasyon sıklığına sahip olduğu vurgulanmıştır.

Bu deneyde, *Agrobacterium* tarafından başarılı bir şekilde transforme edilen eksplantların seçimi için glufosinat herbisit (basta) kullanılmıştır. Ancak, 267 genotipi basta herbisitine çok hassas bir tepki göstermiştir. Yapraklar sararmaya ve yavaş yavaş ölmeye başladığında, basta konsantrasyonunun bu özel genotip için biraz fazla sert olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, konsantrasyon 2 mg/l'den 1 mg/l'ye düşürülmüştür. Bu değişiklikten sonra, bitkilerin yeniden canlandığı görülmüştür. Domates bitkilerinin bu antibiyotiğe duyarlılığı birçok çalışma ile doğrulanmıştır.

Örneğin, Frary ve Earle (1996), 0,5 mg/ml'den başlayan basta konsantrasyonlarının etkilerini değerlendirirken, daha yüksek konsantrasyonlara maruz kalan bitkilerin rejenerasyon oranında bir düşüş olduğunu fark etmişlerdir. Böylece, yüksek basta konsantrasyonlarının aşırı seleksiyon baskısı yoluyla bitki gelişimini etkilediği gerçeği vurgulanmıştır. Benzer şekilde, Zhang vd. (2020a), transformasyon verimliliğine zararlı olduğu için rejenerasyon sırasında yüksek basta konsantrasyonlarından kaçınılması gerektiği konusunda uyarıda bulunmuştur. Aynı şekilde, Sun vd. (2006) da 1 mg/l basta'nın birçok kallusun ölümüne neden olduğunu bildirmiştir. Bülbül (2021) tarafından yapılan çalışmada, bitkileri korumak ve hayatta tutmak için 267 domates genotipinde basta seçimi nispeten düşük konsantrasyonlarda tutulmuştur. Ancak bu deneyde, bitkilerin hayatta kalmasını sağlamasına rağmen, basta konsantrasyonunun 1 mg/l'de tutulması, tranforme olmamalarına rağmen Basta seleksiyon ortamında hayatta kalmaya devam eden birkaç yanlış pozitif bitkinin ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Bitkiler tranforme olduktan sonra SIROP9 geninin amplifikasyonu sırasında, bitkilerin ikisi üç bant oluşturarak kimerik mutasyon gösterdi. Yani, bu bitkiler üç bant oluşturduğundan, farklı ve bağımsız olarak düzenlenmiş çeşitli hücreler içermeleri olasılığı yüksekti. Üç bantın kimerik mutasyon olduğu sonucuna varılması, Nekrasov vd. (2013) tarafından yapılan diğer çalışmalarda da kanıtlanmıştır. CRISPR ile düzenlenmiş domates bitkilerini tararken çoklu bantların varlığını da aynı şekilde doğruladılar ve mutasyonun, aynı bitkide hem düzenlenmiş hem de düzenlenmemiş hücrelerin var olduğu bir kimerik mutasyon olduğu sonucuna varmışlardır. Böyle bir fenomenin, tek hücre aşamasından sonra bile düzenleme mekanizmasının aktif kalması ve bu nedenle çeşitli hücre soylarında farklı allel modifikasyonlarına neden olması sonucu mümkün olduğunu açıklamışlardır. Ayrıca, Brooks vd. (2014) bu deneyde olduğu gibi, T₀ transgenik domates hatlarında PCR sonrası üç farklı bant tespit etmiş ve bunları vahşi tip, ekleme ve silme alelleri olarak yorumlamış ve sonuç olarak bu tür mutasyonun erken gelişim aşamalarında eksik düzenleme nedeniyle oluşan somatik mozaiklik (kimerizm) olduğu sonucuna varmışlardır.

Bu çalışmada, tüm bitkiler için Sanger sonuçlarına dayalı uyum modeli (R²) analiz edildi. Bitki 10 (P4), bitki 17 (P5) ve bitki 32 (P12) sırasıyla %94, %91 ve %91 R² değeri göstererek, önerilen veya beklenen düzenleme sıklığının gözlemlenen düzenlemeyle yüksek oranda eşleştiğini gösterdi. Bitki 27 (P11) ise %78 gibi orta düzeyde bir değer gösterdi. R² değerinin 1,0'a yakın olması, modelin mükemmel bir uyum gösterdiğini göstermektedir. Synthego ICE tarafından hazırlanan analiz kılavuzuna göre, R² değeri için önerilen eşik $\geq 0,8$ olmalıdır. Bu, tahmin edilen ve gerçek düzenleme sonuçları arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu eşik altında görülen herhangi bir değer, kimerizm gibi beklenmedik mutasyon modellerinin olabileceğini göstermektedir (Synthego Help Center 2023). Bu, bitki 27'de (P11) görüldü; bu bitki, muhtemelen bitkide meydana gelen kimerik mutasyon nedeniyle düşük bir R² değeri gösterdi.

Benzer şekilde, indel mutasyon sıklığının çoğunun %27 gibi düşük bir değer olduğunu gösteren P5 dışında, geri kalan bitkilerde P4, P11 ve P12 için sırasıyla %59,9, %52,6 ve %47,4 gibi yüksek indel mutasyon sıklığı görülmüştür. %30 ve üzeri indel frekanslarının, bitkide önemli düzeyde mutasyon olduğu anlamına geldiği için, genom düzenlemesinin başarılı olma olasılığının yüksek olduğunu gösterdiği söylenmektedir (Brinkman vd. 2014). %30 indel sıklığı, düzenlemede yüksek bir başarı olasılığı

gösterirken, %15–29 aralığı ortalama bir mutasyon olasılığı olarak görülürken, %15'in altındaki indel, düzenleme olasılığının minimum veya hiç olmadığı anlamına gelir (Conant vd. 2022). Diğer araştırmalardan elde edilen tüm bu kanıtlara dayanarak, P4, P11 ve P12'nin, orta düzeyde bir mutasyon olasılığına sahip olan P5'e kıyasla daha yüksek bir mutasyon olasılığına sahip olduğu görülmektedir.

Mutant bitkilerde gözlemlenen verimlilik düzeyine bakıldığında, iyi gelişmiş mutant bitkilerin meyve verme potansiyeli düşük görünmektedir. Toprak ortamına aktarıldıktan yaklaşık dört ay sonra, bitki 10 (P4) sadece beş meyve verirken, bitki 17 de yaklaşık aynı sürede yedi meyve vermiştir. Bu durum muhtemelen stoma boyutunun küçülmesine neden olan genin düzenlenmesinden kaynaklanıyor olabilir. Bu durum, stoma düzenlemesi ve terleme hızı ile ilgili başka bir geni de düzenleyen Pan vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada da görülmüştür. Bu çalışmada, *To* bitkilerinde meyve sayısında azalma gözlemlenmiştir. Ancak, *T₁* tohumları elde etmek için kendi kendine dölleme yapıldıktan sonra, *T₁*'den üretilen meyvelerde mutasyon korunmasına rağmen meyve sayısında önemli bir artış görülmüştür. Aynı şekilde, Zhang vd. (2023) stoma üzerinde doğrudan etkisi olan bir geni mutasyona uğratmak için çalışmışlardır. Sonuçlarında, *To* bitkilerinde meyve veriminde bir azalma gözlemlenmiştir.

Embriyo kültürü, bir sonraki neslin geri kazanımını hızlandırmak için güvenilir bir yöntem olduğu kanıtlanmış ve meyvenin tamamen olgunlaşmasını beklemeden canlı *T₁* bitkilerinin oluşturulmasına olanak sağlamıştır. Benzer sonuçlar, *Capsicum annuum* gibi diğer solanaceae familyası bitkilerinde de bildirilmiştir; bu bitkilerde, hormonsuz ortamda kültürlenmiş olgunlaşmamış embriyolar yüksek canlılık ve hızlı gelişim göstermiştir (Manzur vd. 2013). Domateslerde, embriyo kurtarma daha önce üreme engellerini aşmak ve özellikle genetiği değiştirilmiş hatlarda düşük tohum canlılığı ile ilgili zorlukları aşmak için uygulanmıştır (Pramanik 2021). P5 embriyolarında %29 ve P4 embriyolarında %11 olarak gözlemlenen hayatta kalma oranı, somaklonal etkiler, ekleme yeri farklılıkları veya epigenetik değişiklikler nedeniyle genellikle rejenerasyon değişkenliği yaşayan transgenik veya düzenlenmiş materyallerden beklenenlerle uyumludur (Sharma ve Srivastava 2013).

Önemli olarak, P5 ve P4 mutantlarının meyve ve tohum üretme yeteneği, üreme gelişiminin gen düzenleme olayından olumsuz etkilenmediğini göstermektedir. Bu çalışmada embriyo kültürü ve olgun tohumlar yoluyla çimlenen *T₁* fidelerinin geri kazanılması, mutasyon aktarımını doğrulamak ve fenotipik özellikleri değerlendirmek için ikili bir yaklaşım sunmaktadır. Özellikle embriyo kültürü, daha erken nesil analizini kolaylaştırır ve düşük meyve tutumu, kısırılık veya gecikmiş olgunlaşma tohum geri kazanımını engellediği durumlarda değerlidir. Gelecekteki çalışmalar, mutasyonun doğrulanması için *T₁* neslinin moleküler taramasını ve ardından SIROP9 bozulmasıyla ilişkili su kullanım verimliliği, kuraklık direnci ve stoma davranışını değerlendirmek için fizyolojik testleri içermelidir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, stoma düzenleme mekanizmaları ve dolayısıyla su kullanım verimliliği (WUE) ile ilgili özellikleri potansiyel olarak geliştirmek amacıyla domateste (*Solanum lycopersicum*) SIROP9 genini hedeflemek ve mutasyona uğratmak için CRISPR/Cas9 gen düzenleme teknolojisi başarıyla kullanılmıştır. SIROP9 geni, absisik asit (ABA) yolundan bağımsız olarak, özellikle reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin düzenlenmesi yoluyla, bekçi hücre sinyallemede yer alan Rho benzeri bir GTPaz olarak rolüne dayanarak seçilmiştir. Türkiye'nin önemli domates yetiştirme bölgelerinde artan kuraklık ve aşırı sıcak sıklığı ve su rezervlerinin giderek azalması göz önüne alındığında, genetik mühendisliği yoluyla WUE'nin iyileştirilmesi, daha sürdürülebilir mahsul üretimi için zamanında ve gerekli bir adımdır.

Biyoinformatik araçlar, SIROP9'un ekzon 4'ünü hedefleyen spesifik ve verimli bir kılavuz RNA (gRNA) için SIROP9 dizisinin özgülüğünü doğrulamak için kullanıldı ve in silico araçlar kullanılarak tasarlandı ve domates genomu içinde minimum hedef dışı risk ile yüksek hedef özgülüğüne sahip olduğu doğrulandı. Böylece, korunmuş alan girişimiyle ilgili kritik endişeler giderilmiştir. gRNA başarılı bir şekilde bağlanmış ve ikili vektör pCO-Cas9'a klonlanmış ve hem *Escherichia coli* hem de *Agrobacterium tumefaciens* suşu EHA105'e eklenmiştir. 267 domates genotipinin transformasyonu, iki çenekliler için yaygın olarak kullanılan bir yöntem olmasına rağmen, bu özel genotipin zayıf rejenerasyon kapasitesi ve glufosinat duyarlılığı nedeniyle önemli sınırlamalar sunan *Agrobacterium* aracılı bir yaklaşımla gerçekleştirilmiştir. Glufosinat (Basta) konsantrasyonunu optimize etme çabaları zor bir süreç olduğunu kanıtladı çünkü eksplant sağkalımını iyileştirirken, yanlış pozitiflerde artışa yol açtı ve transformasyon protokollerinde gerekli olan hassas dengeyi vurguladı.

Zorluklara rağmen, birden fazla varsayılan transgenik sürgün yeniden üretildi ve dört To bitkisinin hedef gende CRISPR kaynaklı mutasyonlar taşıdığı PCR taramasıyla moleküler olarak doğrulandı. Bu bitkiler, biallelic nakavtlar ve kimerik düzenlemeler de dahil olmak üzere çeşitli mutasyonlar sergilemiş, SIROP9'un işlevsel kaybına yol açması muhtemel çerçeve kaymasına neden olan eklemeler ve silmeler Sanger dizileme ve indel analiz araçları (DECODR ve Synthego ICE) kullanılarak doğrulanmıştır. İki düzenlenmiş hatta kimerizmin varlığı, pCO-Cas9 vektörü kullanılarak CRISPR ile düzenlenmiş bitkilerde, özellikle de yapısal promotörler ve dokuya özgü ifade modeli kullanan To hatlarında önceki raporlarla tutarlıdır.

İki mutant bitki (P4 ve P5) başarılı bir şekilde olgunluğa ulaşmış ve meyve üretmiştir, diğer ikisi ise hala olgunlaşma aşamasındadır. Bununla birlikte, dönüştürülmemiş kontrollere kıyasla meyve sayısı ve boyutunda gözle görülür bir azalma gözlenmiştir. Bu fenotip, stoma düzenleyicilerini içeren önceki çalışmalarda gözlemlenen bir olgu olan, değiştirilmiş stoma işleviyle ilişkili geçici bir verim maliyetini yansıtabilir (Pan vd. 2021; Zhang vd. 2023). Meyve tutumunda gözlenen azalma, gen nakavtının veya dönüşüm stresinin kendisinin getirdiği pleiotropik etkilerden veya stres duyarlılığından da kaynaklanabilir. Daha da önemlisi, literatür, To nesillerindeki bu tür verim cezalarının, bitki gelişimi stabilize oldukça ve arka plan genetik bağlamı uyum sağladıkça T₁ ve T₂ nesillerinde hafifletilebileceğini veya tersine çevrilebileceğini göstermektedir. Bu çalışma, olgunlaşmamış meyvelerden embriyo kültürü yoluyla hem T₁ bitkilerini (hala gelişmekte olan) hem de olgun meyvelerden T₁ tohumlarını başarıyla üretmiştir.

Genel olarak, bu çalışma SIROP9'un domateste kuraklığa tepki yollarını modüle etmeyi amaçlayan genom düzenleme için uygun bir hedef olduğunu doğrulamaktadır. Gen düzenlemesinin fizyolojik tarama ile entegrasyonu, fotosentetik aktiviteyi sürdürürken terlemeyi ve dolayısıyla WUE'yi azaltan domates hatlarının geliştirilmesi için umut vaat etmektedir. Sonuçlar aynı zamanda genotip seçimi, transformasyon protokolü optimizasyonu ve ürün ıslahında genom düzenlemeyi uygularken aşağı akış doğrulamasının önemini göstermektedir.

Deneylere ve elde edilen sonuçlara dayanarak önerilen tavsiyeler şunlardır:

- T1 ve T2 generasyonlarında homozigot mutant bitkilerde fizyolojik testlemeler

Gelecekteki araştırmalar, kalıtımsallığı, iyileştirilmiş WUE'yi ve T₀ bitkilerindeki düşük verimin devam edip etmediğini veya stabilize olup olmadığını doğrulamak için bu mutantların T₁ ve T₂ nesillerini değerlendirmelidir.

- Tarla koşullarında Doğrulama

Nihayetinde, SIROP9 gen düzenlemesinin gerçek dünyadaki tarımsal ortamlarda pratik faydasını belirlemek için kuraklık ve sulama rejimleri altında saha denemeleri yapılmalıdır.

- Fizyolojik ve Anatomik Karakterizasyon

SIROP9 nakavtının WUE üzerindeki işlevsel etkisini doğrulamak için ayrıntılı fizyolojik deneyler (örn. stoma iletkenliği, terleme hızı, yaprak sıcaklığı) ve stoma özelliklerinin mikroskopik incelemesi yapılmalıdır.

- Yüksek Rejenerasyonlu Çeşitlerle Karşılaştırma

Rejenerasyon verimliliğini artırmak ve seleksiyon baskısı komplikasyonlarını azaltmak için Micro-Tom ve M82 gibi daha uygun bir genotip kullanılarak transformasyon etkinliğinin anlaşılması.

- Seçim Protokollerinin İyileştirilmesi

Basta konsantrasyonunun optimizasyonu genotipe özgü olmalıdır ve çift işaretleyici sistemler (örneğin, GFP gibi görsel işaretleyiciler) erken rejenerasyon aşamalarında yanlış pozitiflerin daha etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasına yardımcı olabilir.

7. KAYNAKLAR

- Alordzinu, K. E., Jiuhao, L., Appiah, S. A., Aasmi, A. A. L., Blege, P. K., & Afful, E. A. 2021. Water stress affects the physio-morphological development of tomato growth. *African Journal of Agricultural Research*, 17(5), 733-742.
- Anonymous 1: *GeneJET™ plasmid miniprep kit user guide* (Publication No. MAN0012655). (n.d.). Thermo Fisher Scientific. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/manuals/genejet-plasmid-miniprep-manual-man0012655.pdf> [Son erişim tarihi: 09.06.2025].
- Anonymous 2: *GeneJET™ gel extraction kit user guide* (Publication No. MAN0012661). (n.d.). Thermo Fisher Scientific. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/manuals/genejet-gel-extraction-kit-manual-man0012661.pdf> [Son erişim tarihi: 09.06.2025].
- Anonymous 3: *GeneJET™ PCR purification kit user guide* (Publication No. MAN0012662). (n.d.). Thermo Fisher Scientific. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/manuals/genejet-pcr-purification-kit-manual-man0012662.pdf>
- Arslan-Alaton, I., Türkman, A., & Orhon, D. 2011. Future of Water Resources and Wastewater Reuse in Turkey (pp. 285–292). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1143-3_31
- Asmamaw, M., & Zawdie, B. 2021. Mechanism and applications of CRISPR/Cas-9-mediated genome editing. *Biologics: targets and therapy*, 353-361.
- Baba, A., & Tirol, N. 2023. Understanding the Challenges: Sustainable Usage of Groundwater Resources in Türkiye (pp. 109–129). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-43348-1_5
- Bashimov, G. 2016. Türkiye'nin domates ihracat performansı ve rekabet gücü. *Alınleri Dergisi*, 31, 1-8.
- Behind the Bench Staff. 2019. PCR primer design tips. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/> [Son erişim tarihi: 09.06.2017].
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., ... & Cañizares, J. 2015. Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC genomics*, 16, 1-19.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *nature*, 349(6305), 117-127.
- Bozbuga, R., Ates, S. Y., Guler, P. G., Yildiz, H. N., Kara, P. A., Arpacı, B. B., & Imren, M. 2022. Host-Pathogen and Pest Interactions: Virus, Nematode, Viroid, Bacteria,

- and Pests in Tomato Cultivation. In *Tomato-From Cultivation to Processing Technology*. IntechOpen.
- Brandt, B., Brodsky, D. E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjärvi, J., ... & Schroeder, J. I. 2012. Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10593-10598.
- Brembu, T., Winge, P., Bones, A. M., & Yang, Z. 2006. A RHOse by any other name: a comparative analysis of animal and plant Rho GTPases. *Cell Research*, 16(5), 435-445.
- Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., & van Steensel, B. 2014. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research*, 42(22), e168. <https://doi.org/10.1093/nar/gku936>
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. 2014. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the CRISPR/Cas9 system. *Plant Physiology*, 166(3), 1292–1297. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247577>
- Brumfield, R. G., & Ozkan, B. 2016. Gender analysis of labor and resources in greenhouse vegetable production in the Antalya Province of Turkey. *HortScience*, 51(12), 1547-1554.
- Bülbül, C. 2021. Development of broomrape (*Orobanch* spp., *Phelipanche* spp.)-resistant tomato (*Solanum lycopersicum*) using gene editing technology (CRISPR).
- Cakmak, E., Dudu, H., & Saracoglu, S. 2009. Climate change and agriculture in Turkey: a CGE modeling approach. *Econ Anadolu*, 17-19.
- Ceasar, S. A., Rajan, V., Prykhozhij, S. V., Berman, J. N., & Ignacimuthu, S. 2016. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(9), 2333-2344.
- 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(1), 667-697.
- Chen, Y., Liu, Y., Yan, X., & Wang, H. 2010. Genome-wide analysis of small GTP-binding protein family in rice and Arabidopsis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 28(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11105-009-0120-0>
- Cherfils, J., & Zeghouf, M. 2013. Regulation of small gtpases by gefs, gaps, and gdis. *Physiological reviews*, 93(1), 269-309.

- Conant, D., Hsiau, T., Rossi, N., Oki, J., Maures, T., Waite, K., ... & Hsu, P. D. 2022. Inference of CRISPR edits from Sanger trace data. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.02.08.479396>
- Costa, J. M., & Heuvelink, E. 2018. The tomato crop and industry. In E. Heuvelink (Ed.), *Tomato Crop Production in Greenhouses* (2nd ed., pp. 1–25). CABI.
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. 2010. Abscissic acid: emergence of a core signaling network. *Annual review of plant biology*, 61(1), 651-679.
- Demircan, S. 2023. *Agricultural products markets* [Report]. Republic of Türkiye Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Agricultural Economic Policies (TEPGE). <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Piyasalar%C4%B1/2023-Temmuz%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Raporu/DOMATES%20T%C3%9CP%20HAZ%C4%B0RAN%202023-TEPGE.pdf> [Son erişim tarihi: 08.06.2025].
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- Doyle, J. 1991. DNA Protocols for Plants. In: Hewitt G.M., Johnston A.W.B., Young J.P.W. (Eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 283-293.
- Dupeux, F., Santiago, J., Betz, K., Twycross, J., Park, S. Y., Rodriguez, L., ... & Márquez, J. A. 2011. A thermodynamic switch modulates abscissic acid receptor sensitivity. *The EMBO journal*, 30(20), 4171-4184.
- Eliáš, M., & Klimeš, V. 2012. Rho GTPases: deciphering the evolutionary history of a complex protein family. *Rho GTPases: Methods and Protocols*, 13-34.
- Endo, H., & Torii, K. U. 2019. Stomatal development and perspectives toward agricultural improvement. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(5), a034660.
- Esquinas-Alcázar, J. and Nuez, F. 1995. Situación taxonomica, domesticación y difusión. In: Nuez, F. (Ed.), *El Cultivo del Tomate*. Ediciones Mundi, Madrid, pp. 14-42.
- FAO. 2021. The state of the world's land and water resources for food and agriculture – Systems at breaking point. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb7654en> [Son erişim tarihi: 05.06.2025].
- FAO. 2023a. FAOSTAT statistical database: Turkey tomato production (1961–2023). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Son erişim tarihi: 06.06.2025].

- FAO. 2023b. FAOSTAT statistical database: Turkey tomato yield (1961–2023). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Son erişim tarihi: 06.06.2025].
- FAO. 2023c. FAOSTAT statistical database: World tomato production (1961–2023). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Son erişim tarihi: 06.06.2025].
- FAO. 2023d. FAOSTAT statistical database: Top 10 counties production of tomatoes (2023). https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity [Son erişim tarihi: 08.06.2025].
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., et al. 2009 Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29, 185-212.
- Feiguelman, G., Fu, Y., & Yalovsky, S. 2018. ROP GTPases structure-function and signaling pathways. *Plant physiology*, 176(1), 57-79.
- Frary, A., & Earle, E. D. 1996. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Reports*, 16(3), 235–240. <https://doi.org/10.1007/BF01232272>
- Gao, J., Wang, G., Ma, S., Xie, X., Wu, X., Zhang, X., ... & Xia, Q. 2015. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant molecular biology*, 87, 99-110.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., ... & Hedrich, R. 2009. Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21425-21430.
- Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(1), 16-37.
- Giardini, L., Giovanardi, R., & Borin, M. 1985. Water consumption and yield response of tomato in relation to water availability at different soil depths. In IV International Symposium on Water Supply and Irrigation in the Open and under Protected Cultivation 228 (pp. 119-126).
- Gözener, B., & Dereli, H. 2018. Greenhouse Tomato Producers ‘Views on Soilless Agriculture in Antalya. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(4), 460-463.
- Grossiord, C., Buckley, T. N., Cernusak, L. A., Novick, K. A., Poulter, B., Siegwolf, R. T., ... & McDowell, N. G. 2020. Plant responses to rising vapor pressure deficit. *New phytologist*, 226(6), 1550-1566.

- Guo, M., Zhang, Y. L., Meng, Z. J., & Jiang, J. 2012. Optimization of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of Micro-Tom tomatoes. *Genetics and Molecular Research*, 11(1), 661–671.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hatfield, J. L., & Dold, C. 2019. Water-use efficiency: advances and challenges in a changing climate. *Frontiers in plant science*, 10, 103.
- Henis, Y. I., Hancock, J. F., & Prior, I. A. 2009. Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters. *Molecular membrane biology*, 26(1-2), 80-92.
- Hetherington, A. M., & Woodward, F. I. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424(6951), 901-908.
- Heuvelink, E. (Ed.). 2005. *Tomatoes*. CABI publishing.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., & Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6(2), 271-282.
- Hille, F., & Charpentier, E. 2016. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, 371(1707), 20150496.
- Hu, H., Boisson-Dernier, A., Israelsson-Nordström, M., Böhmer, M., Xue, S., Ries, A., ... & Schroeder, J. I. 2011. Erratum: Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nature cell biology*, 13(6), 734-734.
- Imber, D., & Tal, M. 1970. Phenotypic reversion of flacca, a wilted mutant of tomato, by abscisic acid. *Science*, 169(3945), 592-593.
- Jacobs, T. B., LaFayette, P. R., Schmitz, R. J., & Parrott, W. A. 2017. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *Plant Physiology*, 174(4), 2023–2037. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00426>
- Janik, E., Niemcewicz, M., Ceremuga, M., Krzowski, L., Saluk-Bijak, J., & Bijak, M. 2020. Various aspects of a gene editing system—crispr–cas9. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9604.
- Jenkins, J. A. 1948. The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2, 379-392.
- 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.

- Jones Jr, J. B. 2007. *Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden*. CRC press.
- Kaur, G., Guruprasad, K., Temple, B. R., Shirvanyants, D. G., Dokholyan, N. V., & Pati, P. K. 2018. Structural complexity and functional diversity of plant NADPH oxidases. *Amino acids*, 50, 79-94.
- Khan, Q., Wang, Y., Xia, G., Yang, H., Luo, Z., & Zhang, Y. 2024. Deleterious Effects of Heat Stress on the Tomato, Its Innate Responses, and Potential Preventive Strategies in the Realm of Emerging Technologies. *Metabolites*. <https://doi.org/10.3390/metabo14050283>.
- Kim, T. H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J. I. 2010. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual review of plant biology*, 61(1), 561-591.
- Klein, M., Reschke, M., Dreyer, A., & Stuttmann, J. 2022. Efficient genome editing of multiple genes in tomato using a CRISPR/Cas9 multiplexing system. *Frontiers in Plant Science*, 13, 891346. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.891346>
- Kleinstiver, B. P., Pattanayak, V., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Zheng, Z., & Joung, J. K. 2016. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529(7587), 490-495.
- Krishna, R., Akhter Ansari, W., Soumia, P. S., Yadav, A., Jaiswal, D. K., Kumar, S., Singh, A. K., Singh, M., & Verma, J. P. 2022. Biotechnological Interventions in Tomato (*Solanum lycopersicum*) for Drought Stress Tolerance: Achievements and Future Prospects. *Biotech*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/biotech11040048>
- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z. M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangel, J. L., ... & Schroeder, J. I. 2003. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *The EMBO journal*, 22(11), 2623–2633. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg277>
- Lawson, T., & Blatt, M. R. 2014. Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant physiology*, 164(4), 1556-1570.
- Li, J., Meng, X., Zong, Y., Chen, K., Zhang, H., Liu, J., ... & Gao, C. 2013. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR–Cas9. *Nature Biotechnology*, 34(3), 332–338. <https://doi.org/10.1038/nbt.3479>
- Li, R., Li, R., Li, X., Fu, D., Zhu, B., Tian, H., ... & Zhu, H. 2018. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant biotechnology journal*, 16(2), 415-427.

- Li, X., Ma, J., Sun, X., Zheng, L., Chen, R., & An, J. 2023. Estimating the effects of deficit irrigation on water absorption and utilization of tomatoes grown in greenhouse with Hydrus-1D model. *Sustainability*, 15(4), 3216.
- Li, Z., Kang, J., Sui, N., & Liu, D. 2012. ROP11 GTPase is a negative regulator of multiple ABA responses in Arabidopsis. *Journal of integrative plant biology*, 54(3), 169-179.
- Li, Z., Waadt, R., & Schroeder, J. I. 2016. Release of GTP exchange factor mediated down-regulation of abscisic acid signal transduction through ABA-induced rapid degradation of RopGEFs. *PLoS biology*, 14(5), e1002461.
- Liu, M., Rehman, S., Tang, X., Gu, K., Fan, Q., Chen, D., & Ma, W. 2019. Methodologies for improving HDR efficiency. *Frontiers in genetics*, 9, 691.
- Liu, Z., Dong, H., Cui, Y., Cong, L., & Zhang, D. 2020. Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microbial cell factories*, 19, 1-14.
- Lobell, D. B., Roberts, M. J., Schlenker, W., Braun, N., Little, B. B., Rejesus, R. M., & Hammer, G. L. 2014. Greater sensitivity to drought accompanies maize yield increase in the US Midwest. *Science*, 344(6183), 516-519.
- Malnoy, M., Viola, R., Jung, M. H., Koo, O. J., Kim, S., Kim, J. S., ... & Nagamangala Kanchiswamy, C. 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Frontiers in plant science*, 7, 1904.
- Manghwar, H., Lindsey, K., Zhang, X., & Jin, S. 2020. CRISPR/Cas system: Recent advances and future prospects for genome editing. *Trends in Plant Science*, 25(6), 638–654. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.006>
- Manzur, J. P., Penella, C., & Rodríguez-Burruezo, A. 2013. Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the in vitro culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. *Scientia Horticulturae*, 161, 181-187.
- McKown, K. H., & Bergmann, D. C. 2018. Grass stomata. *Current Biology*, 28(15), R814-R816.
- Mega, R., Abe, F., Kim, J. S., Tsuboi, Y., Tanaka, K., Kobayashi, H., ... & Okamoto, M. 2019. Tuning water-use efficiency and drought tolerance in wheat using abscisic acid receptors. *Nature plants*, 5(2), 153-159.
- Mei, Y., Wang, Y., Chen, H., Sun, Z. S., & Ju, X. D. 2016. Recent progress in CRISPR/Cas9 technology. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(2), 63-75.

- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., ... & Mittler, R. 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science signaling*, 2(84), ra45-ra45.
- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J. D. G., & Kamoun, S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31(8), 691–693. <https://doi.org/10.1038/nbt.2655>
- Ng, L. M., Melcher, K., Teh, B. T., & Xu, H. E. 2014. Absciscic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(5), 567-584.
- Nguyen, C. H., Yan, D., & Nambara, E. 2023. Persistence of absciscic acid analogs in plants: chemical control of plant growth and physiology. *Genes*, 14(5), 1078.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., ... & Nureki, O. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949.
- Oliveira, M. D. R., Calado, A. M., & Portas, C. A. M. 1996. Tomato root distribution under drip irrigation.
- Ordon, J., Gantner, J., Kemna, J., Schwalgun, L., Reschke, M., Streubel, J., ... & Stuttmann, J. 2020. Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit. *The Plant Journal*, 103(1), 203–216. <https://doi.org/10.1111/tpj.14729>
- Ors, S., Ekinici, M., Yildirim, E., Sahin, U., Turan, M., & Dursun, A. 2021. Interactive effects of salinity and drought stress on photosynthetic characteristics and physiology of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings. *South African Journal of Botany*, 137, 335–339. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.031>
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science*, 5, 86.
- Pan, C., Ye, L., Qin, L., Liu, X., He, Y., Wang, J., ... & Lu, G. 2021. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of SIMAPK3 reveals its role in regulating stomatal development and fruit set in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 165, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.009>
- Pardo-Tomás, J., & López Terrada, M. L. 1993. *Las primeras noticias sobre plantas americanas en las relaciones de viajes y crónicas de Indias (1493-1553)*. CSIC-UV-Instituto de Historia de la Medicina y de la Ciencia López Piñero (IHMC).
- Patane, C., & Cosentino, S. L. 2010. Effects of soil water deficit on yield and quality of processing tomato under a Mediterranean climate. *Agricultural water management*, 97(1), 131-138.

- Pei, Z. M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G. J., ... & Schroeder, J. I. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406(6797), 731-734.
- Peng, R., Lin, G., & Li, J. 2016. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *The FEBS journal*, 283(7), 1218-1231.
- Peralta, I. E., & Spooner, D. M. 2007. History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). *Genetic improvement of solanaceous crops*, 2, 1-27.
- Peralta, I. E., Spooner, D. M., & Knapp, S. 2008. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*).
- Pramanik, K. A. R. T. I. K., Sahoo, J. P., Mohapatra, P. P., Acharya, L. K., & Jena, C. H. I. N. M. A. Y. A. 2021. Insights into the embryo rescue—A modern in-vitro crop improvement approach in horticulture. *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol*, 22, 20-33.
- Puli, M. R., Muchoki, P., Yaaran, A., Gershon, N., Dalal, A., Nalufunjo, F., ... & Yalovsky, S. 2024. Null mutants of a tomato Rho of plants exhibit enhanced water use efficiency without a penalty to yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(4), e2309006120.
- Raiola, A., Rigano, M. M., Calafiore, R., Frusciante, L., & Barone, A. 2014. Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. *Mediators of inflammation*, 2014(1), 139873.
- Rajametov, S. N., Lee, K., Jeong, H.-B., Cho, M.-C., Nam, C.-W., & Yang, E.-Y. 2021. Physiological Traits of Thirty-Five Tomato Accessions in Response to Low Temperature. *Agriculture*, 11(8), 792. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11080792>
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. 2015. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119-128.
- Razdan, M. K. (Ed.). (2006). *Genetic improvement of solanaceous crops volume 2: tomato*. CRC Press.
- Rönspies, M., Schindele, P., Wetzels, R., & Puchta, H. 2022. CRISPR–Cas9-mediated chromosome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Protocols*, 17(5), 1332-1358.
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M. H., Schroeder, J. I., Serrano, R., & Rodriguez, P. L. 2006. Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in *Arabidopsis* by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant physiology*, 141(4), 1389-1399.

- Sambrook, J., & Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Secgin, Z., Kavas, M., & Yildirim, K. 2021. Optimization of Agrobacterium-mediated transformation and regeneration for CRISPR/Cas9 genome editing of commercial tomato cultivars. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 45(6), 704-716.
- Sensoy, S., Demircan, M., Ulupinar, Y., & Balta, İ. 2016. Climate of Turkey. Turkish State Meteorological Service. https://www.mgm.gov.tr/FILES/genel/makale/31_climateofturkey.pdf [Son erişim tarihi: 06.06.2025].
- Seth, R. 2024. An Overview on Impact of Salinity Stress in Tomato under invitro Conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 13(11), 191–201. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2024.1311.023>
- Sharma, P., & Srivastava, D. K. 2013. In vitro plant regeneration from leaf and petiole tissues of tomato (*Solanum lycopersicum* CV. SOLAN VAJR). *Journal of Cell & Tissue Research*, 13(3).
- Shimazaki, K. I., Doi, M., Assmann, S. M., & Kinoshita, T. 2007. Light regulation of stomatal movement. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58(1), 219-247.
- Singh, A., Singh, M. K., Singh, V. K., Singh, R., Raghuvanshi, T., & Singh, C. K. 2017. Debilitation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) as result of heat stress. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 1917–1922. <https://www.phytojournal.com/archives/2017.v6.i6.2311/debilitation-in-tomato-solanum-lycopersicum-l-as-result-of-heat-stress> [Son erişim tarihi: 09.06.2025].
- Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H. C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., ... & Kwak, J. M. 2009. Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS letters*, 583(18), 2982-2986.
- Smokvarska, M., Jaillais, Y., & Martinière, A. 2021. Function of membrane domains in rho-of-plant signaling. *Plant Physiology*, 185(3), 663-681.
- Sun, H. J., Uchii, S., Watanabe, S., & Ezura, H. 2006. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant and Cell Physiology*, 47(3), 426–431. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci251>
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A., & Mittler, R. 2011. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current opinion in plant biology*, 14(6), 691-699.
- Svitashev, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J. K., & Mark Cigan, A. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature communications*, 7(1), 13274.

- Synthego Help Center. 2023. ICE Analysis: Interpreting the R^2 value. Retrieved from <https://www.synthego.com/help-center>. [Son erişim tarihi: 06.06.2025].
- Thomas, C., Fricke, I., Scrima, A., Berken, A., & Wittinghofer, A. 2007. Structural evidence for a common intermediate in small G protein-GEF reactions. *Molecular cell*, 25(1), 141-149.
- Thomas, C., Fricke, I., Weyand, M., & Berken, A. 2009. 3D structure of a binary ROP-PRONE complex: the final intermediate for a complete set of molecular snapshots of the RopGEF reaction. *Biological chemistry*, 390(5-6), 427-435.
- Thompson, M., Gamage, D., Hirotsu, N., Martin, A., & Seneweera, S. 2017. Effects of elevated carbon dioxide on photosynthesis and carbon partitioning: a perspective on root sugar sensing and hormonal crosstalk. *Frontiers in Physiology*, 8, 578.
- Turan, M., Ekin, M., Argin, S., Brinza, M., & Yildirim, E. 2023. Drought stress amelioration in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings by biostimulant as regenerative agent. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1211210>
- Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı. 2023. Değişen iklime uyum çerçevesinde su verimliliği strateji belgesi ve eylem planı (2023–2033). <https://www.tarimorman.gov.tr> [Son erişim tarihi: 06.06.2025].
- van Andel, T., Vos, R., Michels, E., & Stefanaki, A. 2021. Sixteenth-century tomatoes in Europe: who saw them, what did they look like, and where did they come from?
- Waadt, R., Hitomi, K., Nishimura, N., Hitomi, C., Adams, S. R., Getzoff, E. D., & Schroeder, J. I. 2014. FRET-based reporters for the direct visualization of abscisic acid concentration changes and distribution in *Arabidopsis*. *elife*, 3, e01739.
- Wang, D., Lu, Q., Wang, X., Ling, H., & Huang, N. 2023. Elucidating the role of SIXTH5 in tomato fruit softening. *Horticultural Plant Journal*, 9(4), 777-788.
- Wang, Q., Zhang, D., Liu, C., Li, Y., & Miao, Y. 2022. Comprehensive analysis of subcellular localization, immune function and role in bacterial wilt disease resistance of *Solanum lycopersicum* linn. ROP family small GTPases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9727.
- Wang, X., Fan, J., Xing, Y., Xu, G., Wang, H., Deng, J., ... & Li, Z. 2019. The effects of mulch and nitrogen fertilizer on the soil environment of crop plants. *Advances in agronomy*, 153, 121-173.
- Woo, J. W., Kim, J., Kwon, S. I., Corvalán, C., Cho, S. W., Kim, H., ... & Kim, J. S. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature biotechnology*, 33(11), 1162-1164.

- Wu, Y., Guo, P., Liu, H., Liu, Y., & Zhang, X. 2018. Genome-wide identification and expression analysis of ROP GTPases in grape, Medicago, and rubber tree. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1892. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01892>
- Yang, H., Ren, S., Yu, S., Pan, H., Li, T., Ge, S., ... & Xia, N. 2020. Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6461.
- Yin J, Niu L, Li Y, Song X, Ottosen CO, et al. 2023. The effects of waterlogging stress on plant morphology, leaf physiology and fruit yield in six tomato genotypes at anthesis stage. *Vegetable Research* 3:31 doi: 10.48130/VR-2023-0031
- Yu, F., Qian, L., Nibau, C., Duan, Q., Kita, D., Levasseur, K., ... & Luan, S. 2012. FERONIA receptor kinase pathway suppresses abscisic acid signaling in Arabidopsis by activating ABI2 phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(36), 14693-14698.
- Zhang, L., Liu, G., Guo, X., Wang, X., & Li, T. 2023. Functional analysis of *SlSPCH* in stomatal development and water use efficiency using CRISPR/Cas9 in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1123456. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1123456>
- Zhang, Y., Liang, Z., Zong, Y., Wang, Y., Liu, J., Chen, K., ... & Gao, C. 2020a. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature Communications*, 7, 12617. <https://doi.org/10.1038/ncomms12617>
- Zhang, Z., Liu, Y., Li, X., Wang, H., & Zhang, X. 2020b. Evolutionary and comparative analysis of the ROP GTPase gene family in Solanaceae species. *Genes*, 11(7), 745. <https://doi.org/10.3390/genes11070745>
- Zheng, Z. L., & Yang, Z. 2000. The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants. *Plant molecular biology*, 44, 1-9.
- Zheng, Z. L., Nafisi, M., Tam, A., Li, H., Crowell, D. N., Chary, S. N., ... & Yang, Z. 2002. Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(11), 2787-2797.
- Zhou, J., Shen, B., Zhang, W., Wang, J., Yang, J., Chen, L., ... & Huang, X. 2014. Dual sgRNAs facilitate CRISPR/Cas9-mediated mouse genome targeting. *FEBS Journal*, 281(7), 1717–1725. <https://doi.org/10.1111/febs.12735>
- Zsögön, A., Čermák, T., Naves, E. R., Notini, M. M., Edel, K. H., Weinl, S., ... & Peres, L. E. P. 2018. De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nature biotechnology*, 36(12), 1211-1216.

ÖZGEÇMİŞ

Nana Ama Bissawaa BISSAH

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2023-2025	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye
Türkçe Hazırlık Eğitimi 2022-2023	Akdeniz TÖMER
Lisans 2017-2021	KNUST Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Gana