

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



**DOMATESTE DOKU KÜLTÜRÜ,
GENETİK TRANSFORMASYON VE CRISPR/Cas9 SİSTEMİ İLE
GENOM İŞLEME OPTİMİZASYONU**

Doktora Tezi

Zafer SEÇGİN

Danışman

Doç. Dr. Musa KAVAS

II. Danışman

Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM

SAMSUN
2021

TEZ KABUL VE ONAYI

Zafer SEÇGİN tarafından, **Doç. Dr. Musa KAVAS** danışmanlığında hazırlanan **“Domateste Doku Kültürü, Genetik Transformasyon ve CRISPR/Cas9 Sistemi ile Genom İşleme Optimizasyonu”** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 28.2.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Orhan KURT Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye (Danışman)	Doç. Dr. Musa KAVAS Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. İskender TİRYAKİ Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret

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

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

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

İmza

28/03/2021

Zafer SEÇGİN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: Domateste Doku Kültürü, Genetik Transformasyon ve CRISPR/Cas9 Sistemi ile Genom İşleme Optimizasyonu

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 18.01.2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 13

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

İmza

28/03/2021

Doç. Dr. Musa KAVAS

ÖZET

DOMATESTE DOKU KÜLTÜRÜ, GENETİK TRANSFORMASYON ve CRISPR/Cas9 SİSTEMİ ile GENOM İŞLEME OPTİMİZASYONU

Zafer SEÇGİN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

Doktora, Şubat/2021

Danışman: Doç. Dr. Musa KAVAS

Solanaceae familyası içerisinde yer alan domates (*Solanum lycopersicum*), dünya çapında ikinci en önemli bahçe bitkisidir. Sağlık, ekonomik ve besleyici öneminin yanı sıra domates, etli meyve gelişimi çalışmaları ve genom manüplasyon çalışmalarında model bitki olarak kullanılır. Genom düzenleme sistemleri kullanılarak elde edilen bitkilerin, tarla koşullarına doğrudan uygulanabilmesi için ticari domates çeşitlerinde de optimize edilmelidir. Rejenerasyon sistemi ve *Agrobacterium* kullanılarak yapılan gen aktarımı bitkilerde genom düzenlemenin temelini oluşturmaktadır. CRISPR/Cas9 sistemi, domates çeşitlerinde genom düzenleme amacıyla çeşitli çalışmalarda başarıyla kullanılmıştır. Genom düzenleme çalışmalarında farklı fenotipik markör genleri kullanılarak yapılan genom düzenleme çalışmalarının etkinliği tespit edilmeye çalışılmaktadır. Bu genlerden biri olan *phytoen desaturaz* (*PDS*) geni bitkilerde albino fenotipler oluşturmaktadır *Akonitaz hidrataz* (*ACO*) geni ise TCA (Tricarboxylic Acid) döngüsü içerisinde yer alan, sitratı geri dönüşümlü olarak izositratı parçalamakta ve Acly-CoA üretimi ile ilişkili olduğundan polen oluşumu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın amaçları, Crocker domates çeşitinde doku kültürü parametrelerini optimize ederek, etkili bir *Agrobacterium* gen aktarım protokolü oluşturmak ve CRISPR/cas9 genom düzenleme sistemi ile *PDS* geni hedeflemesine yönelik optimizasyon çalışmalarını gerçekleştirmektir. Çalışmanın diğer bir amacı ise CRISPR/cas9 genom düzenleme sistemi ile *SIACO4* geninin düzenlenmesini yapmak ve bu düzenlemenin polen oluşumu üzerine olan etkilerini belirlemektir.

Crocker ticari domates çeşitinde doku kültürü optimize çalışmalarında kotiledon ve yaprak eksplantları farklı konsantrasyonlardaki benzyl adenin (BA) (0, 0.5, 1, 2, 3 ve 4 mg/L) ve indole 3-asetik asit (IAA) (0, 0.1, 0.5 ve 1 mg/L) içeren MS besiy ortamında test edilmişlerdir. Çalışmada *Agrobacterium* aracılı gen aktarımının etkinliği eksplant kaynağı, bakteri suşu ve konsantrasyonu ile inokülasyon süresi, ko-kültürasyon süresi, ön-kültürleme süresi, antibiyotiklerin etkisi ve higromisin konsantrasyonu gibi farklı parametreler kullanılarak test edilmiştir. *PDS* ve *SIACO4* genlerini CRISPR/Cas9 sistemi ile hedeflemek için ikiye adet klavuz RNA (gRNA) tasarlanmış ve *Agrobacterium* aracılı gen aktarımı yapılarak genom düzenlenmiş domates bitkileri başarılı bir şekilde elde edilmiştir.

Çalışma sonuçları Crocker domates çeşitinde en yüksek bitki rejenerasyonunun kotiledon eksplantının kullanıldığı 3 mg/L BA ve 0.1 mg/L IAA içeren MS besiy ortamından elde edildiğini göstermiştir. *Agrobacterium* aracılı gen aktarım sonuçları en etkin gen aktarım parametrelerinin: kotiledon ekplantlarında, ön-kültür süresinin 2 gün, *Agrobacterium* OD600: 0.6'da 10 dakika, ko-kültürasyon süresinin 48 saat olduğu uygulamalarda maksimum transformasyon etkinliğinin (%44) olduğu belirlenmiştir. CRISPR/Cas9 sistemi ile *PDS* ve *SIACO4* genini hedefleyen iki gRNA'nın test edildiği çalışma sonuçları, *PDS* geni hedeflenen bitkilerde tam albino,

kimerik bitkiler ve yeşil fenotipler elde edilmiş ve mutant bitki oranı %71 olarak belirlenmiştir. *SLACO4* geninin hedeflenmesi sonucunda elde edilen mutant bitkilerin meyve başına tohum sayıları %85 oranında azalmıştır. Bu çalışma sonucunda ilk kez ticari domates çeşidinde CRISPR/Cas9 genom düzenleme çalışmaları için *Agrobacterium* aracılı gen transferi ve doku kültürü parametreleri optimize edilerek, *SLACO4* geninin polen oluşumu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Domates, *phthoene desaturaz*, *Akonitaz hidrataz*, CRISPR/Cas9



ABSTRACT

OPTIMIZATION of TISSUE CULTURE, GENETIC TRANSFORMATION and CRISPR/CAS9 SYSTEM with GENOME PROCESSES in TOMATO

Zafer SEÇGİN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Agricultural Biotechnology

Doctora, February/2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Musa KAVAS

Tomato (*Solanum lycopersicum*), a member of Solanaceae family is the second most important horticultural crop worldwide. In addition to the health, economic and nutritional importance, tomato is used as a model plant in fleshy fruits improvement studies and in genome manipulation studies. Genome editing systems must be optimized before applying directly to field conditions and for commercial tomato varieties. The regeneration system and *Agrobacterium* mediated gene transfer forms the basis of genome editing in plants. CRISPR/Cas9 system has been successfully used in various genome editing studies in tomato varieties. In genome editing studies, different phenotypic marker genes are used in the genome editing efficacy studies. These genes include, *phytoen desaturaz* (*PDS*) gene which creates albino phenotype in plants, *Akonitaz hidrataz* (*ACO*) gene which is present in the Tricarboxylic Acid (TCA) cycle, breaks the citrate reversibly into isocitrate and is associated with the production of Acyl-CoA, hence considered associated with pollen formation. The objectives of this study are to create an effective *Agrobacterium* mediated gene transfer protocol by optimizing tissue culture parameters of tomato cv. Crocker and to carry out optimization studies for CRISPR/Cas9 gene editing system by targeting the *PDS* gene. Other aim of this study is to edit the *SIACO4* gene using the CRISPR/Cas9 gene editing system and study the effect of this editing on the pollen formation.

In the tissue culture optimization studies, leaf and cotyledon explants of commercial tomato cultivar Crocker were tested on MS medium containing different concentrations of 6-benzyladenine (BA) (0, 0.5, 1, 2, 3 and 4 mg/L) and Indole-3-acetic acid (IAA) (0, 0.1, 0.5 and 1 mg/L). Efficiency of *Agrobacterium* mediated gene transfer was tested using different parameters including, source of explant, bacterial strain and concentration, inoculation period, co-cultivation period, pre-cultivation timing, effect of antibiotics and concentration of hygromycin. Two each guide RNA (gRNA) were designed to target *PDS* and *SIACO4* genes using CRISPR/Cas9 system and genome edited plants were produced using *Agrobacterium* mediated gene transfer.

Study results showed that highest plant regeneration of tomato cv Crocker was obtained from cotyledon explants grown in MS medium supplemented with 3 mg/L BA and 0.1 mg/L IAA. Results of the most effective *Agrobacterium* mediated gene transfer parameters were found in cotyledon explant with 2 days pre-culture time, 10 minutes with *Agrobacterium* at OD600: 0.6 and co-cultivation period of 48 hours. These parameters resulted in maximum transformation effect (44%). Results of CRISPR/Cas9 system by testing two gRNA targeting each of *PDS* and *SIACO4*. A fully albino, chimeric and green phenotypes with mutant plant ratio of 71% were

shown in *PDS* gene targeted plants. Targeting *SIACO4* gene resulted in 85% decrease in number of seeds per fruit in mutant plants. As a result, by optimizing the optimizing *Agrobacterium* mediated gene transfer and tissue culture parameters for CRISPR/Cas9 genome editing studies, this study for the first time in commercial tomato cultivar determined that *SIACO4* gene is associated with the pollen formation.

Keywords: Tomatoes, *phytoen desaturase*, *Aconitase hydratase*, CRISPR/Cas9



ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden itibaren beni yönlendirerek lisansüstü eğitime başlamaya teşvik eden, yüksek lisans ve doktora çalışmalarımın her aşamasında özgün fikirleriyle bana yol gösteren, hayatımın her döneminde bilgisi ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan, her zaman varlığından güç bulduğum değerli danışman hocam Doç. Dr. Musa KAVAS'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora araştırmamın yürütülmesi sırasında görüş ve önerileriyle katkıda bulunan ikinci danışmanım Kubilay YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Doktora araştırmamın yürütülmesi sırasında görüş ve önerileriyle katkıda bulunan Tez İzleme Komitesi Üyeleri hocalarımdan Prof. Dr. Orhan KURT'a; tezimin her aşamasında görüş ve önerileriyle katkıda bulunduğu kadar manevi desteğini, yardımını ve zamanını esirgemeyerek engin bilgileriyle yol gösteren Tez İzleme Komitesi Üyeleri hocalarımdan Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız ve her daim paylaşacağımıza inandığım, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarım, Gökhan GÖKDEMİR'e, Çiğdem OTUR'a, Ayşegül ŞENYER'e ve Ferruh TURAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullanmış olduğum domates çeşitlerinin tedarik edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Orhan KOÇ'a, Syngenta firmasına, ayrıca yardımlarından dolayı Alfa Tohum Karadeniz Bölge Müdürü Onur YANCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getirmek için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, her konuda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, tecrübeleriyle yolumu aydınlatıp bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan başta eşim Büşra Abanoz SEÇGİN'e ve sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TUBİTAK'a teşekkür ederim.

Zafer SEÇGİN



*Bu tezi kızım Ada SEÇGİN'e ve tüm iyilere ithaf ediyorum,
İyiler kaybetmez, kaybedilir.*

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. DOMATES HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Domatesin Ekonomik Önemi	8
2.2. Domates Doku Kültürü	11
2.3. Domates Bitkisine <i>Agrobacterium</i> Aracılı Gen Aktarımı	15
3. GENOM DÜZENLEME	17
3.1. DNA Kırıkları Tamir Mekanizması	18
3.1.1. Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ)	19
3.1.2. Homolog Rekombinasyonel Onarım (HDR)	20
3.2. Genom Düzenleme Araçları.....	21
3.2.1. Meganükleazlar (MNs).....	21
3.2.2. ZFN (Zinc Finger Nucleases)	22
3.2.3. TALEN	23
3.2.4. CRISPR/Cas9.....	24
4. CRISPR/CAS9	25
4.1. CRISPR/Cas9'ın Kısa Tarihçesi	25
4.2. CRISPR/Cas Sisteminin Sınıflandırması.....	27
4.3. CRISPR/Cas9 Sisteminin Organizasyonu ve Fonksiyonu.....	29
4.4. CRISPR/Cas9 Sisteminin Genom Düzenleme Mekanizması	32
4.5. Bitkilerde CRISPR/Cas9 Aracılı Genom Düzenlenmesi.....	34
4.5.1. CRISPR/Cas9 Aktarım (iletim) Sisteminin Tasarlanması	34
4.5.2. CRISPR/Cas9 Sistemi için Taşıyıcı Vektörler	34
4.5.3. CRISPR/Cas9 Yapısını Tasarlamak için Biyoinformatik Araçlar	36
4.5.4. Bitkilere CRISPR/Cas9 Vektörünün Aktarım Yöntemleri.....	37
4.5.5. Genom Düzenlenmiş Bitkilerde Mutant Tarama Stratejileri.....	38
4.6. Gen Fonksiyon Çalışmalarında CRISPR/Cas Sisteminin Uygulamaları.....	39

4.6.1. CRISPR/Cas Kullanılarak Tek Bir Genin Susturulması	39
4.6.2. CRISPR/Cas ile Hedef Bazlı Gen Aktarımı	39
4.6.3. CRISPR/Cas Aracılı Baz Düzenleme	41
4.7. Domates Islahında CRISPR/Cas Uygulamaları	42
4.7.1. CRISPR/Cas9 Kullanılarak Biyotik Stres Faktörlerine Dirençli Domates Geliştirilmesi	43
4.7.2. CRISPR/Cas9 Kullanılarak Abiyotik Stres Faktörlerine Dirençli Domates Geliştirilmesi	46
4.7.3. CRISPR/Cas Kullanılarak Domates Bitkisinin Verimini, Kalite, Büyüme ve Gelişiminin Artırılması.....	48
4.7.4. CRISPR/Cas9 Aracılı Erkek Kısır Domates Bitkilerin Üretimi	50
5. AKONİTAZ	51
6. HİBRİT BİTKİ ÜRETİMİNDE, TOZLAŞMA KONTROL TEKNOLOJİLERİ VE CRISPR/CAS9.....	55
6.1. Bitkilerde Erkek Kısırlılığı.....	56
6.2. Genetik Erkek Kısırlılığı (GMS)	57
6.3. Sitoplazmik Erkek Kısırlık (CMS)	59
6.4. Sitoplazmit-Genetik Erkek Kısırlık (CGMS)	59
6.5. Genetik Mühendisliği Kullanılarak Erkek Kısırlık Oluşturulması.....	60
7. MATERYAL VE METHOD.....	62
7.1. Bitki Materyali ve Doku Kültür Ortamı	62
7.2. Kullanılan Bakteri Suşları ve Besi Ortamları.....	63
7.3. Besi Ortamları	63
7.4. Tamponlar ve Solüsyonlar	63
7.5. Kimyasal ve Enzimler.....	63
7.6. Bitki Rejenerasyon Sisteminin Optimizasyonu.....	64
7.6.1. Bitki Materyali, Eksplant Hazırlanması ve Doku Kültürü Koşulları	64
7.6.2. Bitki Rejenerasyon Parametrelerinin Optimizasyonu	64
7.7. <i>Agrobacterium</i> Aracılı Gen Aktarımının Optimizasyonu	67
7.7.1. <i>Agrobacterium</i> Aracılı Gen Aktarımı Üzerine Eksplant Kaynağının Etkisi	67
7.7.2. Higromisin (Hygromycin) Testi	67
7.7.3. <i>Agrobacterium</i> Suşu, İnokülasyon Besi Ortamı ve Yoğunluğunun Etkisi	67
7.7.4. Domates Gen Aktarımı Üzerine Ön-Kültürleme Süresi ve Ko- Kültürasyon Süresinin Etkisi	68
7.7.5. <i>A. tumefaciens</i> Bakterisi Üzerine Antibiyotiklerin Etkisi	68
7.8. Genom Düzenlenmiş Domates Bitkilerinin Elde Edilmesi	68

7.8.1. <i>PDS</i> ve <i>ACO</i> Genlerinin Domates Bitkisinde Tanımlanması.....	68
7.8.2. gRNA Tasarlanması	72
7.8.3. gRNA İçeren CRISPR/Cas Bitki İfade Vektörünün Oluşturulması	73
7.8.4. pKI1.1R Vektörünün <i>AarI</i> Enzimi ile Kesilmesi.....	74
7.8.5. Bitki Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu ve Tohumların Çimlendirilmesi	82
7.8.6. Domates Bitkisi Gen Aktarımı	82
7.8.7. T0 Aday Bitkilerin Moleküler Olarak Belirlenmesi	84
7.8.8. Genom Düzenlenmiş Bitkilerde Mutasyon Analizleri	85
7.8.9. Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	86
7.8.10. Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Polen Canlılıklarının Belirlenmesi.....	87
7.8.11. To Transgenik Mutant bitkilerde RNA İzolasyonu ve Kantitatif RT-qPCR	87
8. BULGULAR	89
8.1. Bitki Doku Kültürü ve Rejenerasyon Parametrelerin Optimizasyonu	89
8.2. <i>Agrobacterium</i> Aracılı Gen Aktarımının Optimizasyon	92
8.2.1. Bitki Gen Aktarımı Üzerine Eksplantın Etkisi	92
8.2.2. Higromisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	92
8.2.3. <i>Agrobacterium</i> Suş, Konsantrasyon ve İnokülasyon Besi Ortamının Bitki Gen Aktarımı Üzerine Etkisi.....	93
8.2.4. Bitki Gen Aktarımı Üzerine Ön-kültür ve Ko-kültürasyon Sürelerinin Etkisi	95
8.2.5. Bitki Gen Aktarımı Üzerine Antibiyotiklerin Etkisi	96
8.3. Genom Düzenlenmiş Domates Bitkilerinin Elde Edilmesi	97
8.3.1. <i>PDS</i> ve <i>ACO</i> Genlerinin Domates Bitkisinde Tanımlanması.....	97
8.3.2. gRNA'ların Tasarlanması ve Etkinliği.....	103
8.3.3. CRISPR/Cas9 Bitki İfade Vektörünün Oluşturulması	104
8.3.4. PKI1.1R+gRNA Plazmitlerinin Kompetan <i>E. coli</i> 'ye Transferi.....	105
8.3.5. PKI1.1R+gRNA plazmitlerinin Kompetan <i>Agrobacterium</i> Gv3101 suşuna transferi	106
8.3.6. <i>Agrobacterium</i> Aracılı Gen Aktarımı ve Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Elde Edilmesi	107
8.3.7. T0 Transgenik Mutant Aday Bitkilerin Moleküler Olarak Tanımlanması	108
8.3.8. Genomu Düzenlenmiş Bitkilerin Morfolojik Tanımlanması.....	109
8.3.9. Genom Düzenlenmiş Bitkilerde Mutasyon Analizi	111

8.3.10. <i>SIACO4</i> Mutant Hatlarda Polen Canlılığını Kontrolü ve Tohum Oluşumunun Belirlenmesi.....	113
8.3.11. Genomu Düzenlenmiş Mutant Bitkilerde <i>ACO</i> geninin RT-qPCR ile Belirlenmesi.....	115
9. TARTIŞMA	117
10. KAYNAKLAR.....	122
ERKLER.....	135



SİMGELER VE KISALTMALAR

Semboller

%

°C

1 X

2n=2x=24

× g

µg

µL

µM

µm

Açıklamalar

Yüzde

Santigrat Derece

Normal Solüsyon

Haploid numara (n) ve monoploid numara (x)

Bağıl merkezkaç kuvveti

Mikrogram

Mikrolitre

Mikromolar

Mikrometre

Kısaltmalar

AT-rich

BLAST

bp

BSA

CaCl₂

cDNA

CDS

cm

CTAB

cv.

d

dATP

ddH₂O

DEPC

DNA

dNTPs

EDTA

EtBr

FAOSTAT

FASTA

g

GFP

GUS

h

H₂O

kb

KCl

kDa

Açıklamalar

Adenin Timin Bakımından Zengin

Temel Yerel Hizalama Arama Aracı

Çift Bazlı

Sığır Serum Albumin

Kalsiyum Klorür

Komplementer DNA

Kodlama Sırası

Santimetre

Setil Trimetil Amonyum Borat

Kültivar

Gün

Deoksiadenozin Trifosfat

Çift Damıtılmış Su

Dietil Pirokarbonat

Deoksiribo Nükleik Asit

Dinükleotid Trifosfat

Etilen Diamin Triasetik Asit

Etidyum Bromür

Gıda ve Tarım Örgütü İstatistik Veritabanları

FAST-Tümü [FAST-P (protein) and FAST-N (nükleotid) hizalaması]

Gram

Yeşil Floresan Proteini

β-glukuronidaz

Saat

Su

Kilo Baz Çifti

Potasyum Klorür

Kilodalton

kV	Kilovolt
L	Litre
m	Metre
M	Molar
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
min	Dakika
mL	Mililitre
mM	Mili-molar
mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog Medium
Na ₂ EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit Disodyum Tuzu Dihidrat
NaCl	Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄	Sodyum Dihidrojen Fosfar
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
<i>nptII</i>	Neomisin Fosfotransferaz
nt	Nükleotid
OD	Optik Yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen Potansiyeli
PVP	Polivinilpirolidon
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
s	Saniye
SOC medium	Süper Optimal Sıvı Besiyeri
spp.	Türler (Çoğal)
TAE	Tris Asetat EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Ti Plasmid	Tümör İndükleyici Plasmid
T _m	Primer Bağlanma Sıcaklığı
U	Enzim Ünitesi
UTR	Çevrilmemiş Bölge
UV	Ultraviyole
V	Volt
X-gluc	5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-glukuronik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Dünya domates üretim haritası.	9
Şekil 2.2. Dünya domates ihracatı ve ithalatı yapan ülkeler (FAO, 2017).	9
Şekil 3.1. Genom düzenlenmesinde DNA tamir mekanizmalar.....	18
Şekil 3.2. Meganükleazların yapısal gösterimi.....	22
Şekil 3.3. Çinko parmak nükleazların yapısal gösterimi	23
Şekil 3.4. Genom düzenleme için kullanılan TALEN yapısı.	23
Şekil 4.1. Bilinen CRISPR/Cas sistemlerine genel bakış.	28
Şekil 4.2. Bakteriyel ve Arkea kromozomlarında bir CRISPR bölgesinin yapısı.....	30
Şekil 4.3. Doğal CRISPR-Cas tabanlı bağışıklığın birincil adımları.....	31
Şekil 4.4. DNA kırıkları tamir mekanizması.	33
Şekil 4.4. CRISPR/Cas genom düzenlemesinin gen fonksiyonel çalışmasında uygulanması.....	42
Şekil 5.1. Trikarboksilik asit döngüsü (TCA).	51
Şekil 5.2. TCA döngüsü acetyl-CoA'nın oluşumunda anahtar rol oynar.	54
Şekil 6.1. Genetik erkek kısırlık sisteminin idamesi ve F1 hibrit tohumluk üretimi..	58
Şekil 7.1. Domates tohumlarının in-vitro ortamlarda çimlendirilmesi.....	64
Şekil 7.2. Kotiledon eksplant kaynağı olarak kullanılan farklı yaşta domates fideleri.	65
Şekil 7.3. Kotiledon ve yaprak eksplantlarının bitki rejenerasyonunda kullanılan bölgeleri dikdörtgen içerisinde gösterilmiştir.....	65
Şekil 7.4. Rejenerasyon başladıktan sonra 2-3 cm uzunluğunda bitkicikler kök oluşturmak için RM besi ortamına transferi.	66
Şekil 7.5. MS besi ortamında köklenen bitkiler torf içeren saksılara aktarılması ve iklim odasında yetiştirilmesi.	66
Şekil 7.6. Domatesin farklı büyüme aşamaları ve dokuları.	71
Şekil 7.7. <i>PDS</i> ve <i>ACO</i> genlerini hedefleyen gRNA'ların şematik gösterimi.	73
Şekil 7.8. Çalışmada kullanılacak plazmit (markör gen, Cas9 bölgesi, sgRNA bölgesi)	73
Şekil 7.9. Plazmid AarI kesim enzim bölgesi sgRNA klonlama bölgesi.....	74
Şekil 7.10. pKI1.1R vektörünün kompetan <i>E. Coli</i> bakterisine klonlama aşaması.	78
Şekil 7.11. İzole edilen plazmitlerin agaroz jelde görüntülenmesi.....	79
Şekil 7.12. pKI1.1R plazmitlerin kompetan <i>A. tumefaciens</i> GV3101 bakterisine aktarılması	81
Şekil 7.13. <i>A. tumefaciens</i> GV3101 bakterisin ile gen aktarım yöntemin özeti.....	83
Şekil 7.14. Genom düzenlenmiş bitkilerde mutasyonların belirlenmesinde izlenen metotlar.	86
Şekil 8.1. Yaprak eksplantlarından bitki rejenerasyonu.	90
Şekil 8.2. Kotiledon ekplantlarından elde edilen kallus ve bitki rejenerasyonu	91
Şekil 8.3. Transgenik olmayan 15 günlük domates ekplantlarında farklı higromisin bitki rejenerasyonu üzerine etkisi.	93
Şekil 8.4. <i>Agrobacterium</i> konsantrasyonunun ve inokülasyon besi ortamının eksplant doku karaması üzerine etkisi	95
Şekil 8.5. Ön-Kültüre alınan kotiledon eksplantlarının farklı sürelerde PCM besi ortamında inkubasyonu	96
Şekil 8.6. Domates ACO proteinin Megax yazılımı ile hizalanıp Neighbor-Joining (NJ) metodu filogenetik ağaç oluşturulması.	98

Şekil 8.7. Akonitaz proteinin Megax yazılımı kullanılarak model organizmalarda filogenetik ağaç oluşturulması.....	99
Şekil 8.8. Filogenetik ilişkiye dayanan <i>ACO</i> proteinlerinin korunmuş motifleri <i>ACO</i> genlerinin korunan motiflerin domates bitkisinde dağılımı	100
Şekil 8.9. <i>ACO</i> genlerinin kromozom üzerinde yerleri ve gen duplikasyonlarının şematik gösterimi.....	101
Şekil 8.10. Tomates <i>ACO</i> genlerinin in-siliko gen ifadesi.....	102
Şekil 8.11. Croker domates çelidinde <i>SlACO4</i> genin RT-qPCR sonuçları.....	102
Şekil 8.12. <i>ACO</i> gRNA1 RNAfold webserver görüntüsü.....	104
Şekil 8.13. pKI1.1R vektörünün <i>Aarl</i> restriksiyon enzimi ile kesimi	105
Şekil 8.14. pKI1.1R plazmiti içeren <i>E.coli</i> bakterilerinin <i>HptII</i> geni ile koloni PCR yapılması.	106
Şekil 8.15. Sanger dizleme sonucunda gRNA'ların kontrol edilmesi	106
Şekil 8.16. <i>Agrobacterium</i> Gv3101 koloni PCR yapılması.	107
Şekil 8.17. <i>Agrobacterium</i> Gv3101 hptII primerleri ile koloni PCR yapılması	107
Şekil 8.18. <i>Agrobacterium</i> aracılı gen aktarım sonrasında genom düzenlenmiş bitkilerin yetiştirilmesi.	108
Şekil 8.19. Aday transgenik ve wt bitkilerde HptII geni ile yapılan PCR sonucu. ..	109
Şekil 8.20. <i>PDS</i> geni hedefleniş gRNA1 ile oluşturulan Albino, kimerik ve yeşil hatlar.....	110
Şekil 8.20. Bitkiler hasat dönemine kadar iklim dolabında büyütülmesi.	110
Şekil 8.21. CRISPR/Cas9 ile elde edilen mutant hatlarda ve wt bitkilerde <i>ACO</i> ve <i>PDS</i> genlerinin amplifikasyonu	111
Şekil 8.22. <i>PDS</i> geninde meydana gelen mutasyon analizleri.	112
Şekil 8.23. <i>SlACO</i> geninde meydana gelen mutasyon analizleri.....	112
Şekil 8.24. Wt ve <i>SlACO4</i> mutant bitkilerin: a) İklim odasında büyütülmesi.	113
Şekil 8.25. WT ve <i>SlACO4</i> mutant bitkilerin olgunlaşma sonrasında hasat edilen meyvelerin ve meyvede oluşan tohumların görüntüsü	114
Şekil 8.26. Wt ve <i>SlACO4</i> mutant bitkilerde elde edilen meyve başına tohum sayısı	114
Şekil 8.27. Transgenik T1 tohumlarının MS besi ortamında çimlendirilmesi.	115
Şekil 8.28. WT ve <i>SlACO4</i> mutant bitkilerde farklı zamanlarda ve farklı dokular <i>SlACO4</i> genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi	116

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Taze domatesin besin değeri (Anwar, Fatima et al. 2019).....	10
Tablo 4.1. gRNA tasarlamak için kullanılan online programlar	36
Tablo 4.2. Biyotik stres faktörlerine dirençli CRISPR-Cas9 tabanlı domates geliştirilmesi	43
Tablo 4.3. Abiyotik stres faktörlerine dirençli CRISPR/Cas9 tabanlı domates geliştirilmesi	46
Tablo 4.4 CRISPR/Cas9 kullanılarak domates kalite ve verim özelliklerinin geliştirilmesi	49
Tablo 4.5. CRISPR/Cas9 kullanılarak erkek kısır domates geliştirilmesi	50
Tablo 7.1. Domates gen aktarımında kullanılan besi ortamları ve kimyasal içerikleri	62
Tablo 7.2. Kullanılan bakteri suşları ve besi ortamları	63
Tablo 7.3. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri	71
Tablo 7.4. cDNA sentezi için kullanılan PCR koşulları	71
Tablo 7.5. QPCR sentezi reaksiyon bileşenleri	72
Tablo 7.6. QPCR koşulları (Biorad CFx96)	72
Tablo 7.7. pK11.1R vektörünün AarI enzimi reaksiyon içeriği	74
Tablo 7.8. sgRNA'ların çift iplikli hale getirilmesinde kullanılan bileşenler	76
Tablo 7.9. sgRNA'ların çift iplikli hale getirilmesinde kullanılan protokol	76
Tablo 7.10. Ligasyon içeriği	76
Tablo 7.11. Tampon 1 bileşenleri	77
Tablo 7.12. Tampon 2 bileşenleri	77
Tablo 7.13. Bakteri kolanilerinde bulunan plasmidlerin teyidinde kullanılan PCR bileşenleri	78
Tablo 7.14. Bakteri kolanilerinde bulunan plasmidlerin teyidinde kullanılan PCR protokolü	78
Tablo 7.15. Koloni PCR bileşenleri	81
Tablo 7.16. Koloni PCR protokolü	81
Tablo 7.17. Transgenik To bitkilerinin PCR ile belirlenmesinde kullanılan PCR bileşenleri	84
Tablo 7.18. Transgenik To bitkilerinin PCR ile belirlenmesinde kullanılan PCR protokolü	85
Tablo 7.19. To bitkilerinde Q5 High-Fidelity DNA polimeraz PCR bileşenleri	86
Tablo 7.20. To bitkilerinde Q5 High-Fidelity DNA polimeraz PCR koşulları	86
Tablo 7.21. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri	87
Tablo 7.22. cDNA sentezi PCR koşulları	88
Tablo 7.23. RT-qPCR sentezi reaksiyon bileşenleri	88
Tablo 7.24. RT-qPCR koşulları (Biorad CFx96)	88
Tablo 8.1. <i>S. lycopersicum</i> Cvs Crocker ve Bobcat çeşitlerinde kotiledon ve yaprak eksplantlarından farklı kombinasyonda bitki büyüme düzenleyiciler içeren MS besi ortamında in vitro rejenerasyonu.	91
Tablo 8.2. Eksplant yaşının kotiledon eksplantlarında bitki rejenerasyon üzerine etkisi	92
Tablo 8.3. Eksplant yaşının yaprak eksplantlarında bitki rejenerasyon üzerine etkisi	92
Tablo 8.4. Transformasyon etkinliği üzerine <i>Agrobacterium</i> konsantrasyonunun ve inokülasyon besi ortamının etkisi	94
Tablo 8.5. Ön kültür, inokülasyon ve ko-kültürasyon sürelerinin gen aktarımı üzerine etkisi	96

Tablo 8.6. Domates ekplantlarının rejenerasyonu üzerine farklı konsantrasyonlarda cefotaxime ve timentin etkisi.....	97
Tablo 8.7. Gen duplikasyon ve genlerin evrimi	101
Tablo 8.8. Tasarlanan gRNA'ların forward ve reverse dizileri	103
Tablo 8.9. <i>AarI</i> restriksiyonu enzimi ile kesilen pKI1.1R plazmitlerin konsatrasyonu	105
Tablo 8.10. Transformasyon sonucunda elde edilen transgenik ve genom düzenlenmiş hatların miktarı	108
Tablo 8.10. Wt ve mutant bitkilerde polen canlılıklarının kontrolü	113



1. GİRİŞ

Gıda güvenliğini sağlamak, hızla artan küresel nüfusun mevcut durumuna karşı en önemli zorluklardan biridir. Dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 9,6 milyara ulaşacağı düşünülürken, küresel ürün talebinin 2005 yılına kıyasla %100-110 artacağı tahmin edilmektedir (Tilman, Balzer et al. 2011). İklim değişikliği, artan biyotik ve abiyotik stres faktörleri, azalan ekilebilir arazi ve mevcut su kaynaklarının yetersizliği karşısında hızla artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamak amacıyla, tarımsal üretimi artırmak ve sürdürülebilir tarımsal kalkınmayı hızlandırmak için bitki ıslahı uygulamalarında yeniliklere gereksinim duyulmaktadır. Son yıllarda, bitkisel ürünlerin geliştirilmesine, çok sayıda biyolojik mekanizmanın şifresini çözerek, genetik ve epigenetik faktörlerin rolü aydınlatılarak katkıda bulunmuştur (Ma, Zhu et al. 2016). Bitki ıslahçıları ve bitki bilimcileri, çevresel stres faktörlerine karşı, bitki tepkilerinin altında yatan genetik mekanizmaya çalışmaktadırlar. Son zamanlarda, bitkilerde çok sayıda yeni gen ve bunların düzenleyici yolları tanımlanmıştır (Nasr Esfahani, Inoue et al. 2017, Cao, Li et al. 2018). Verimi artırmak, elit çeşitlerin geliştirilmesi ve ürün iyileştirilmesi için, önemli tarımsal özelliklerle ilişkili genler üzerine odaklanılarak, ‘elit çeşitlerin elit çeşitlerle melezleme’ stratejisi izlenmektedir (Abdelrahman, Sawada et al. 2015). Elde edilecek ürünün niteliklerini iyileştirmeye yönelik klasik bitki ıslahı stratejileri kullanılarak elit çeşitlerin geliştirilmesi çalışmaları hem zor hem de uzun zaman almaktadır. Öte yandan, genom düzenlemek için kullanılan modern teknikler, bir yabancı geni kesin olarak genomun önceden belirlenmiş bir bölgesine entegre edilmesine izin vermekte ve mevcut bir allelin alternatif bir allel ile doğru bir şekilde değiştirilmesini sağlamaktadır (Feng, Zhang et al. 2013).

Domatesin yer aldığı Solanaceae familyası, içerdiği yaklaşık 90 cins 3.000–4.000 tür ile angiosperm cinslerinin en büyüğünü oluşturmaktadır (Frodin 2004). Ekonomik ve besleyici önemine ek olarak, domates, etli meyve gelişiminin incelenmesi çalışmalarında kullanılan model bitki haline gelmiştir (Li, Wang et al. 2018). Domates genomunun tamamı, zengin bir genomik kaynak oluşturmak amacıyla düzenlenmiştir. Bu amaçla türe ait hem genetik hem de fiziksel haritalar bitki ıslahçılarının kullanımı için hazır hale getirilmiştir (Consortium 2012, Zhou, Kong et al. 2019). Buna ek olarak iyi karakterize edilmiş çeşitli monojenik mutant hatların varlığı, TILLING popülasyonları, yabani domates türleri, rekombinant kendi içinde melezlenmiş soylar ve domates çalışmaları için genom düzenleme araçları mevcuttur

(Martín-Pizarro and Posé 2018, Rothan, Diouf et al. 2019). Gen ekspresyon analizi için zengin bir RNA-Seq datası içermektedir. Domates metabolomik çalışmalarında kaydedilen son gelişmeler, bu türün birincil ve özel metabolizması ve moleküler biyosentezinde yer alan yollar hakkında önemli bilgiler sunmaktadır (Scarano, Rao et al. 2017, Zouine, Maza et al. 2017, Toubiana, Puzis et al. 2019).

Domates, her yıl 4,85 milyon ha alanda yaklaşık 182,3 milyon ton üretilen, patatesten (*Solanum tuberosum* L.) sonra en önemli ikinci bitkidir (FAOSTAT, 2019). Asya kıtası, küresel domates üretiminin %61,1'ini sağlarken, Avrupa, Amerika ve Afrika sırasıyla %13,5, %13,4 ve %11,8'ini üretmektedir. Domates verimi, Hollanda'da 508 ton/ha, Somali'de 1.5 ton/ha ve dünya domates üretimi ortalama 376 ton/ha iken ülkeler arası verim oldukça değişkendir (FAOSTAT, 2019).

Domates, dünyanın hemen hemen her ülkesinde tarla ve sera koşullarında yaygın olarak yetiştirilen başlıca sebze ürünlerinden biridir (Singh, Kumar et al. 2017). Ticari olarak üretilen domatesler taze olarak tüketilmekte veya işlenmiş bazı ürünleri üretmek içinde kullanılmaktadır. Domates, iyi bir A, C, K vitamini ve potasyum kaynağı olmasının yanı sıra, içerdiği bitki besinleri, likopen ve karotenoidler gibi zengin metabolitleri nedeniyle çok sayıda sağlık yararı ile ilişkilendirilmiştir (Tanambell, Quek et al. 2019). Gıda endüstrisindeki yüksek tüketimi ve kullanımı, özellikle son yıllarda domates üretiminde istikrarlı bir artışa neden olmuştur. Domates aynı zamanda meyve kalitesinin iyileştirilmesi, bitki verimin artırılması, bitki fonksiyonel genomunun anlaşılması ve incelenmesi için bir model bitki olarak da kullanılmıştır (Khan, Usman et al. 2006).

Günümüzde yetiştirilen ve çok tüketilen domates, doğada bulunan ve lezzetli olmayan yabani türlerinden bugüne kadar uzun yıllar süren ıslah çalışmaları sonucunda meydana getirilmiştir. Islah stratejileri, domates de dahil olmak üzere arzu edilen ürünlerin insan tüketimine uygun hale getirmede önem arz etmektedir. Bununla birlikte; diğer bahçe bitkilerinde olduğu gibi, domatesin raf ömrü kısadır. Bu da ürünün neredeyse %50'sine ulaşabilen kayıplara neden olmaktadır (Parmar, Singh et al. 2017, Wang, Zhang et al. 2019, Costan, Stamatakis et al. 2020) Bu kayıplar, gelişmiş teknolojilere ve daha iyi altyapıya sahip ülkelere göre gelişmekte olan ülkelere daha fazladır. Özellikle 2050 yılına kadar beklenen nüfus artışı, daha fazla gıda üretimi ve daha besleyici gıda üretimi gerektireceği göz önüne alındığında, gıda güvenliği endişeleri ortaya çıkmaktadır. Son zamanlarda, meyveler ve sebzeler de dahil olmak

üzere besin açısından zenginleştirilmiş ürünler üretmek için çok az çalışma yapılmıştır. Ayrıca, ekstrem ortamlar bitki stresini artırmakta, ürünün verimini ve besin kalitesini etkilemektedir. Bitki/meyve genetiğinin anlaşılmasındaki son gelişmeler ve CRISPR/Cas9 kullanımı da dahil olmak üzere genetik mühendisliği teknolojilerinin geliştirilmesinde kaydedilen ilerlemeler, beslenme değeri ve raf ömrü uzun kaliteli domates çeşitlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulacağına işaret etmektedir.

Modern ıslah yöntemleri aracılığıyla tarımsal verimi artırmak, küresel gıda üretimi ve güvenliği bakımından temel hedeftir. Biyotik ve abiyotik stres faktörleri, ürün kalitesini etkilediği kadar üretkenliği de etkiler ve bu stres faktörlerine karşı geliştirilmiş adaptasyon, yüksek verimlilik ve dayanıklılığa sahip ürünler geliştirmek birincil ihtiyaçtır. Yeni nesil dizileme ile güçlendirilmiş son teknoloji ürünü OMICS yaklaşımları ve genom düzenleme araçlarındaki en son gelişmeler, hedef mutagenезin yolunu açmış aynı zamanda genom mühendisliği çalışmaları için de yeni yollar göstermiştir. Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler), çinko parmak nükleazlar (ZFN'ler) ve meganükleazlar (MN'ler) gibi çeşitli genom düzenleme yöntemleri, bitki bilimcilerinin bitkilerde istenen genleri manipüle edilmesini sağlamaktadır. Fakat bu yaklaşımların pahalı ve zahmetli olması, başarılı bir genom düzenleme elde etmek için karmaşık prosedürler içermektedir (Gupta and Musunuru 2014, Harrison, Jenkins et al. 2014). Bu yöntemlerin aksine, CRISPR/Cas9, hassas ve verimli bitki genom düzenlemesi için büyüleyici, tasarımı kolay, uygun maliyetli ve çok yönlü bir araçtır (Xu, Hulshoff et al. 2020). Son yıllarda, CRISPR/Cas9 sistemi, tek nükleotid değişimi, multipleks gen düzenleme, gen susturma ve bitkilerde gen transkripsiyonunun düzenlenmesi dahil olmak üzere hedeflenen mutagenез için güçlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, CRISPR/Cas9 tabanlı genom düzenleme, bitkilerin iyileştirilmesi için büyük bir potansiyele sahiptir.

Melezleme, mutasyon ıslahı ve gen aktarım yöntemleri ile ıslah çalışmaları modern tarımda ürün iyileştirmek için kullanılan başlıca metotlardır. İstenilen allellerin melezleme yolu ile yani klasik ıslah yöntemleri kullanılarak aktarılması uzun yıllar almaktadır. Binlerce yıldır yapılan ıslah çalışmaları sonucunda, bitki genomlarında homozigotluk artmış, genetik değişkenlik büyük ölçüde azaltılmış ve bu uygulamaların bir sonucu olarak birçok özelliğin geliştirme potansiyeli sınırlanmıştır. Mutasyon ıslahı uygulamalarında kimyasal veya fiziksel mutajenler kullanarak

rastgele mutasyonlar oluşturulması sonucunda genetik çeşitlilik genişletilmiştir (Pacher and Puchta 2017). Bu prosedürler stokastik yapıları nedeniyle sınırlıdır, çok sayıda mutantın üretilmesi ve taranması sonucunda etkin fenotiplerin oluşturulması zordur. Bu tür zaman alıcı, zahmetli, hedeflenmemiş ıslah programlarında, seçim verimliliğini artırmak amacıyla markör destekli ıslah yaklaşımları benimsenmiş olsa da, artan mahsul üretimi taleplerine yetersiz kalmaktadır (Scheben, Wolter et al. 2017). Gen aktarım yöntemleri kullanılarak, ekzojen genlerin elit çeşitlerine aktarılması yoluyla istenen özelliklerin elde edilmesi, üreme izolasyonunun darboğazını kırabilir. Ancak, genetiği değiştirilmiş mahsullerin ticarileştirilmesi, uzun ve maliyetli işlemlerin yanı sıra kamuoyunun endişeleriyle sınırlıdır.

Hibrit çeşitler, adaptasyon kabiliyeti, tekdüzellik, kalite, biyotik ve abiyotik stres dirençleri ve yüksek verimleri nedeniyle sebze üretim sistemlerinin ana bileşenleridir. Kendileme yolu ile elde edilen saf ebeveynler melezleme yolu ile elde edilen hibrit tohumlar, tek kullanımlık olmaları nedeni ile ticari bir önem taşımaktadırlar. Dolayısı ile hibrit tohuma sahip olan kurum/kuruluş veya şahıslar çeşit üzerinde hak iddia etmekte ve ürünlerini koruma altına alarak kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Dünya çapında, çoğu sebze mahsulünde hibrit tohumun pazar payı yılda % 8-10 arasında değişmekte olup bu oran hızla artmaktadır (da Silva Dias 2014). Bununla birlikte hibrit tohumların yüksek maliyetlerinden dolayı sebze yetiştiricileri tarafından tercih edilmeleri sınırlıdır. Hibrit tohum üretimindeki darboğazlardan biri, istenmeyen kendiliğinden döllenmeyi önlemek ve böylece gerçek F1 tohumunu elde etmek için anne hatta polen oluşumunu önlemek için gerekli olan tozlaşmanın kontrol edilmesidir. Anne hatlarda polen üretimini engellemek için emaskülasyon tekniklerine ek olarak gen transformasyon teknolojileri kullanılmaktadır. Son yıllarda polen oluşumundan sorumlu genlerin tanımlanması amacıyla CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemini başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Polen oluşumu ile ilişki genler susturularak erkek kısır hatlar elde edilmektedir (Du, Zhou et al. 2020, Jung, Kim et al. 2020, Liu, Wang et al. 2021).

CRISPR/Cas9 sistemi teorik olarak tüm bitki türlerine uygulanabilir, ancak birçok bitki türünde bu sistemin uygulanabilirliği deneysel olarak gösterilmemiştir. 2013 yılından beri CRISPR/Cas9, diğer türlerin yanı sıra *Oryza sativa* (Shan, Wang et al. 2013), *Arabidopsis thaliana* (Feng, Zhang et al. 2013), *Nicotiana benthamiana* (Nekrasov, Staskawicz et al. 2013), *Solanum lycopersicum* (Brooks, Nekrasov et al.

2014), *Zea mays* (Liang, Zhang et al. 2014) ve *G. max* (Liang, Zhang et al. 2014)'da uygulanmaktadır. CRISPR/Cas9 tarafından *phytoen desaturaz* genini (PDS) mutasyona uğratılması sonucunda albino fenotip ortaya çıktığından, CRISPR/Cas9'un genom üzerinde oluşturduğu mutasyonun fenotipik olarak hızlı bir şekilde göstermek için yaygın olarak uygulanmaktadır. Bundan dolayı genom düzenleme çalışmalarında *phytoen desaturaz* (PDS) geni fenotipik markör olarak kullanılmaktadır. Genom düzenleme araçlarının bitkilerde kullanılmadan önce yapılan optimizasyon çalışmalarında, bu araçlarının başarısının kontrol edilmesinde ve gözlemlenmesinde PDS geni hedeflenmektedir.

Akonitaz hidrataz (ACO) geni TCA döngüsü içerisinde yer alan, sitratı geri dönüşümlü olarak izositrate parçalayan enzimdir. Acly-CoA üretimi ile ilişkili olduğundan polen oluşumu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi kullanılarak domates bitkisinde ACO genlerinin susturulması sonucunda erkek kısır hatların elde edilmesi hibrit tohum üretimine önemli derecede katkı sağlayacaktır. Elde edilen erkek kısır hatlarda emaskülasyon çalışmalarına gerek kalmayacağından hibrit tohum üretiminde önemli yer tutmaktadır.

Bitki ıslahı, daha önce belirtildiği gibi, mahsul bitkilerini iyileştirmek ve aynı zamanda sürdürülebilir bir gıda üretimine katkıda bulunmak için hayati önem taşımaktadır. Ülkemiz dünya domates üretiminde dördüncü sırada söz sahibi konumda olmasına rağmen domateste verimin daha da artırılması için yetiştiricilikteki çeşitli kısıtlamaların önüne geçilmesi ve verimi yüksek çeşitlerden yararlanılması gerekmektedir. Biyotik ve abiyotik stres faktörleri nedeniyle domates yetiştiriciliğinde ciddi kayıplar oluşmaktadır. Bu nedenle, bu mahsulün verimini artırmak için biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması kaçınılmazdır. Bitki doku kültürü ve bu in vitro bitki rejenerasyonu, bitkinin genetik iyileştirilmesi için kullanılmış olan bitki biyoteknolojisinin ayrılmaz bir parçasıdır ve bitkilere gen aktarımına yönelik ilk ve temel bir adımdır. Gen aktarımı yapılmış küçük bir hücre kütesinden genetik olarak özdeş bitkileri yeniden üretmek için güvenilir, tekrarlanabilir ve verimli bir sistem olmadan, tam bir genetiği değiştirilmiş bitki üretmek mümkün değildir. Bununla birlikte in vitro rejenerasyon ve sürgün çoğaltma protokollerinin iyileştirilmesi ve standardizasyonu, farklı eksplantların ve genotiplerin çeşitli morfojenik potansiyeli nedeniyle hala zorunludur. *Agrobacterium tumefaciens* aracılı transformasyon, birçok bitkide tercih edilen bir yöntemdir. *Agrobacterium* aracılı gen aktarımı, basit

çalışması, yüksek tekrarlanabilirliği, düşük kopya sayısı ve düşük deneysel maliyeti nedeniyle bitki transformasyonu için en iyi seçimdir. Fakat bu işlem sırasında, eksplant türleri, *Agrobacterium* konsantrasyonu, ko-kültivasyon süresi ve ortam bileşimi gibi birçok faktör gen aktarım verimliliğini etkilemektedir. Bitki genomunda bölgeye yönelik mutasyona izin veren yeni bir bitki yetiştirme tekniği CRISPR/Cas9 yöntemidir. CRISPR/Cas9 yönteminin domateste başarılı bir genom düzenleme aracı olarak kullanılabilmesi için etkili protokolün geliştirilmesi gerekmektedir.

Yapılan bu çalışmanın amacı;

(i): Crocker ticari domates çeşitinde, in vitro çoğaltma ve bitki rejenerasyonu için çeşitli parametrelerin (genotiplerin, sterilizasyon ajanların, eksplant türlerinin, oksin ve sitokinin dengesinin) optimizasyonu yoluyla, ekonomik açıdan önemli olan mahsulün verimli ve tekrarlanabilir bir rejenerasyon sistemini formüle etmeyi amaçlamaktadır.

(ii): Gen aktarım verimliliğinin yüksek olması, gen işlevi ve moleküler ıslah çalışmaları için bir ön koşuldur. Bununla birlikte, domateste gen aktarım verimliliği henüz istenilen seviyede değildir. Burada çeşitli gen aktarım parametreleri optimize edilerek, transformasyon etkinliğini artırmak ve domateste etkili bir *Agrobacterium* aracılı gen aktarımının protokolü geliştirmektir.

(iii): Mevcut çalışma ile model bir organizma olan domates bitkisini kullanarak karatenoid yolağında görev alan *PDS* hedef gen üzerinde gelecekteki işlevsel çalışmalara zemin hazırlamak için CRISPR/Cas9 genom düzenleme aracının optimizasyonu sağlamaktır.

(iv): Çalışmanın diğer bir amacı ise CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi ile *SLACO4* geninin düzenlenmesini yapmak ve bu düzenlemenin polen oluşumu üzerine olan etkilerini belirlemektir.

2. DOMATES HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Domates, dünyanın en önemli taze ve işlenmiş meyvelerinden biridir ve dünya sebze üretiminin %15'inden fazlasını oluşturan, patatesten sonra en önemli ikinci sebze ürünüdür (Rothan et al., 2019). Domates taksonomik olarak, *Solanaceae* (itüzümü ailesi) familyası, *Solanum* cinsi, *Lycopersicon* türü içerisinde yer alır. 3.000'den fazla türü içeren *Solanaceae* familyası, biber ve şili biber (*Capsicum* spp.), patates (*Solanum tuberosum*), patlıcan (*Solanum melongena*), tomatillo (*Physalis ixocarpa*), tamarillo veya ağaç domates (*Solanum betaceum*) ve tütün (*Nicotiana tabacum*) gibi diğer önemli (sebze) mahsulleri içerir (Knapp 2005, Knapp 2008).

1753'te Linnaeus, domatesi *Solanum lycopersicum* olarak adlandırmıştır. On beş yıl sonra, Philip Miller kendi adlandırma sistemini kullanarak *Lycopersicon esculentum* olarak adlandırmıştır. Bu isim yoğun olarak kullanılmış fakat bitki adlandırma kurallarını ihlal etmektedir. Günümüzde *Lycopersicon* ya da *lycopersicum* isimleri bazı kaynaklarda bulunabilmesine rağmen, botanik isimlendirmede tautonimlerin kullanılmasını yasaklayan Uluslararası İsimlendirme Kodunu ihlal ettiği için kullanılmamaktadır. Elde edilen genetik kanıtlar, Linnaeus'un domatesi *Solanum* cinsine koymanın doğru olduğunu ve domatesin *Solanum lycopersicum* olarak adlandırmanın daha doğru bir kullanım olacağı benimsenmiştir (Spooner, Peralta et al. 2005, Peralta, Spooner et al. 2008). Ancak, her iki isim kullanımının da de belirli bir süre literatürde yer alacağı öngörülebilir bulunacaktır.

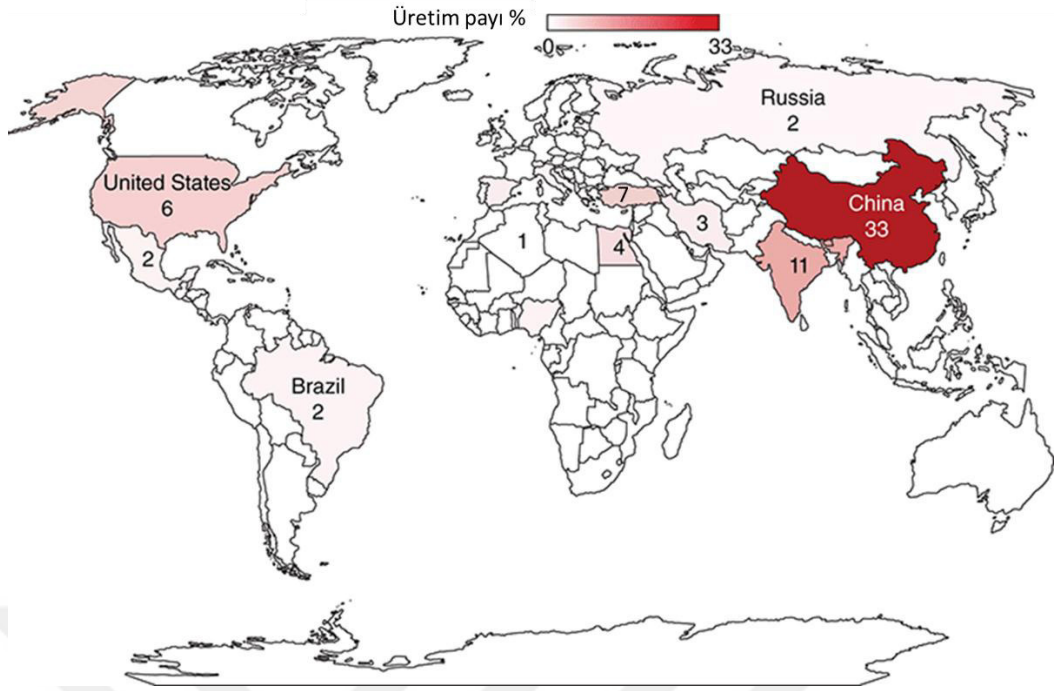
Yetiştiriciliği yapılan domates (*Solanum lycopersicum*, eski adıyla *Lycopersicon esculentum*) Meksika veya Peru'da Kolombiya öncesi zamanlarda kültüre alınmış ve 1521'de İspanyolların Meksika'yı fethinden kısa bir süre sonra Avrupa'ya tanıtıldığı düşünülmektedir. İlk olarak aşk elması olarak tanımlanan domates on altıncı yüzyılın ortalarında Avrupa herbaryumlarında ortaya çıkmıştır (Daunay, Laterrot et al. 2007). Avrupa'dan diğer tüm kıtalara yayıldığı düşünülen domates, bugün patatesten sonra Solanaceous familyasına ait en önemli ikinci bitkidir. Kültürü yapılan domates, kendine ve melezleme ile döllenebilen, kolay yetiştirme ve geniş morfolojik çeşitliliği sayesinde, yirminci yüzyılda mısırın yanı sıra klasik genetiğin başlıca model bitkilerinden biri olmuştur. Domatesin genetik bağlantı haritası, yirminci yüzyılın ilk on yılında, cücelik, meyve ve yaprak rengi, şekli, yüzey yapısı gibi morfolojik karakterlerin Mendel kalıtım analizi ile başlamıştır (Craig 1907, Price and Drinkard

1908).

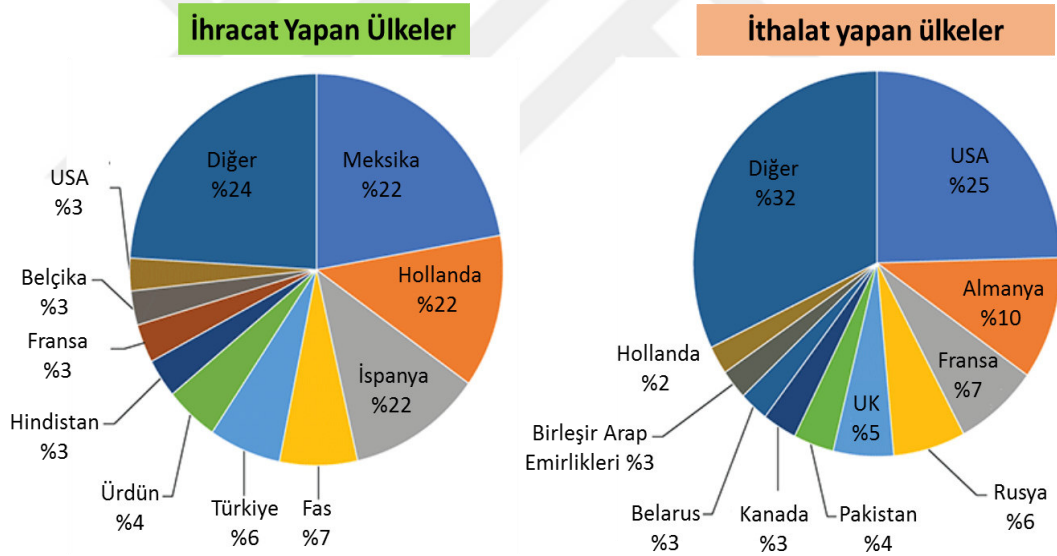
2.1. Domatesin Ekonomik Önemi

Domates, yaygın olarak tüketilen diğer sebzeler arasında yüksek verimli (37.6 ton hektar) mahsul olması nedeniyle dünya çapında yüksek ekonomik değere sahip önemli bir sebze/meyve haline gelmiştir. Dünyada üretilen ilk 10 sebze arasında domates ilk sırada yer alır ve en çok ticareti yapılan ürünlerden biridir (Şekil 2.1). Salatalarda ve bazı yemeklerin yapımında taze domates tüketilmektedir. Minimal olarak işlenmiş domatesler konserve veya ezilmiş formlarda bulunurken, tamamen işlenmiş domatesler arasında meyve suyu, ketçap, salça, püre ve sos ürünleri bulunmaktadır. Çoğu ülkede, günlük diyetin önemli bir gıda bileşenini haline gelmiştir.

Dünyadaki domates üretiminin %61'inden sorumlu domates yetiştiren başlıca ülkeler arasında Çin (%33), Hindistan (%11), Türkiye (%7), Amerika Birleşik Devletleri (%6) ve Mısır (%4) bulunmaktadır. Diğer yüksek üretim yapan ülkeler ise İran, İtalya, İspanya, Meksika, Brezilya, Nijerya ve Rusya'dır (Rothan et al., 2019). 2016 yılında dünya taze ve işlenmiş domates ihracatı 12,8 milyar ABD doları gelir sağlarken, 2017 yılı itibarıyla dünyadaki toplam domates üretimi 4,8 milyon hektardan 182,3 milyon tona ulaşmıştır (FAO, 2017). Taze domates ihraç eden diğer başlıca ülkeler arasında Fas, Türkiye, Ürdün, Hindistan, Fransa, Belçika ve Amerika Birleşik Devletleri bulunmaktadır (Şekil 2.2). Bunlar arasında Amerika Birleşik Devletleri sadece domates ihracatçısı ülke değil, aynı zamanda en çok taze domates ithal eden ülkeler arasında yer almaktadır. Norveç, Finlandiya, İsviçre, İrlanda, İsveç, Almanya, Danimarka, Avusturya ve Kanada 2016 yılında ilk 10 ithalatçı ülke arasında yer almıştır. İthal edilen ithal domates bu ülkelere 2016 yılına göre maliyeti ton başına 2,475- 1,611 dolara mal olmaktadır (FAO, 2017). Bu nedenle domates dünya çapında ekonomik açıdan önemli bir üründür. Domates talebi, daha iyi beslenme kalitesine sahip daha yeni, yüksek verimli çeşitler üretme ihtiyacını da yaratmıştır.



Şekil 2.1. Dünya domates üretim haritası. Sadece birkaç ülkenin adı veya yüzde payı referans için vurgulanmıştır (FAO, 2017).



Şekil 2.2. Dünya domates ihracatı ve ithalatı yapan ülkeler (FAO, 2017).

Domates (*Solanum lycopersicum* L.) dünyada en çok tüketilen sebzelerden biridir ve diğer gıda ürünlerinin temelini oluşturur. Domates, şekerler, mineraller, vitaminler, karotenoidler ve fenolikler gibi önemli bileşikler içermektedir (Coyago-Cruz, Corell et al. 2018). Bu bileşiklerin miktarı genetik, fizyolojik, agronomik, teknolojik veya diğer faktörlerin etkisiyle önemli ölçüde değişebilmektedir. Bu biyoaktif bileşikler, anti-enflamatuvar, anti-alerjenik, antimikrobiyal, vazodilatör, antitrombotik, kardiyο koruyucu ve antioksidan etkiler dahil olmak üzere çok çeşitli

fizyolojik özelliklere sahiptir (Raiola, Rigano et al. 2014). Domatesler, insan diyetindeki ana likopen kaynağını temsil eden karotenoidler bakımından zengindir. Karotenoidler ve polifenolik bileşikler, domateslerin besin değerine katkıda bulunur ve bunların tat, aroma ve doku dahil olmak üzere fonksiyonel niteliklerini ve duyuşal niteliklerini iyileştirir (Raiola, Rigano et al. 2014, Martí, Roselló et al. 2016). Domatesler ayrıca doğal olarak oluşan antioksidanlar vitamin C ve E'ye ve ayrıca şeker, heksozlar, sitrat, malat ve askorbik asit gibi büyük miktarlarda metabolitlere sahiptir (Li, Wang et al. 2018). Domates, sağlığı geliştiren bu bileşikler sayesinde dengeli bir diyetin besleyici bir parçası olarak kolayca diyet programlarına entegre edilebilir (Martí, Roselló et al. 2016). Tüketiciler, taze meyveleri tüketmenin yanı sıra, çorba, meyve suyu, sos gibi işlenmiş ürünlerde domatesi kullanmaktadır. Domatesin besinsel içeriği aşağıda Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Taze domatesin besin değerleri (Anwar, Fatima et al. 2019)

Besin	Miktar	Besin	Miktar
Su	94.52 g	Niasin	0.594 mg
Enerji	18 kcal	Vitamin B-6	0.08 mg
Protein	0.88 g	Ascorbik asit (vitamin C)	13.7 mg
Toplam lipid	0.2 g	Folat, toplam	15 µg
Karbonhidrat	3.89 g	Folate, food	15 µg
Lif	1.2 g	Folate, DFE	15 µg
Şeker	2.63 g	Kolin, toplam	6.7 µg
Kalsiyum (Ca)	10 mg	Vitamin A, RAE	42 µg
Demir (Fe)	0.27 mg	β-karoten	449 µg
Magnezyum (Mg)	11 mg	α-karoten	101 µg
Fosfor (P)	24 mg	Likopen	2573 µg
Potasyum (K)	237 mg	Lutein + Zeaxanthin	123 µg
Sodyum (Na)	5 mg	Vitamin E (α-tocopherol)	0.54 mg
Çinko (Zn)	0.17 mg	Vitamin K (phylloquinone)	7.9 µg
Bakır (Cu)	0.059 mg	Doymuş yağ asitleri	0.028 g
Tiamine	0.037 mg	Yağ asitleri, tekli doymamış	0.031 g
Riboflavin	0.019 mg	Yağ asitleri, çoklu doymamış	0.083 g

Raf ömrü kısa bahçe ürünü olarak domates olgunlaşma, hasat sonrası ve yaşlanma aşamaları da dahil olmak üzere etli meyve gelişiminin karmaşık nüanslarını incelemek için yerleşik bir model sistem haline gelmiştir. Domates 10°C'nin altındaki (soğutma yaralanmasına neden olan) ve 28°C'nin üzerindeki (ısı stresine yol açan) hasara neden olan sıcaklıklara duyarlıdır. Bu, sıcak yaz aylarında uzun mesafeli nakliyyeyi engelleyerek ciddi domates kayıplarına neden olur ve daha uzun süre soğuk

hava deposu kullanımına neden olmaktadır. Bu tür hasat sonrası kayıplar, depolama ve uzun mesafeli nakliye / nakliye sırasında gıda güvenliğine ve ekonomik kayıplara engel oluşturur. Domates de dahil olmak üzere meyve / sebzelerin hasat sonrası fizyolojisi ve biyokimyası, son yıllarda ileri moleküler ve biyokimyasal yaklaşımların ortaya çıkmasıyla geçiş yapmıştır.

2.2. Domates Doku Kültürü

Geleneksel ıslah metotlarının, iş yükü fazla ve zaman alıcı olması, ıslah amaçlarına uygun kriterlerin seçiminde bazı sorunlar oluşmaktadır. Bu nedenle, genetik iyileştirme için basit ve etkili rejenerasyon sisteminin belirlenmesinde hücre ve doku kültüründen yararlanmak temel bir gereksinim haline gelmiştir. İn vitro domates kültürü, yüksek değerli ticari çeşitlerin, virüslerden arı bitkilerin klonal çoğaltılması ve gen aktarımı dahil olmak üzere farklı biyoteknolojik uygulamalarda başarıyla kullanılmıştır (Yarra, He et al. 2012, Namitha and Negi 2013).

Yüksek kaliteli domates bitkilerinin (doku kültürü yoluyla) kitlesel çoğaltılması için uygun maliyetli ve üretken bir protokol geliştirmenin fide maliyetlerini önemli ölçüde azaltmaya yardımcı olabileceği unutulmamalıdır. Etkili bir rejenerasyon sistemi, haploid bitki üretimi, mikro çoğaltım, somatik hibridizasyon, mutasyon ıslahı ve germplazm saklanması gibi tekniklerin başarısı için de ayrıca önemlidir. Domatesle ilgili birçok bağımsız çalışmanın gösterdiği gibi, organogenez yoluyla elde edilen bitki rejenerasyonu, genotip, eksplant kaynağı, eksplantların yaşı, ortam bileşimi ve çevresel koşullar gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (Namitha and Negi 2013, Sherkar and Chavan 2014). Organogenez yoluyla farklı eksplantlardan (kotiledon, hipokotil, yaprak, gövde bölümleri, pedisel, yaprak sapı ve çiçek salkımları dahil) domates gen aktarımı ve in vitro bitki rejenerasyonu ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Chaudhry, Abbas et al. 2010, Ashakiran, Sivankalyani et al. 2011, Mamidala and Nanna 2011, Zhang, Hou et al. 2012, Rai, Singh et al. 2013, Sherkar and Chavan 2014, Wayase and Shitole 2014). Bu raporlar, aynı zamanda gen aktarım çalışmaları için domates bitkisini recalcitrance (inatçı) olarak belirtmektedir. Bu nedenle, domates bitkileri için doku kültürü yöntemlerini kullanarak, bitki rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi, farklı genotiplerin çeşitli morfojenik potansiyelleri de dikkate alınarak belirlenmesi halen önemlidir. Yukarıda bahsedildiği gibi, bilim insanları farklı domates türleri ve farklı eksplant kullanmışlardır, ancak eksplant türlerinin yalnızca eksplantların organogenezinin sıklığını değil, aynı zamanda eksplant başına üretilen

filiz sayısını da belirlediği vurgulanmalıdır (Bahurupe, Patil et al. 2013). Namitha ve Negi (2013), sürgün rejenerasyon yeteneğinin etkinliğinin hipokotil> kotiledon> yaprak sırasını takip ettiğini göstermiştir. Mamidala ve Nanna (2011) kotiledon eksplantlarının, hipokotiller ve yaprak eksplantlarına göre daha iyi organogenez üstünlüğüne sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yaprak eksplantlarının, test edilen ortamlardan yalnızca birinde etkili rejenerasyon gösterirken (MS + 2 mg/L BAP, + 0.1 mg/L IAA), bu tür eksplantların kullanılmasının genotipe bağlı varyasyonları en aza indirebileceğini göstermektedir. Bu raporun aksine, Chaudry vd. (2010), yaptıkları çalışmada hipokotiller, yaprak eksplantlarından daha yüksek rejenerasyon potansiyeli göstermiştir. Ashakiran vd. (2011) TDZ'nin (Thidiazuron) kotiledon ve yaprak saplarından organogenez indüksiyonu üzerindeki etkisini incelemiş, benzer sonuçlar elde etmiştir. Öte yandan, Zhang vd. (2012) eksplantların kesilen bölgesinde oluşan yaranın, kallus indüksiyonunu ve adventif tomurcuk oluşumunu önemli ölçüde etkilediğini belirtmiştir. En yüksek tomurcuk indüksiyon sıklığının kotiledon segmentinin orta kısmında meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca, bir eksplantın bir ortama yerleştirilme şeklinin kotiledon tomurcuklarının farklılaşma oranını etkilediğini ve kotiledonun ortam yüzeyine alt kısmının gelecek şekilde yerleştirilmesinin en iyi olduğunu kanıtlamışlardır.

Rejenerasyon sürecinin eksplantların yaşına bağlı olduğu iyi bilinmektedir. Genç eksplantların daha yaşlı olanlara göre daha iyi morfojenik yanıt verdikleri bildirilmiştir. Eksplant türüne göre farklı yaştaki fideler (7, 8, 10 veya 14 günlük) kullanılmıştır (Ishag, Osman et al. 2009, Bahurupe, Patil et al. 2013). Ayrıca, birçok veri, eksplantların boyutunun domatesde verimli bitki rejenerasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir. Domatesler için en uygun eksplant boyutunun, hipokotiller için 0,7–2 cm ve kotiledonlar için 5 mm × 5 mm olduğu belirtilmiştir (Ishag, Osman et al. 2009, Chaudhry, Abbas et al. 2010).

İn vitro bitki rejenerasyonu için kullanılan iki temel yöntem vardır: somatik embriyogenesis (doğrudan veya dolaylı) ve organogenesis (doğrudan ve dolaylı). Kalıtım veya genetik mühendisliği üzerine araştırma yürütme açısından ikinci yol, genetik çeşitlilikten kaçınmaya izin verdiği için daha çok arzu edilmektedir. Bu nedenle, yayınlanan prosedürlerin çoğu, bozulmamış eksplantlardan doğrudan organogenesis'e dayanmaktadır. Somatik embriyogenez yoluyla domates rejenerasyon çalışmaları oldukça sınırlıdır. Ancak Godishala ve ark. (2011), somatik embriyogenez

yoluyla domates cv S-22 rejenerasyonu için basit ve tekrarlanabilir bir protokol bildirmişlerdir (Godishala, Mangamoori et al. 2011).

Bir ortamdaki ekzojen fitohormonlar, kallus indüksiyonunun ve organ farklılaşmasının veya köklenmesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Çok sayıda rapora göre IAA (İndol-3-Asetik Asit), NAA (α -Naftalenasetik asit), 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit), ZT (Zeatin) ve 6-BAP (6-Benzilaminopurin), kallus indüksiyonunu ve bitki rejenerasyonu için in vitro domates kültürlerinde yaygın olarak kullanılan hormonlardır (Ashakiran, Sivankalyani et al. 2011, Mamidala and Nanna 2011, Zhang, Hou et al. 2012). KIN (Kinetin), 2iP (6- (γ , γ -dimetilalilamino) purin), TDZ ve IBA (İndol-3-butirik asit), test edilen diğer bitki büyüme düzenleyicileridir (PGR) (Ishag, Osman et al. 2009). Farklı türdeki eksplantlardan domates sürgün oluşumu, ortam koşullarının modifikasyonu yoluyla farklı kültürlerde elde edilmiştir. Dahası, kullanılan bazal ortam türünün rejenerasyon sürecini önemli ölçüde etkileyebileceği gösterilmiştir (Ashakiran, Sivankalyani et al. 2011). Rashid ve Bal (2010), 0,5 mg/L kinetin ve 0,5 mg/L BAP eklenen MS besi ortamı doğrudan sürgün rejenerasyonunu uyarmak için en uygun ortam olduğunu göstermiştir (Rashid and Bal 2010). Bu bulguların aksine Wu ve ark. (2011) B5 bazal besiyerinin MS ortamına üstünlüğünü vurgulamıştır. Yapılan bu çalışmada, MicroTom eksplantlarından elde edilen sürgünlerin B5 besi ortamı üzerindeki rejenerasyon oranı MS besi ortamı göre önemli ölçüde daha yüksek (+%12) olarak gözlemlenmiştir. Pawar vd. (2012), 2 mg/L zeatin ve 0.2 mg/L IAA ile desteklenen MS besi ortamında oldukça yüksek sayıda rejenerasyon (% 87-91) elde etmiştir (Pawar, Jadhav et al. 2012, Zhang, Hou et al. 2012). Öte yandan, BAP (2 mg/L) ve IAA (0.1 mg/L) kombinasyonu ile oluşturulan MS, sürgün rejenerasyonunu (% 74) ve hipokotillerden eksplant başına çoklu sürgün oluşumunu indüklemek için en iyi besi ortamı olarak bulunmuştur (Namitha and Negi 2013). Birçok çalışmanın aksine, Ali ve ark. (2012), 1mg/L kinetin ve 1mg/L kombinasyonu ile desteklenen bir MS ortamının domateste hipokotil ve kotiledon ekplantlarından eksplant başına en yüksek sayıda sürgün üretmek için ideal olabileceğini ileri sürmüştür (Ali, Yossef et al. 2012).

Bitki doku kültürlerinde, bitkilerin büyümesi ve yenilenmesi, besi ortamına konan organik bileşenler tarafından geliştirilebilir. Genel olarak, bu besinler farklı konsantrasyonlarda vitamin, amino asit, yağ asitleri, peptit, karbonhidrat veya doğal PGR potansiyel bir kaynak olabilir. Bunlardan biri, birkaç bileşiğin karmaşık bir

kombinasyonunu içeren hindistancevizi sütüdür (CM). CM, ağırlıklı olarak orkide doku kültüründe kullanılır. Afroz vd. (2010) beş çeşit domatesin in vitro rejenerasyon verimliliğini artırmak için CM kullanmış ve CM'nin bitki hücresi çoğalmasını ve bunların hızlı büyümesini uyardığı bildirmiştir (Afroz, Chaudhry et al. 2010). Bhatia ve Ashwath (2005) kotiledon eksplantlarından sürgün rejenerasyon yanıtını iyileştirmek için aktif kömür, askorbik asit ve kazein hidrolizat gibi diğer adjuvanları kullanmıştır. Sonuç olarak, aktif kömürün ve askorbik asidin rejenere domates filizlerinin kalitesini iyileştirebileceğini, kazein hidrolizatın ise sürgünlerin altında kallus oluşumunu azaltmak için etkili bir şekilde kullanılabileceğini ve somaklona varyasyon olasılığını azalttığını göstermiştir (Bhatia and Ashwath 2005).

Işık ve sıcaklık gibi çevresel faktörler doku kültürü uygulamalarında bitki rejenerasyonunu doğrudan etkileyen çok önemli bileşenlerdir. Işığın (maruz kalma süresine veya kalitesine göre) eksplant büyümesi ve farklılaşma süreçlerini doğrudan etkilediği bilinmektedir. Domates eksplantlarının doku kültürüne tepkisi, bir ana bitkinin büyümesi sırasında kullanılan ışığın kalitesine ve miktarına bağlı olarak değişmektedir. Nitekim Glowacka (2004) kırmızı, sarı, yeşil, mavi ve doğal ışığın domateslerin mikro çoğalması üzerindeki etkisini araştırmıştır. Bu çalışmada, kırmızı ve sarı ışığın sürgün ve boğum arası uzama üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu göstermiş ve bitkiciklerin kesilmesi kolaylaştırmıştır. Öte yandan, mavi ve doğal ışık, sürgün ve internodların uzamasını engellemiştir (Glowacka 2004). Rejenerasyon süresinin uzatılması, kırmızı ve sarı ışık altında bitkilerin büyümesi üzerinde hiçbir etkiye sahip değildir. Kırmızı ve sarı ışığın kök oluşumu üzerinde olumlu etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Domates sürgün rejenerasyonu için ışık vazgeçilmez olduğundan, domates rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda 16 saatlik fotoperiyottan faydalanılmıştır (Ali, Yossef et al. 2012, Zhang, Hou et al. 2012). Örneğin, Bhatia ve Ashwath (2005) 16/8, 22/2 ve 24/0 aydınlık karanlık maruz kalan eksplantlarda maksimum sürgün rejenerasyon tepkisinin sırasıyla %60, 47 ve 40 olduğu belirlemiştir.

Köklendirme, bitki doku kültürlerinde rejenerasyon protokolünün son adımıdır. Köklenme sürecini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır (Örn. fidelerin fizyolojik durumu, besiyeri kompozisyonu, büyüme düzenleyicileri). Çoğunlukla tam MS veya ½ MS, bazal besi ortamları köklendirme çalışmalarında kullanılmaktadır. Rashid ve Bal (2010) ve Bahurpe ve ark. (2013), kök indüksiyonu için domatesin herhangi bir

eksojen bitki büyüme düzenleyicisine ihtiyaç duymadığını öne sürmüştür (Bahurupe, Patil et al. 2013). Ancak, 0.1-1 mg / L arasında değişen konsantrasyonlarda tek başına oksinlerle (IAA, NAA veya IBA), kök oluşumu artırmak ve hızlandırmak amacıyla kullanılabilmektedir (Bahurupe, Patil et al. 2013). Domates bitkisinde genellikle köklenme 2 hafta sonra görülebilmektedir (Bahurupe, Patil et al. 2013).

2.3. Domates Bitkisine *Agrobacterium* Aracılı Gen Aktarımı

Domates bitkisine *Agrobacterium* kullanarak gen aktarımı ilk olarak 1986 yılında bildirilmiştir (McCormick, Niedermeyer et al. 1986). O zamandan beri, çeşitli eksplantlar (ör. kotiledon, hipokotil, yaprak) kullanılarak farklı domates çeşitleri için çeşitli gen aktarım protokolleri geliştirilmiştir (Qiu, Diretto et al. 2007, Cruz-Mendivil, Rivera-López et al. 2011, El-Siddig, El-Hussein et al. 2011, Wu, Sun et al. 2011, Chetty, Ceballos et al. 2013). Bitkilere yapılacak gen aktarım çalışmaları çok kompleks olup başarı oranı birçok faktöre bağlı olarak önemli oranda değişmektedir. Bu faktörlerin başında besi ortamına Asetoşiringon eklenmesi, pre-kültür besi ortamı ve zamanı, bakteriyel faktörler (*Agrobacterium* suşu ve kültür yoğunluğu), eksplanta bağlı faktörler (eksplant tipi, kaynağı ve genotip), plazmit vektör çeşit ve özellikleri, besi ortamı kompozisyonu, antibiyotiklerin türü ve konsantrasyonu ve ko-kültivasyon süresi gibi faktörler gelmektedir (Bhupendra, Sugandha et al. 2014). Ne yazık ki, bugüne kadar geliştirilen *Agrobacterium* aracılı gen transformasyon protokolleri, domates çeşitlerinin rejenerasyon kapasitesinin düşük olmasından dolayı halen uygun değildir (Afroz vd. 2010). Bununla birlikte, yeni çeşitlerde verimli bir gen aktarım protokolü oluşturmak için çalışmalar halen devam etmektedir. Domates plastidlerine gen aktarımı için bir sistemin geliştirilmesi, domatesin gen aktarım çalışmalarında bir kilometre taşı olmuştur (Ruf, Hermann et al. 2001). Bu nispeten yeni gen aktarım yöntemi, domateslerdeki pro-vitamin A içeriğini yükseltme olasılığını araştırmaya izin vermiştir (Apel and Bock 2009). Bir eubacterium *Erwinia herbicola*'dan ve daha yüksek bir bitki olan nergisden (*Narcissus pseudonarcissus*), likopen plant-siklaz genleri karotenoid biyosentezini arttırmak için domates plastid genomuna aktarılmış ve likopenin provitamin A'ya dönüşmesi sağlanmıştır (Apel ve Bock 2009). Sonuç olarak transplastomik domates bitkilerinde karotenoid birikimi %50 artmıştır. Domates kloroplast transformasyonun başka bir örneği, Zhou ve ark. (2008), HIV antijenleri p24 ve Nef'in domates bitkilerinin plastidinde ifade edilebileceğini göstermiştir (Zhou, Badillo-Corona et al. 2008).

Son zamanlarda, domates bitkilerinin kararlı bir gen aktarımı için birkaç prosedür bildirilmiştir (Sharma, Solanke et al. 2009). Buna rağmen, transgenlerin fonksiyonel analizini etkin bir şekilde belirlemek için verimli, basit ve güvenilir bir protokol ihtiyaç olduğu bildirilmektedir (Sharma vd. 2009). Bu sorunun üstesinden gelmek için bilim adamları transient gen aktarım yönteminden yararlanmıştır. Bu alternatif teknoloji, arzu edilen genlerin (transgenler) fonksiyonel analizi için hızlı bir araç sağlayabilir. Jaberolansar et al. (2010), Romero et al. (2011), Tütün Rattle Virüsü (TRV) tabanlı VIGS vektörünün, genleri susturmak için domateste kullanılabileceğini başarıyla göstermiştir (Jaberolansar, Hayati et al. 2010, Romero, Tikunov et al. 2011). Belirtilen yöntemin meyvelerde geçici ifadesi için paha biçilmez bir araç olduğu ve aynı zamanda o organla ilgili fonksiyonel araştırmayı önemli ölçüde kolaylaştırdığı belirlenmiştir. Hasan vd. (2008), agroinjeksiyon yöntemini kullanarak, stabil gen aktarımı yaparak transgenik domates meyvesi elde etmiştir. F2 bitkilerinde yapılan analizler sonucunda transgenik verimliliği %54 ile 68 arasında değişmiştir.

3. GENOM DÜZENLEME

Genom düzenleme (GD), hedef dizide insersiyon, delesyon ya da baz substitüsyonu gibi DNA üzerinde mutasyon oluşturmak için kullanılan bir tekniktir (Feng vd. 2013). Genom düzenleme teknolojilerinin temel hedefi, belirli DNA dizilerini tanımak ve hedeflenen bölgelerde çift sarmal DNA kırılmaları (DSB'ler) üretmek için diziye özgü nükleazların kullanılmasıdır. Oluşturulan çift sarmal DNA kırıkları, homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve homolog rekombinasyon (HR) olarak iki yolla tamir edilmektedir (Voytas and Gao 2014). Hücreler çoğu durumda DSB'lerin tamirinde NHEJ yolunu kullanmaktadır. Ancak NHEJ tamir mekanizması hataya meyillidir ve genellikle ekleme veya silme mutasyonları ile sonuçlanmaktadır (Yin ve Quin 2019). DSB'lerin homolog rekombinasyon yolu ile baz veya gen değişimi meydana gelerek onarımı mümkündür (Yin and Qiu 2019).

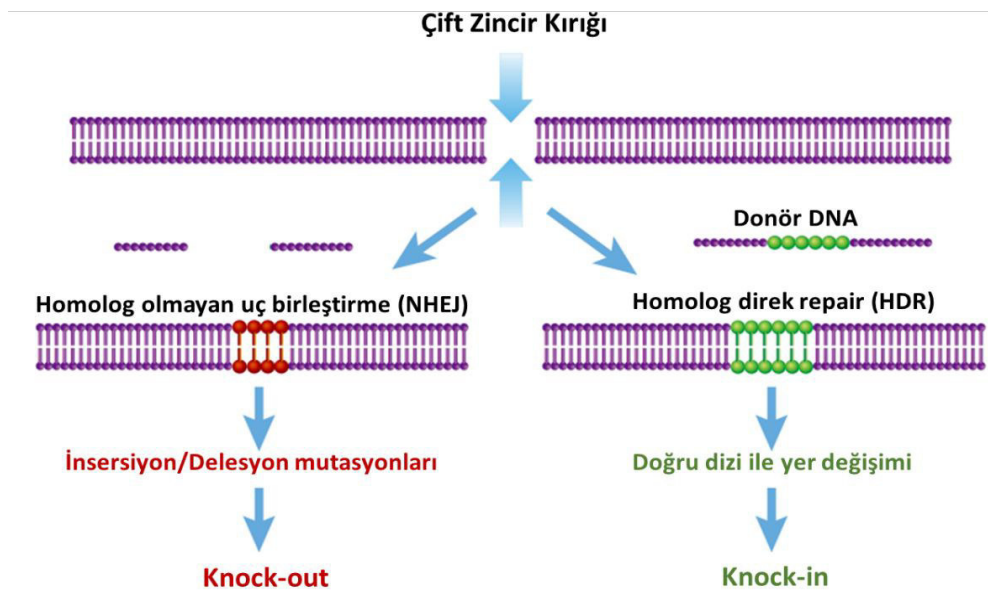
Genom düzenleme araçları, protein ile yönlendirilebilen birinci nesil nükleazlar (MN (meganulceases), ZFN (Zinc Finger Nucleases) ve TALEN (Transcription activator-like effector nucleases)) ve RNA ile yönlendirilen ikinci nesil nükleazlar (CRISPR/Cas9 ve CRISPR/Cpf1 için) olmak üzere sınıflandırılabilir.

TALEN'ler, ZFN'ler ve MN'ler, genom manipülasyonu için birinci nesil düzenleme araçlarıdır. Birinci nesil genom düzenleme yaklaşımları ile karşılaştırıldığında, CRISPR/Cas9 tekniği gibi ikinci nesil genom düzenleme araçlarının aynı amaçlar için kullanımı daha kolaydır (Moscou and Bogdanove 2009, Shan, Wang et al. 2013). CRISPR/Cas9 sistemi, TALEN'lerin ve ZFN'lerin aksine yalnızca tek kılavuzlu RNA (sgRNA) ve Cas9 proteinini içerdiğinden tasarımı çok basittir. ZFN'ler herhangi bir bölgeden DNA dizisini kesmek için kullanılan hedeflenebilir DNA kırıkları oluşturabilen proteinlerdir. TALEN'ler DNA hasar tamir yolağını tetikleyerek, genom modifikasyonuna yol açan hedef dizide çift zincir kırıkları (DSBs) oluşturabilmektedir (Gaj, Gersbach et al. 2013). ZNF ve TALEN'lerin etkin kullanılmalarını engelleyen bazı kısıtlamaları olmasına rağmen insan, hayvan ve bitki çalışmalarında kullanılmaktadırlar. ZFN'nin özgüllüğü sınırlıdır ve çoğunlukla hedef dışı mutasyon meydana getirebilmektedir (Puchta 2017). ZFN ve TALEN'lerde vektör oluşturmak zaman alıcı ve protein mühendisliği gerektirdiğinden dolayı laboratuvar çalışmalarında iş yükü de fazladır. Bu kısıtlamalar nedeniyle, TALEN'lerin ve ZFN'lerin bitkilerdeki uygulamaları sınırlı kalmıştır (Jinek, Chylinski et al. 2012). Verimli ve etkin bir genom düzenleme aracı geliştirmek için sürekli

inovasyon çalışmaları, bitki biliminin çeşitli alanlarında CRISPR/Cas9 sisteminin uygulamalarını genişletmiş ve hızlı bir şekilde umut verici bir genom düzenleme aracı haline gelmesini sağlamıştır (Feng, Zhang et al. 2013, Nekrasov, Staskawicz et al. 2013).

3.1. DNA Kırıkları Tamir Mekanizması

Bitki hücrelerinin genomu hem hücre içinde hem de hücre dışında üretilen maddeler tarafından zarar görebilmektedir. Reaktif oksijen türleri olarak hücrenin kendi metabolizmasının yan ürünleri, çevresel radyasyona, kimyasal maddeler veya ultraviyole ışığa (UV) maruz kalma DNA'ya zarar verebilir. Genoma yapılan bu saldırılar sonucunda, her hücrede günde birden fazla DNA'da mutasyon oluşmasına neden olur ve bunlar içerisinde en zararlı olan çift zincir DNA kırıklarıdır (DSBs). Tamir edilemeyen ya da kısmi tamir edilen DSBs'ler indüklenmiş apoptoz veya kromozomal anormallikler (translokasyonlar veya delesyonlar) ile sonuçlanabilir. Genomun bütünlüğünün korunması açısından bu kırıkların tamir edilmesi oldukça önemlidir. (Çetintas, Kotmakçi et al. 2017). Ökaryot hücrelerde DNA çift zincir kırıklarının tamirinde iki mekanizma kullanılmaktadır. Birincisi hücre tarafından en fazla tercih edilen homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ)'dir ve tamir mekanizmasında en önemli rolü oynamaktadır. İkinci mekanizma homolog direkt rekombinasyon (HDR) olarak adlandırılan yüksek verimli DSB onarım yoludur (Davis and Chen 2013). NHEJ, özünde hataya açık bir yoldur, HDR ise doğru onarımla sonuçlanır (Mao, Bozzella et al. 2008).



Şekil 3.1. Genom düzenlenmesinde DNA tamir mekanizmaları
(<https://www.genscript.com/gfiles/techfiles/CRISPR-Handbook>)

Daha önce açıklandığı gibi, CRISPR/Cas9 sistemi DNA'da DSB'ye neden olur ve daha sonra bu kırıklar hücrelerin endojen onarım mekanizmalarından yararlanarak tamir edilebilmektedir. NHEJ ile tamir hataya meyilli olduğundan çerçeve kayması mutasyonları (Frameshift mutations) ve InDel mutasyonu adı verilen insersiyon/delesyon mutasyonlarına neden olur. Bu mutasyonların kazanılması ile gen ürünü bozulduğundan, NHEJ gen çıkarma (knock-out, KO) uygulamaları için oldukça uygundur. CRISPR/Cas9 teknolojisinin kullanıldığı uygulamalarda Cas9 ve gRNA'nın transfeksiyonu sırasında hedef DNA dizisiyle homoloji gösteren bir verici (donör) DNA dizisinin de hücreye verilmesiyle HR yoluyla genom içine bu DNA dizisinin eklenmesi (knock-in) sağlanabilmektedir. Farklı çalışma grupları tarafından yapılan uygulamalarda homolog rekombinasyon yoluyla insersiyon, delesyon ya da dizi değişikliği yapabilmek mümkün olmuştur (Sander and Joung 2014, Çetintas, Kotmakçi et al. 2017).

3.1.1. Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ)

Homolog olmayan uç birleştirme (Non Homologous End Joining) terimi 1996 yılında Moore ve Haber tarafından geliştirilmiştir (Moore and Haber 1996). DNA zincirleri, HDR onarım mekanizmasına kıyasla homolog bir şablona ihtiyaç duymadan ortamda bulunan nükleotidler doğrudan bağlandığından, homolog olmayan olarak adlandırılmaktadır. DNA'da DSB'den kaynaklanan kırık yapışkan uçlar mükemmel uyumlu olduğunda, NHEJ genellikle kırılmayı doğru bir şekilde tamir etmektedir. Çıkıntıların uyumlu olmadığı zıt senaryoda, nükleotidlerin kaybına/eklenmesine yol açan kesin olmayan onarım ortaya çıkar (Budman and Chu 2005). Ökaryotik hücreler için (maya hariç), DNA uçlarının yapısından bağımsız olarak NHEJ onarımı için üç adım tanımlanmıştır. NHEJ'in ilk aşaması, Ku70 ve Ku80 heterodimerik protein kompleksini tarafından kırık DNA uçlarını tanıdığı ve bunları bağlandığı DNA uç bağlama aşamasıdır. Ku70 ve Ku80 kompleksi aynı zamanda DNA-bağımlı protein kinaz katalitik alt birimi (DNA-PKcs) ile birleşir (Iyama and Wilson III 2013). Bu multiprotein kompleksi DNA uçlarını stabilize eder ve hizaya sokar. Ku proteinleri bağlandığı zaman, DNA ligaz IV dahil birkaç nükleer proteini fosforile eden DNA-PK'nin katalitik alt birimini bağlayarak kompleks oluşturur. Her bir çift zincir kırık uçlarında konumlandırılmış iki Ku proteinleri ile DNA-PKcs arasındaki etkileşim meydana gelir (Çetintas, Kotmakçi et al. 2017). Daha sonra DNA PKcs otofosforilasyon yaparak protein kinaz etkinliğini aktif hale getirir. İkinci adım işlemin sonlandırılması

adımıdır ki bu adımda yanlış ve hasar görmüş nükleotidler çıkarılır. DNA-PKcs bir endonükleaz olan Artemisi aktive eder. Artemis komplementer nükleotid uzantılarını ortaya çıkarmak için kırık 3' ve 5' tek zincir çıkıntılarını düzeltir ve bu çıkıntılar bir polimeraz (Pol λ ve Pol μ) ile doldurulabilir. Üçüncü adım lidasyon aşamasıdır. Katalitik alt birim DNA ligaz IV ve onun kofaktörü XRCC4 ile bazı yardımcı faktörlerden oluşan DNA ligaz IV kompleksi tarafından ligasyon yapılarak onarım işlemi tamamlanır (Bennardo, Gunn et al. 2009, Waters, Strande et al. 2014).

3.1.2. Homolog Rekombinasyonel Onarım (HDR)

HDR (Homologous-Directed Repair), CRISPR sistemi tarafından indüklenen DSB gibi DNA kırıklarını onarmak için daha uzun dizi homolojisi kullanmaktadır (Davis ve Chen 2013). Hasarlı ve kaynak DNA arasındaki gerekli dizi homolojisi göz önüne alındığında, DSB onarımı için en uygun mekanizma olduğu vurgulanmıştır. Onarım için kullanılan DNA şablonu DSB'deki orijinal DNA dizisi ile aynıysa işlem hatasız olarak gerçekleşirken, hasarlı DNA içerisine çok spesifik mutasyonlar ya da eklemeler meydana gelmektedir (Davis ve Chen 2013). HDR'nin dört ana yolu bildirilmiştir. Klasik çift sarmallı kırılma onarımı (DSBR), sentez bağımlı sarmal bağlanma (SDSA) kırılmaya bağlı onarım (BIR) ve tek sarmallı bağlanmadır (SSA) (Saleh-Gohari and Helleday 2004).

Kırılmaya bağlı onarım (BIR), esas olarak hücrenin ölümsüzleştirilmesinde anahtar bir özellik olan telomerlerin uzunluğunun korunmasına yardımcı olduğu rapor edilmiştir (McEachern and Haber 2006). Tek sarmallı bağlanma SSA genetik materyalin silinmesine neden olduğu için onarım sırasında başka bir DNA molekülüne ihtiyaç duyulmaz ve diğer DNA onarım yöntemlerinde yer alan moleküller tarafından baskılanır (Mansour, Schumacher et al. 2008). CRISPR kaynaklı oluşturulan mutasyonlarda, DSB onarımı gibi genom düzenleme uygulamaları için yalnızca DSBR ve SDSA kullanılır.

DSB'ler ilk olarak MRN kompleksi, tarafından tanınmaktadır (Saleh-Gohari ve Helleday 2004). MRN kompleksi Mre11, Rad50 ve Nbs1 proteinlerinden oluşmaktadır. Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) kompleksi kırılmanın her iki tarafında DNA'ya bağlanır ve ardından 3'-çıkıntı oluşturmak için 5' ucunda parça alınmasına izin verir. MRN Bu diğer hasar tanıma proteinlerini toplamak için bir sinyal olarak rol oynamaktadır (Iyama and Wilson III 2013). MRN, Sae2 proteinini ile bağlayarak bu iki protein, kırığın her iki tarafında 5'-ucunu geriye doğru keser. Komplementer ipliğin

5'→ 3' nükleotid çıkarılması Sgs1 helikaz, Exo1 ve Dna2 nükleazları ile daha kapsamlı olarak kesim devam eder (Mimitou and Symington 2009). Bir tek zincir DNA bağlayan heteromerik kompleks olan RPA (Replikasyon proteini A) uzamış tek zincir DNA'ya bağlanır ve diğer proteinlerin yardımıyla, Rad51 proteini, RPA ile kaplanmış tek DNA ipliği üzerinde bir nükleik asit ve protein filamenti oluşturur (Jekimovs, Bolderson et al. 2014). RPA'nın bağlanmasıyla tek zincirli DNA stabilize hale getirilmekte ve nükleazlardan korunması sağlanmaktadır. Bu filaman daha sonra 3'-çıkıntıya benzer DNA dizilerini aramaya başlar. Kardeş kromatid'de böyle bir dizi bulduktan sonra, tek sarmallı nükleoprotein filamenti, kardeş kromatid'de zincir invazyonu gerçekleşir (yani istila eder). İstilacı 3'-çıkıntılı iplik ve homolog kromozom arasında iplik invazyonu sırasında bir yer değiştirme loop'u (D-loop) oluşur. Daha sonra, bir DNA polimeraz, yeni DNA'yı sentezleyerek istilacı 3'-sarmalın sonunu uzatır. Bu, D-loop, Holliday junction (HJ) olarak bilinen çapraz şekilli bir yapıya dönüşür. Rad51 nükleoprotein filamenti ile kaplanmış tek zincir DNA sağlam homolog DNA bölgesinin zincir invazyonunu gerçekleştirir. Değişim ve invazyonu takiben, bir polimeraz (genellikle pol δ) tarafından DNA uzatılır ve ligasyonla süreç tamamlanır (Wold 1997).

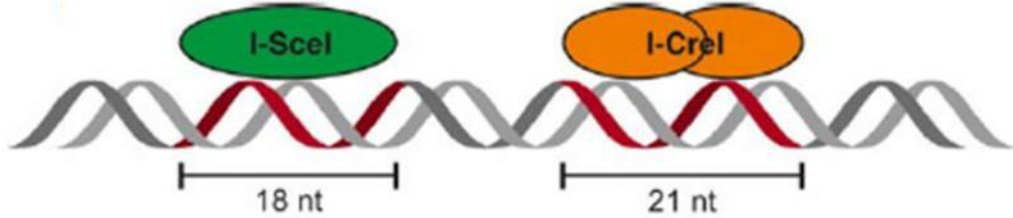
HDR, hücrenin G1 fazında neredeyse yoktur, en çok S fazında aktiftir ve G2 / M fazında ise azalır (Mao, Bozzella et al. 2008). Kardeş kromatidlerin daha kolay elde edilebildiği, DNA replikasyonu sırasında ve hemen sonrasında meydana gelir (Shrivastav, De Haro et al. 2008). HDR, CRISPR sistemlerinde belirli bir konuma, istenen bir gen setini eklemek için kullanılır.

3.2. Genom Düzenleme Araçları

3.2.1. Meganükleazlar (MNs)

Sekans spesifik nükleazlarda, meganükleazların bitkilerde genom düzenleme amacıyla yaygın olarak kullanılan öncü nükleaz sınıfıdır (D'Halluin, Vanderstraeten et al. 2013). Meganükleazlar ayrıca homing endonükleazlar olarak da adlandırılmaktadır. Çeşitli genomlarda çift zincir DNA kırıkları oluşturmak amacı ile kullanılmıştır (Stoddard 2011). Meganükleazlar, yaklaşık ~ 12–40 bp'lik hedef DNA dizilerini tanıma yeteneğine sahiptir ve bu, meganükleazları bitki RNA virüsleri de dahil olmak üzere tüm vektörler için en etkili aktarım yöntemi kılmaktadır (Marton, Zuker et al. 2010). Diğer sekansa spesifik nükleazlar ile karşılaştırıldığında, meganükleazlar doğal olanlardan farklı hedef diziler için yeniden tasarlanması zordur. Spesifik proteinlerin

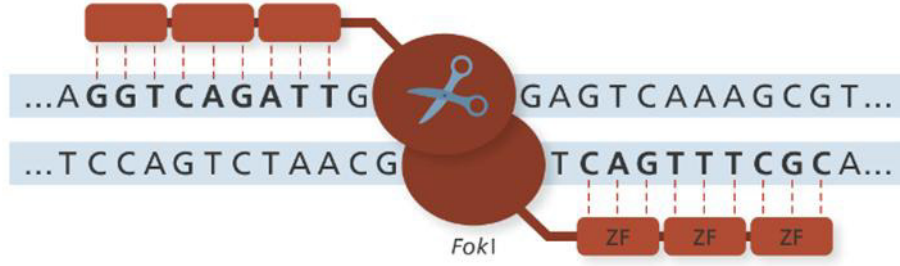
modüler olmayan özellikleri, meganükleazların yeniden tasarlanmasındaki engelin ana nedenidir. Bu nedenle, bitkiler için meganükleazların uygulamaları yalnızca I-SceI ve I-CreI nükleazları gibi doğal olarak var olan meganükleazlar ile sınırlandırılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Meganükleazların yapısal gösterimi. Meganükleazlar çift sarmal hedef DNA'ya bağlanma ve çift zincir kırıkları oluşturma yeteneğine sahiptirler. Meganükleazlar 14-40 bp'lik hedef ara sekansa bağlanmaktadır.

3.2.2. ZFN (Zinc Finger Nucleases)

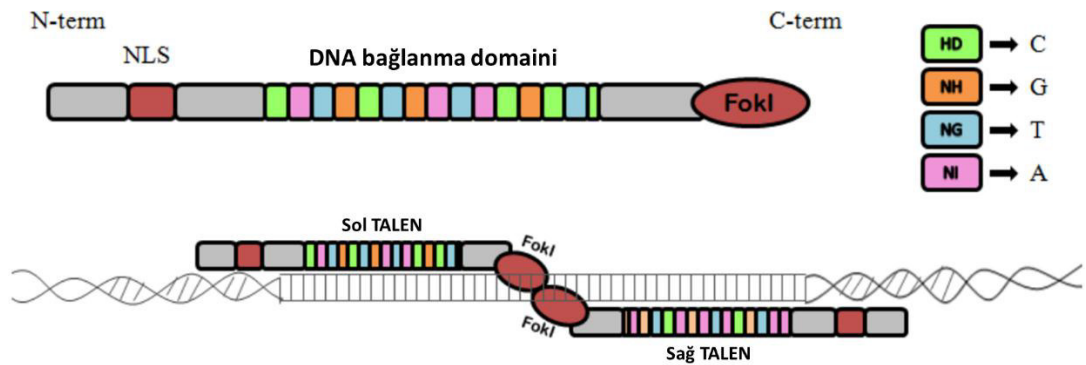
ZFN'ler 2005 yılında bitki genom düzenlemede kullanılan ilk genom düzenleme aracıdır (Lloyd, Plaisier et al. 2005). ZFN'ler tip II restriksiyon endonükleaz FokI enziminin spesifik olmayan DNA kesme domaini ile sekansa spesifik çinko parmak DNA-binding domainlerinin yapay olarak birleştirilmesi sonucunda oluşturulmuştur. DNA-binding domainleri birkaç bağlı çinko parmak motifi (ZFs) içerir ki her bir motif, 3-bp spesifik DNA dizisini tanımaktadır. Tek ZFN tipik olarak 3 ile 6 ZFs içerir ve 9-18 bp uzunluğunda spesifik DNA dizisini tanıyabilir. FokI nükleazlar çift-zincir DNA kırıkları oluşturabilmek için dimerize olmalıdır. Bu nedenle, istenilen DNA bölgesinde çift zincir DNA kırıkları üretmek için bir çift ZFN tasarlamak gereklidir. FokI dimerizasyonunu elde etmek için, iki ayrı ZFN'nin sırasıyla ileri ve geri iplikçiklere bağlanması gerekir ve ileri ve geri olmak üzere iki hedef sekans, 5 ila 7 bp aralayıcı sekans ile ayrılmalıdır. ZFN'ler kullanılarak genom modifikasyonu soya, pamuk, mısır, tütün ve *Arabidopsis* dahil birçok bitkide başarılı bir şekilde yapılmasına rağmen tasarlanan tüm ZFN'ler DSB'leri verimli bir şekilde oluşturamamaktadır (Zhang, Maeder et al. 2010, Sander, Dahlborg et al. 2011). ZFN'lerin birleştirilmesi ve tasarımı teknik olarak zordur ve ZFN modüllerinin ticari olarak sağlanması pahalıdır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Çinko parmak nükleazların yapısal gösterimi

3.2.3. TALEN

ZFN'ler gibi TALEN'ler de *FokI* nükleaz enzimi ile TALE tekrarlarının birleştirilmesi ile oluşur (Şekil 3.4). Fakat her bir TALE tekrarı tek bir nükleotidi hedefler, daha esnek hedef tasarımına izin verir ve ZFN'ler tarafından hedeflenebilecek olanlara göre potansiyel hedef alanların sayısını artırır. TALEN aracılığı ile GD arpa, patates, şeker kamışı, soya, çeltik, mısır ve buğday dahil olmak üzere birçok bitkide gösterilmiştir (Martínez-Fortún, Phillips et al. 2017). Ürün geliştirmede TALEN-aracılı genom düzenlemenin ilk uygulaması çeltik bitkisinde yapılmış, bakteriyel yanıklık hastalığına duyarlılık sağlayan *OsSWEET14* geninin parçalanması sonucunda elde edilen mutant hatlar bakteriyel yanıklık hastalığına dirençli olduğu bulunmuştur (Liu, Zhang et al. 2020). Benzer şekilde, TALEN'ler buğdayda, küllenmeye karşı dayanıklı buğday oluşturmak için üç *TaMLO* homolog genini susturmak için kullanılmıştır (Wang, Cheng et al. 2014). Sonuç olarak, TALEN'ler bitkilerde besin içeriklerinin artırılması, hastalıklara dirençliliğin artırılması gibi farklı özelliklere sahip bitkilerin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Genom düzenleme için kullanılan TALEN yapısı. *FokI* DNA ayırma domaini TALE'ler ile birleştirilir ve çift olarak kullanılır çünkü *FokI* enzimi DNA kesme aktivitesi için dimerizasyon gerektirmektedir. Hedef sekansa karşılık gelen TALE tekrarları tasarlanır. TALE'ler DNA'yı bağladığında, *FokI* bu bölgeyi ayırmak için spacer sekans üzerinde toplanır. TALEN enzimleri, doğal olarak oluşan TALE proteinlerine kıyasla modifiye bir yapıya sahiptir. NLS, N-terminalinde bulunur; *FokI* alanı (kahverengi), C-terminaline kaynaştırılır.

3.2.4. CRISPR/Cas9

Son zamanlarda, hedeflenen gen manipölasyonları ve çok sayıda organizmada istenen genleri ifade etmek için büyüleyici bir genom düzenleme aracı olarak CRISPR/Cas9 tanımlanmıştır (Feng, Zhang et al. 2013, Alagoz, Gurkok et al. 2016). CRISPR/Cas9 sistemi, bitkiler dahil birçok türde en güçlü ve kullanışlı genom düzenleme aracı olarak kabul görmüştür. CRISPR/Cas9 genom düzenleme aracı bu tezde ana başlık olarak aşağıdaki şekilde ele alınarak açıklanmıştır.



4. CRISPR/CAS9

4.1. CRISP/Cas9'ın Kısa Tarihçesi

CRISPR/Cas9 sisteminin keşfi, Ishino ve meslektaşlarının *E. coli* genomundaki *Apoptoz inhibitör protein (IAP: The inhibitory of apoptosis protein)* gen dizisini incelerken CRISPR'ı ilk kez tanımladıkları 1987 yılına dayanmaktadır. *Iap* geninin klonlanması sırasında, beklenmedik bir şekilde CRISPR'ın belirli bir bölümünü klonladılar ve yaptıkları deney sonucunda, bakteriyel genomda ardışık tekrarlar dizisinin (~29 bp) bulunduğunu ortaya çıkardılar (Ishino, Shinagawa et al. 1987). Bakterilerde yapılan bu keşiften sonra, arkea olan *Haloferax mediteranii*'de de CRISPR dizilerini bulunmuştur (Mojica, Ferrer et al. 1995). Mojica vd. (2000), birbiriyle ilişkili işlevlere sahip olan *Haloferax mediterranei* ve *Haloferax volcanii*'de benzer türde düzenli aralıklı tekrarlar bildirmiştir. Fakat bu tekrarların farklı bakteri ve arkea türlerinde bulunması ile ilgili yayınlar artmış fakat fonksiyonları hakkında net bir bilgi henüz bilinmemektedir (Mojica, Ferrer et al. 1995, Mojica, Díez-Villaseñor et al. 2000). 2002'de Jansen ve ark. (2002) bu dizileri tanımlamak için 'düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri' anlamına gelen CRISPR terimini kullanmıştır. Yalnızca prokaryotlarda bulunan ancak ökaryotlarda ve virüslerde bulunmayan bu tür tekrarlayan dizilere sahip olduğu kabul edilmiştir (Jansen, Embden et al. 2002). Bu kısa tekrarların ortalama uzunluğu 32 bp'dir, ancak farklı organizmalarda 21 ila 47 bp arasında değişebilmektedir. Her tekrar, belirli türlerde son derece korunmuş benzersiz bir nükleotid dizisine sahiptir (Karginov and Hannon 2010). CRISPR dizilerinin biyoinformatik analizi, bu palindromik tekrarları birleştiren dizilerin, aynı zamanda "aralayıcılar" olarak da bilinen, bakteriyofaj (faj) genomlarıyla eşleştiği belirlenmiştir (Bolotin, Quinquis et al. 2005). CRISPR dizilerinin nükleaz ve helikaz domaini içeren CRISPR ile ilişkili (Cas) proteinlerle çevrili olduğunun tanınmasıyla birlikte, ayırıcıların yabancı kökenli olduğu belirlenmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda kısa düzenli tekrarların küçük RNA'lara dönüştürüldüğü ortaya çıkmıştır (Haft, Selengut et al. 2005, Mojica, García-Martínez et al. 2005).

Daha sonraki çalışmalarda, CRISPR DNA sekanslarına sahip prokaryotlarda dört Cas geni (Cas1–4) keşfedilmiş fakat bu genler ve tekrar bölgelerinin işlevi 2005 yılına kadar esrarengizliğini korumuştur. 2005 yılında üç araştırma grubu bağımsız olarak, tekrarlar arasındaki birçok ayırıcı dizinin mobil genetik element dizileriyle eşleştiğini ve bunların mobil genetik elementlerden türetildiğini öne sürmüştür. Daha

sonra, CRISPR bölgesindeki bu aralık sekanslarının bakteriyi daha önce enfekte eden bakteriyofaj (faj) genomları ve plazmitlerdeki diziler ile genellikle aynı olduğunu bildirmesi ile aydınlığa kavuşmuştur. Bu gözlemler, CRISPR'ların virüsler ve diğer genetik parazitlerin neden olduğu enfeksiyona karşı bakteri ve arkeleri korumak için tasarlanmış yeni bir nükleik asit tabanlı bağışıklık sisteminin bir parçası olabileceğini akla getirmiştir (Bolotin, Quinquis et al. 2005, Mojica, García-Martínez et al. 2005, Pourcel, Salvignol et al. 2005). Ayrıca, tanımlanmış CRISPR dizi transkriptlerinin ve cas gen fonksiyonlarının in silico olarak tahmini, CRISPR-Cas'ın RNAi'ye benzer bir RNA tabanlı müdahale sistemi olarak davrandığı hipotezine yol açmıştır. CRISPR/Cas'ın işlevi, Barrangou vd (2007)'den önce hala belirsizdi. CRISPR'ın *Streptococcus thermophilus*'u viral enfeksiyonundan koruduğunu ilk kez başarıyla gösterilmiştir (Barrangou, Fremaux et al. 2007). *Streptococcus thermophilus*'u farklı fajlarla kültüre almış ve faja dirençli mutantları görüntülemişlerdir. Faja dirençli *S. thermophilus* suşlarının CRISPR bölge DNA'sının sekanslanması ile bu bölgenin bakteriyi enfekte eden faj DNA'sından türeyen yeni aralık kısımları içerdiği gösterilmiş ve bu yeni faj türevli aralık kısımların sayısı faja dirençliliğin derecesi ile orantılı bulunmuştur. Sonuç olarak CRISPR sisteminin bakterilerde bağışıklık sağlayan savunma mekanizması deneysel olarak kanıtlanmıştır. Bakteriyel genomda CRISPR/Cas sisteminin varlığı, plazmit DNA ve bakteriyofajlarda belirli bölgeleri kesmek için kullanıldığı belirlenmiştir. CRISPR Tip II sisteminin fonksiyonel mekanizmalarını tanımlayan iki çalışmada, genom düzenlenmesi için bu sistemin basitliği ve temel bileşenleri ortaya konmuştur. İlk olarak *Streptococcus thermophilus* ile yapılan genetik çalışmalarla Cas9 (Cas5, Csn1 veya Csx12 olarak adlandırılmış olan)'un cas gen kümeleri içerisinde hedef DNA'nın kesimini sağlayan tek enzim olduğu gösterilmiştir (Gök and Tunalı 2016).

2011 yılında, *S. thermophilus*'un CRISPR/Cas sistemi *E. coli*'ye aktararak bağışıklık kazandırmak için kullanılmıştır (Sapranaukas, Gasiunas et al. 2011). 2012'ye kadar Charpentier, Doudna ve Siksnys gruplarınca yapılan çalışmalarda biyokimyasal karakterizasyonlar ile gösterilmiştir ki *Streptococcus thermophilus* veya *Streptococcus pyogenes* Cas9'u hedef DNA'nın in vitro kesimi için crRNA'lar ile yönlendirilebilmektedir ve alınan sonuçlar daha önceki yapılan bakteriyel çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (Gök and Tunalı 2016).

Emmanuelle Charpentier ve çalışma arkadaşları CRISPR'ın karakterizasyonunu biyokimyasal olarak keşfetmeyi başardılar. 2011 yılında Porto Riko'daki bir toplantıda Jennifer Doudna ile tanıştılar ve birlikte çalışmaya karar verdiler (Reviewed in Lander, 2016). 2012 yılında, iki öncü CRISPR/Cas9 bileşenlerini izole ettiler ve CRISPR/Cas9 sisteminin bölgeye spesifik bir şekilde DNA'yı kesebildiğini laboratuvar ortamında bir test tüpünde gerçekleştirdiler. CRISPR/Cas teknolojisi ilk olarak 2012'de RNA rehberliğinde programlanabilir gen düzenlemesinin kullanılmasıyla gösterildi. Bu çalışmalarıyla, genom düzenleme olarak bilinen hassas bir teknoloji geliştirebildikleri için 2020'de Nobel Kimya Ödülü'nü kazandılar. 2013 yılında, CRISPR teknolojisinin kullanımı ilk kez bitki genom düzenlemesinde gösterildi. Bu, bitki genomu düzenleme alanında CRISPR teknolojisinde devrime yol açmıştır (Zhang Y et al. 2019).

4.2. CRISPR/Cas Sisteminin Sınıflandırması

Cas genleri çok çeşitlidir ve CRISPR/Cas sistemlerini ayırt etmek için kullanılan sınıflandırma sisteminin temelini oluşturur. CRISPR/Cas sisteminin sınıflandırılması, yeni genomik bilgiler kullanılabilir hale geldikçe ve yeni sistemler keşfedildikçe gelişmektedir. En son yapılan sınıflandırma, RNA kılavuzlu efektör proteinlerinin yapısına göre sınıf 1 ve sınıf 2 olarak adlandırılmıştır (Makarova, Wolf et al. 2015, Makarova, Zhang et al. 2017). Sınıf 1 sistemler çoklu protein komplekslerini kullanırken, sınıf 2 sistemleri tek protein kompleksi kullanmaktadır. Günümüzde 6 tip ve 25 alt tip CRISPR/Cas sistemi keşfedilirken, tip I, tip III ve tip IV sınıf 1 içerisinde, tip II, tip V ve tip VI, sınıf 2 içerisinde yer almaktadır (şekil 4.1) (Koonin, Makarova et al. 2017).

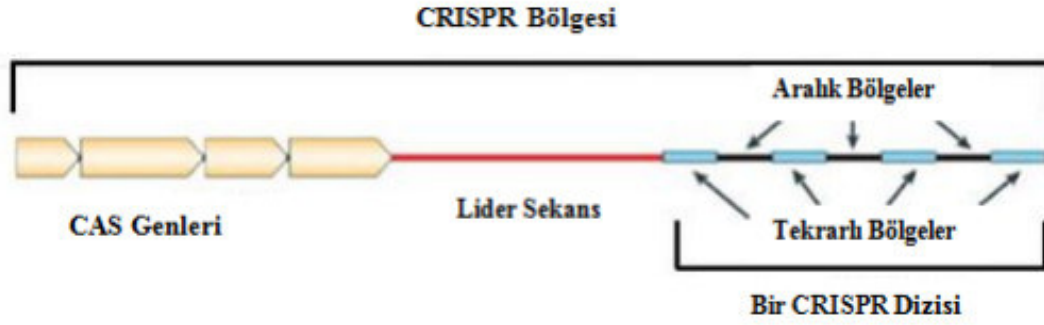
(sırasıyla cas9, cas12 (cpfl) ve cas13 (c2c2)) efektör genlerlerdir ve tek gen ile ifa edilirler. Tip I, tip III ve tip IV sistemlerinde ise operon modeli şeklide ifade edilen proteinleridir. Bu operonlar, düşük sekans benzerliğine rağmen yapısal olarak çarpıcı benzerlikler paylaşan çoklu protein efektör komplekslerini kodlar (örneğin tip I sistemlerde Kaskad ve tip III sistemlerde CSM/CMR kompleks) (Şekil 4.1). Genellikle efektör kompleksinin omurga proteinini cas7 genleri kodlarken, cas5, küçük bir alt birim ve büyük bir alt birimi oluşturur. Bazı durumlarda cas6 gen ürünleri de son efektör kompleksinin bir parçasıdır, ancak Cas6 işlevi genellikle kompleksten bağımsızdır. Tip I sistemler, hedef DNA bozulmasından sorumlu bir helikaz-nükleaz olan cas3 adında ek bir efektör genine sahip tek sistemlerdir. Cas3 proteini, efektör kompleksinin bir parçası değildir ve Cascade tarafından hedef DNA'nın tanınmasından sonra trans olarak toplanır. Diğer tüm sistemler, efektör kompleksleri içinde nükleaz işlevselliğini birleştirir. CRISPR/Cas sistemlerinin çoğu DNA'yı hedeflemektedir fakat, tip III sistemler RNA dizisini spesifik olarak hedefler ve ek olarak DNA'yı RNA hedefine bağlı bir şekilde spesifik olmayan bir şekilde keserken, tip VI sistemleri yalnızca RNA'yı hedeflerler.

4.3. CRISPR/Cas9 Sisteminin Organizasyonu ve Fonksiyonu

İnsanlar gibi daha gelişmiş canlı organizmalarda patojenler, B ve T lenfositler gibi antikorlar tarafından tespit edilmektedir. Bakteriler ve Archaea gibi prokaryotik organizmaları fajlar, plazmit ve transpozonların saldırılarına karşı kendilerini korumak için, adaptif bir immün bağışıklık sistemi olan CRISPR/Cas (düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR) ve ilgili proteinler (Cas) adı verilen özel bir savunma mekanizmasına sahiptir (Pawluk, Davidson et al. 2018).

Doğal CRISPR/Cas sistemi, homolog palindromik tekrar dizileri, RNA ile yönlendirilebilen endonükleazlar, kısa RNA'lar, 'protospacer' adlı kısa mobil dizilerin eklenmesiyle üretilen "aralayıcılar (spacers)" olarak adlandırılan diziler ve Cas genlerinden oluşur. Protospacer'lar, yabancı genetik materyalin kısa segmentlerinden üretilen tekrarlanmayan sekansların tekrarlayan sekanslar içerisine girmesi ile oluşur (Şekil 4.2). Bu aralayıcılar (spacers), istila edilen hücre için tanımlayıcı birimler olarak çalışır ve CRISPR/Cas sisteminin yabancı DNA dizilerini kesmesine izin verir. CRISPR bölgeleri ile ilişkili diğer bir özellik, transkripsiyon yönüne göre CRISPR'ın gerisinde yer alan lider olarak adlandırılan korunmuş sekansların varlığıdır (Şekil 4.2). Spacer bölgelerinin ve aralık bölgelerinin sekansları ve uzunlukları CRISPR

bölgesinde iyi bir şekilde korunmaktadır. Tekrar dizilerinin uzunluğu 21-48 baz çifti (bç) arasında iken, aralık dizilerin uzunluğu 26-72 bç arasında değişmektedir (Şekil 4.2). CRISPR bölgesindeki aralık kısımlar birkaç taneden birkaç yüze kadar büyük değişkenlik gösterir (Gök and Tunalı 2016). CRISPR/Cas sistemi aracılı bağışıklık, adaptasyon, ifade ve müdahale olmak üzere üç adımda gerçekleşir

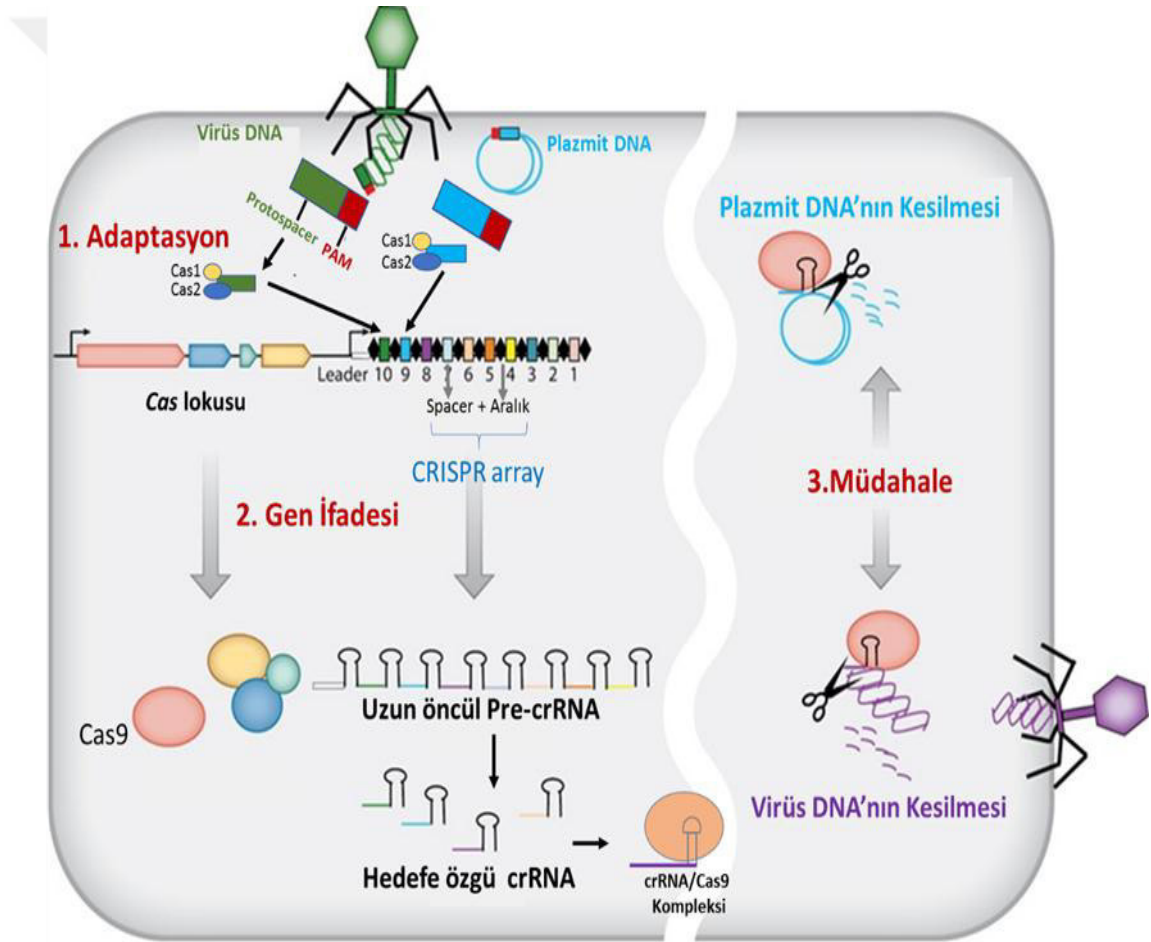


Şekil 4.2. Bakteriyel ve Arkea kromozomlarında bir CRISPR bölgesinin yapısı (Gök and Tunalı 2016)

İlk adım adaptasyon aşamasıdır ve bu aşamaya genetik hafızaya almada denilebilir (Şekil 4.3). Yabancı DNA parçasının özel Cas proteinleri tarafından tanınmasını ve ardından CRISPR lokusuna işlenmesini ve entegrasyonunu içerir. İlk olarak viral, transpozon element veya plazmit DNA'ya homolog olan yaklaşık 30 bp uzunluğunda kısa bir protospacer DNA parçası oluşturulur. Bu protospacer dizleri korunmuş kısa (3 veya 4 bp) PAM (Protospacer adjacent motif) dizleri içermektedir. Cas1 ve Cas2 nükleazları yabancı DNA'ayı protoaralık bitişik motif (protospacer adjacent motif PAM) dizisini spesifik olarak tanıyarak kesmektedir. Daha sonra bu protaspacer dizilerinden spacer dizileri oluşturulur ve spacer'lar CRISPR dizisine entegrasyonu gerçekleştirilir (Şekil 4.3). Yabancı DNA parçaları, yardımcı Cas proteinleri tarafından küçük spacer'lara dönüştürüldükten sonra CRISPR lokusunda lider sekansına doğru yerleştirilir. Bazı durumlar da CRISPR dizisinin boyutunu sınırlandırmak için dizideki bazı eski spacer'ların yok edilmesini gerektirebilir. Bu nedenle, spacer dizilerin entegrasyonunun zamanı, mobil genetik unsurlarla (bakteriyel patojenler) önceki karşılaşmaların hiyerarşisini yansıtır. CRISPR dizisi, gereksiz veya eski ayırıcıları silerek gelişir. Bu yeni spacer dizilerin her biri, bir protospacer olarak adlandırılan, enfekte edici faj genomunun bazı bölümleriyle eşleşir. Protospacer dizisinin patojenin genomundaki konumu rastgele olmasına rağmen, her zaman kısa PAM dizilerinden sadece birkaç baz çifti CRISPR sistemi tarafından tanınmaktadır. Dolayısı ile kendi genetik materyalinden olmayan yabancı bir DNA'yı

ayırt ederek, kendini korumanın bir yolu sağlanmış olmaktadır (Şekil 4.3).

Gen ifadesi olarak da adlandırılan ikincil basamak, CRISPR dizilerinin ifadesi ve işlenmesi aşamasıdır (Şekil 4.3). Spacer ve aralıklardan oluşan CRISPR array'lerinin ifadesi, aslında işi yapan küçük crRNA'lara sırayla işlenen uzun öncül crRNA'nın transkripsiyonudur. Bu adım, *E. coli*'deki Cascade kompleksinde olduğu gibi daha büyük bir kompleksin bir alt birimi olarak çalışabilen Cas genleri tarafından kodlanan endoribonükleazlar tarafından katalize edilir (Şekil 4.3) (Brouns, Jore et al. 2008). Bu crRNA'lar, protospacer dizisine bağlandıktan sonra genetik materyali hedefleyen ve ayıran Cas kompleksi için kılavuz RNA'lar olarak işlev görmektedir (Şekil 4.3) (Chaterji, Ahn et al. 2017).

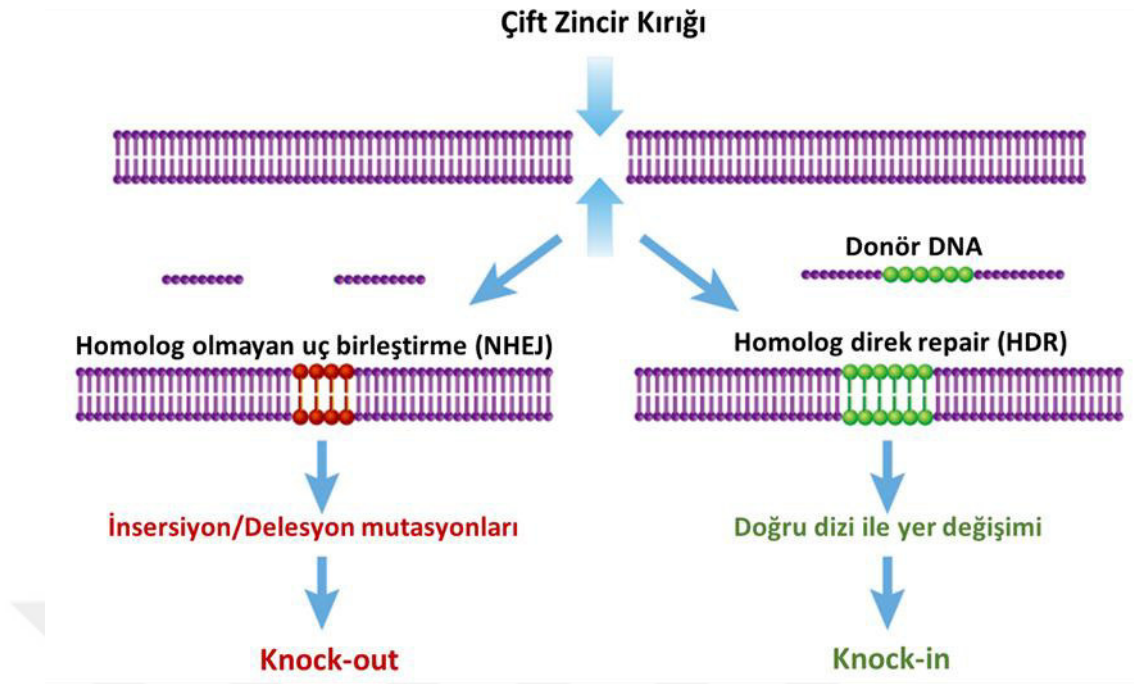


Şekil 4.3. Doğal CRISPR-Cas tabanlı bağışıklığın birincil adımları. Bakteri ve arkea'larda CRISPR/Cas savunma mekanizması üç adımda özetlenebilir İlk adım adaptasyondur, CRISPR lokusuna yeni aralayıcılar yerleştirilir. İkinci adımda, CRISPR lokusunun transkripsiyonu ve CRISPR RNA'nın işlenmesi gerçekleşir. Son adımda ise, patojen veya mobil genetik elementlerin CRISPR/crRNA kompleksi tarafından saptanması ve kesilmesi işlemidir (Bhaya, Davison et al. 2011).

CRISPR müdahalesi, patajone ait hedef nükleik asidin (DNA veya RNA), PAM sekasını tanıyan Cas nükleaz enzim tarafından potansiyel olarak parçalanmasını içermektedir. Rehber olarak görev yapan crRNA ve bir dizi Cas proteininden oluşan ribonükleoprotein kompleksi tarafından hedef DNA'nın kesilmesi, PAM sekansının gerisinde 3 ve 4. baz arasından gerçekleşir. Her ne kadar bakteriler enfeksiyonu önlemek için CRISPR mekanizmasını geliştirmiş olsa da, virüsler bazen CRISPR-RNA etkileşiminde veya PAM tanıma bölgelerini rastgele mutasyona uğratarak CRISPR/Cas sistemini aldatabilir (Seed, Lazinski et al. 2013).

4.4. CRISPR/Cas9 Sisteminin Genom Düzenleme Mekanizması

Genom düzenlemenin modu, genomun kendini tamir etme süreci tarafından belirlenmektedir. Cas9 hedef bölgeyi tanımlanmasından sonra, sgRNA'nın hedef DNA sekansı ile eşleşmesine izin verir. Cas9 endonükleaz, HNH ve RuvC benzeri domaininden oluşur ve hedef DNA zincirlerini PAM bölgesinin üç ile dört baz upstream bölgesinden keser. HNH domaini grRNA'nın bağlandığı komplementer DNA ipliklerini keserken RuvC domaini, grRNA'ya tamamlayıcı olmayan antisens ipliği keser. Bunun sonucunda çift zincir DNA kırıkları meydana (DSB) gelir. Hücre tamir mekanizmaları tarafından küt uçlu DSB'ler, HDR ve NHEJ onarım yolları ile onarılabilir (Şekil 4.4). NHEJ hataya meyillidir ve hedef dizide DNA insersiyonu veya delesyonuna neden olur (Cong, Ran et al. 2013). sgRNA'nın çift olarak ifade edilmesi, NHEJ mekanizmasında büyük delesyonlara sebep olmaktadır. Kromozomlardaki büyük delesyonlar, birlikte ifade edilen sgRNA'ları kullanan NHEJ mekanizması ile elde edilmiştir. HDR onarım mekanizması, yalnızca DSB bölgesine göre belirli bir homolog hedef bölge mevcut olduğunda çalışmaktadır. Bitkilerde, genom düzenleme yoluyla, gen değiştirme, DNA düzeltmesi ve hedeflenen knock-in gibi birçok olağanüstü onarım HDR aracılığıyla gerçekleştirilmiştir (Li, Norville et al. 2013).



Şekil 4.4. DNA kırıkları tamir mekanizması.

SgRNA ve Cas9 proteinini istenen hücrelere aktarmak için biyolistik ve *Agrobacterium* aracılı transformasyon yöntemleri kullanılmaktadır. CRISPR/Cas9 ile genom düzenleme büyük ölçüde, sgRNA promotörlerinin seçimine ve Cas9 enziminin her dokudaki ifadesine bağlıdır. Evrensel CaMV35S RNA polimeraz II promotörleri, bitkilerde Cas9 ekspresyonu için yaygın olarak kullanılmıştır. Benzer şekilde, sgRNA ekspresyonu için U3 veya U6 RNA pol III promotörleri kullanılmaktadır (Belhaj, Chaparro-Garcia et al. 2013). SgRNA'ların ekspresyon seviyesi, eksojen promotörlere kıyasla endojen promotörlerde önemli ölçüde daha yüksektir (Sun, Hu et al. 2015). Buna ek olarak, sgRNA ekspresyonu, monokotiledon veya dikotiledon türlerinden türetilen ve sadece monokot veya dikot bitkilerde kullanılabilen U6 promotörleri tarafından yönlendirilir (Mao, Botella et al. 2017). CRISPR/Cas9 sisteminin bitki çekirdeklerine başarılı bir şekilde entegre edilmesi için, Cas9 proteinlerinin nükleer lokalizasyon sinyalleri ile birleşmeleri gerekir (Belhaj, Chaparro-Garcia et al. 2013). Hedef DNA'yı sentetik olarak geliştirilmiş yaklaşık 20 nükleotidlik kısa gRNA dizileriyle bağlamak için, CRISPR/Cas düzenleme mekanizması, protospacer oluştuktan sonra hedef DNA dizisindeki 3-4 bazın kesimini gerçekleştiren Cas9 enzimi için PAM 5'NGG motife ihtiyaç duyulmaktadır (Jinek, Chylinski et al. 2012). HNH domaini ve RuvC-like domaini gibi tek bir DNA zincirini kesme yeteneğine sahip iki Cas nükleaz domaini bulunmaktadır. CRISPR mekanizmasının yürütülmesini

içeren basit adımlar şunlardır: PAM dizisinin tanınması, sgRNA'nın oluşumu; sgRNA'nın klonlanması, konakçı hücreye transformasyonu, transforme olmuş bireysel organizmaların seçimi ve genom düzenlenmiş hatların doğrulanması.

4.5. Bitkilerde CRISPR/Cas9 Aracılı Genom Düzenlenmesi

Bugüne kadar, CRISPR/Cas9 tabanlı genom düzenleme araçları vasıtasıyla en fazla ekilen tarım ürünlerinin yanısıra model bitkilerde de hedeflenen gen düzenlemelerine çok sayıda başarılı çalışma yapılmıştır. Hedeflenen DNA, GC içerikleri, Cas9 kodonları, sgRNA yapısı ile Cas9 ve sgRNA ekspresyonu dahil olmak üzere CRISPR/Cas9 sisteminin düzenleme yeteneğini etkileyen birçok faktör bildirilmiştir. CRISPR/Cas9 sisteminden daha yüksek verim elde edebilmek için tüm bu faktörlerin yüksek oranda optimize edilmesi gerekmektedir.

4.5.1. CRISPR/Cas9 Aktarım (iletim) Sisteminin Tasarlanması

Bitkilerde gen düzenlemesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak ilk zamanlarda CRISPR/Cas9'un verimliliği oldukça düşük bulunmuştur (Nekrasov, Staskawicz et al. 2013). Teknolojideki gelişmelerle birlikte, CRISPR/Cas9 için birçok yüksek verimli vektör aktarım sistemi, viral enfeksiyonunların önlenmesi, cis elementlerin gen yapısının bozulması, genomik delesyonlar, gen nakavtı ve multipleks genom düzenleme gibi birçok çalışma için CRISPR/Cas9 sistemleri tasarlanmıştır. Bu düzenleme araçlarındaki güncellemeler, Cas9 sisteminin bitki hücrelerine daha kesin, doğru ve hedeflenmiş olarak verilmesine izin vermiştir. Yeni Cas9 varyantlarının oluşturulma çalışmaları, nakavt mutantlar için verimli tarama yöntemlerinin geliştirilmesi, vektör seçimini ve Cas9 ekspresyon kaseti için en uygun dağıtım sisteminin oluşturulması ve kullanılmasına yönelik çalışmaları içermektedir.

4.5.2. CRISPR/Cas9 Sistemi için Taşıyıcı Vektörler

Benzersiz bir sgRNA ekspresyon kasetinin oluşturulması doğrudan SgRNA ifade kasetinin yapısına bağlı olup bu adım CRISPR/Cas9 aracılı gen düzenlemesinin en önemli adımını oluşturmaktadır. 20 nükleotit hedef sekanslı gRNA ve scaffold 98 nükleotitten oluşan Cas9/sgRNA kompleksi için bir kılavuz sistem olarak çalışır (Nishimasu, Ran et al. 2014). Bitkilerde, RNA polimeraz III, sgRNA'nın transkripsiyonu için kullanılmakta ve ekspresyon çoğunlukla U3 veya U6 promotörleri tarafından yönetilmektedir (Li, Norville et al. 2013). SgRNA U3/U6 promotörlerinin ekspresyon kasetlerinin uzunlukları çok küçük olduğundan, bu ekspresyon kasetlerini

oluşturmak için yaklaşık ~ 300-600 bp, üst üste çakışan PCR veya adaptör ligasyonu uygulanmaktadır. Gibson assembly veya Golden Gate klonlama stratejileri, sgRNA ekspresyon kasetinin CRISPR/Cas9 sistemi için ikili vektörler olarak doğrudan klonlanmasını sağlamaktadır.

Cas9 enzimi, yaklaşık olarak 4107 bp kodlama dizisinden oluşmaktadır (Nishimasu vd. 2014). Ökaryotlarda Cas9 nükleer lokalizasyonu için, Cas9 kodlama sekansı nükleer lokalizasyon sinyali ile birleştirilmelidir. Bitkilerde gelişmiş genom düzenleme için yüksek verimli ve optimize edilmiş Cas9 ekspresyon kasetleri tasarlamak için, Cas9 dizileri kodon optimizasyonlarının yapılması gerekmektedir. Örneğin, çeltikte ve Gramineae familyasında kodon ile optimize edilmiş Cas9p kullanımı, GC içeriklerinin artırılması ile geliştirilmiştir (Li vd. 2013). Yaygın olarak 35S Karnabahar mozaik virüsü (CaMV) ve *A. thaliana*, çeltik ve mısırdan ubikitin gibi konstitütif promotörler, kallus bazlı transformasyon yaklaşımları kullanılarak yüksek doğrulukta hedeflenmiş gen düzenleme için dikotlarda ve monokotlarda Cas9 ekspresyonunu yönetilebilmektedir (Tsutsui, H. and T. Higashiyama 2017).

CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenlemede tekli vektör sistemi ya da ikili vektör sistemi kullanılmaktadır. Hızlı test edilebilmesinden dolayı uzun yıllardır ikili vektör sistemi kullanılmaktadır. Birkaç gRNA'ya ve bir Cas9 protein içeren ekspresyon kasetine sahip olan herhangi bir spesifik vektör, bitki transformasyonu için kullanılabilir. Hem gRNA hem de Cas9 proteinini birlikte barındıran bitki ifade vektörleri daha kullanışlıdır. Genel olarak, tek vektörlü sistemlerde, RNA polimeraz III aracılı promotorlar (U6/U3) gRNA'yı ifade ettirmek için kullanılırken, RNA polimeraz II'ye dayalı ubikutin ve CaMV35S promotorları, Cas9 gen ekspresyonu için kullanılmaktadır. CRISPR/Cas9 genom düzenleme sisteminde araştırmaların giderek artmasına bağlı gelişmeler, araştırmacıların gRNA ve Cas9 geninin ifadesini düzenlemek için daha akıllı vektör sistemleri geliştirmesine imkan sağlamaktadır. Son zamanlarda, tekli vektör sisteminde tekli polimeraz II ve ikili polimeraz II promotorları kullanılmaya başlanmıştır. Tekli polimeraz II vektörleri, aynı anda gRNA ve Cas9 geninin ifadesini yönetmek için kullanılırken, ikili polimeraz II vektörleri, gRNA ve Cas9 geninin ifadesini sağlamak için iki farklı promotordan yararlanır. CRISPR/Cas9 sisteminde yapılan bu yeni gelişmeler vektör boyutlarının azaltılmasına yardımcı olmaktadır ve böylelikle transformasyon etkinliğini artırılabilir. Günümüzde hayvan, bitki ve diğer birçok organizma için CRISPR/Cas vektörleri geliştirilmiş ve

ticarileştirilmiştir. Addgene ve Genscript gibi vektör veritabanları günümüzde mevcuttur ve çalışmaların amacına göre vektör erişimine izin vermektedir.

4.5.3. CRISPR/Cas9 Yapısını Tasarlamak için Biyoinformatik Araçlar

Son derece hassas genom düzenleme için en önemli adımlardan biri, CRISPR/Cas9 için bir sgRNA yapısı tasarlamaktır. Bugüne kadar çok sayıda biyoinformatik araç geliştirilmiştir ve sgRNA tasarımı için çevrimiçi olarak mevcuttur. Tablo 4.1'de gösterildiği gibi, bitki veri tabanlarına sahip ve yeni hedef bölgelerin belirlenmesi için sgRNA'nın tasarımına izin veren birçok erişilebilir çevrimiçi araç bulunmaktadır. Örneğin CRISPR Design (<http://www.genome-engineering.org>), Zhang ve arkadaşları tarafından sgRNA'yı tasarlamak için geliştirildi ve ayrıca hedef dışı mutasyonun değerlendirilmesine yardımcı olmuştur. 2014 yılında, Xie ve çalışma arkadaşları, CRISPR / Cas9 tabanlı genom düzenleme için etkili sgRNA yapıları tasarlamak amacıyla CRISPR-PLANT (<http://www.genome.arizona.edu/CRISPR>) adlı bir web aracını başarıyla geliştirdiler (Hsu, Scott et al. 2013). Benzer şekilde, CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>), mevcut bir dizilenmiş genoma sahip her bitki için sgRNA'nın tasarımını kolaylaştırmakta ve ayrıca hedef dışı bağlanmaların değerlendirilmesine yardımcı olmaktadır (Lei, Lu et al. 2014). Ancak birçok online gRNA dizayn programlarında, programda yüklü olan bitki genomuna bağlı kalındığından sınırlı sayıda bitki için gRNA dizayn etmeye izin vermektedir. Benchling (<https://benchling.com/>) herhangi bir nükleotid dizisine gRNA tasarlamaya izin veren özgür bir online araçtır.

Tablo. 4.1. gRNA tasarlamak için kullanılan online programlar

Araç Adı	Açıklama ve İşlevi	Web Link
CRISPRlnc	LncRNA'lar için sgRNA tasarlama, tüm türler için çalışır	(http://www.crisprlnc.org)
CRISPR-Local	Referans olmayan çeşitler için sgRNA tasarımı, birden fazla geni hedefleyebilen sgRNA'yı tahmini	(http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR-Local/)
CRISPR-P 2.0	Hedef bölge skor tahmini, analizi ve hedef sekans tespiti	(http://cbi.hzau.edu.cn/CRISPR2/)
CRISPRpred	Hedef tabanlı sgRNA'nın etkili tasarımı için in silico tahmini	(https://github.com/khaled-buet/CRISPRpred)
CRISPR-DO	Hem kodlayan hem de kodlamayan hedeflere özel, hedef dışı bölgeler ve fonksiyonel korumasıyla ilgili bilgiler sağlar	(http://cistrome.org/crispr/)
CRISPy	SgRNA için hedef tahmini, sonuçların grafiksel gösterimi	(http://crispy.secondarymetabolites.org/)

Cas-Designer	RNA aracılı endonükleazlar, hedef dışı ve out-of frame sorlar hakkında tüm bilgileri sağlar	(http://rgenome.net/cas-designer/)
CCTop	Olası hedef dışı sgRNA tabanlı hedef tahmini	(https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/)
Azimuth	Hem hedefe yönelik hem de hedef dışı modeller için sgRNA tasarımı	(https://research.microsoft.com/en-us/projects/azimuth/)
CRISPRdirect	Minimum off-target'a sahip sgRNA tasarımı	(https://crispr.dbcls.jp/)
CRISPR-PLANT	Belirli bitki türleri için spesifik sgRNA'lar oluşturma	(https://www.genome.arizona.edu/crispr/)
CRISPRseek	Hedeflenen diziler için sgRNA görüntüleme, tahmin edilen off-targets hedefler için kesim skorları üretir	(https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/CRISPRseek.html)
Cas-OFFinder	RNA aracılı endonükleazlara dayalı, hedef dışı bölgeleri tespit etmek için sağlam	(http://www.rgenome.net/cas-oinder/)
E-CRISP	Potansiyel hedef bölge değerlendirmesi	(https://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html)
SSFinder	Hedef bölgelerin yüksek doğruluklu tespiti	(https://code.google.com/p/ssinder/)
GPPWeb Portal	Potansiyel sgRNA skorları üretir	(https://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysisistools/sgrnadesign)
CRISPR-P	Sentetik sgRNA oluşturur, enzim kesimi için potansiyel bölgeleri tahmin eder	(https://cbi.hzau.edu.cn/crispr)
CHOPCHOP	SgRNA için en uygun hedef bölgeleri tespit eder, hedef bölgeler için potansiyel skorlar oluşturur	(https://chopchop.cbu.uib.no/)
sgRNAcas9	Daha az hedef dışı etkiye sahip sgRNA'nın hızlı tasarımı	(https://www.biootools.com/col.jsp?id=103/)
CRISPR Design	Hedef bölgeler için hassas sgRNA oluşturma, hedef dışı bölgeleri değerlendirme	(http://www.genome-engineering.org)

4.5.4. Bitkilere CRISPR/Cas9 Vektörünün Aktarım Yöntemleri

CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme için hem sgRNA hem de Cas9 geninin ekspresyon kasetlerini barındıran taşıyıcı vektörler, bitki hücrelerinde hedeflenen bölgelere taşınmalıdır. Taşıyıcı vektörlerin transformasyonu için genellikle çiçek daldırma (floral dip), biyolistik ve *Agrobacterium* aracılı gen aktarım yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler genellikle üzerinde çalışılan bitkiye ve çalışmanın amacına göre seçilmektedir. Günümüzde, bitki transformasyonu için ribonükleo-protein kompleksi, plazmit aktarımı ve virüs aracılı aktarım sistemleri gibi gelişmiş stratejiler de uygulanmaktadır. Virüs aracılı aktarım sisteminin kullanımında belirli sınırlamalar vardır, ancak virüs aktarım sistemini kullanan bitkilerde birkaç çalışma

yapılmıştır (Ali, Eid et al. 2018). Geçici bir ifade sistemi, CRISPR/Cas9 aracının etkinliğini ve yapılabilirliğini analiz etmek için vektörün protoplasta transferinde araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır (Jiang, Zhou et al. 2013). Cas9 gen ekspresyon kasetlerinin doğrudan iletimi için biyolistik ve PEG aracılı transformasyon teknikleri kullanılabilir (Wolter and Puchta 2017). Bununla birlikte, birçok bitki türünde bu yaklaşımla ilişkili büyük bir dezavantaj oluşturan kalıtsal hedeflenmiş mutasyonlar nedeniyle bitkileri protoplasttan yeniden üretmek zordur. *Agrobacterium* aracılı transformasyon, dikot ve monokotlarda CRISPR/Cas9 sisteminin kararlı transformasyonu için oldukça verimli bir yaklaşımdır (Char, Neelakandan et al. 2017, Zhang, Zhang et al. 2018).

4.5.5. Genom Düzenlenmiş Bitkilerde Mutant Tarama Stratejileri

CRISPR/Cas9 sistemi, istenen mutantları geliştirmek için genom düzenleme teknolojisinde çığır açan bir yeniliktir ve bugüne kadar CRISPR/Cas9 sistemi tarafından, domates (Jacobs, Zhang et al. 2017) ve çeltik için genomik ölçekli mutant kitaplığı gibi çok sayıda mutant kitaplığı oluşturulmuştur (Meng, Yu et al. 2017). Genom düzenleme yaklaşımları için uygulamalar gün geçtikçe arttığından, bilim insanlarının hedef dışı ve hedefe yönelik mutasyonlar ve genom düzenlenmiş bitkilerin bir sonraki jenerasyonlarında transgenleri kalıcı olup olmadığını tespit etmek amacıyla bir strateji kullanarak çok sayıda mutantı taraması gerekmektedir.

Mutant taramayla ilişkili sınırlamaların üstesinden gelebilmek için, kritik sıcaklıkta polimeraz zincir reaksiyonunda (ACT-PCR) bağlanma, yüksek çözünürlüklü erime analizi (HRM), poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) aracılı genotipleme, T7 endonükleaz I (T7EI) yaklaşımı ve restriksiyon enzim bölgesinde oluşan mutasyon tekniği gibi farklı teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerin kendi içinde artıları ve eksileri bulunmaktadır. Açık bir fenotipe sahip olduğu zaman bir mutant hızla tespit edilebilmektedir. Örneğin, CRISPR/Cas9 sistemi yoluyla *phytoen desatüras* geni mutasyona uğradığında, görünür bir albino fenotipi gözlemlenmektedir. Bu tarz genler genomu düzenlenmiş bitkilerini saptamak için fenotipik bir markör olarak kullanılmıştır. Ek olarak, transgenik bitkiler de bazı herbisit/antibiyotik seçilebilir markörler kullanılarak taranabilir. Ancak görsel fenotipler ve hedeflenen genler arasında bir bağlantı kurmak, fenotip aracılı taramayla ilişkili tek zorluktur. Diğer yaklaşımlardan birisi olan, yüksek verimli dizileme ile, CRISPR/Cas9 sistemi ile oluşturulan tüm mutantları taramak için oldukça verimli ve

hassas bir stratejidir. CRISPR/Cas9 tarafından düzenlenen DNA içermeyen bitkilerin tespiti için, tüm genom dizileme oldukça faydalı ve kullanışlıdır (Bell, Magor et al. 2014).

4.6. Gen Fonksiyon Çalışmalarında CRISPR/Cas Sisteminin Uygulamaları

CRISPR/Cas aracılı genom düzenleme, Cas enzim aktivitelerine ve DSB onarım mekanizmasına bağlı olarak birçok potansiyel uygulamaya sahiptir. DSB onarımları, farklı uygulamalara yol açan birkaç farklı sonuca neden olabilir.

4.6.1. CRISPR/Cas Kullanılarak Tek Bir Genin Susturulması

Gene nakavt/susturma, CRISPR/Cas tabanlı genom düzenlemelerinde yaygın olarak kullanılan uygulamalardan birini oluşturmaktadır. Bunun başlıca nedeni, gen düzenleme ve onarım mekanizmalarıdır. En yaygın kullanılan CRISPR/Cas9 ve diğer CRISPR/Cas sistemleri genellikle çift sarmallı DNA'yı keser ve bir DSB oluşturur. Çoğu durumda, bir DSB NHEJ tarafından onarılmaktadır. Rastgele bir veya daha fazla nükleotidin silindiği veya eklendiği gerçeğinden dolayı, eğer bir protein kodlayıcı gen ise, temel çerçeve kayması nedeniyle hedeflenen genin ifadesini kesintiye uğratmaktadır. T-DNA mutagenезiyle karşılaştırıldığında, CRISPR/Cas kaynaklı gen susturmanın birçok avantajı vardır. En büyük avantajı, CRISPR/Cas tabanlı gen düzenleme hedefe özgüdür, başka yan etkiler olmaksızın tek bir gen hedeflenebilmektedir. Böylece, CRISPR/Cas sistemi bir geni amaca yönelik olarak hızlı ve kesin bir şekilde susturabilir. Bu, özellikle bir gen işlevini incelemek veya belirli bir gen tarafından kontrol edilen bazı istenmeyen özellikleri ortadan kaldırmak için yararlıdır. Bu nedenle, bu yöntem geliştirildiğinden beri, CRISPR/Cas sistemi, tek bir geni susturmak için yaygın olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, temel çerçeve kayması anlamsız mutasyona neden olacağı ve farklı bir proteini kodlayacağı için, büyük ölçüde bir protein kodlayan genin işlevini incelemek için kullanılabilir. Kodlanmayan RNA genleri, özellikle mikroRNA'lar (miRNA'lar) gibi küçük RNA'lar, hem bitki hem de hayvanlar alemindeki hemen hemen tüm biyolojik ve metabolik süreçlerde çok yönlü işlevlere sahip kapsamlı bir küçük RNA sınıfıdır. Temel çerçeve kayması genel olarak miRNA'ların protein kodlayan geni üzerindeki hedeflenmesini etkilemediği için onları büyük ölçüde susturmak biraz zordur.

4.6.2. CRISPR/Cas ile Hedef Bazlı Gen Aktarımı

Agrobacterium aracılı gen transformasyonu, geleneksel olarak, yabancı DNA

dizilerini içeren T-DNA ekleme yoluyla bir bitki hücresindeki tek bir geni aşırı ifade etmek için kullanılır. Bununla birlikte, aktarılan bir genin bir bitki genomuna rastgele girişi, diğer işlevsel genleri susturmak da dahil olmak üzere her zaman birçok istenmeyen etkiye neden olmaktadır. CRISPR/Cas genom düzenleme ile DNA dizisini belirli bir bölgeden kesebilir ve ardından HDR aracılığı ile bu kesilen bölgeye yabancı bir DNA dizisi (hedeflenen gen) eklenecektir. Bu nedenle, CRISPR/Cas, bir yabancı geni diğer genleri kesintiye uğratmadan bir genom içindeki belirli bir konuma hassas bir şekilde eklemek için kullanılabilir. Gen susturma ile karşılaştırıldığında, CRISPR/Cas tabanlı gen ekleme, daha düşük genom düzenleme etkinliği ile çok daha zor ve biraz daha karmaşıktır. Son zamanlarda, Kim ve arkadaşları (2020), CRISPR/Cas gen ekleme sistemini modifiye etmiş, bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksi ve DNA parçası (antibiyotik direnç geni) kombinasyonunu kullanarak yüksek verimlilikte (%37) başarılı bir şekilde gen ekleme elde etmişlerdir (Kim, Lee et al. 2020). Bununla birlikte, uzun dizilerin ve genlerin CRISPR/Cas9 ile eklenmesi veya değiştirilmesi bitkilerde hala zorlayıcıdır. Son zamanlarda Lu ve ark. (2020), uzun DNA dizilerini aktarmak için kimyasal olarak modifiye edilmiş donör DNA ve CRISPR/Cas9'u kullanmış ve %25'lik bir verimlilikle çeltik genomuna 2.049 baz çifti (bp) eklemeyi başarmıştır (Lu, Tian et al. 2020). CRISPR/Cas tabanlı gen ekleme etkinliğinin zamanla geliştirilmesi ile CRISPR/Cas tabanlı gen ekleme, herhangi bir pozisyon etkisi olmaksızın belirli genleri aşırı ifade etmek için tüm bitkilerde kullanılabilecek etkin bir gen aktarım yöntemi olarak kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır.

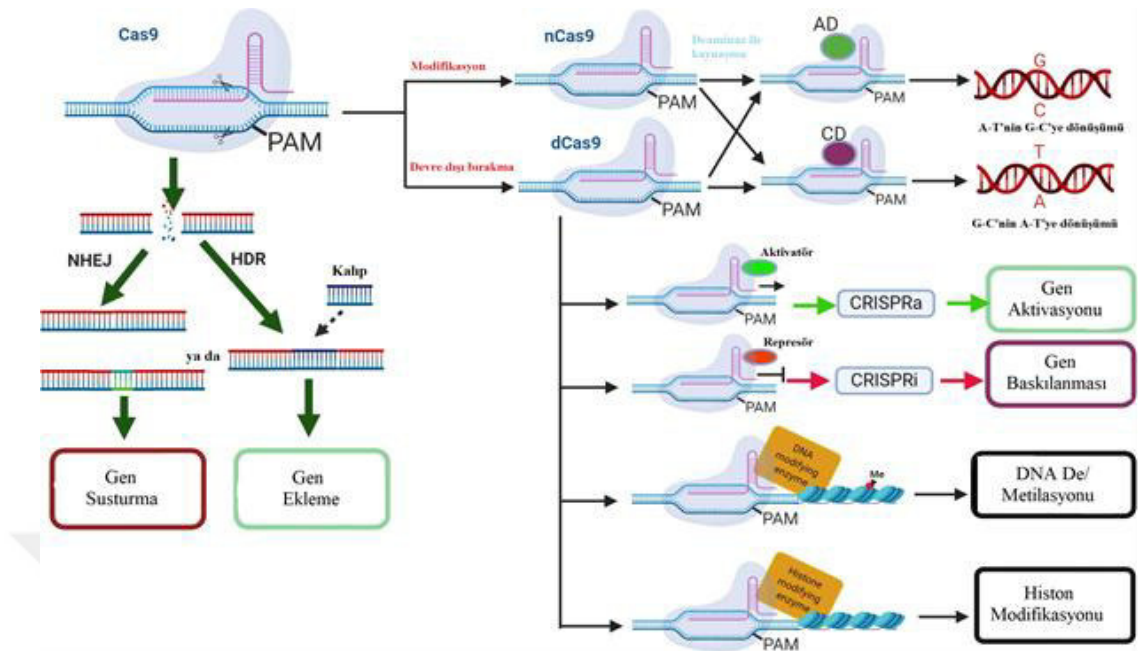
CRISPR/Cas9 aracılı ile gen mutasyonları ve istenmeyen genler değiştirmek mümkündür. HDR'nin doğası gereği, herhangi bir dizi DSB bölgelerinin etrafına orijinal genom dizisi eklenebilir ve değiştirilebilir. Dolayısıyla, gen dizilerinin mutasyonları, hatta nokta mutasyonları veya herhangi bir istenmeyen dizileri varsa, bunları değiştirmek için orijinal dizilerle homolog bölgelere sahip istenen bir gen/DNA dizisini kullanabiliriz. CRISPR/Cas tabanlı gen ekleme ile aynı şekilde, CRISPR/Cas tabanlı gen değişiminde düşük verimliliğe sahiptir. Son zamanlarda, Li ve arkadaşları (2019), DNA'sız ribonükleoprotein kompleksinin verilmesi yoluyla çeltikte asetolaktat sentaz geni (ALS) değişimi başarılı bir şekilde elde etmek için transkript şablonu HDR'yi kullanmıştır.

4.6.3. CRISPR/Cas Aracılı Baz Düzenleme

Nokta mutasyonları, bitki genom ve genetiğinde yaygın bir durumdur. Farklı hastalıklara dirençlilik gibi birçok bitki özelliği, tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tarafından kontrol edilir ya da düzenlenir. Bu nedenle, bir genom içindeki tek bir nükleotidi tam olarak değiştirmek için genomik bir araç geliştirmek önemlidir ve aynı zamanda gereklidir. HDR bazlı CRISPR/Cas9, istenen nükleotid değişimini içeren bir DNA zincirini uyararak tek bir nükleotid değişikliğini indüklemek veya oluşturmak için kullanılabilir. Bununla birlikte HDR ile değişim, özellikle bölünmemiş hücrelerde nokta mutasyonlarını onarmak için çok düşük oranda gerçekleşir. CRISPR/Cas9 sisteminin muazzam potansiyelleri ve tek baz genom düzenleme üzerindeki geniş uygulama nedeniyle, bilim adamları CRISPR/Cas sistemini bir genom içindeki belirli bazları düzenlemek için bir CRISPR/Cas baz editörü geliştirmişlerdir. Günümüzde, CRISPR/Cas tabanlı baz düzenleme, bu gelişmekte olan son teknolojinin en önemli ilerlemelerinden ve uygulamalarından biri haline gelmiştir.

CRISPR/Cas9 tabanlı baz düzenlemenin temel prensibi, gRNA'nın belirli bir DNA dizisini tanıyabilmesi ve ardından belirli bir bazı farklı bir baza dönüştürebilmesidir. Bunu başarmak için Cas9 enzimi DSB'ler üretemez. Böylece, bilim adamları yabani tip Cas9 enzimlerini Cas9 (nCas9) olarak değiştirerek daha sonra ölü Cas9 veya dCas9 olarak adlandırılan Cas9'u etkisiz hale getirmişlerdir. Hem nCas9 hem de dCas9, gRNA'ların yardımıyla spesifik DNA dizisine bağlanabilir. Daha sonra bilim adamları, spesifik bir DNA bazını değiştirmek için bu cas9'ları bir baz dönüşüm enzimini birleştirdiler. Şu anda kullanılan iki tane baz dönüştürücü enzim vardır, biri sitidin deaminaz (CD) ve diğeri adenin deaminazdır (AD). CD, nükleotid değişimini C'den U'ya dönüştürür ve daha sonra C-G'den T-A'ya değişimi sağlamak için T haline gelir. AD, nükleotid değişimini A'dan I'ye dönüştürür ve daha sonra A-T'den G-C'ye son değişimi elde etmek için G haline gelir. Sitidin deaminaz tabanlı baz düzenleme (CBE), buğday başta olmak üzere birçok tarım ürününde ve bitki türünde kullanılmıştır (Xu, Song et al. 2019). CBE ayrıca herbisite dayanıklı bitkiler oluşturmak ve ayrıca başka amaçlar için kullanılmaktadır (Shimatani, Fujikura et al. 2018). Son zamanlarda CRISPR/Cas9 baz düzenleme, anlamlı kodu anlamsız koda değiştirerek nakavt mutantları oluşturmak için de kullanılmaktadır. CRISPR/Cas9 tarafından oluşturulan nakavt NHEJ ile karşılaştırıldığında, CRISPR/Cas baz düzenleyici kaynaklı nakavt, kolay çalışma ve yüksek verimlilik gibi daha fazla

avantajlara sahiptir (Şekil 4.4). (Zhang, Zhang et al. 2020).



Şekil 4.4. CRISPR/Cas genom düzenlemesinin gen fonksiyonel çalışmada uygulanması. CRISPR/Cas sistemi, gen fonksiyonel çalışmalarında çeşitli uygulamalara sahiptir. DNA çift zincir kırık (DSB) onarım mekanizmasına dayanan CRISPR, bir çift nükleotidin eklenmesi veya silinmesi ve homolog olmayan uç birleştirme (EHEJ) ile onarılması yoluyla doğrudan gen nakavtına (susturma) neden olabilir; Fakat, bir DNA donörü ile birlikte homolog yönlendirmeli onarım (HDR) gerçekleştiyse, CRISPR/Cas genom düzenleme aracı, istenmeyen bir gen değişimine, aşırı ekspresyonuna (knockin) ve tek bir genin aktarımı için kullanılabilir. Ayrıca Cas9 enzimi, transkripsiyon efektörü veya dCas9 ile birleştirilmiş diğer enzimlerle devre dışı bırakılırsa, CRISPR/Cas sistemi düzenleme, epigenom düzenleme ve görüntülemeye kullanılabilir.

4.7. Domates Islahında CRISPR/Cas Uygulamaları

CRISPR / Cas sistemi, genom düzenleme araçları içerisinde son teknoloji bir araç olarak kabul edildiğinden beri umut vaat eden bir teknoloji olarak, mahsul yetiştiriciliğini iyileştirmek için hem bilimsel araştırmacılar hem de endüstriler tarafından ilgi görmektedir. Bitkilerde uygulandığından bu yana kısa bir süre içinde, CRISPR / Cas tabanlı genom düzenleme sistemleri, pirinç, buğday ve domates dahil olmak üzere birçok ürünlerde kullanılmaktadır (Li, Unver et al. 2017). Günümüzde, CRISPR / Cas genom düzenlemesi, biyotik ve abiyotik strese dirençli bitki gelişiminin yanı sıra bitkilerin gelişim ve verim özelliklerinin iyileştirilmesi, sekonder metabolitlerin içeriğinin değişimi için önemli bir biyoteknolojik araç haline gelmiştir.

4.7.1. CRISPR/Cas9 Kullanılarak Biyotik Stres Faktörlerine Dirençli Domates Geliştirilmesi

Biyotik stresler arasında virüsler, bakteriler, mantarlar ve böcekler bulunur ve bunların tümü bitkilere saldırıp zarar verebilir (Langner, Kamoun et al. 2018). Haşere ve patojen kaynaklı hastalıklar, domates, pamuk ve buğday gibi başlıca mahsuller de dahil olmak üzere birçok bitki için büyük bir sorundur. Biyotik faktörler sadece bitki büyümesini ve gelişimini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda mahsul verimini ve kalitesini düşürür, hatta bazı durumlarda yüzde yüz verim kayıplarına neden olmaktadır. Bitkilerin çeşitli hastalıklara karşı tepki oluşturmak için sahip oldukları karmaşık bir süreç ve mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar ile ilişkili birçok gen bulunmaktadır. Transgenik teknolojileri, farklı patojene karşı yüksek toleranslı transgenik bitkileri elde etmek için belirli genleri aşırı ifade etmek için kullanılmış olmasına rağmen, hastalıklara karşı bitkinin tepkisinde tek bir genin önemli bir baskın rol oynamaması nedeniyle küçük bir ilerleme kaydedilmiştir. Bununla birlikte, istenmeyen bir genin susturulması sonucunda patojenlere karşı bitki toleransı sağladığı görülmektedir. Bu nedenle, CRISPR/Cas9 bir genom düzenleme aracı olarak kullanıldığından, fungus, virüs ve bakterilerin neden olduğu çeşitli hastalıklara karşı bitki direncine sahip genom düzenleme mutantları oluşturmak için kullanılmaktadır (Arora and Narula 2017).

Tablo 4.2. Biyotik stres faktörlerine dirençli CRISPR-Cas9 tabanlı domates geliştirilmesi

Hastalık direnci	Hedef gen	Sonuç	Referans
Fungus	<i>DMR6</i>	Tüylü küf karşı dirençlilik (Downy mildew)	(de Toledo Thomazella, Brail et al. 2016)
Fungus	<i>SiMlo</i>	Küllemeye dirençlilik (Powder mildew)	(Nekrasov, Wang et al. 2017)
Fungus	<i>PMR4</i>	Küllemeye dirençlilik (Powder mildew)	Koseoglu, 2017
Fungus	<i>Solyc08g075770</i>	Fusarium solgunluğuna duyarlılık <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. lycopersici	(Prihatna, Barbetti et al. 2018)
Fungus	<i>MAPK3</i>	Kurşini küf hastalığına duyarlılık (<i>Botrytis cinerea</i>)	(Zhang, Wang et al. 2018)
Bakteri	<i>SlJAZ2</i>	Bakteriyel leke hastalığına dirençlilik (<i>Pseudomonas syringae</i> pv.)	(Ortigosa, Gimenez-Ibanez et al. 2019)
Bakteri	<i>SlDmr6</i>	Bakteriyel dirençlilik (<i>Xanthomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> ve <i>Phytophthora capsici</i>)	(Deng, Shi et al. 2015)

Virüs	Virüsün <i>CP</i> ve <i>Rep</i> geni	Domates sarı yaprak virüsüne karşı dirençlilik (TYLCV)	(Tashkandi, Ali et al. 2018)
Virüs	DCL2	Papates x virüsü, Tütün mozaik virüsü ve domates mozaik virüsüne duyarlılık	(Wang, Hardcastle et al. 2018)
Virüs	<i>eIF4E1</i>	Potyviruslere dirençlilik tobacco etch virus (TEV) Biber benek virüsü((PepMoV))	(Yoon, Venkatesh et al. 2020)

Funguslar, külleme, küf, mildöyo, pas ve çürüme gibi birçok hastalıktan sorumludur ve bu da ürün verimi ve kalitesinde önemli kayıplara neden olabilir (Borrelli, Brambilla et al. 2018). Külleme domates gibi tarımsal açıdan önemli mahsuller dahil olmak üzere birçok bitki türünde fungal patojenlerin neden olduğu yaygın bir hastalıktır (Nekrasov, Wang et al. 2017). Domateste, on altı *Mlo* geni vardır, *SIMlo1* ile *SIMlo16*, *SIMlo1* külleme duyarlılığına neden olmaktadır (Zheng, Appiano et al. 2016). Bir çalışmada, CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak *MILDEW-RESISTANCE LOCUS O (SIMlo1)* geninin susturulması sonucunda külleme hastalığına dirençli domates bitkisi elde edilmiştir (Nekrasov, Wang et al. 2017). *Botrytis cinerea*, kurşini küf hastalığına neden olan ve hem hasat öncesi hem de hasat sonrası aşamalarda ciddi ekonomik kayıplara neden olan hava ile taşınan bir bitki patojenidir. CRISPR-Cas9 teknolojisini kullanarak Mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), geni *B. cinerea*'ya direnç sağladığı gösterilmiştir (Zhang, Wang et al. 2018).

Tespit edilemeyen asemptomatik enfeksiyonlar ve uygun tarımsal kimyasalların eksikliği nedeniyle, bitki patojeni bakterileri kontrol etmek zordur. Bu patojenlere karşı genetik olarak dirençli bitkiler kullanmak en etkili stratejidir. Birçok bakteri çeşitli bitki hastalıklarına neden olur. *Pseudomonas syringae*, domates bitkilerinde bakteriyel benek hastalığına neden olarak üretkenliği ve pazarlanabilirliği olumsuz yönde etkiler. *Jasmonatezım domain protein 2 (JAZ2)*, *A. thaliana*'da *P. syringae*'ye karşı savunmaya katkıda bulunmaktadır (Gimenez-Ibanez, Boter et al. 2017). Bilim adamları *JAZ2* geninin represörü olan *JAZ2Ajas (C-terminal jasmonate associated (Jas) domain)* domates bitkisinde CRISPR/Cas sistemi ile susturulmuştur. *JAZ2Ajas* baskılayıcıları, *P. syringae*'ye karşı domates bitkisinde direnç sağlamaktadır, bu da bitkilerin bakteriyel leke hastalığına karşı korunması için CRISPR-Cas9 tabanlı bir stratejinin arazilerde uygulanabileceğini göstermektedir (Ortigosa, Gimenez-Ibanez et al. 2019).

Ortigosa ve arkadaşları (2018) CRISPR/Cas9 kullanarak domatesta *SiJaz2* genini susturdu ve genomu düzenlenmiş bitkileri, bakteriyel benek hastalığına direnç göstermiş fakat, nekrotrofik mantar patojeni *Botrytis cinerea*'ya direnç göstermemiştir.

CRISPR/Cas teknolojisi, virüslere karşı yüksek dirençli genom düzenleme tesisleri oluşturmak için de kullanılmaktadır. Bitki virüsleri doğal ortamda her yerde bulunur ve sıklıkla bitkileri enfekte eder ve bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde önemli etkilere neden olur. CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak virüse dirençli bitki geliştirmede iki farklı strateji izlenmektedir. Birinci stratejide bitki genomunda bulunan ve antiviral özellikler veren domates genlerinin modifiye edilmesinden oluşur. İkinci strateji ise hastalığa neden olan virüsü hedefleyen CRISPR/Cas9 sistemini bitkiye aktararak bitkinin virüse karşı doğal bağışıklık oluşturmamasıdır. CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak domates bitkisinde *eIF4E1* geni başarıyla susturulmuştur. Elde edilen *IF4E1* mutant domateslerde, biyokütle ve çiçeklenme zamanı dahil olmak üzere diğer özellikleri etkilemeden önemli viral hastalıklara neden olan Potyviruslere karşı dirençlilik kazandırılmıştır (Bastet, Zafirov et al. 2019, Yoon, Venkatesh et al. 2020). Yine aynı şekilde, Domates *Dicer-like 2 (DCL2)* geni hedeflenerek elde edilen *dcl2* mutantları, patates x virüsü, tütün mozaik virüsü ve domates mozaik virüslerine direnç göstermiştir. Sonuç olarak *DCL2* geninin RNA virüslerine karşı savunma mekanizmasında yer aldığını düşündürmektedir (Wang, Deng et al. 2018). Buna örnek olarak, TYLCV, önemli derecede ürün kayıplarına neden olabilecek en önemli viral domates patojenlerinden biridir. Yapılan bir çalışmada, 35S promotörü ile yönlendirilen Cas9 endonükleaz ve U6 promotörü ile yönlendirilen viral kılıf proteinini ve replikaz genlerini hedefleyen sgRNA'lar içeren vektör oluşturulmuştur. Elde edilen bitkiler, TYLCV enfeksiyonuna direnç açısından analiz edilmiştir. Virüs birikiminin WT (Wilt type) bitkilere göre son derece düşük olduğu ve viral genomun hedef bölgesinde delesyonların tespit edildiği gösterilmiştir (Wang, Zhang et al. 2019). Bu tür bir bağışıklık, isteminin nesilden nesile aktararak aktif kaldığı, bu da CRISPR/Cas9 sisteminin virüse dirençli bitkiler geliştirmek için yararlı bir teknik olduğunu göstermektedir.

4.7.2. CRISPR/Cas9 Kullanılarak Abiyotik Stres Faktörlerine Dirençli Domates Geliştirilmesi

Charles Darwin'in evrim teorisine göre, hayatta kalan en entellektüel veya en güçlü tür değil, kendisini içinde bulduğu değişen ortama en iyi uyum sağlayabilen türdür (Darwin and Costa 2009). Küresel ısınmanın giderek artması ile birlikte meydana gelen abiyotik stres, bitkilerin büyümesi ve gelişmesini önemli derecede etkilemektedir. En yaygın abiyotik stresler arasında kuraklık, tuzluluk, soğuk, aşırı sıcaklıklar ve çevre kirliliği ele alınabilir. Her biri bitki büyümesini ve gelişimini önemli ölçüde etkilemektedir ve bunun bir sonucu olarak ta bitkilerin verim ve kalitesi etkilenir. Geleneksel yetiştirme teknikleri mahsul verimini büyük ölçüde artırmıştır, ancak artan gıda talebi ile mahsul üretimini daha da iyileştirmek için yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır ve CRISPR-Cas9 teknolojisi en umut verici olanıdır (Haq, Taniguchi et al. 2018).

Kodlanmayan RNA'lar da dahil olmak üzere birçok yapısal ve düzenleyici gen, farklı çevresel stres faktörlerine karşı bitkinin tepkisinde rol oynar (Zhang 2015). Tüm bu genler, geleneksel transgenik teknolojileri ve halihazırda gelişmiş genom düzenleme araçlarını kullanarak, abiyotik streslere karşı ürün geliştirmek amacı ile hedeflenebilir. Bitkilerde, binlerce genin bir bitkideki tek bir stres koşuluyla ilişkilendirilebileceği gibi tek bir genin bu strese karşı baskın bir rolü olmayabilir. Bu nedenle CRISPR/Cas teknolojisini kullanarak bitkinin abiyotik streslere toleransını iyileştirmek için çok az ilerleme kaydedilmiştir.

Tablo 4.3. Abiyotik stres faktörlerine dirençli CRISPR/Cas9 tabanlı domates geliştirilmesi

Abiyotik stress	Hedef gen	Sonuç	Referans
Sıcaklık	<i>SIBZR1</i>	Sıcaklık stresi toleransında azalma	(Yin, Qin et al. 2018)
Sıcaklık	<i>SIAGL6</i>	Sıcaklık stresi toleransında artış	(Klap, Yeshayahou et al. 2017).
Soğuk	<i>SICBF1</i>	Soğuk stresi toleransında azalma	(Li, Zhang et al. 2018)
Kuraklık	<i>MAPK3</i>	Kuraklık stresi toleransında azalma	(Wang, Chen et al. 2017)
Kuraklık	<i>SINPR1</i>	Kuraklık stresi toleransında azalma	(Li, Liu et al. 2019)
Kuraklık	<i>SILBD40</i>	Kuraklık stresi toleransında artış	(Liu, Zhang et al. 2020)
Tuzluluk	<i>SIARF4</i>	Tuz stresine dayanıklılık	(Bouzroud, Gasparini et al. 2020).
Herbisit	<i>ALS</i>	Chlorsulfuron herbisitine dirençlilik	(Veillet, Perrot et al. 2019)

Son zamanlarda, *Brassinazole resistant 1 (BZR1)* brassinosteroid (BR) yanıtını düzenler ve BR aracılı gelişimsel süreçlere katılır. Bu genin domates içindeki ortoloğu da brassinosteroid tepkisini kontrol eder. *BZR1* geni hem CRISPR ile susturulmuş hem de overekspresyon yapılarak doğrulanmıştır. Sonuç olarak Feronia (FER) genlerini düzenleyerek termo toleransa katılmaktadır. Domates soğuğa duyarlı bir mahsul olduğundan, meyve kalitesi soğuk stres nedeniyle kolayca zarar görür. *C-repeat binding factor 1 (CBF1)* bitkileri soğuğa karşı korumaktadır. CRISPR/Cas9 kullanılarak elde edilen *cbf1* mutanlığı, soğuk ortamda WT bitkilerinden daha yüksek elektrolit sızıntısı ile daha şiddetli yaralanma semptomları sergilediği belirlenmiştir (Li, Zhang et al. 2018). *Lateral Organ Boundaries Domain (LBD)* içeren genler, yanal organ gelişiminde önemli roller oynayan bitkiye özgü genlerdir. Domates *LBD40* geni, köklerde ve meyvede yüksek oranda ifade edilmektedir ve bu genin ifadesi, PEG ve tuz tarafından önemli ölçüde indüklenmektedir. Ayrıca, *SILBD40* genin ifadesi metil jasmonat muamelesi ile indüklenirken, *jasmonic acid-insensitive1 (jai1)* mutant bitkilerde ifadesi indüklenmemiştir. Bu bulgular, *SILBD40* gen ekspresyonunun jasmonik asit sinyaline bağlı olduğu ve JA sinyal iletim yolundaki ana transkripsiyon faktörü olan SIMYC2'nin aşağı yönde olabileceğini göstermektedir. Kuraklık stres testi sonucunda, CRISPR/Cas9 aracı *SILBD40* geninin susturulması ile elde edilen mutant bitkilerin hafifçe solduğunu, *SLBD40* geninin overekspresyon yapıldığı bitkilerde ise bitkilerin şiddetli solmaya maruz kaldığını gösterilmiştir (Liu, Zhang et al. 2020). *Slagamous-Like 6 (SLGL6)* bir R genidir, bu genin CRISPR/Cas9 teknolojisi ile nakavt edilmesi, domates bitkisinin daha iyi büyümesini ve ısı stresi durumunda bile meyve geliştirmesini sağladı (Klap, Yeshayahu et al. 2017).

SLARF4 transkripsiyon faktör geninin knockdown ve knockout yapılması ile domateste su kullanım verimliliğini artırdı ve genom düzenlenmiş bitkilerinin tuzluluk ve ozmotik strese daha fazla tolerans göstermesini sağlamıştır (Bouzroud, Gasparini et al. 2020).

Domates bitkisinde CRISPR/Cas9 uygulamalarındaki son yaklaşımlardan biri, herbisite dayanıklı domates üretimidir. Klorosülfürona dirençli domates ve patates,% 71'e ulaşan verimli bir şekilde sitidin baz editör (CBE'ler) aracı ile hassas bir şekilde *asetolactate synthase (ALS)* knock-ed yapılarak herbisit dirençli domates elde edilmiştir (Veillet, Perrot et al. 2019).

4.7.3. CRISPR/Cas Kullanılarak Domates Bitkisinin Verimini, Kalite, Büyüme ve Gelişiminin Artırılması

CRISPR/Cas sistemi, bitki büyümesi ve gelişimi üzerindeki gen işlevini incelemek için yaygın olarak benimsenmiştir ve ayrıca bitki büyümesini ve gelişimini artırmak için bitki morfolojisini iyileştirmede sağlam bir araç olarak kullanılmıştır.

CRISPR/Cas9 teknolojisi ile S ve SP promotorunda mutasyon oluşturmaları, domateste iyileştirilmiş çiçeklenme ve bitki yapısı ile sonuçlanmıştır (Rodríguez-Leal, Lemmon et al. 2017). Meyve kalitesi iç ve dış özelliklere göre tanımlanabilir. Dış kalite faktörleri, tümü çıplak gözle kolayca tespit edilebilen meyve boyutu, rengi ve dokusudur. Besin seviyeleri (şeker ve vitamin gibi), biyoaktif bileşikler (likopen, antosiyanin ve malat gibi) ve meyve kalitesi gibi özelliklerin belirlenmesinde cihaza gereksinim duyulmaktadır.

Domates meyvesinde, çiçek karpellerinden türetilen loküllerin sayısı, meyve büyümesine %50'ye varan oranda katkıda bulunarak, domates meyve büyüklüğü üzerinde en büyük etkiye sahiptir. Domateste lokul sayısı, birkaçı tanımlanmakla birlikte çoklu kantitatif özellik lokusları (QTL) tarafından kontrol edilir (Li, Qi et al. 2017). Bilim adamları, klasik *Clavata-Wuschel* (*CLV-WUS*) kök hücre devresini yok ederek hızla daha büyük domates meyveleri üretmek için CRISPR-Cas9 teknolojisini kullandılar (Lin, Zhu et al. 2014). Renk ve tekstür, tüketicinin taze domates algısının önemli unsurlarındandır. Farklı alanlardan tüketicilerin farklı renk tercihleri vardır. Örneğin, Avrupalı ve Amerikalı tüketiciler kırmızı domatesi tercih ederken, Asya'da pembe renkli domatesler daha popülerdir (Lin, Zhu et al. 2014). Araştırmacılar, sırasıyla *phytoene synthase 1* (*PSY1*), *MYB transcription factor 12* (*MYB12*), and *Anthocyanin 2* (*ANT2*), hedefleyerek sarı (Hayut, Bessudo et al. 2017), pembe (Deng, Wang et al. 2018) ve mor (Čermák, Baltes et al. 2015) domatesleri başarılı bir şekilde elde etmişlerdir. Domates raf ömrünün uzatılması için doku özelliklerini değiştirmek için bitki ıslahçıları genom düzenleme araçlarından yararlanmıştır. CRISPR ile *ripening inhibitor* (*RIN*) ya da *DNA demethylase 2* (*DML2*) inaktivasyonu, meyve olgunlaşmasının önlenmesi ve raf ömrünün uzamasına yol açmaktadır (Ito, Nishizawa-Yokoi et al. 2015, Lang, Wang et al. 2017). Fakat, bu meyveler genellikle tam renk geliştiremezler, bu da kötü lezzet ve besin değerinin düşmesine neden olur. Bu nedenle, diğer kalite yönlerini etkilemeden iyi raf ömrü sergileyen meyveler elde etmek çok önemlidir. İki farklı araştırma grubu, domates organoleptik ve beslenme

kalitesini düşürmeden *pektat liyazı (PL)* ve *alcobaca (ALC)* genlerini susturarak meyve yumuşatmasının başarılı bir şekilde kullanıldığını bildirmiştir (Ulusik, Chapman et al. 2016, Yu, Wang et al. 2017).

İç meyve kalitesi ile ilgili olarak, besin ve biyoaktif bileşiklerin seviyelerini artırmak için çok çaba sarf edilmiştir. Karbonhidratlar ve vitaminler enerji sağladıkları için hayati öneme sahip besinlerdir. Şeker ve karotenoidlerin sentezi ve metabolizmasında çeşitli genler rol oynamaktadır. Örneğin, *mitogen-activated protein kinase 20 (MPK20)* devre dışı bırakmak, hem transkript hem de protein seviyelerinde şeker metabolizmasını kontrol eden birkaç genin ekspresyonunu bozmuştur (Chen, Yang et al. 2018). Biyoaktif bileşikler, "tipik olarak gıdalarda küçük miktarlarda oluşan ekstra besin bileşenleri" olarak tanımlanır ve genellikle kardiyovasküler hastalıkların ve kanserin önlenmesinde rol oynar. Antosiyanin (Meng, Yang et al. 2015), malat (Ye, Wang et al. 2017), γ -aminobütirik asit (GABA) (Nonaka, Arai et al. 2017) ve likopen (Li, Wang et al. 2018), biyoaktif bileşikler olarak kabul edilir. CRISPR/Cas9 teknolojisi, metabolik yollardaki anahtar genlerin ekspresyonunu modüle ederek antosiyanin, GABA ve likopen ile zenginleştirilmiş domates meyveleri üretmek için uygulanmaktadır.

Tablo 4.4 CRISPR/Cas9 kullanılarak domates kalite ve verim özelliklerinin geliştirilmesi

Hedef gen	Sonuç	Referans
<i>CLV-WUS, FASCIATED, ENO</i>	Domates meyvesinin irileştirilmesi	(Lin, Zhu et al. 2014)
<i>PSY1</i>	Domates renginin değiştirilmesi	(Hayut, Bessudo et al. 2017)
<i>PL</i>	Raf ömrünün uzatılması	(Ulusik, Chapman et al. 2016).
<i>ALC</i>	Raf ömrünün uzatılması	(Yu, Wang et al. 2017)
<i>MPK20</i>	Şeker metabolizmasını kontrol eden genlerin baskılanması	(Chen, Yang et al. 2018)
<i>ANT2</i>	Antosiyanin içeriğinin artırılması	(Meng, Yang et al. 2015)
<i>GAD2, GAD3</i>	GABA içeriğinin artırılması	(Nonaka, Arai et al. 2017)
<i>SGR1, LCY-E, Blc, LCY-B1, LCY-B2</i>	Likopen içeriğinin artırılması	(Li, Wang et al. 2018)
<i>ALMT9</i>	Malat içeriğinin azaltılması	(Ye, Wang et al. 2017)
<i>AGL6</i>	Partenokarpik meyve üretimi	(Klap, Yeshayahou et al. 2017)
<i>ARF7</i>	Partenokarpik meyve üretimi	(Hu, Israeli et al. 2018)
<i>IAA9</i>	Partenokarpik meyve üretimi	(Ueta, Abe et al. 2017)
<i>GAI</i>	Cüce domates geliştirilmesi	(Tomlinson, Yang et al. 2019)

4.7.4. CRISPR/Cas9 Aracılı Erkek Kısır Domates Bitkilerin Üretimi

Ticari sebze ve tarla bitkilerinin çoğu, çok çeşitli ortamlarda istikrarlı bir şekilde performans gösteren F1 hibritleridir. Erkek kısırılığı, hibrit tohum üretimi için gereken işçiliği azaltır ve yüksek çeşit saflığı sağlar (Zhang, Wu et al. 2018). Domates bitkisinde erkek kısırılık, ilk mutant 1915'te tanımlandığından beri bitki ıslahçıları tarafından büyük önem verilmiş ve hibrit domates tohumları üretmek için erkek kısırılığının kullanımı giderek artmaktadır. (Gorman, McCormick et al. 1997).

Erkek kısırılığının hibrit tohum üretiminde kullanılması maliyeti düşürür ve polen üretmeyen domates çeşitlerinde yüksek saflık sağlar. *Basic helix-loop-helix* transkripsiyon faktör (bHLH) kodlayan *SIMS10* geni, mikrosporogenez sırasında tapetumda mayoz ve programlanmış hücre ölümüne katılmaktadır. Bu nedenle, *SIMS10* geninin CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme yoluyla modifikasyonunun domates bitkilerinin erkek kısırılığına yol açtığını bildirilmiştir (Jung, Kim et al. 2020).

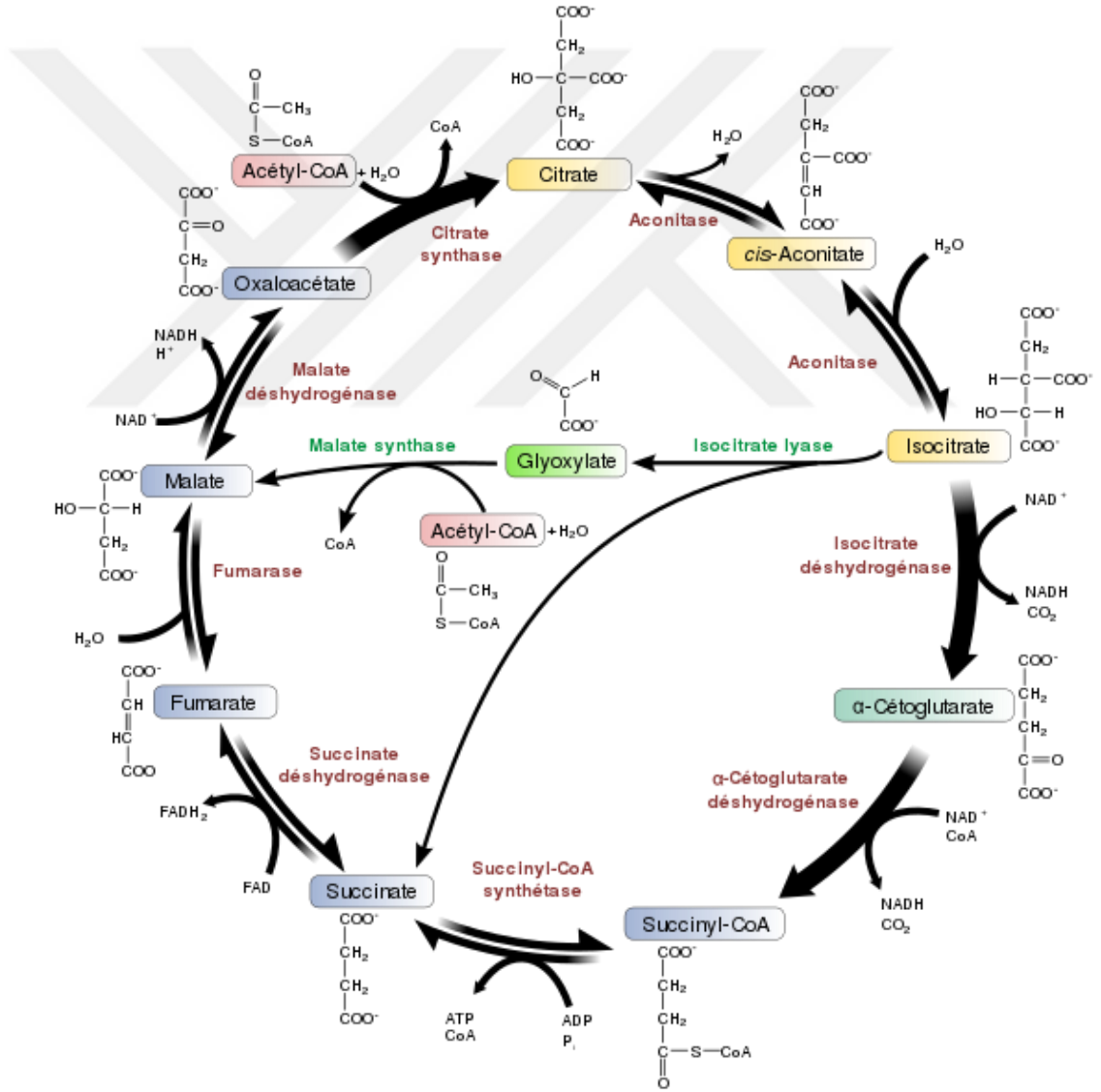
Başka bir çalışmada Du ve ark. (2020), Mısır bitkisinin *Ms45* geni domatestede homologunu *Strictosidine synthase-like (SlSTR1)* geni CRISPR ile susturularak erkek kısır hatlar elde edilmiştir. Yazarlar, bu erkek kısır bitkilerine, *Anthocyanin1 (ANT1)* fide rengine bağlı bir fertil-restorasyon genin aktarılması ile transgenik idame ettirici hatlar elde edilmiştir. bR2R3 MYB transkripsiyon faktörü *ANT1*, antosiyanin birikimini güçlü bir şekilde artırır. Bu, idame hatların mor fidelerinin yeşil MS bitkilerinden ayırt edilmesini kolaylaştırır.

Tablo 4.5. CRISPR/Cas9 kullanılarak erkek kısır domates geliştirilmesi

Hedef gen	Hedef genin görev aldığı lokasyonlar	Referans
<i>SIMS10</i>	Mayoz, Tapentum	(Jung, Kim et al. 2020)
<i>SlSTR1</i>	Stamen	(Du, Zhou et al. 2020)

5. AKONİTAZ

Trikarboksilik asit döngüsü (TCA) kreps döngüsü ya da sitrik asit döngüsü olarak da adlandırılmaktadır. Tüm ökaryotlarda olduğu gibi, bitkilerdeki TCA döngüsü, organizmalara enerji sağlamak için temel olan ATP'yi üretmektedir (Şekil 5.1) (Schnarrenberger and Martin 2002). TCA döngüsü, oksidatif fosforilasyon için elektronlar ve amino asit biyosentezi için ara maddeler sağlayan karbon metabolizmasının merkezi unsurudur. TCA döngüsü ayrıca glikoliz yolunu, glioksilat döngüsü aracılığıyla yağ asidi metabolizmasına bağlar (Nunes-Nesi, Araújo et al. 2013).



Şekil 5.1. Trikarboksilik asit döngüsü (TCA).

TCA döngüsünün ikinci aşaması olarak, sitratın bir ara ürün olarak cis-akonitat aracılığıyla izositrata tersine çevrilebilir izomerizasyonu, akonitaz tarafından katalize edilir (Peyret, Perez et al. 1995). Sitrat (izositrat) hidrolizaz veya akonitat hidrataz olarak da bilinen akonitaz, (EC 4.2.1.3) trikarboksilik asit döngüsünde sis-akonitat yoluyla sitratın izositrata tersine çevrilebilir izomerizasyonunu katalize eden, Fe-S kümesi içeren bir 90 kDa civarında bir enzimdir. Tüm ökaryotik hücrelerde glikosilat döngüsü ve sitozolik sitrat metabolizması gibi bazı metabolik süreçlere katılan sitozolik akonitaz (Cyt-Aco) (Sadka, Dahan et al. 2000, Cercós, Soler et al. 2006) ve TCA (Tricarboxylic acid cycle) içerisinde yer alan mitokondrial akonitaz (Mit-Aco) (Hayashi, De Bellis et al. 1995) olmak üzere akonitazların iki formu tanımlanmıştır. Ayrıca akonitazlar çok işlevli proteinlerdir. Enzimatik aktiviteye ek olarak, örneğin, maya mitokondriyal akonitaz'ın mitokondriyal nükleoid'in bir bileşeni olduğu ve mitokondriyal DNA ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. İnsanlarda *ACO1* geni, bir AcnA_IRP domaini içeren, iron-responsive element-binding protein 1 (IRP1) olarak da adlandırılan sitozolik bir akonitazdır. IRP1, iron-responsive element'lerin RNA stem-loop yapısını tanıyabilir, ferritin mRNA'sının 5 'untranslated bölgesinde lokalize olur ve ferritin translasyonunu engeller. Bu nedenle sitozolik akonitazlar, hayvanlarda çift işlevli proteinlerdir; akonitazlar, 4Fe-4S kümesi bağlandığı zaman *ACO* etkinliğini gösterir ve 4Fe-4S kümesini ayrıldığı zaman IRP aktivitesi gösterirler. Ek olarak, insanlarda bulunan *ACO2* geni, AcnA_Mitokondriyal domain içeren ve Krebs döngüsünde işlev gören bir mitokondriyal akonitazdır. Hayvanlarda, sitozolik akonitaz demir homeostazı ve hem hayvanlarda hem de bitkilerde oksidatif strese direnç ile ilişkili RNA bağlanma aktivitesine sahiptir (Chen, Kis et al. 2007).

Özellikle, yüksek bitkilerde bugüne kadar tespit edilen tüm akonitaz dizileri, hayvanlardaki mitokondriyal izoformlardan daha çok sitozolik akonitaz izoformlarına benzemektedir (Moeder, Del Pozo et al. 2007). *Arabidopsis* bitkisinde bulunan üç akonitaz proteininin tümü, insanlarda bulunan sitozolik akonitaz IRP1 ile aynı AcnA_IRP domainine sahiptir; ancak *Arabidopsis* akonitazların hiçbirinde IRP aktivitesi tespit edilememiştir (Heazlewood, Tonti-Filippini et al. 2004). Mitokondriyal proteomda üç *Arabidopsis ACO* geni tespit edilmiştir. Buna ek olarak, Yabani domates türlerinde bulunan *ACO1* proteinleri hem sitozol hem de mitokondride lokalize olmaktadır (Carrari, Nunes-Nesi et al. 2003). Çünkü *ACO* genlerinin *Arabidopsis*, tütün ve domateste mitokondriyal izoformları tespit

edilmemiş, bu sitozolik akonitazlar, mitokondride akonitaz aktivitesini telafi edebilirler (Carrari, Nunes-Nesi et al. 2003, Moeder, Del Pozo et al. 2007).

Wang et al. (2016), 12 kara bitkisinden (*Arabidopsis*, mısır, soya fasulyesi vb.) akonitaz genlerinin evrimini araştırmış, Akonitaz genlerinin yüksek bitkilerde gen duplikasyonunu, gen ifadelerini ve bu genlerin promotör bölgelerinde bulunan cis-acting elementleri biyoinformatik araçlarla belirlemişler. Bununla birlikte, tüm kara bitki akonitazlarının sitozolik olduğu ve analiz edilen on iki genomda mitokondriyal izoform bulunmadığı gösterilmiştir (Wang, Yang et al. 2016). Arnaud vd. (2007) *ACO1* ve *ACO3* genlerinin sitozolik *ACO2* geninin ise mitokondriyal akonitaz olduğunu öne sürmüştür. Ancak, bu üç akonitaz geninin *Arabidopsis* mutantlarıyla ilgili bulguları kesin değildir (Arnaud, Ravet et al. 2007).

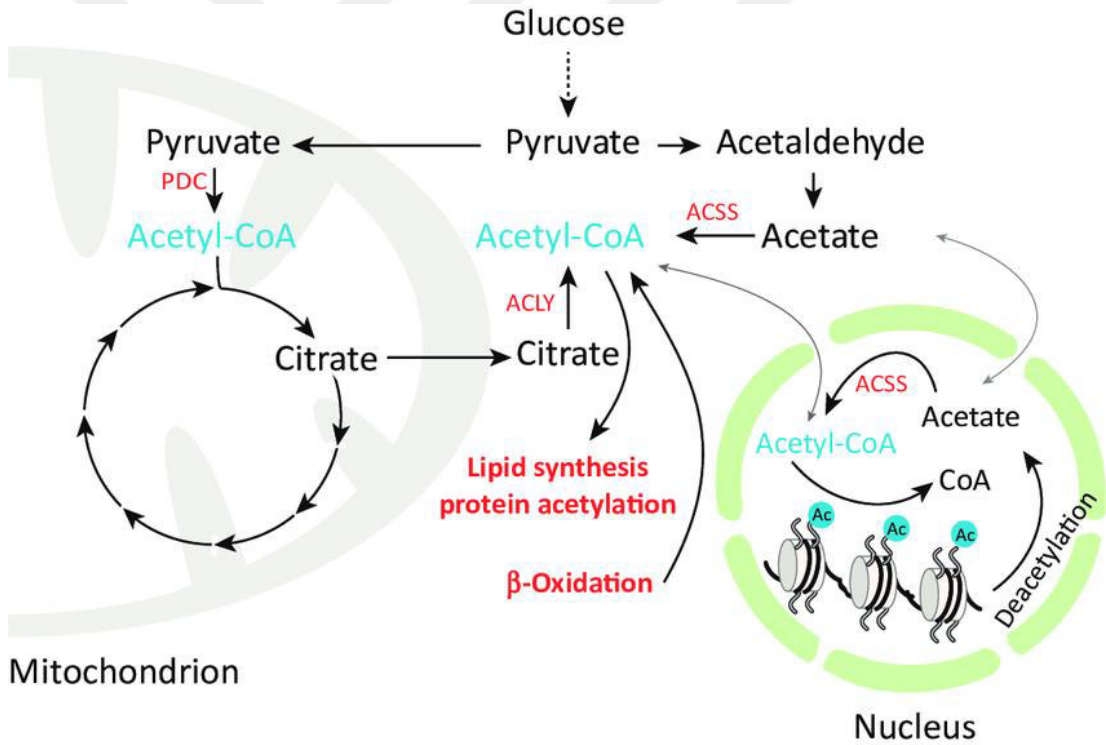
TCA döngüsündeki akonitaz aktivitesine ek olarak, bitki akonitazları yağ asit metabolizmasının karbon iskelet akışına, süktroz metabolizmasına ve glioksilat döngüsüne katılmaktadırlar (Navarre, Wendehenne et al. 2000, Borek and Nuc 2011). Bitki akonitazları ayrıca birkaç önemli fizyolojik ve gelişimsel süreçte yer alır (Navarre, Wendehenne et al. 2000).

Mit-Aco citrik asit metabolizması içerisinde yer alır, sitrik asitten izositrat oluşumunu katalizler, aynı zamanda sitrik asitin dönüşümü ve parçalanmasını düzenler. Cyt-Aco ise çeşitli biyokimyasal süreçlerde rol oynar (Chen, Zhao et al. 2009). Kivi (*Actinidia eriantha*) bitkisinde Mit-Aco çiçeklenmeden 80 gün sonra Cyt-Aco'dan daha yüksek aktivite göstermiş 110 gün sonra ise aktivitesi azalma eğilimi göstermiştir. Cyt-Aco ise çiçeklenmeden sonra aşağı yukarı stabil bir aktivite göstermiştir. Yapılan bu çalışmada, sitrik asit içeriğindeki değişikliklerin, Mit-Aco ve Cyt-Aco aktiviteleri ile tutarlı olmadığı gösterilmiştir (Jiang, Huang et al. 2020).

Akonitaz geni, yapısal olarak (konstitüv) ifade edilir, ancak çoğu gelişim aşamasında düşük seviyelerde ifade edilirken, tohum, polen olgunlaşması sırasında ve çimlenme sırasında ifadesinde çarpıcı bir artış gözlemlenmektedir (Peyret, Perez et al. 1995). *Arabidopsis*'de bulunan 3 *ACO* genin tohum, kök, gövde, yaprak ve çiçeklerde ifadesine northern blot analizi belirlenmiştir. Üç gen tohum hariç tüm organlarda benzer ifade göstermiştir. Tohumlarda *ACO1* genin ifadesi bulunamazken *ACO2* ve *ACO3* ifadesi oldukça düşük bulunmuştur. *ACO1* geninin ifadesi kök, gövde ve kauliner yapraklarda daha fazla bulunmuştur. En yüksek *ACO2* gen ekspresyonu köklerde, kanül yapraklarında ve çiçeklerde tespit edilmiştir (Arnaud, Ravet et al.

2007). *ACO* mutant *Arabidopsis* bitkileri mutant olmayan hatlar ile çaprazlanması ile yapılan çalışmada %23-25 tohum oluşumunun engellendiği gözlemlenmiştir (Arnaud, Ravet et al. 2007).

Mitokondri, TCA döngüsü, solunum elektron transferi ve ATP sentezi dahil olmak üzere çok sayıda metabolik yol için önemli bir bölgedir. Polen oluşumunda meydana gelen bir kusur mitokondrial mutasyonun ikincil bir etkisi, solunum verimliliğinde azalma veya diğer mitokondriyal fonksiyonların azalmasından kaynaklanabilir. Du vd., (2016) *Brassica napus* bitkisinde sitoplazmik erkek kısır hatlar transkriptom dizileme yapılmış ve kontrol bitkiler ile karşılaştırılmıştır (Du, Liu et al. 2016). Yapılan bu çalışmada, TCA döngüsüne katılan başta akonitaz olmak üzere altı genin önemli ölçüde down-regüle olduğu gösterilmiştir. Burada TCA döngüsü acetyl-CoA'nın oluşumunda anahtar rol almaktadır (şekil. 5.2).



Şekil 5.2.TCA döngüsü acetyl-CoA'nın oluşumunda anahtar rol oynar.

ACO genleri birkaç model bitkide çalışılmış ve daha yüksek bitkilerde yalnızca sitozolik *ACO*'lar gözlemlendiği bildirilmiştir. Belirlen *ACO* genlerinin bitkilerde sitrik asit içerikleri, oksidatif stres ile ilişkisi ve demir homeostazisi ile ilişkileri belirlenmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda bitkilerin olgunlaşma dönemlerinde *ACO* genlerinin ifadesinin arttığı belirlenmiş fakat polen oluşumu ile ilişkisi çalışılmamıştır.

6. HİBRİT BİTKİ ÜRETİMİNDE, TOZLAŞMA KONTROL TEKNOLOJİLERİ VE CRISPR/CAS9

İki (veya daha fazla) homozigot (kendilenmiş hat, çeşit veya klonun) melezlenmesinden elde edilen tohumlukların üretimde kullanıldığı çeşitlere “F1 hibrit çeşit”, böyle çeşitlerin geliştirilmesine yönelik ıslah çalışmalarına da “F1 hibrit çeşit ıslahı” veya “F1 hibrit gücü ıslahı” adı verilmektedir.

Hibrit ıslahında yapılan çalışmalar, bu teknolojiyi, özellikle son on yılda tarımsal üretimde önemli küresel artışa katkıda bulunan ana faktörlerden biri haline getirmiştir. Hibrit ıslahında ve üretiminde, dişi ebeveynlerin kendi kendine veya kardeş polinasyonları ile tozlamasını önlemek için etkili bir emaskülasyon (sterilizasyon) kontrol sistemi gereklidir. Birçok bitki türünde hibritler baskın çeşit haline gelmiştir. Geliştirilmiş çeşitlerin veya hibrit çeşitlerin sayısının ve bu çeşitlerin benimsenmesi, sebzelerin verimlerini artırmak için kullanılan makul çözüm yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. 1860'larda Charles Darwin ilk olarak mısırdaki (*Zea mays*) heterosisi tanımlamış ve Gregor Mendel, bezelye bitkilerinin farklı türlerini çaprazlayarak kalıtsal özellikler için genetik prensipleri oluşturmuştur. Ancak, 1920'lere kadar mısırdaki heterosisten faydalanılamamış ve daha sonra mısır, ticarileştirilen ilk hibrit tohum haline gelmiştir. İlk mısır melezleri piyasaya sürüldüğünde, aynı anda yetiştirilen heterozigotluğu yüksek çeşitlerden yaklaşık %15 daha fazla verim elde edilmiştir (Duvick 2005). Bu görüşle orantılı olarak, geçtiğimiz yirmi yılda domates (%40), lahana (%68.6), patlıcan (%82) ve bamya (%10) gibi sebzelerde hibrit tohum teknolojisinin benimsenmesinde artan bir eğilim olmuştur (Sudha, Gajanana et al. 2006).

Günümüzde, mısır, ayçiçeği, lahana, kabakgiller, havuç, pancar ve soğan dahil olmak üzere birçok allogam (yabani tozlanan ve döllen) bitkiler, ağırlıklı olarak hibrit çeşitlerden üretilmektedir. Ayrıca, bazı otogam (kendi kendini döleyen) mahsullerde hibrit çeşitler de yaygın hale gelmiştir (Havey 2004). Kendine dölenen bitkilerde domates, sorgum ve çeltik hibrit tohumu üretimi yapılan önemli bitkiler arasındadır. Örneğin, hibrit sorgum çeşitleri ABD ve dünya pazarlarına hakim olup ve şuanki hibrit kullanım oranı Çin'de yaklaşık %80 ve Kanada'da %50 seviyelerine ulaşmıştır (Havey 2004).

Hibritlerin faydalı özellikleri, artan tohum verimi veya biyokütle ile sınırlı değildir. Gelişmiş fiziksel stabilite, gübrelere daha yüksek yanıt verme, daha iyi kök penetrasyonu ve daha iri tohum yapısı gibi diğer faktörler de değerli avantajlardır. Ekonomik olarak, hibrit bitkiler biyotik (virüs, bakteri, fungus ve nematod) ve abiyotik streslere (örneğin, kuraklık ve ısı) karşı geliştirilmiş tolerans özellikle önemli olmuştur. Kuraklığa dayanıklı hibrit özelliklerinin, gelecekte mahsul üretimini olumsuz etkileyeceği tahmin edilen iklim değişiklikleri ışığında bir etkisi olabileceği tahmin edilmektedir (Bruce, Edmeades et al. 2002).

Hibritlerin faydalarına rağmen, birçok ürün için pratik ve uygun maliyetli hibrit tohum üretim sistemi mevcut değildir. Sonuç olarak, yüksek tohum üretim maliyetleri veya ticari hakların korunamaması gibi kaygılar nedeniyle, bazı önemli türlerin hibritleri (buğday arpa) ticari olarak etkin üretilememektedir. Üretimi yapılan çeşitlerde ise, hibrit üretim sırasında gerekli olan zaman ve işçilik giderlerinden dolayı maliyet artmaktadır. Hibrit yetiştirme için bir ön koşul olarak kendi kendine döllenmeyi önlemek için iyi bir tozlaşma kontrol sistemidir. Biseksüel bitkilerde çapraz tozlaşmayı teşvik etmenin en etkili yolu erkek kısırlığıdır.

Hibrit bitkilerde ortaya çıkan ve yüksek oranlarda verim artışına neden olan heterosisten en etkin şekilde yararlanmayı hedefler. Fakat, hibrit geliştirmek için harcanan giderleri, heterosisin neden olacağı verim artışı ile rahatlıkla karşılayabilir nitelikte olmalıdır. Hibrit tohumluk üretiminin pratik ve sürdürülebilir olmasının yanı sıra, ekonomik olması da gerekmektedir. Çünkü birçok bitki türünde yüksek heterosis elde edilmekle birlikte, anne ve baba hatların birbiri ile melezlenebilmesi için yani dişi çiçekleri elle kısırlaştırmak (emaskülasyon) ve sonra kısırlaştırılan çiçeklerin stigmatını erkek çiçek polenleriyle melezlemek işçilik ve maliyet gerektirmektedir. Genetik erkek kısırlığa (GMS), sitoplazmik erkek kısırlığa (CMS), genetik stoplazmik erkek kısırlığı (CGMS), kimyasal ve genetik mühendisliği sayesinde erkek kısır bitkiler elde edilebilmekte, bu bitkilerden yararlanılarak emaskülasyon gibi zahmetli ve masraflı bir işleme gerek kalmadan ekonomik anlamda hibrit tohum üretimi başarılabilmektedir.

6.1. Bitkilerde Erkek Kısırlığı

Bitki erkek kısırlığı, anterlerin, polenlerin veya erkek gametlerin fonksiyonlarının bulunmamasına karşılık gelir ve genellikle organların gelişimlerinden kaynaklanan bozukluklar sonucunda ortaya çıkar. Aslında, doğada

birden fazla erkek kısırlığı mekanizması gözlemlenebilir. Birçok hermafrodit çiçek yapısına sahip bitki, tozlaşmayı teşvik etmek amacı ile sahip oldukları bazı mekanizmaları kullanarak çiçek gelişimini düzenleyebilirler. Örneğin diogamy (kendi kendine tozlaşma, pistillerin ve organların farklı zamanlarda olgunlaşmasıyla önlenir), chasmogamy (anthesis’de açılan ve bir böcek vektörü tarafından ziyaret edilebilen hermafrodit çiçek türü), heterostyly (polimorf bitkiler üzerindeki çiçekler, farklı uzunluklarda stillere sahiptir, bu nedenle çapraz tozlaşmayı teşvik eder) kendine uyumsuzluk ve tek cinsiyet kısırlığı (erkek veya dişi) gibi durumlar buna örnek olarak gösterilebilir (Kaul 2012).

Kısacası erkek kısırlığı, bitkilerin fonksiyonel anter, polen veya erkek gamet üretememesi olarak tanımlanmıştır (Kaul 2012). Anter ve polen oluşumunda yer alan anahtar genlerin çoğu tanımlanmıştır (Wilson, Song et al. 2011). Tapetum, mikrospor oluşumu ve polen duvarı oluşum sürecinde kullanılan besinleri, proteinler, lipidler ve polisakkaritler önemli rol oynarlar. Erkek kısırlığı, sırasıyla genik erkek kısırlığı (GMS) ve sitoplazmik erkek kısırlığı (CMS) ile sonuçlanan mikrosporogenez veya gametogenez aşamalarından herhangi birini etkileyen nükleer veya sitoplazmik faktörlerle ilişkilendirilebilir.

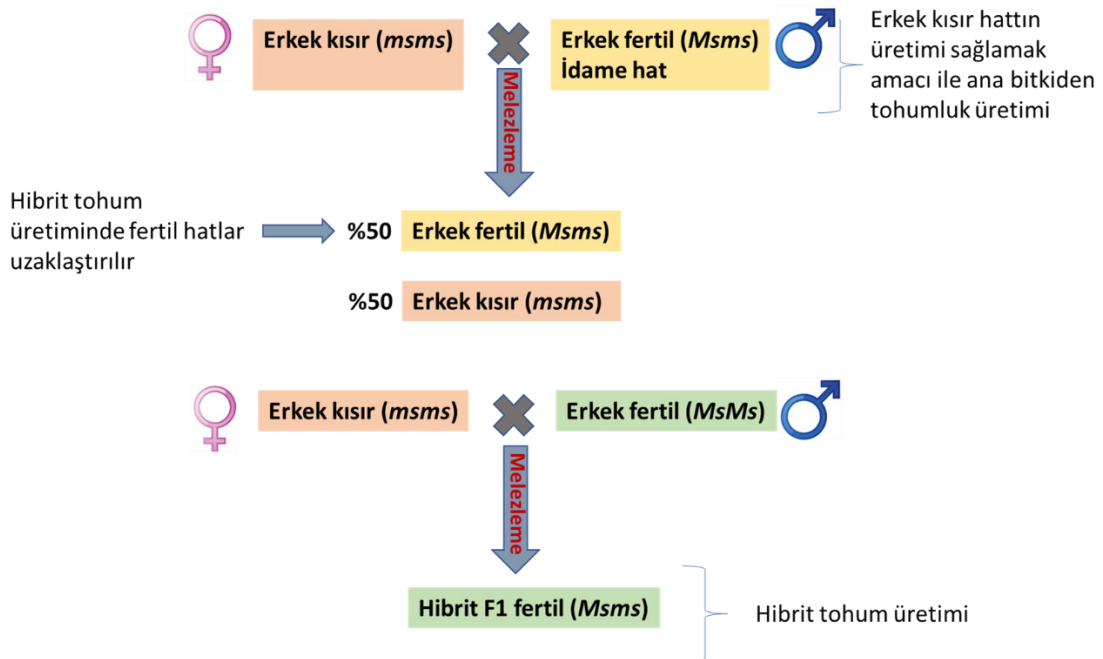
Hibrit tohumların üretilmesi için, genetik çeşitliliğe sahip ana ve baba hatların çapraz tozlaşması gerekir. Bu nedenle kendine döllen bitki türlerinde erkek-kısır dişi hatların kullanılması hibrit tohum üretiminin bir ön koşuludur. İkinci olarak, erkek steril bitkiler muhafaza edilmeli ve çaprazlamada kullanılacak erkek kısır bitkiler geniş ölçekli kullanım için çoğaltılmalıdır. Erkek-steril dişi hatları oluşturmak için emaskülasyon ve kimyasal işlem gibi çeşitli yaklaşımlar kullanılmış olsada, doğal erkek-steril hatların kullanımı büyük ölçekli hibrit tohum üretimi için ideal bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir.

6.2. Genetik Erkek Kısırlığı (GMS)

Normal polen gelişimini etkileyen nükleer genler, 175’ten fazla türde rapor edilmiştir. Erkek steril mutantların çoğu, tek başına veya kombinasyon halinde fiziksel veya kimyasal mutajenler etkisiyle çoğunlukla kendiliğinden ortaya çıkmıştır. *ms* genlerinin çoğu, mutasyona uğradığından dolayı işlev kaybı oluşmuştur. Genellikle resesif bir gen çifti tarafından idare edilmekte ve “*msms*” şeklinde sembolize edilmektedir. Fakat, bazı baskın genler de rapor edilmiştir (Kaul 2012). Domateste 55’ten fazla, biberde 12’den fazla ve brokolide altıdan fazla resesif *ms* geni

tanımlanmıştır (Prasanth and Kumary 2014). Fasulye, bakla, karnabahar, lahana ve şalgamda hem çekinik hem de baskın *ms* genleri rapor edilmiştir. Brüksel lahanası, turp, pancar, pazı, soğan ve havuç gibi diğer türlerde çekinik *ms* genleri mevcuttur, ancak hibrit üretmek için kullanılmazlar (Prasanth and Kumary 2014).

Hibrit tohum üretiminde homozigot *msms* genetik yapısına sahip bitkiler kendini dölleyemediğinden tohum üretimi meydana gelmez ve erkek kısır popülasyon üretilmemektedir. Resesif *ms* genleri hibrid tohum üretiminde kullanıldığında, erkek steril olan (*msms*) bitkilerini ve erkek fertil bitkiler üreten heterozigot bir idame hattı (maintainer) (*Msms*) ile çaprazlayarak popülasyon muhafaza edilebilmektedir. Çaprazlama sonucunda oluşan fertil ve steril hatlar tek tek kontrol edilerek fertil hatlar uzaklaştırılmaktadır (Şekil 6.1). Çiçeklenmeden önce erkek fertil ana genotiplerin atılmasında faydalanan diğer bir olay yaklaşım ise, *ms* genine sıkıca bağlı bazı morfolojik veya moleküler belirteçlerin kullanılmasıdır. Domateste, *ms* genlerine bağlı bazı belirteçler şu şekildedir: fide sapında antosiyanin bulunmaması, tüylü fenotip, patates yaprağı şekli ve enzim belirteçleri (Colombo and Galmarini 2017). Geriye kalan bitkiler hibrit tohum üretiminde ana ebebeyn olarak kullanılmaktadır (şekil 6.1). Uygun belirteçlerin olmaması, zahmetli bakım süreçleri ve fertil bitkilerin uzaklaştırma zorluğu nedeniyle, kısırılık sisteminin sebze ıslahında kullanımı yaygın değildir.



Şekil 6.1. Genetik erkek kısırılık sisteminin idamesi ve F1 hibrit tohumluk üretimi

Bazı erkek kısırlık genleri, sıcaklık ve fotoperiyot gibi farklı çevresel koşullar altında ifadelerini değiştirmektedir. Bu tür erkek kısır bitkiler sırasıyla ısıya duyarlı genetik erkek kısırlığı (TGMS) ve fotoperiyod duyarlı genetik erkek kısırlığı (PGMS) olarak adlandırılmaktadır (Virmani and Ilyas-Ahmed 2001). Ekstrem ortamlar altında büyütüldüğünde, TGMS ve PGMS soyları erkek sterildir ve anne hat olarak kullanılırken, normal koşullarda büyütülen aynı hatlar erkek kısır değildir ve populasyon bu şekilde muhafaza edilebilmektedir. TGMS ve PGMS hatları birçok bahçe bitkisinde rapor edilmiştir. GMS kullanılarak hibrit üretimi biber, kırmızı biber, lahana, karnabahar ve domatesde gösterilmiştir (Dhall 2010).

6.3. Sitoplazmik Erkek Kısırlık (CMS)

Sitoplazmik erkek kısırlığı (CMS), polenin normal gelişimini bozan mitokondriyal DNA yeniden düzenlemelerinden kaynaklanan mitokondriyal genler tarafından belirlenmektedir. Kalıtsal olarak anne tarafından miras alınan bu karakter, 140'tan fazla yüksek bitki türünde tanımlanmıştır. CMS ile ilgili mekanizma aydınlatılmamış olsa da, enerji eksikliği, programlanmış hücre ölümü (PCD) ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) rollerinin olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (Hu, Huang et al. 2014). Bu tip kısırlık sitoplazma tarafından determine edilmektedir. Genellikle kısırlığa neden olan sitoplazma S, bunun karşıtı olan fertil olan stoplazma N harfi ile gösterilmektedir. “S” stoplazmayı taşıyan bitkiler, “erkek kısır” “N” stoplazma taşıyan bitkiler ise fertildir. Bu bitkilerin melezlenmesi sonucu elde edilen F1 bitkilerin (Ana S X bab N çaprazlanması sonucu döller S olur) hepsi kısırdır. Stoplazmik erkek kısırlığın kalıtımı sadece ana bitki tarafından sağlanmaktadır. Kısırlığın sitoplazma tarafından yönetilmesi nedeniyle sitoplazmik kısırlık pratikte yalnızca vejetatif kısımları tüketilen bitki türleri için geçerlidir ve sebzelerde soğan, pırasa, havuç gibi türlerde uygulama alanı bulabilmiştir (Karağaç ve Balkaya, 2009)

6.4. Sitoplazmit-Genetik Erkek Kısırlık (CGMS)

Sitoplazmik-genetik erkek kısırlığı (CGMS), erkek kısırlığına neden olan mitokondriyal genler ile nükleer genlerin etkileşiminden kaynaklanır. Bu tip kısırlık ilk kez soğanlarda Jones (1937) tarafından bulunmuş ve F1 hibrit tohumluk üretimindeki ilk uygulaması da yine Jones ve Clarke (1943) tarafından yapılmıştır. Sitoplazmik-genetik erkek kısırlığında, kısırlık özelliği hem sitoplazma hem de resesif genlerin etkisi altında ortaya çıkmaktadır. Gerek sitoplazmik gerekse genetik faktörlerden birinin fertil olması halinde, fertil bitkiler meydana gelir. Sitoplazmik

genetik erkek organ kısırlığının F1 hibrit tohumluk üretiminde kullanılmasında ana ebeveyn *S ms ms*, baba ebeveyn de *N Ms Ms* yapısındadır. Kısacası, Stoplazma tipi “S” ve çekirdekte bulunan genler “rfrf” yapıda bulundukları durumda “erkek kısırlığı” oluşmaktadır (Karaağaç ve Balkaya 2009).

6.5. Genetik Mühendisliği Kullanılarak Erkek Kısırlık Oluşturulması

Erkek kısırlığı sistemini oluşturma uzun yıllar alması ve mevcut kısır hatlarda stabilite sorunlarının ortaya çıkmasından dolayı genetik mühendisliğinden yararlanılarak erkek kısırlığının sağlanmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (Karaağaç ve Balkaya 2009). Son yıllarda, genetik mühendisliği, özellikle diğer verimli erkek kısırlık kaynaklarının bulunmadığı sebze mahsullerinde erkek kısır hatlar elde etmek için yeni bir kaynak haline gelmiştir. Bu teknolojinin amacı, klonlanmış gen dizilerini gen aktarım yöntemleri kullanılarak mikrosporogenez veya mikrogametogenez oluşumuna müdahale ederek gamet oluşumu engellenmesidir. Yapılan ilk erkek kısır bitki, *Bacillus amyloliquefaciens* bakterisinde bulunan *ribonükleaz geni* toksik bir enzim olan *barnaz*’ı kodlamaktadır. Barnaz, tapetum hücrelerinin erken gelişmiş dejenerasyonuna, mikrospor gelişiminin durmasına ve bunun sonucunda erkek kısırlığına yol açmaktadır (Mariani, De Beuckeleer et al. 1990). Bu sistemle hibrit üretilmesi aşamasında öncelikle anne hatta *barnaz* geni aktararak erkek kısır oluşturulmuştur. Anne hattın devamını sağlamak amacı ile baba hatta ise, hücre içi barnaz inhibitörünü kodlayan *barstar* genini aktararak ifade ettirilir. Bu strateji domateste başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Bai, Liu et al. 2002).

Son zamanlarda genom düzenleme teknolojileri, erkek kısırlık sisteminin moleküler kontrolü hakkındaki bilgilere dayanan erkek-steril hatlar oluşturmak için kullanılmıştır. Zhou vd., (2016) CRISPR/Cas9 aracılığıyla *TMS5* geninin susuturulması ile thermo-genik erkek kısır (TGMS) hatları geliştirilmiştir (Zhou, He et al. 2016). Hibrit ıslahında potansiyel kullanımı olan 11 adet TGMS hattı yalnızca 1 yıl içinde elde edilmiş ve bu tekniğin üreme süresini kısaltmada ve verimliliği artırmada büyük umut vaat ettiği gösterilmiştir. Genom düzenleme araçları kullanılarak, polen oluşum sürecinde görev alan genlerin tanımlanması ve incelenmesi, bunların çeşitli varyetelerde uygulanmasına ve bunun sonucunda erkek kısır hatlar elde edilmesinde umut vadeden yaklaşımlardır. Günümüzde CRISPR/Cas sistemi kullanılarak erkek kısır hatlar üretmek için çalışmalar devam etmektedir ve henüz gelişme aşamasındadır.

Modern biyoteknoloji en geniş kullanım alanını tarım sektöründe bulmuştur. Tarımsal biyoteknolojide en çok üzerinde çalışılan özellikler yüksek miktarda ve kalitede ürün almak, hastalıklara ve zararlılara karşı toleant/dayanıklılık, yabancı ot ilaçlarına tolerant/dayanıklılık, meyve olgunlaşma sürecinin değiştirilmesi, besin öğelerince zenginleştirilmesi ve iyileştirilmesi, raf ve depolama ömrünün uzatılması ve aromanın artırılmasıdır (Li vd. 2017). Hastalık ve zararlıların etkisi azaltılarak yüksek verim ve daha ekonomik üretim amaçlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda tohum üretiminde en çok yararlanılan ıslah yöntemlerinden olan F1 hibrit üretimini artırmak ve üretim sırasındaki zorlukları aşmak için biyoteknolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Klasik yöntemlerle erkek kısır bitkiler elde edilebilmekte fakat bunun uygulanması bazı bitki türleri ile sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle biyoteknolojik yöntemlerle erkek kısır bitkiler elde etmek hem daha kolay hem de daha düşük maliyetli yaklaşımlar olarak kabul edilmektedir (Jung vd. 2020). CRISPR/Cas teknolojisinin ortaya çıkması ile birlikte, bitki gen aktivitelerinde hassas manipülasyonların yapılabilmesi çok daha kolay hale gelmiştir. Bu teknoloji kullanılarak polen oluşumundan sorumlu genlerin susturulması ile polen oluşumu engellenebilmektedir (Du vd. 2020). Bu teknoloji sayesinde foto periyoda ve ısıya duyarlı genler belirlenerek çevreye duyarlı erkek kısır hatlar elde edilmesi mümkün olabilmektedir. Diğer erkek kısır hatların elde edildiği yöntemlerin zorlukları ve tohum devamlılığının sağlanmasındaki zorluklar CRISPR genom düzenleme tekniğinin bu amaçla kullanımını ve bu sayede erkek kısır hatların elde edilmesini ve mutant bitkilerin tohum devamlılığının sağlanmasını mümkün kılacaktır.

Küresel gıda güvenliği, tahıl üretimini artırmak için yeni ve etkili tarım teknolojilerinin geliştirilmesini gerektirmektedir. Domates, mısır, çeltik ve diğer tarım ürünlerinde hibrit ıslahı, ürün veriminin artmasına önemli katkı sağlamıştır. Daha fazla erkek kısırlık geninin tanımlanması ve farklı bitkilerde gen fonksiyonunun anlaşılması, yeni hibrit bitkilerin geliştirilmesine önemli derecede katkı sağlanması beklenmektedir.

7. MATERYAL VE METHOD

7.1. Bitki Materyali ve Doku Kùltür Ortamı

Bu çalışmada, *Solanum lycopersicum* cv Crocker ve Bobcat ticari domates çeşitleri kullanılmıştır. Bobcat ve Crocker domates çeşitleri Syngenta tohum firmasından temin edilmiştir. Çeşitler ile ilgili daha fazla bilgi EK-1’de verilmiştir. Doku kùltürü çalışmaları ve gen aktarım çalışmalarında kotiledon ve yapraklar eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

Tablo 7.1. Domates gen aktarımında kullanılan besi ortamları ve kimyasal içerikleri

Kimyasallar	GM	PCM2	BGM	IM	CCM	WM	SRM	RM
Murashige and Skoog media	4.4	4.4	-	-	4.4	4.4	4.4	4.4
Luria broth (g)	-	-	25	25	-	-	-	-
Sucrose (g)	20	30	-	-	30	30	30	20
Glycine (mg)	--	2	-	-	2	2	2	-
Myo-Inositol (mg)	-	100	-	-	100	100	100	-
Nicotinic acid (mg)	-	0.50	-	-	0.50	0.50	0.50	-
Pyridoxine HCl (mg)	-	0.50	-	-	0.50	0.50	0.50	-
Thiamine HCl (mg)	-	0.10	-	-	0.10	0.10	0.10	-
6-Benzylaminopurine (BAP)	-	3	-	-	3	-	3	-
Indole-3-acetic acid (IAA)	-	0.1	-	-	0.5	-	0.5	0.1
Hygromycin (mg)	-	-	-	-	-	-	15	25
Cefotaxime (mg)	-	-	-	-	-	500	500	500
Carbenicilin (For AGL-1)	-	-	50	50	-	-	-	-
Gentamicin (For GV3101)	-	-	30	30	-	-	-	-
Rifamycin (mg)	-	-	10	10	-	-	-	-
Spectinomycin (mg)	-	-	100	100	-	-	-	-
Timentin (mg)	-	-	-	-	-	80	80	-
Acetosyringone (µM)	-	100	-	200	100	-	-	-
phytagel (g)	2.8	2.8	-	-	2.8	2.8	2.8	2.8
Agar (g)	-	-	-	-	-	-	-	-

GM; Çimlendirme besi ortamı, PCM; Ön kùltürleme besi ortamı, BGM; bakteri büyütme ortamı, IM; indüksiyon besi ortamı (vir genlerinin aktivasyonu), CCM; kokùltüvasyon besi ortamı, SRM; seleksiyon besi ortamı ve RM; köklendirme besi ortamı.

Domates tohumları GM (çimlendirme besi ortamı) besi ortamında çimlendirilmiştir. Gen aktarımı yapılan yaprak ve kotiledon eksplantlarından bitki rejenerasyonu SRM (seleksiyon besi ortamı) besi ortamında higromisin, sefotaksim ve timentin varlığında sağlanmıştır. Dirençli sürgünler, transgenik domates bitkileri elde etmek için RM (köklendirme besi ortamı) besi ortamına aktarılarak köklendirilmiş ve devamında torf içeren saksılara transfer edilmiştir. Bitki besi ortamlarının içerikleri Tablo 7.1’de açıklanmıştır.

7.2. Kullanılan Bakteri Suşları ve Besi Ortamları

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve plazmitler Tablo 7.2’de listelenmiştir. Gen klonlama çalışmalarında *Escherichia coli* (*E. coli*) ve gen aktarım çalışmalarında *A. tumefaciens* bakterileri kullanılmıştır. *E. coli* Luria broth (LB) besisi ortamında orbital çalkalamalı inkübatörde 37 °C’de veya katı LB’de agar petrielerde (LA) büyütülmüştür. *A. tumefaciens* Luria broth (LB) besisi ortamında orbital çalkalamalı inkübatörde 28 °C’de veya katı LB’de agar petrielerde (LA) büyütülmüştür. Uzun süreli koruma için, uygun büyüme koşullarında büyütülen bakteriler 3 ml bakteri kültürü (O.D₆₀₀ 0,8) 5000 xg’de 5 dakika santifüj edilerek pellet 250 ul LB besisi ortamında çözümüştür. Daha sonra 750 ul %85 gliserol eklenmiş ve kullanılabileceği kadar -80 ° C’de saklanmıştır. Bitki ifade vektörü olarak pKI1.1R plazmiti (Addgene) kullanılmıştır.

Tablo 7.2. Kullanılan bakteri suşları ve besiy ortamları

Suş	Ti-plasmid types	Kromozom bilgisi	Antibiyotik dirençlilik	Referans
GV 3101 (pMP 90)	a disarmed nopaline-type pTiC58ΔT-DNA	C58	Rm ^R , Gm ^R	Koncz and Schell, 1986
AGL1 (pAL154/156)	a disarmed pTiBo542ΔT-DNA	C58	Rm ^R , Cb ^R	Lazo et al., 1991
<i>E. Coli</i> (Dh5α)	-	-	-	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center
Plazmit pKI1.1R			Spect.	Addgene

Cb, carbenicillin; Em, erythromycin; Gm, gentamicin; Km, kanamycin; Rm, rifampicin, Tc: tetracycline.

7.3. Besi Ortamları

Besi ortamlarının hazırlanışı ve bileşenleri EK2’de listelenmiştir.

7.4. Tamponlar ve Solüsyonlar

Buffer solüsyonların kimyasal içerikleri ile hazırlanışı EK3’de listelenmiştir.

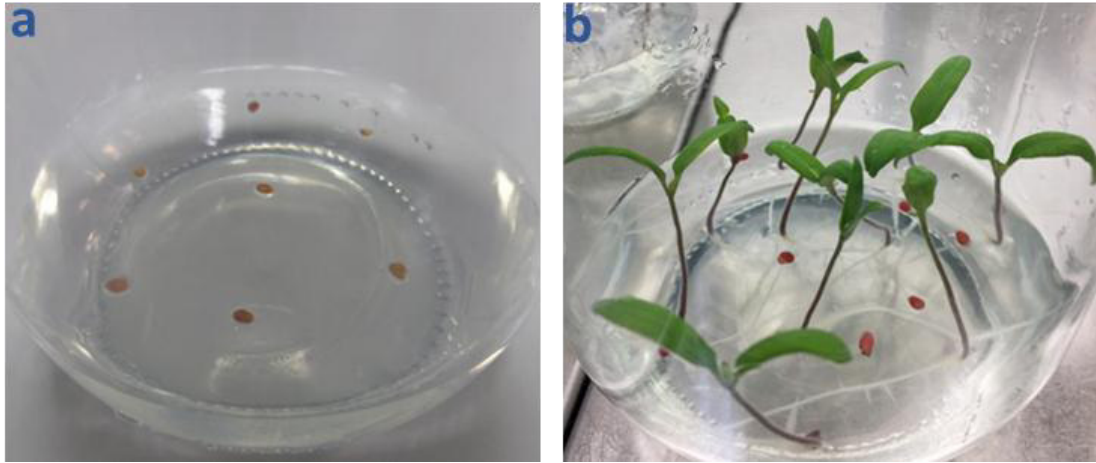
7.5. Kimyasal ve Enzimler

Tedarikçi firmalarla birlikte kullanılan kimyasallar ve enzimler EK4’de listelenmiştir.

7.6. Bitki Rejenerasyon Sisteminin Optimizasyonu

7.6.1. Bitki Materyali, Eksplant Hazırlanması ve Doku Kültürü Koşulları

Domates tohumları (*Solanum lycopersicum*) cv. Crocker ve Bobcat ticari firmadan sağlanmıştır (Syngenta). Bu tohumlar 50 ml'lik falkon tüp içerisine alınarak %70 (v/v) etil alkolde 1 dakika bekletilerek alkol uzaklaştırılmış, hemen ardından tween-20 (100 ul/50 ml) içeren %20 (v/v) sodyum hipoklorid çözeltisinde 20 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Deterjanların tohumlardan uzaklaştırmak amacı ile 5 kez steril saf su ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra falkon tüp içerisinde bulunan steril tohumlar, petri kaplarının üzerinde bulunan steril kurutma kağıtlarında yarım saat kurumaya bırakılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar GM besi yeri içeren 1 Lt'lik kavanozlara, her kavanozda 10 adet tohum olacak şekilde ekim yapılmıştır (Şekil 7.1). Kavanozlar 16/8 saat aydınlık/karanlıkta 25 °C'de, büyüme kabini içinde inkübe edilmiştir (MLR-350HT (Sanyo, USA)). Bitki doku kültüründe kullanılan tüm besi ortamlarının pH'sı 5.7 olarak ayarlanmış ve 121 °C'de 20 dakika otoklav yapılmıştır. Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyiciler ve antibiyotikler, filtre sterilizasyonu yapıldıktan sonra besi ortamı 55-65 °C'ye soğutulduktan sonra eklenmiş ve karıştırılmıştır.



Şekil 7.1. Domates tohumlarının in-vitro ortamlarda çimlendirilmesi a: Tohumların GM besi ortamına ekilmesi. b: 8 günlük domates fideleri.

7.6.2. Bitki Rejenerasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

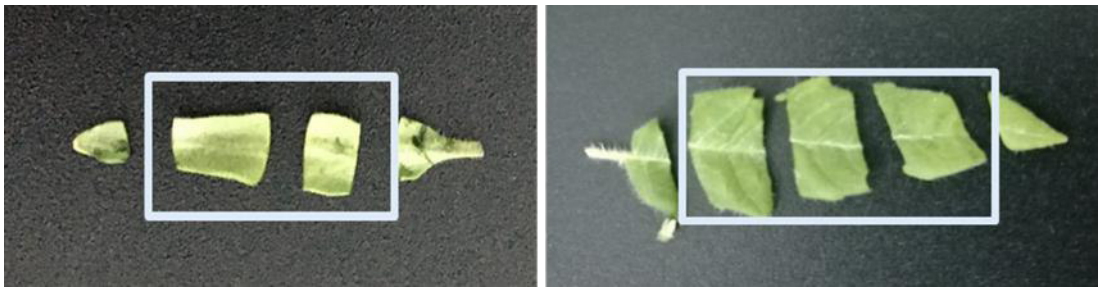
Domates bitkisinde doku kültürü koşulları optimize edilirken bitki rejenerasyonu üzerine ekplant kaynağı, ekplant yaşı, genotip ve bitki büyüme düzenleyicilerin etkisi araştırılmıştır. Bitki rejenerasyonu üzerine ekplant yaşının etkisinin belirlenmesi amacı ile 8, 10, 12 ve 14 günlük domates fidelerinin kotiledon eksplantları

kullanılmıştır (Şekil 7.2). Yaprak eksplantlarında ise 20, 30 ve 40 günlük domates fidelerinin ilk gerçek yaprakları kullanılmıştır (Şekil 7.3).



Şekil 7.2. Kotiledon eksplant kaynağı olarak kullanılan farklı yaşta domates fideleri.

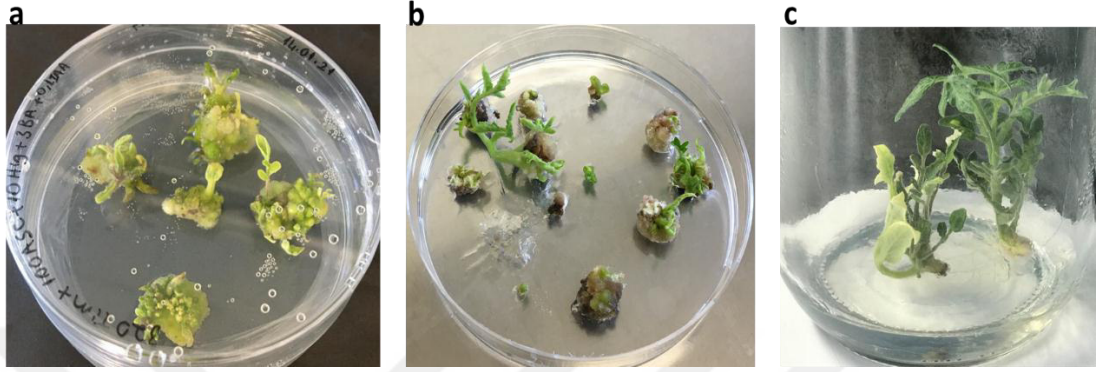
Bitki rejenerasyonu üzerine genotipin etkisini belirlemek amacıyla iki farklı domates çeşidi (Crocker ve Bobcat) kullanılmıştır. Çalışmamızda, bitki rejenerasyonu için en uygun eksplant kaynağının belirlenmesi için kotiledon ve yaprak kısımları eksplant olarak kullanılmıştır. Kotiledon ve yaprak eksplantlarının uç kısımları ve yaprak sapları çıkarıldıktan sonra yaklaşık 1 cm² olacak şekilde kesilmiştir (Şekil 7.3). Yaprak ve kotiledonların kullanılan bölgeleri Şekil 7.3’de dikdörtgen içerisinde gösterilmiştir.



Şekil 7.3. Kotiledon ve yaprak eksplantlarının bitki rejenerasyonunda kullanılan bölgeleri dikdörtgen içerisinde gösterilmiştir

Bu eksplantlardan başarılı bir bitki rejenerasyonu elde etmek için vitaminli MS (Duchefa, Almanya) besi ortamı içerisine farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyiciler; 6-benzylaminopurine (BA) (0, 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/L), kinetin (Kin) (0, 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/L), ve indole-3-acetic acid (IAA) (0,0.1, 0.5, 1, mg/L), eklenmiştir. Dokuların kararmasını önlemek amacı ile tüm besi ortamları içerisine 100 mg/L L-

askorbik asit eklenmiştir. Çalışmada rejenerasyon besi ortamına alınan eksplantlar 10 günlük periyotlarla alt kültüre alınmıştır. Rejenerasyon başladıktan sonra 2-3 cm uzunluğunda bitkicikler kök oluşturmak için RM besi ortamına transfer edilerek köklendirilmiştir. Tüm kültürler 26 ± 2 °C’de 16/8-h aydınlık/karanlık periyotta iklim dolabında inkübe edilmiştir (Şekil 7.4).



Şekil 7.4. Rejenerasyon başladıktan sonra 2-3 cm uzunluğunda bitkicikler kök oluşturmak için RM besi ortamına transferi. (a): double petriye alınan bitkicikler. (b): 2-3 cm büyüklüğünde bitkiciklerin gösterimi. (c): Bir Lt’lik kavanozlarda RM besi ortamına alınmış bitkiler.

Köklenen bitkiler daha sonra torf içeren saksılara nakledilerek İklim odasına aktarılmıştır (Şekil 7.5). Bu çalışmada kullanılan ortamlar ve kompozisyonları Tablo 7.1’de verilmiştir. Bitki rejenerasyonunun optimize edilmesi sonucunda belirlenen en iyi rejenerasyon besi ortamı seçilmiş ve *Agrobacterium* aracılı gen aktarımında bu ortam kullanılmıştır.



Şekil 7.5. MS besi ortamında köklenen bitkiler torf içeren saksılara aktarılması ve iklim odasında yetiştirilmesi. (a): MS besi ortamında köklenen genom düzenlenmiş bitkiler. (b): Bitkilerin saksıya aktarılması ve nem kaybının önlenmesi (c,d,e):Bitkilerin hasat dönemine kadar iklim odasında yetiştirilmesi.

7.7. *Agrobacterium* Aracılı Gen Aktarımının Optimizasyonu

7.7.1. *Agrobacterium* Aracılı Gen Aktarımı Üzerine Eksplant Kaynağının Etkisi

Domates bitkisinde bitki doku kültürü parametrelerinin optimizasyonu sonucunda en yüksek bitki rejenerasyona sahip domates çeşidi seçilerek *Agrobacterium* aracılı gen aktarımının optimizasyonu yapılmıştır. Kotiledon ve yaprak eksplantları için en uygun rejenerasyon besi ortamı kullanılarak gen aktarım çalışmaları yürütülmüştür. Kotiledon ve yaprak eksplantlarının *Agrobacterium* aracılı gen aktarımı üzerine etkisi araştırılmıştır.

7.7.2. Higromisin (Hygromycin) Testi

Hygromycin phosphotransferase (HptII) geni hem bitki hem hayvan sistemleri için uygun bir seleksiyon markör genidir ve *HptII* enzimi hygromycin B antibiyotiğini inaktif yapmaktadır. Higromisin genellikle kanamisin antibiyotiğinden daha toksiktir ve hassas hücrelerin daha çabuk ölümüne sebep olmaktadır. Bu çalışmada kullanılan bitki ifade vektöründe *hptII* geni bulunmaktadır. Gen aktarımı sonrasında transgenik hücrelerin seçilmesi için bitki ifade vektöründe bulunan *hptII* geninin direnç gösterdiği higromisin antibiyotiğinden yararlanılmıştır. Transgenik olmayan eksplantlarının %70-80'ini öldürebilen uygun higromisin konsantrasyonunu belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 10, 20, 30 mg/L) higromisin içeren ön testler yapılmıştır.

7.7.3. *Agrobacterium* Suşu, İnokülasyon Besi Ortamı ve Yoğunluğunun Etkisi

Domates bitkisinde transformasyon etkinliğini artırmak amacı ile iki farklı *Agrobacterium* suşu kullanılmıştır. AGL-1 ve GV3101 suşları ile ayrıntılı bilgi tablo 7.2'de gösterilmiştir. Yüksek *Agrobacterium* konsantrasyonları domates eksplantlarında doku nekrozlarına neden olmaktadır. Bu durumun gen aktarım etkinliğinin düşmesine neden olduğu bildirilmiştir (Mimidala vd. 2011). Bu nedenle çalışmada kullanılacak en uygun bakteri yoğunluğunu belirlemek amacı ile farklı OD₆₀₀lerde (0.3, 0.6 ve 0.8) *Agrobacterium* konsantrasyonları denenmiştir. Bakteri inokülasyon besi ortamının etkisini araştırmak amacı ile MS besi ortamı ve LB besi ortamları inokülasyon besi ortamı olarak kullanılmıştır.

7.7.4. Domates Gen Aktarımı Üzerine Ön-Kültürleme Süresi ve Ko-Kültüvasyon Süresinin Etkisi

Domates dokuları *Agrobacterium* ile enfekte edilmeden önce ön-kültürleme besi ortamında farklı sürelerde (12 saat, 24 saat, 48 saat), 25°C’de 16/8 saat aydınlık/karanlık periyotta iklim dolabında inkübe edilmiştir. *Agrobacterium* ile enfekte edilen eksplantların optimum ko-kültüvasyon sürelerinin belirlenmesi amacı ile farklı sürelerde (1, 2, 4 gün) 25°C’de karanlıkta etüvde veya iklim dolabında belirtilen sıcaklık ve ışık şartlarında bekletilmiştir.

7.7.5. *A. tumefaciens* Bakterisi Üzerine Antibiyotiklerin Etkisi

Ko-kültüvasyon sonrasında *Agrobacterium*’un eksplantlardan uzaklaştırılması ve seleksiyon aşamasında aşırı büyümesini önlemek amacı ile timentin ve sefotaksim antibiyotikleri kullanılmıştır. SRM ortamına farklı konsantrasyonlarda antibiyotikler (Cefotaxime: 300, 400, 500 mg/L ve Timentin 80, 160, 320 mg/L) ilave edilmiş ve etkileri eksplantlar üzerindeki bakterilerin büyümesine göre değerlendirilmiştir.

7.8. Genom Düzenlenmiş Domates Bitkilerinin Elde Edilmesi

7.8.1. *PDS* ve *ACO* Genlerinin Domates Bitkisinde Tanımlanması

7.8.1.1. *PDS* Geninin Domates Bitkisinde Tanımlanması

Arabidopsis thaliana PDS3 (AtPDS: NM117498) geni homolog nükleotid sekansları için Phytozome (phytozome.jgi.doe.gov) kullanılarak referans domates genomunu BLAST yapılarak araştırılmıştır.

7.8.1.2. *ACO* Geninin Domates Bitkisinde Tanımlanması

Domates bitkisinde *ACO* gen ailesini tanımlamak için *A. thaliana ACO1* (AT4G35830) geninin protein sekansı NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) veri tabanından fasta formatında indirilmiştir. 795 amino asit uzunluğunda bu gene ait domain sekansını bulmak için Pfam veri tabanı (<http://pfam.xfam.org/>) kullanılarak sekans araması yapılmıştır. *Akonitaz* domainini kodlayan 1-465 amino asit sekansı alınarak Phytozome v12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>) veri tabanından domates proteomu seçilerek Blast araması yapılmıştır. Daha sonra karşılaştırma yapmak amacı ile *Akonitaz* domain Hidden Markov Model (HMM) dosyası Pfam veri tabanından indirilmiştir. Domates bitkisine ait *Akonitaz* domaini içeren genler HMMER 3.1b2 veri tabanı (<http://hmmer.org>) kullanılarak analiz

edilmiştir.

7.8.1.3. Filogenetik Analiz

Domates ve diğer model bitkiler ile benzerliklerini karşılaştırmak amacı ile *A. thaliana*, *P. trichocarpa*, *Medicago truncatula*, *P. patens*, *B. distachyon*, ve *S. Bicolor* bitkilerine ait *ACO* genlerinin protein sekansları Phytozome v12 veri tabanından indirilmiştir. *ACO* proteinlerinin amino asit sekanslarının çoklu hizalamaları MEGAX yazılımı kullanılarak ClustelW ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, hizalanan *ACO* proteinlerinin filogenetik ağaçları Neighbor-Joining (NJ) metodu aracılığıyla takip eden parametreler ile MEGAX kullanılarak yapılmıştır. Jones-Taylor-Thornton (JTT) modeli, gama dağılımı ve bootstrap methodu seçenekleri seçilerek filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

7.8.1.4. İntron/Exon Yapısı ve Motif Analizi

ACO genlerinin intron exon yapıları, domainleri ve korunmuş motiflerin analizi ve görselleştirilmesi için gerekli veriler elde edilmiştir. TBtool yazılımında analiz yapabilmek için *ACO* genlerinin DNA, Protein ve CDS dizileri, domates genomuna ait gene.gff3 dosyaları Phtozome veri tabanından indirilmiştir. *ACO* genlerinin korunmuş motifleri takip eden parametreler ile MEME Suite (<http://meme-suite.org>) web tabanlı sekans analiz aracılığıyla tespit edilmiştir. Yapılan işlemde optimum genişlik 80-100 amino asit, herhangi bir sayıda motif tekrarlanması ve maksimum motif sayısı 10 olarak ayarlanmıştır. *ACO* genlerine ait domainlerin belirlenmesi için NCBI Conserved Domain Database veri tabanı kullanılarak genlerin dizilerini içeren Fasta formatındaki dosyalar yüklenip analiz edilmiştir. İntron ekzon yapıları ve motif analizi TBTools yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve görselleştirilmiştir.

7.8.1.5. *ACO* Kromozom Lokasyonu ve Gene Duplikasyonlarının Belirlenmesi

ACO genlerin kromozom üzerindeki dağılımları ve gen duplikasyonları TBtools yazılımı (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) kullanılarak yapılmıştır. İlk *ACO* genlerinin kromozom üzerinde dağılımını göstermek için domates genom dosyası ve gene lokasyon bilgileri phytozome veri tabanından elde edilmiştir. Daha sonra bu veriler kullanılarak TBtool yazılımı ile kromozom lokasyonları belirlenmiştir.

Gen duplikasyonlarının belirlenmesi için Plant Genome Duplication Database (<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/>) veri tabanı kullanılarak domates- domates

block dosyası indirilmiştir. Elde edilen Block dosyası içersinden *ACO* genlerinin verileri seçilerek Ka/Ks oranları TBtools yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen Ka/Ks oranları kullanılarak gen çiftlerinin uzaklaşma süresi (Divergence time), $T = Ks / 2x$ ($x = 6.56 \times 10^{-9}$) formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

7.8.1.6. Cis-Acting Element Analizleri

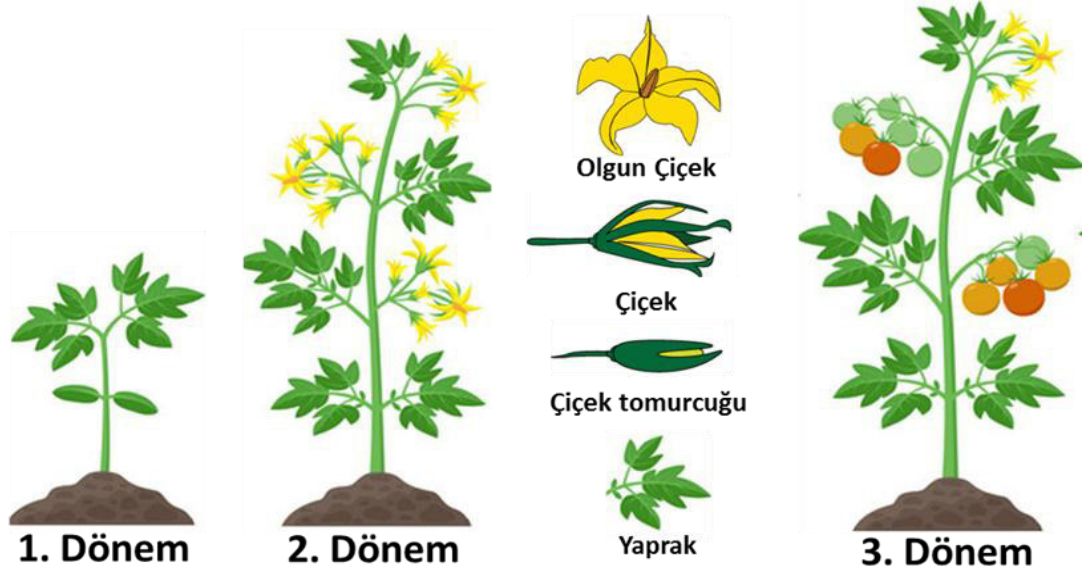
Her bir *ACO* geninin potansiyel promoter bölgesi (başlangıç kodonundan 1500 bp yukarı bölgesi), Phytozome veri tabanından elde edilmiştir. Varsayılan promoterlerin Cis-Acting elementleri, PlantCARE veri tabını kullanılarak tanımlanmıştır. (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Daha sonra gen promoterlerinin Cis-Acting elementleri, elementlerin türlerini ve sayılarını analizi TBtools yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

7.8.1.7. Domates ACO Genlerinin İn-Sliko İfade Analizi

Domates bitkisi *ACO* genlerinin ekspresyon modelleri domates sperm hücresinin gelişim profilinin NCBI GEO dataset (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>) veri tabanından elde edilen transkriptom datası kullanılarak incelenmiştir (Liu, Lu et al. 2018). Transkriptom datası kullanılarak *ACO* genlerinin ifade profilleri TBtools ile görselleştirilmiştir. *ACO* genlerinin ekspresyon veri setinde en yüksek ekspresyon değerine sahip *ACO4* genini çalışmamızda hedeflenmiştir.

7.8.1.8. WT Bitkilerde *SIACO4* Geninin İfadesinin RT-qPCR ile Belirlenmesi

SIACO4 genin farklı dönemlerde ve farklı dokularda gen ifadesini belirlemek amacıyla RT-qPCR yapılmıştır. Özellikle çiçeklenme döneminde, çiçek tomurcuğu, çiçek, olgun çiçek ve yapraklarda *SIACO4* genin ifadesi belirlenmiştir. Bu amaçla farklı gelişme dönemlerinde alınan ve değişik bitki dokuları şekil 7.6'da gösterilmiştir.



Şekil 7.6. Domatesin farklı büyüme aşamaları ve dokuları. 1. Dönem: Bitkilerin ilk çiçeklenmeden önceki fide aşaması. 2. Dönem: Bitkilerin ilk çiçek oluşturduğu dönem. 3. Dönem: bitkilerin ilk meyvelerinin olgunlaştığı aynı zamanda çiçeklenme

RNA izolasyonuna başlamadan önce kullanılacak olan saf su, porselen havanlar, mikrosantrifüj tüpler, pipet uçları, pensler ve diğer tüm malzemeler 2 kere otoklavlanarak steril edilmiştir. Porselen havan ve mikrosantrifüj tüpler kullanılmadan önce DEPC water ile silinerek, sıvı azot ile muamele edilmiştir. RNA izolasyonu, QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit kullanılarak kullanılarak yapılmıştır. Bir mikrogram RNA alınarak iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad) kullanılarak Tablo 7.3’de bileşenler hazırlanarak cDNA sentezi kitinin protokolüne (Tablo 7.4) uygun olarak yapılmıştır.

Tablo 7.3. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Reaksiyon hacmi, μ l
5x iScript Reaksiyon Mix	4
iScript Reverse Transkriptaz	1
Nükleaz- ferece su	X
RNA template (1 μ g)	X
Total hacim	20

Tablo 7.4. cDNA sentezi için kullanılan PCR koşulları

Reaksiyon basamağı	Sıcaklık °C	Süre dakika
Ön sıcaklık	25	5
Reverse Transkripsiyon	46	20
RT inaktivasyon	95	1
Store	4	süresiz

RT-qPCR SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Biorad) kullanılarak yapılmıştır. 1 μ l cDNA template olarak kullanılmış ve tüm örnekler 3 tenik tekerrürlü olarak hazırlanmıştır. Çalışmada gen ifadesinin belirlenebilmesi için

domates *actin 1* geni internal kontrol olarak kullanılmıştır. *Aktin* geni primerleri ve *ACO* QPCR primerleri EK5’de sunulmuştur. cDNA konsantrasyonu ve yapılan RT-qPCR çalışmasının güvenilirliğini belirlemek amacı PCR standartları oluşturulmuştur. Yapılan tüm QPCR işlemleri üç teknik tekrar ile tekrarlanmıştır. PCR bileşenleri Tablo 7.5’de ve protokolü firmanın önerdiği Tablo 7.6’da gösterildiği gibi yapılmıştır.

Tablo 7.5. QPCR sentezi reaksiyon bileşenleri

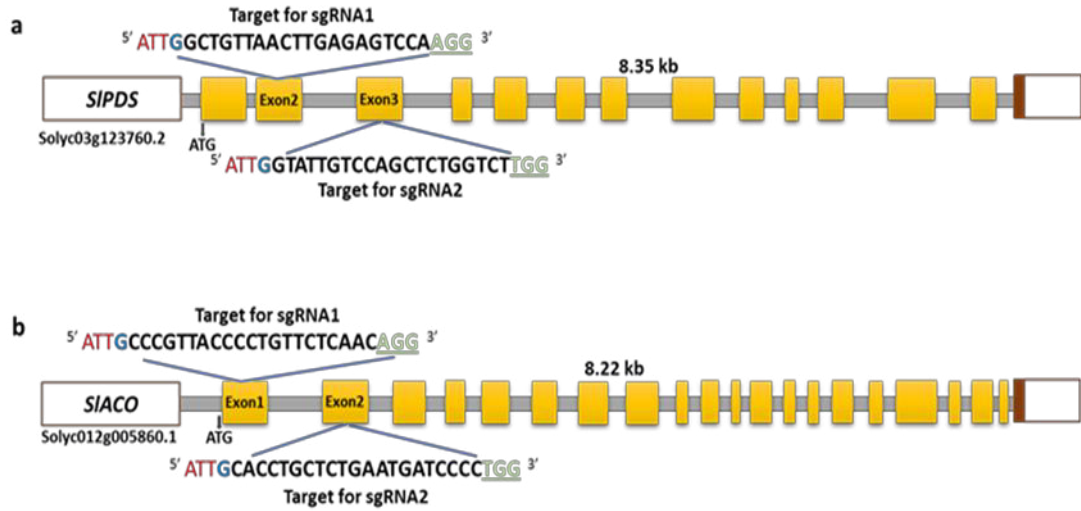
Bileşenler	Reaksiyon hacmi (µl)
SsoAdvanced Universal SYBR green süper Mix	10
Forwar Primer (10 uM)	0,5
Reverse Primer (10 uM)	0,5
cDNA	1
Nükelaz free su	8
Total hacim	20

Tablo 7.6. QPCR koşulları (Biorad CFX96)

Reaksiyon basamağı	Sıcaklık °C	Süre	Döngü
Polimeraz aktivasyon sıcaklığı	98	30 sn	1
Denatürasyon	98	15 sn	40
Bağlanma/ uzama	60	30 sn	
Melt curve analiz	65-95 (0,5 derece artılır her döngüde)	--	5
Store	4	süresiz	

7.8.2. gRNA Tasarlanması

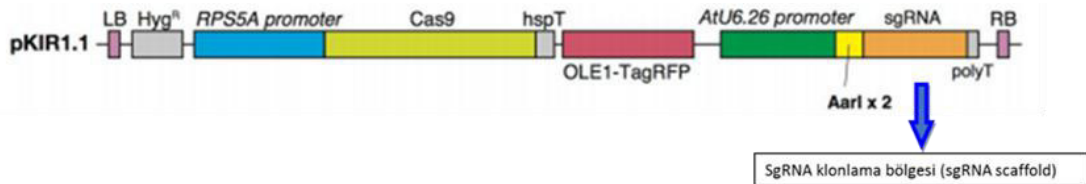
SIPDS ve *SLACO4* genlerini hedefleyen gRNA tasarlamak için Benchling software ve CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2>) online programlar kullanılmıştır. Bu programa göre gRNA seçiminde On-Score ((en iyi score > 0.50) ve orta (0.20 < score < 0.50)), GC içeri (% 30-80), gRNA’nın toplam loop sayısı (TSL) ≥ 3 , gRNA sekansında stem loop sayısı (GSL), gRNA ve gRNA scaffold sekansları arasında ardışık baz sayısı (CBP) ≤ 7 , gRNA ve gRNA scaffold sekansı arasında komplementer baz sayısı (TBP) ≤ 12 , gRNA sekansı içersinde internal baz sayısı (IBP) ≤ 6 , gen üzerinde gRNA lokasyonu, off-target kapasitesi, PAM sekansından sonraki nükleotid, gRNA 5’ ucundan 17. nükleotid (A/T), gibi parametreler dikkate alınmıştır. Tasarlanan gRNA’lar “MFE secondary structure”, “Centroid secondary structure” ve RNA free enerjilerinin kontrolü RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) kullanılarak yapılmıştır. gRNA seçiminde gen üzerinde hedef bölgeler seçilirken Exon 1 yada domain içeren korunmuş bölgeler hedeflenmeye çalışılmıştır. Tasarlanan tüm gRNA’ların 19-21 nükleotid uzunluğunda olmasına ve 5’ ucunda G nükleotidi eklenmesine dikkat edilmiştir (Şekil 7.7).



Şekil 7.7. *PDS* ve *ACO* genlerini hedefleyen gRNA'ların şematik gösterimi. (a): *SIPDS* geninin intron ekzon yapısı ve sgRNA1 ve sgRNA2'nin hedef bölgelerinin gösterimi. (b): *SIACO4* geninin intron ekzon yapısı ve sgRNA1 ve sgRNA2'nin hedef bölgelerinin gösterimi

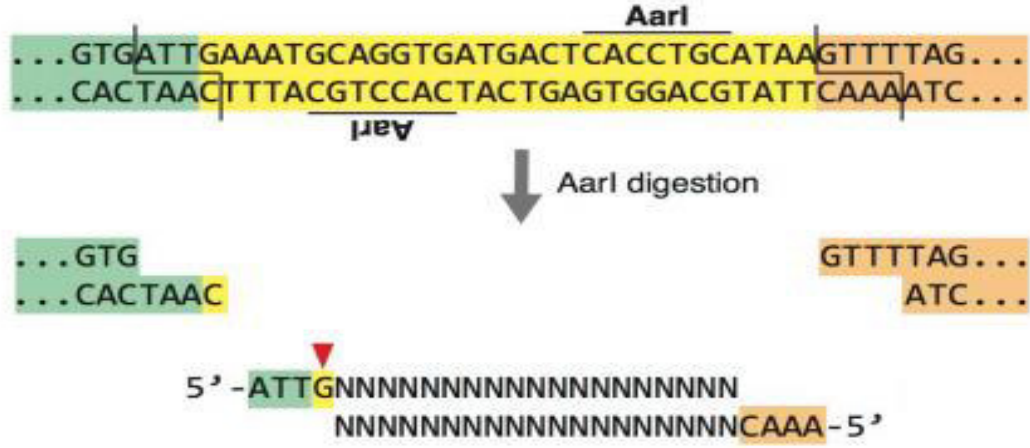
7.8.3. gRNA İçeren CRISPR/Cas Bitki İfade Vektörünün Oluşturulması

Çalışmada kullanılan CRISPR/Cas9 sisteminin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacı ile *PDS* geni hedeflenmiştir. Erkek kısır domates bitkisi elde etmek amacı ile *ACO* geni hedeflenmiştir. Çalışmada kullanılan CRISPR/Cas9 vektörü pKI1.1R (Plasmid #85808) Addgene'den satın alınmıştır. Bitki ifade vektörünün linear haritası şekil 7.8'de ve plazmit ile ilgili ayrıntılı bilgi EK6'de verilmiştir.



Şekil 7.8. Çalışmada kullanılacak plazmit (markör gen, Cas9 bölgesi, sgRNA bölgesi)

Çalışmada kullanılan markör gen, promotör ve Cas enzimi Şekil 7.8'de gösterilmektedir. Gen hedeflemek amacıyla dizayn edilen gRNA'ların forward primerlerin 5' ucuna *AarI* kesim enzim bölgesi ve U6 promotörünün G nükleotidine ihtiyaç duymasından dolayı (ATTG) nükleotidleri eklenmiştir. Aynı şekilde reverse olarak tasarlanan gRNA primerlerinin 5' ucuna (AAAC) nükleotidleri eklenmiştir (Şekil 7.9). Daha sonra gRNA'lar hizmet alımı olarak ilgi firmaya HPLC saflığında 100 µM sentezletilmiştir. Sentezlenen 4 adet sgRNA'ların her biri ayrı ayrı pKI1.1R plazmit içersine klonlanmıştır.



Şekil 7.9. Plazmid AarI kesim enzim bölgesi sgRNA klonlama bölgesi

7.8.4. pKI1.1R Vektörünün AarI Enzimi ile Kesilmesi

Çalışmada kullanılan pKI1.1R vektörü *AarI* (ThermoFisher, #ER1581) enzimi ile Tablo 7.7’de gösterilen protokol takip edilerek kesim yapılmıştır. Reaksiyon hazırlandıktan sonra 37 °C’de 6-7 saat PCR cihazında (Biorad, USA) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kesilen bölgenin birleşmemesi inkübasyon tamamlanmasının hemen ardından tüpler buz üzerine alınarak kesim ürünlerine 1 µl FastAP buffer ve 1 µl FastAP enzimi eklenerek PCR 37 °C’de 10 dakika, 75 °C’de 5 dakika, 4 °C’de sonsuz olarak ayarlanmış ve kesim ürünleri defosforile edilmiştir. Defosforilasyon aşamasından sonra vektörün kesilip kesilmediği %0,4’lük agaroz jelde 45 dakika Biorad mini jel elektroforez cihazında yürütülerek kontrol edilmiştir. *AarI* restriksiyon kesim enzimi kesim ürünleri üzerinde kalabildiğinden bunların uzaklaştırılması amacı ile jele yüklenirken kullanılan yükleme boyası içerisine %1’lik SDS eklenmiştir.

Tablo 7.7. pKI1.1R vektörünün AarI enzimi reaksiyon içeriği

Kimyasal	Miktar	Marka
10x AarI Buffer	2 ul	
pKI1.1R	X ul (=1.5 ug)	
AarI	2 ul	ThermoFisher, #ER1581
50x oligo	0.5 ul	
Nükleaz Free su	X ul	
Toplam	20 ul	

7.8.4.1. AarI Enzimi ile Kesilen PKI1.1R Plazmitinin Jelden Ekstraksiyonu

Plazmit izolasyonu “NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up” (MG) kiti kullanılarak yapılmıştır. Uv ışık altında bir bistüri yardımı ile istenilen bant jelden kesilerek 1.5’luk ependorf tüpe alınmış ve tartılmıştır. Her bir 100 mg agaroz jel için

%2 buffer NTI eklenmiştir. Agaroz jel tamamen çözünen kadar 50 °C’de tutulmuş, 2-3 dakikada bir hafifçe vortekslenmiştir. Daha sonra örnekler NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column’a transfer edilerek 11,000 x g’de 30 s santifüj edilerek koleksiyon tüpünde kalan sıvı atılmıştır. NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column’a 700 ul NT3 buffer eklenerek 11,000 x g’de 30 s santifüj edilerek koleksiyon tüpünde kalan sıvı atılmıştır. Bu adım tekrar edilmiştir. Koleksiyon tüpünde kalan sıvı atılarak buffer NT3 kalıntısı olmaması için NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column’a 700 ul NT3 buffer eklenerek 11,000 x g’de 60 s santifüj edilmiştir. NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column 1.5 ml’lik ependorf santifüj tüpüne alınarak 50 ul nükleaz free su eklenmiştir. Plazmit büyüklüğü yaklaşık 18,500 bp olduğundan nükleaz free su önceden 70 °C’ye ısıtılarak eklenmiştir ve su eklenen tüpler etüv içerisinde 5 dakika 70 °C inkübe edilerek 11,000 x g’de 60 s santifüj edilmiştir. Jel ekstraksiyon ürünlerinin miktar ve kalite tayini Thermo Fisher NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer’de belirlenmiştir.

7.8.4.2. Tek İplikli sgRNA’ların Çift İpliğe Dönüştürülmesi

Hedeflenen gen gölgesine komplementer olarak tasarlanan gRNA’lar tek iplikli primer olarak sentezletilmektedir. Bu primerler çift iplikli plazmite klonlanabilmesi için çift iplikli hale getirilmelidir. Primerler sentezlettirilirken eğer defosforilize sentez edilmemiş ise T4 Polynucleotide Kinase enzimi ile defosforile edilmesi gerekmektedir. Defosforilize sentezleme yapılırsa forward ve reverse primerler yüksek sıcaklıktan düşük sıcaklığa doğru yavaş yavaş soğutulularak çift iplikli hale getirilmektedir. İlgili firmaya sentezlettirilen sgRNA’lar 100 uM olacak şekilde de-iyonize suda çözülmüş ve 100 µmol/l forward gRNA, reverse gRNA primer ve T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs#NEB M0201S, USA) çift iplik elde etmek için tablo 7.8’deki gibi karıştırılmıştır. Daha sonra tablo 7.9’daki protokol kullanılarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon kurulurken T4 polinükleotid Kinaz enzim tamponu kullanılmamıştır. T4 DNA ligaz tamponu kullanılmıştır (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7.8 at 25°C). T4 DNA ligaz buffer içerisinde bulunan ATP ye ihtiyaç duyulmaktadır.

Tablo 7.8. sgRNA'ların çift iplikli hale getirilmesinde kullanılan bileşenler

Bileşenler	Miktar
Oligomer FWD (100 um)	1 ul
Oligomer RVS (100 um)	1 ul
10x T4 Ligaz Buffer (Thermo)	1 ul
milliQ dH ₂ O	6.5 ul
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μL) (Thermo)	0.5 ul
Toplam	10 ul

Tablo 7.9. sgRNA'ların çift iplikli hale getirilmesinde kullanılan protokol

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

7.8.4.3. pKII.1R vektörüne çift iplikli gRNA'nın klonlanması

AarI restriksiyon enzmi ile kesimi yapılarak jelden izole edilen PKII.1R plazmidi, defosforile edilen gRNA'lar 250 kat seyreltilerek aşağıdaki karışım hazırlanmıştır (Tablo 7.10). Ürünler PCR cihazında 16 °C'de 30 dakika bekletildikten sonra 4 °C'de buzdolabında bir gece inkübe edilmiştir.

Tablo 7.10. Ligasyon içeriği

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

7.8.4.4. Kompetan *E.coli* Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetant *E.coli* hazırlamak için öncelikle Tablo 7.11 ve Tablo 7.12 de gösterilen tampon 1 ve tampon 2 çözeltileri hazırlanmıştır.

Tampon 2 malzemeleri 50 ml'lik bir santrifüj tüpüne katılıp iyice çözündürülmüş pH'sı KOH ile 6.5'e ayarlanarak filtre sterilizasyonu yapılmıştır. *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α bakteri suşu gliserol stoğundan alınarak 50 μl çizgi ekim tekniği ile LA besi ortamı içeren petri kaplarına ekim yapılmıştır. Oluşan tek koloniler alınıp 10 ml LB besi ortamı içeren 50 ml'lik falkon tüpler ekim yapıp 16 saat 37 °C 200 rpm'de gece boyu inkübatörde büyümeye bırakılmıştır. O.D600 0.4-0.7 olunca 100 ml'lik bakteri kültüründen 50 ml'lik iki falkon tüpe bölünmüş ve 15 dakika buzda bekletilmiştir. Sonra 4 °C'de 5 dakika 3500 rpm'de santrifüj yapıp bakteriler çöktürülmüştür. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst sıvı fazı dökülerek buzda

bekletilen tampon 1'den 5 ml falkon tüplerin üzerine eklenmiş, pipetaj yapılarak bakteri çözülmüştür. 4 °C'de 5 dk 3500 rpm'de santrifüj yapıp çöktürülmüştür. Sıvı kısmı atıldıktan sonra buzda bekletilen tampon 2'den 2 ml her bir falkon tüpe eklenir ve mikropipet ile nazik bir şekilde pipetaj yapılarak çözündürülmüştür. Son olarak bu çözeltiyi 1.5 ml'lik soğuk santrifüj tüplerine 100 µl olacak şekilde dağıtılarak 30 dk buzda bekletilmiştir. Son olarak tüpler uygun bir kap içerisinde alınarak sıvı nitrojen ile dondurulduktan sonra -80 °C'de depolanmıştır.

Tablo 7.11. Tampon 1 bileşenleri

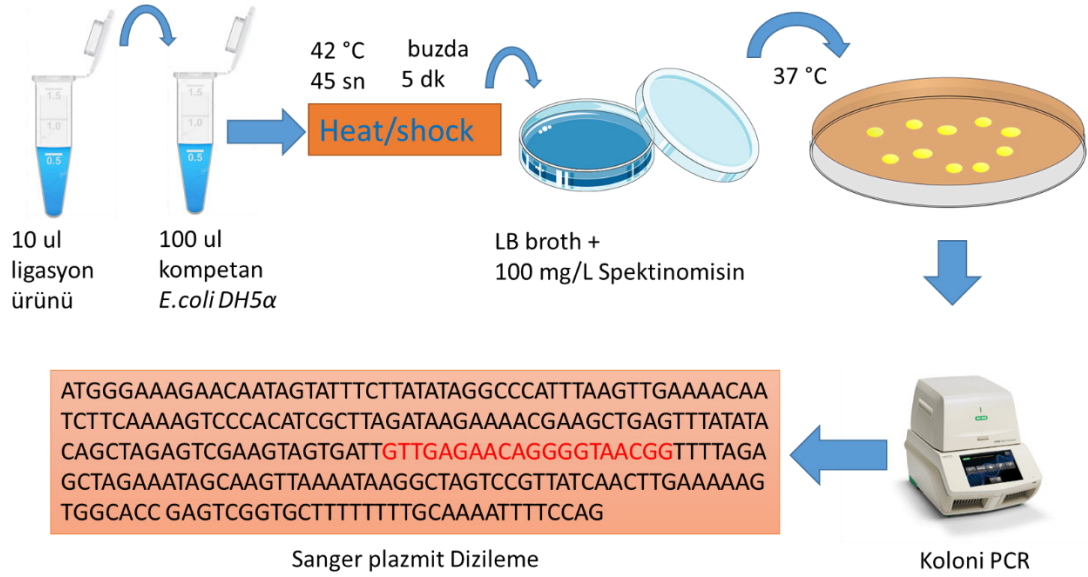
Bileşenler (TAMPON 1)	Miktar
Potasyum Asetat	30 mM
RuCl ₂	100 mM
CaCl ₂	10 mM
Gliserol	8.6 ml
dH ₂ O	50 ml'e tamamlanır
Filtre ile steril edilerek ve 4 °C'de depolanır.	

Tablo 7.12. Tampon 2 bileşenleri

Bileşenler (TAMPON 2)	Miktar
MOPS	10 mM
RuCl ₂	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Gliserol	8.6 ml
dH ₂ O	50 ml'e tamamlanır
pH KOH ile 6,5 ayarlanarak Filtre ile steril edilir ve 4 °C'de depolanır.	

7.8.4.5. pKII.1R Vektörünün Kompetan *E.coli* Bakterisine Klonlanması

200 ml LA besi ortamı hazırlanarak otoklav sonrasında 100 mg/L spektinomisin eklenmiş ve petrilere dökülmüştür. Kompetan *E.coli* bakterisi -80°C'den buz üzerine alınarak 30 dakika bekletilmiştir. 10 µl ligasyon ürünü 50 µl kompetan *E.coli* bakterisi bulunan 1.5 ml'lik ependorf tüplere eklenmiş ve tüpün alt ucunu parmak ucuyla 3-5 kez vurularak karışması sağlanmış ve 20-30 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler daha önceden ayarlanmış su banyosu içerisinde 42°C'de 60 saniye bekletilerek sıcaklık şoku (heat shock) yardımıyla plasmitlerin kompetent *E.coli* hücrelerine transferi sağlanmıştır. Buz üzerinde 2-5 dakika inkübe edildikten sonra bakteriler üzerine 900 µl SOC besi ortamı eklenmiştir. Tüpler 37 °C'de 60 dakika 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 100 µl LB besi ortamı dökülerek pellet çözüldü ve bakteriler spreader yardımı ile içerisinde 100 mg/L amphisilin bulunan LA besi ortamına yayılarak 37°C'de 16 saat inkübe edildikten sonra tek koloniler gözlemlenmiştir (Şekil 7.10).



Şekil 7.10. pK11.1R vektörünün kompetan *E.Coli* bakterisine klonlama aşaması.

7.8.4.6. Bakteri Kolonilerinin PCR ile Test Edilmesi

E. Coli transformasyonu sonucunda gelişen tek kolonilerden seçim yapılarak koloniler 2 µl steril saf suya pipet ucu ile bulaştırılmış Tablo 7.13’de verilen bileşenler oluşturularak PCR yapılmış ve plazmitlerin aktarılıp aktarılmadığı doğrulanmıştır. Koloni PCR bileşenleri tablo 7.13’de PCR koşulları ise 7.14’de gösterilmiştir. Koloni PCR da gRNA’lar 25 bp uzunluğunda olduğundan plazmitler *HptII* primerleri kullanılarak koloniler doğrulanmıştır.

Tablo 7.13. Bakteri kolonilerinde bulunan plasmidlerin teyidinde kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
NEB 2x Taq DNA Master mix	12.5
<i>HptII</i> Primer F	1
<i>HptII</i> Primer R	1
Nüklea free su	10.5
DNA (kloni pipet ucu ile bulaştırılmıştır)	-
Toplam	25

Tablo 7.14. Bakteri kolonilerinde bulunan plasmidlerin teyidinde kullanılan PCR protokolü

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
1	95	3 dk	1 döngü
2	95	30 sn	
3	55	30 sn	34 döngü
4	68	1 dk	
5	68	5 dk	1 döngü
6	4	Süresiz	1 döngü

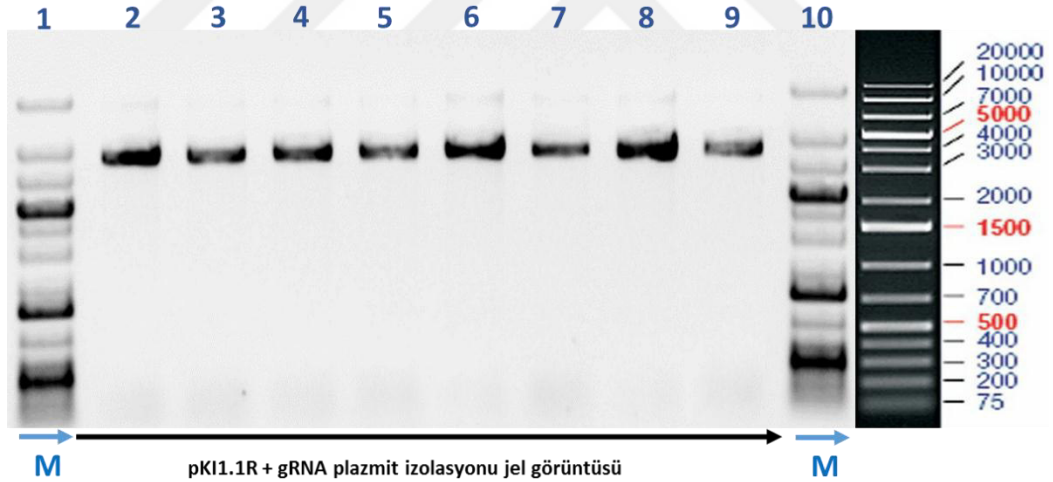
7.8.4.7. Bakterilerin Stok Olarak Hazırlanması ve Saklanması

Koloni PCR doğrulaması yapılan koloniler steril falkon tüp içerisinde 20 ml LB besi ortamına ekimi yapılarak 1 gece 37°C’de 220 rpm’de çalkalamalı inkübatörde

büyütülmüştür. Falcon tüpler 5000 g'de 5 dk santüfuj edilerek bakterilerin çökmesi sağlanmıştır. Pellet 2 ml LB besi ortamı ile çözülerek 500 ul olacak şekilde 2 ml'lik ependorf tüplere transfer edilmiştir. Tüpler 5000 g'de 5 dk santüfuj edilerek bakterilerin çökmesi sağlandı. Pellet 200 ul LB besi ortamı ile çözülerek üzerine 800 ul steril %80'lik gliserol eklenmiştir. Vorteks ile iyice karıştırılarak -80°C'de muhafaza edilmiştir.

7.8.4.8. Plazmit izolasyonu

PCR sonucu belirlenmiş olan kolonilerden plazmit izolasyonu yapmak için bakteriler, içerisine 100 mg/L Spectinomycin eklenmiş 10 ml sıvı LB besin ortamında 37 °C 200 rpm'de 1 gece boyunca inkübatörde büyütülmüştür. Plazmit izolasyonu için Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep kit kullanılmıştır ve ilgili firmanın protokolü takip edilmiştir. Plazmitlerin varlığı ve konsantrasyonu ve NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer ile ölçülmüştür. Daha sonra %0.4'lük agaroz jelde yürütülerek plazmidler kontrol edilmiştir (Şekil 7.11).



Şekil 7.11. İzole edilen plazmitlerin agaroz jelde görüntülenmesi

7.8.4.9. Plazmitlerin Dizilenmesi

Klonlanan gRNA'ların plazmit içerisine aktarılıp aktarılmadığını kontrol edilmesi için plazmid dizleme yapılmıştır. 100 ng/μl konsantrasyonda 30 μl hacimde hazırlanan plazmitler, CRISPR seq forward ve reverse primerleri kullanılarak hizmet alımı şeklinde sanger dizileme ile gerçekleştirilmiştir. NCBI Blast programı kullanılarak Dizilenen sekanslar ile gRNA'lar alignent yapılarak varlıkları kontrol edilmiştir. Dizileme ile doğrulanan plazmitler *Agrobacterium* içerisine 7.8.4.10'da belirtildiği şekilde transfer edilmiştir.

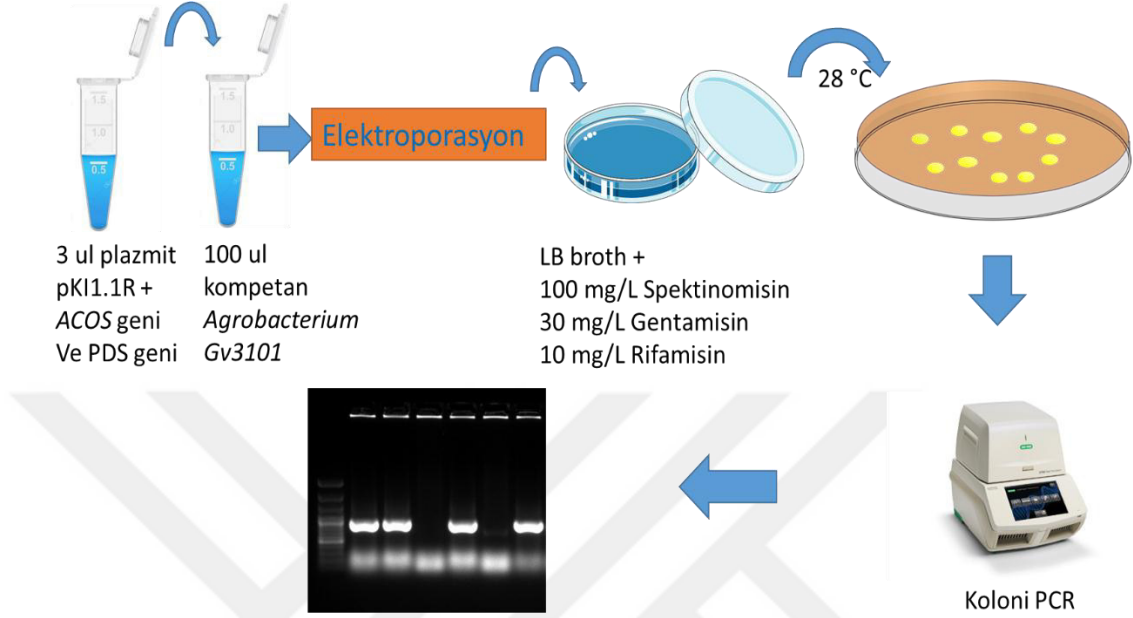
7.8.4.10. gRNA/pKII.1R Vektörünün Kompetan *A. tumefaciens*'e (AGL1) Transformasyonu

pKII.1R vektörü *A. tumefaciens* (AGL1) bakterilerine elektroporasyon (Biorad) cihazı ile transforme edilmiştir. Elektroporasyonda kullanılacak küvetler (Gene Pulser®/MicroPulser™ Electroporation Cuvettes, 0.1 cm gap) buz üzerine önceden yerleştirilip soğutuldu. Kompetan *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) buz üzerine yerleştirilerek 50 µl bakteri üzerine 10 µl ligasyon ürünü eklendi. Daha sonra karışım pipet yardımı ile elektroporasyon küvetine alınarak Kuveyt cihaza yerleştirilmiştir. Elektroporasyon cihazında *Agrobacterium* için ayarlanmış uygun elektrik akımı seçilerek işlem gerçekleştirilmiştir. İşlem gerçekleştirildikten sonra çok hızlı bir şekilde hücrelerin üzerine 1 ml LB besin ortamı eklenmiş ve pipet yardımı ile bakteriler 2ml'lik steril ependorf tüpe transfer edilmiştir. Devamında 28 °C 200 rpm'de 3 saat çalkalayıcı inkübatörde büyütülmüştür. Daha sonra spektinomisin (100 mg/ml), carbenicilin (50 mg/ml) Rifamisin (10 mg/L) antibiyotikleri içeren katı LB besin ortamına 100 µL bakteri yayılarak 28 °C'de inkübasyona bırakılıp iki gün boyunca büyütülmüştür. Seçici ortamdan bakteri kolonileri numaralandırılarak kullanılmıştır. Seçilen her bir koloni için 10 µl steril su içeren PCR tüpü hazırlanıp her bir koloniden pipet ucu ile tek bir bakteri kolonisi alınarak suya inoküle edilmiştir. Elde edilen bakterili inokülanattan 2ul alınarak koloni PCR için, 8 µl'si ise bakterinin sıvı kültüre ekimi için kullanılmıştır.

7.8.4.11. Plazmitlerin Kompetan *A. tumefaciens* GV3101 Bakterisine Aktarılması

500 ml LA besi ortamı hazırlanarak otoklav sonrasında 30mg/L Gentamisin+ 25mg/L rifamisin + 100 mg/L spektinomisin eklenmiş ve petrilere dökülmüştür. Kompetan *A. bacterium* bakterisi – 80 °C'den buz üzerine alınarak 30 dakika bekletilmiştir. 10 µl ligasyon ürünü 50 µl kompetan *Agrobacterium* bakterisi bulunan 1.5 ml lik ependorf tüplere eklenmiş ve tüpün alt ucunu parmak ucuyla 3-5 kez vurularak karışması sağlanmıştır. Daha önceden buz üzerinde bekletilen elektroporasyon kuveytine (Gene Pulser®/MicroPulser™ Electroporation Cuvettes, 0.1 cm gap) alınan karışım transfer için kullanılmıştır. Devamında Biorad Gene Pulser®/Micropulser™ cihazı ile transformasyon gerçekleştirilmiştir. Kuveyt üzerine 900 µl LB besi ortamı eklenerek 2 ml'lik ependorf tüp içerisinde 28°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 100 µl bakteri süspansiyonu spreader yardımı ile LA besi ortamına yayılarak

28°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra tek koloniler gözlemlenmiştir. Seçilen her bir koloni için 10 µl steril su içeren PCR tüpü hazırlanıp her bir koloniden pipet ucu ile bakteri alınarak suya bulaştırılmıştır. Elde edilen bakterili inokülanın 2 µl’si PCR için 8 µl’si ise bakterinin sıvı kültüre ekimi için kullanılmıştır (Şekil 7.12).



Şekil 7.12. pK11.1R plazmitlerin kompetan *A. tumefaciens* GV3101 bakterisine aktarılması

7.8.4.12. Koloni PCR

Agrobacterium transformasyonu sonucunda gelişen tek kolonilerden seçim yapılarak CRISPRseq ve *HptII* primerleri ile koloni PCR yapılmış ve plazmitlerin aktarılıp aktarılmadığı doğrulanmıştır. Koloni PCR bileşenleri tablo 7.15’de PCR koşulları ise 7.16’da gösterilmiştir.

Tablo 7.15. Koloni PCR bileşenleri

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

Tablo 7.16. Koloni PCR protokolü

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
1	95	3 dk	1 döngü
2	95	30 sn	
3	55	30 sn	34 döngü
4	68	1 dk	
5	68	5 dk	1 döngü
6	4	Store	1 döngü

7.8.5. Bitki Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu ve Tohumların Çimlendirilmesi

Steril kabin içerisinde domates tohumları yüzey sterilizasyonu yapmak amacı ile % 70'lik etil alkolde 60 saniye bekletildikten sonra 50 ml % 20'lik ticari çamaşır suyu (Sodyum hipoklorit) içerisine 100 ul Tween20 eklenerek hazırlanan solüsyonda 20 dakika bekletilerek 5 kez steril saf su ile yıkanmıştır. Islak tohumların kuruması için steril kurutma kağıdında 5 dakika bekletilmiştir. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumları çimlendirmek için GM besi ortamları hazırlanmıştır 121 °C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavda steril edilerek, steril 1 litrelik kavanozlara 100 ml/kavanoz olacak şekilde dökülmüştür. Dökülen besi ortamları katılaştıktan sonra steril tohumlar pens yardımı ile her bir kavanoza 10 adet tohum ekimi yapılmıştır. Daha sonra kavanozlar çimlendirilmek için 8 gün süre ile 25 °C'de 16-8 saat aydınlık/karanlık periyotta iklim dolabında inkübe edilmiştir.

7.8.6. Domates Bitkisi Gen Aktarımı

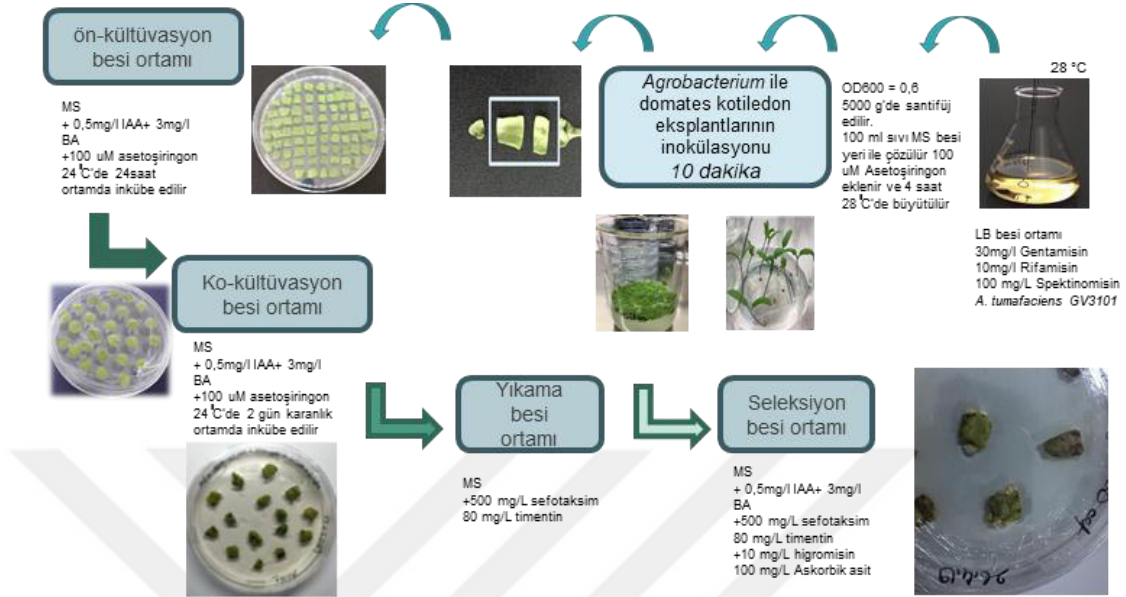
7.8.6.1. Kotiledon Eksplantlarının Ön-kültür Ortamına Alınması

Domates bitkisinde genomu düzenlenmiş bitki elde etmek amacı ile bitki rejenerasyon sistemi optimize edildikten sonra en yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip çeşit ve ekplant kaynağı kullanılmıştır. Buradan yola çıkarak 8 günlük domates fidelerinin kotiledon eksplantları *Agrobacterium* hücreleri ile inoküle edilmeden 12 saat önce PCM besi ortamına transfer edilmiştir.

7.8.6.2. *Agrobacterium* Hücre Kültürünün Hazırlanması

Gen aktarım aşamasında iki farklı *Agrobacterium* suşu kullanılmıştır. pKI1.1R vektörüne sahip *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 ve GV3101 suşu domates bitkisinde gen aktarımı yapılmış fakat AGL-1 suşu domates bitkisinde doku karamasına neden olduğundan dolayı GV3101 suşu ile çalışmaya devam edilmiştir. PKI1.1RPDS ve PKI1.1RACO vektörlerini içeren *Agrobacterium* hücreleri gentamisin (30 mg/L), spektinomisin (100 mg/L) ve rifampisin (10 mg/L) antibiyotiklerini içeren 50 ml sıvı LB ortamında 28°C'de 200 rpm'de 1 gün süreyle OD600 0,8'e gelene kadar büyütülmüştür. Kültürler 50 ml'lik falkon tüpe aktararak 5000 rpm de 5 dakika sentrifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatant atılmıştır. Bakteri peleti *Vir* genlerinin aktivasyonu için 200 uM asetoşiringon, 30 mg/L gentamisin, 100 mg/L spektinomisin içeren LB besi ortamında çözülerek 4 saat süre ile 28°C'de 200 rpm'de büyütülmüştür.

Kültürler 50 ml'lik falkon tüpe aktarılarak 5000 rpm de 5 dakika santifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatant atılmıştır. Bakteri kültürünün OD600'si 0,6 olacak şekilde Sıvı MS besi ortamı ile çözülerek gen aktarımı için hazırlanmıştır.



Şekil 7.13. A. tumefaciens GV3101 bakterisinin ile gen aktarım yönteminin özeti.

7.8.6.3. Kotiledon Eksplantlarının *Agrobacterium* ile İnokülasyonu ve Ko-Kültürasyon Besi Ortamına Alınması

Ön kültür ortamında bekletilen kotiledon eksplantları *Agrobacterium* kültürü ile 10 dakika muamele edilmiştir ve ardından ko-kültürasyon ortamına alınmıştır. Eksplantlar 2 gün 25 °C'de karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Ko-kültürasyondan sonra kotiledon eksplantları üzerinde üremiş olan fazla bakterileri uzaklaştırmak için yıkama besiyerine (WM) alınmıştır. Eksplantlar WM besiyerinde 2 kez her bir yıkamada 10 dakika süre ile yıkanarak steril kurutma kağıtlarında kurumaya bırakılmıştır.

7.8.6.4. Eksplantların Selektif Besi Ortamına Aktarılması

Eksplantlar, selektif besiyerine transfer edilmiştir. Seleksiyon besiyerine alınan eksplantlar 16sa/8sa periyodunda bitki büyüme kabini içinde kallus oluşturmak üzere inkübasyona bırakılmıştır. Her bir petri kabına yaklaşık 10 eksplant yerleştirilmiş ve her çalışmada 100 eksplant kullanılmıştır. 4-5 hafta sonra, rejenerasyon sürgünler (3-5 cm) köklendirme ortamına (RM) aktarılmış ve devamında turba ve perlit (3:1) karışımı içeren 15x25x45 ebatındaki saksılara transfer edilmiştir.

7.8.6.5. Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Aklimatizasyonu

Bitkilerin alınacağı tüm saksılar çamaşır suyu ile yıkanarak temizlenmiştir. Torflar Buzdolap poşetlerine ya da otoklav poşetlerine doldurularak otoklav yardımı ile steril hale getirilmiştir. Steril torflar 1Lt'lik saksılara doldurularak hazırlanmıştır. 1Lt 'lik steril kavanozlarda bulunan steril bitkiler köklerine zarar vermeden dikkatli bir şekilde kavanozdan çıkarılarak köklerinde bulunan fazla MS musluk suyu ile yıkanmıştır. Daha sonra bitkiler torf içeren saksılara dikim yapılmıştır. 0,5 mg/L IAA içeren Hoagland solüsyonu ile sulanmıştır. Sulama yapıldıktan sonra saksılara bir çubuk dikilerek buzdolabı poşeti ile kapatılmıştır. Bitkiler iklim odasına 16/8 saat aydınlık /karanlık periyotta 25 °C'de büyümeye bırakılmıştır. Dikim işleminden 3 gün sonra saksıların üzerinde bulunan buzdolabı poşeti çıkarılmış 1-2 saat bekletildikten sonra tekrar takılmış 5. gün ise tamamen çıkarılmıştır. 15 gün sonra bitkiler 30Lt'lik saksılara transfer edilerek hasat dönemine kadar haftada bir hoagland solüsyonu ile sulanmıştır.

7.8.7. T0 Aday Bitkilerin Moleküler Olarak Belirlenmesi

Genom düzenlenmiş bitkilerden ve yabani türlerden genomik DNA izolasyonu Quick-DNA™ Plant/Seed Miniprep Kit (Zymo Research) kiti kullanılarak firmanın önermiş olduğu protokolüne göre yapılmıştır. *Higromisin* ve *Cas9* geni içeren tüm genom düzenlenmiş T0 bitkiler *HptII*, *virA*, *virD* and *Cas9* spesifik primerler kullanılarak PCR ile kontrol edilmiştir. PCR bileşenleri Tablo 7.17'de ve koşulları Tablo 7.18'da verilmiştir. PCR işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerine 3ul 6x yükleme boyasından eklenerek %0,8'lik agaroz jelde Biorad jel elektroforez cihazında 45 dakika yürütülmüştür. Transgenik olarak belirlenen bitkiler mutasyon belirlemek amacı ile dizileme yapılmıştır.

Tablo 7.17. Transgenik To bitkilerinin PCR ile belirlenmesinde kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
NEB 2x Taq DNA Master mix	12.5
CRISPRseq Primer F	1
CRISPRseq Primer R	1
Nüklea free su	10.5
DNA (kloni pipet ucu ile bulaştırılmıştır)	-
Toplam	25

Tablo 7.18. Transgenik To bitkilerinin PCR ile belirlenmesinde kullanılan PCR protokolü

Sıra	Sıcaklık	Süre	Döngü
1	95 °C	3 dk	1 döngü
2	95 °C	30 sn	
3	55	30 sn	34 döngü
4	68 °C	1 dk	
	68 °C	5 dk	1 döngü
5	4 °C	Store	1 döngü

7.8.8. Genom Düzenlenmiş Bitkilerde Mutasyon Analizleri

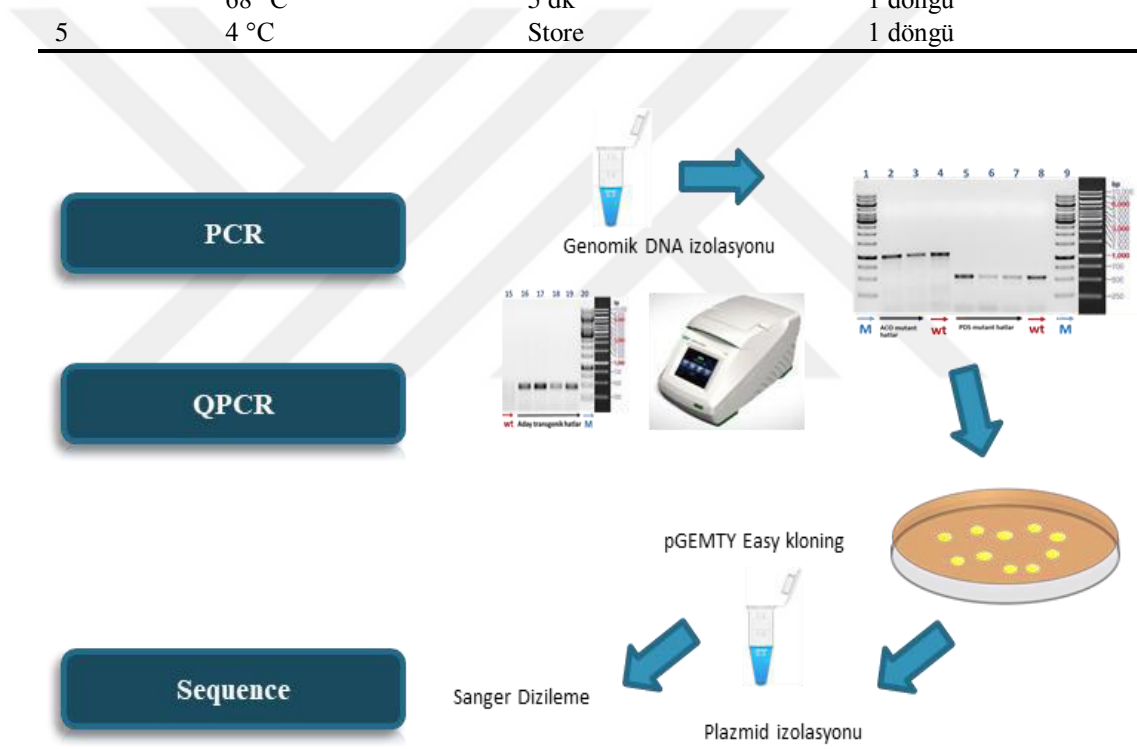
ACO ve *PDS* geninde meydana gelen mutasyonları belirlemek için örneklerden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu Plant/Seed DNA Mini Prep. (Zymo research) kiti kullanılarak yapılmıştır. Bölüm 7.8.7’de yapılan PCR sonuçlarına göre pozitif transgenik bitkiler tespit edilmiştir. Teorik olarak genom düzenlenmiş bitkilerde mutasyonları belirlemek amacıyla *SIPDS* ve *ACO* gen bölgelerinde gRNA hedef bölgelerini kapsayacak şekilde NCBI primer3’de primer dizaynı edilmiş ve PCR ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonu *SIPDS* ve *ACO* genlerine spesifik primeler kullanılarak Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs#M0491S, USA) ile oluşturulmuştur. PCR koşulları ve bileşenleri Tablo 7.19 ile Tablo 7.20’de verilmiştir. PCR ürünleri %0,8’lik agaroz jelde yürütüldükten sonra jelde izole edildi ve pGEM®-T Easy Vector (Promega) kullanılarak klonlama yapılmıştır. Klonlama yapılan plazmitler *E. coli* içersine heat-shock metot yardımı ile transfer edilmiş ve SOC besi ortamında bir saat 37 °C’de 180 rpm’de orbital çalkalayıcıda 1 saat büyütülmüştür. 3000 rpm’de 10 dakika santifüjün ardında pellet 100 ul SOC besi ortamı ile çözülerek tek kolini oluşturmak ve klonlanan plazmitleri seçmek için x-gal boyama yapılarak mavi beyaz koloni seçimi yapılmıştır. X-gal boyama protokolü (EK-6) sunulmuştur. Daha sonra transforme edilen bakteriler aynı petrilere yayılarak 37 °C’de bir gece büyütülerek, elde edilen beyaz tek kolonilerden her bir gen için 10 adet koloni seçimi yapılarak koloni PCR ile doğrulanmıştır. Ardından bakteriler sıvı LB besi ortamına ekilerek bir gece büyütüldükten sonra plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmitler sanger sekanslaması kullanılarak mutasyonlar tanımlanmıştır (Şekil 7.14). Sekanslar, Blastn NCBI kullanılarak *SIPDS* ve *ACO* geninin yabani tip referans sekansı ile karşılaştırılmıştır. Bitkilerde elde edilen mutasyon ile fenotipik değişiklikler incelenerek mutasyon frekansı belirlenmiştir.

Tablo.7.19. To bitkilerinde Q5 High-Fidelity DNA polimeraz PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
5X Q5 Reaction Buffer	5
10 mM dNTPs	0,75
Primer F	1,25
Primer R	1,25
Template DNA 100 ng/µl	2
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25
DMSO	1
Nüklea free su	13,5
Toplam	25

Tablo 7.20. To bitkilerinde Q5 High-Fidelity DNA polimeraz PCR koşulları

Sıra	Sıcaklık	Süre	Döngü
1	95 °C	3 dk	1 döngü
2	95 °C	30 sn	
3	55	30 sn	34 döngü
4	68 °C	1 dk	
	68 °C	5 dk	1 döngü
5	4 °C	Store	1 döngü



Şekil 7.14. Genom düzenlenmiş bitkilerde mutasyonların belirlenmesinde izlenen metotlar.

7.8.9. Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

PDS geni hedeflenen mutant bitkiler fenotipik olarak kontrol bitkileri karşılaştırılmıştır. Albino, kimerik ve tamamen yeşil olanların oranları kontrol bitkilerine göre belirlenmiştir. *ACO* geni hedeflenen mutant hatların kontrol bitkilere göre çiçek yapıları, polen canlılıkları ve morfolojik görüntüleri karşılaştırılmıştır.

7.8.10. Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Polen Canlılıklarının Belirlenmesi

Denemede yer alan çeşitlere ait çiçek tozlarının canlılık düzeylerini belirleyebilmek için 2.3.5 Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) canlılık testleri aşağıda açıklandığı şekilde yapılmıştır.

10 ml TTC çözeltisi hazırlamak için önce 0,1 g TTC, 1 ml sterisaf su içinde çözülmüş, ayrıca 6 g sakkaroz 9 ml saf su içinde eritilmiş ve ayrı ayrı hazırlanan bu iki karışım bir falkon tüp içerisinde karıştırılmıştır. (Norton 1966). Falkon tüp alüminyum folyo ile sarılarak ışık alması engellenmiştir. Daha sonra denemede yer alan mutant bitki ile yabani tür bitkilere ait çiçek tozları 1.5 ml'lik ependorf içerisine polenler toplanmıştır. Her biri için 2'şer lam hazırlanmış ve lamın her iki tarafına bir damla TTC damlatılmıştır. Damlanın üzerine sulu boya fırçasıyla polen ekimi yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra damlanın üzeri lamelle kapatılmıştır. TTC boya maddesi çiçek tozlarının ekiminden 2-3 saat sonra boyanmalarını sağlamıştır. Lamın her iki ucunda da 5'şer bölgede ışık mikroskopunda sayım yapılmıştır. Işık mikroskopunda yapılan gözlemler sonucu TTC boya maddesi ile boyanmayan çiçek tozları cansız, pembe renk olan çiçek tozları yarı canlı, kırmızıya boyanan çiçek tozları ise canlı olarak değerlendirmeye alınmıştır. Lamın 3 farklı bölgesinde 100'er adet polen sayılarak Kırmızıya boyanan çiçek tozlarının oranına göre hesaplama yapılmıştır.

7.8.11. To Transgenik Mutant bitkilerde RNA İzolasyonu ve Kantitatif RT-qPCR

RNA izolasyonuna başlamadan önce kullanılacak olan saf su, porselen havanlar, mikrosantrifüj tüpler, pipet uçları, pensler ve diğer tüm malzemeler 2 kere otoklavlanarak steril edilmiştir. Porselen havan ve mikrosantrifüj tüpler kullanılmadan önce DEPC water ile silinerek, sıvı azot ile muamele edildi. RNA izolasyonu, QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit kullanılarak kullanılarak yapıldı. Bir mikrogram RNA alınarak iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad) bileşenleri tablo 7.21'deki hazırlanmış ve cDNA sentezi kitin protokolüne (tablo 7.22) uygun olarak yapılmıştır.

Tablo 7.21. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Reaksiyon hacmi, µl
5x iScript Reaksiyon Mix	4
iScript Reverse Transkriptaz	1
Nükleaz- ferece su	X
RNA template (1 µg)	X
Total hacim	20

Tablo 7.22. cDNA sentezi PCR koşulları

Reaksiyon basamağı	Sıcaklık °C	Süre dakika
Ön sıcaklık	25	5
Reverse Transkripsiyon	46	20
RT inaktivasyon	95	1
Store	4	süresiz

Daha sonra kantitatif RT-PCR SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Biorad) kullanılarak yapılmıştır. 1 µl cDNA template olarak kullanılmış ve tüm örnekler 3 teknik tekrarlı olarak hazırlanmıştır. Çalışmada gen ifadesinin belirlenebilmesi için domates *actin 1* geni internal kontrol olarak kullanılmıştır. *Aktin* geni primerleri ve *ACO* RT-qPCR primerleri EK5’de sunulmuştur. cDNA konsantrasyonu ve yapılan RT-qPCR çalışmasının güvenilirliğini belirlemek amacı PCR standartları oluşturulmuştur. Yapılan tüm RT-qPCR üç kez tekrarlanmıştır PCR bileşenleri (Tablo 7.23) ve protokolü firmanın önerdiği şekilde yapılmış ve Tablo 7.24’de verilmiştir.

Tablo. 7.23. RT-qPCR sentezi reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Reaksiyon hacmi (µl)
SsoAdvanced Universal SYBR green süper Mix	10
Forwar Primer (10 uM)	0,5
Reverse Primer (10 uM)	0,5
cDNA	1
Nükelaz free su	8
Total hacim	20

Tablo 7.24. RT-qPCR koşulları (Biorad CFX96)

Reaksiyon basamağı	Sıcaklık °C	Süre	Döngü
Polimeraz aktivasyon sıcaklığı	98	30 sn	1
Denatürasyon	98	15 sn	40
Bağlanma/ uzama	60	30 sn	
Melt curve analiz	65-95 (0,5 derece artılır her 5 döngüde)	--	
Store	4	süresiz	

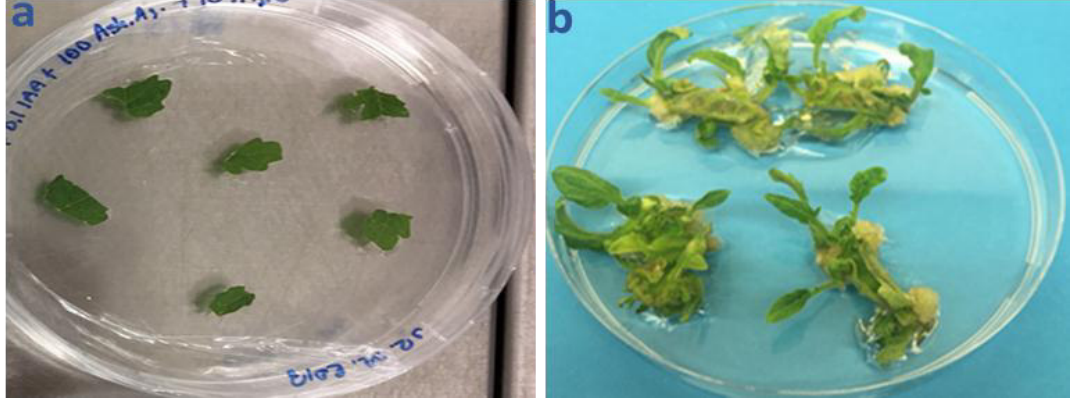
8. BULGULAR

8.1. Bitki Doku Kültürü ve Rejenerasyon Parametrelerin Optimizasyonu

Domates bitkisinde en iyi rejenerasyon ortamına ulaşmak için, eksplant yaşı, eksplant kaynağı ve bitki büyüme düzenleyicilerin etkisi belirlenmiştir.

Domates bitkisinin kotiledon ve yaprak eksplantları çeşitli kombinasyonlarda ve konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Yaprak ve kotiledon eksplantlarından bitki rejenerasyonu  zerine BA, Kinetin ve IAA bitki büyüme düzenleyicilerin etkisi Tablo 8.1'de gösterilmiştir. Kültür başlangıcından üç hafta sonra oluşan bitkicikler değerlendirilmiştir.

Steril koşullar altında yaklaşık 30 günlük domates bitkilerin yaprakları 2-3 mm büyüklüğünde kesilerek farklı konsantrasyonlarda RM besi ortamına alınmıştır. Yaprak eksplantlarında kültür başlangıcından 8 gün sonra embriyojenik kalluslar gözlenmeye başlamış ve 15 gün sonrada sürgün oluşumu gözlemlenmiştir. Yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu, Crocker  eşidinde 0.1 mg/L IAA ve 4 mg/L kinetin takviye edilmiş rejenerasyon ortamı üzerinde en yüksek rejenerasyon elde edilirken (% 78) eksplant başına sürgün oluşumu ise 4.30 olarak belirlenmiştir (Tablo 8.1). Bobcat  eşidinde, yaprak eksplantlarının rejenerasyonu, hem BA hem de Kinetin içeren ortamlarda Crocker çeşidinden daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bobcat  eşidinde yaprak eksplantlarından en yüksek bitki rejenerasyonu 0.1 mg/L IAA ve 4 mg/L kinetin takviye edilmiş ortamlarda gözlemlenmiştir. Buna ek olarak BA içeren rejenerasyon besi ortamlarında Kinetin içeren ortamlara göre, yaprak eksplantlarından elde edilen sürgün sayısı daha düşük olarak bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada ilginç olarak doku kararmasını önlemek amacı ile kullanmış olduğumuz L-Askorbik asit tüm rejenerasyon ortamlarında yapraktan sürgün oluşumunu engellemiştir.



Şekil 8.1. Yaprak eksplantlarından bitki rejenerasyonu. a): yaprak ekplantlarının kesilerek bitki rejenerasyon ortamına alınması. b): yapraktan bitki rejenerasyonu (30 gün)

Yaprak eksplantlarına ek olarak, rejenerasyon ortamında 3-4 hafta kültürden sonra kotiledon yapraklarında çoklu sürgünler gözlemlenmiştir. Kültür başlangıcından 2 hafta sonra embriyojenik kallus yapıları gözlemlenirken 21 günlük kültürlerde sürgün oluşumu gözlemlenmiştir. Kotiledon eksplantlarında en yüksek sürgün oluşumu, 3 mg/L BA ve 0.1 mg/IAA ile takviye edilmiş ortamda Crocker çeşidinde elde edilmiştir. Kinetin içeren ortamda yapraktan yüksek rejenerasyon elde edilmesine rağmen kotiledon eksplantlarından rejenerasyon çok düşük olarak belirlenmiştir. Kotiledon yapraklar ekplant olarak kullanıldığı zaman Crocker çeşidi BA içeren ortamda daha iyi rejenerasyon olurken, Bobcat çeşidi kinetin içeren ortamda daha iyi bir rejenerasyon göstermiştir. Laboratuvar çalışmalarındaki deneyimlerimiz sonucunda kotiledon ekplantlarında doku kararmasının yüksek olduğu görülmüş bu sorunu önlemek amacı ile tüm besi ortamlarında L-askorbik asit (100 mg/L) eklenmiştir. Aynı zamanda kotiledon yaşının ve genotipinin kotiledon eksplantlarından bitki rejenerasyonunda en önemli faktör olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle bu çalışmayı gerçekleştirmek için farklı yaşta bitkilerin kotiledonları kullanılmıştır. Çalışmada 8, 10 ve 12 günlük yaşta bitkilerin kotiledonlarında rejenerasyon çalışılmıştır. Yapılan çalışmada 8-10 günden daha yaşlı ekplantlarda rejenerasyon çok hızlı bir şekilde düşmüş ve rejenerasyon elde edilememiştir. Daha sonra yapmış olduğumuz optimizasyonlarda 8 günlük kotiledon yaprakları rejenerasyonda ve gen aktarım çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 8.2. Kotiledon ekplantlarından elde edilen kallus ve bitki rejenerasyonu (15 gün)

Tablo 8.1. *S. lycopersicum* Cvs Crocker ve Bobcat çeşitlerinde kotiledon ve yaprak eksplantlarından farklı kombinasyonda bitki büyüme düzenleyiciler içeren MS besi ortamında in vitro rejenerasyonu.

BGD (mg L ⁻¹)			Yapraktan bitki rejenerasyonu (%)		Kotiledondan bitki rejenerasyonu (%)	
IAA	BA	Kin	Crocker	Bobcat	Crocker	Bobcat
0.1	0.5	0	10	0	12	0
	1.0	0	12	12	33	0
	2.0	0	24	17	76	0
	3.0	0	45	8	83	12
	4.0	0	10	0	64	0
	0	0.5	0	0	0	0
	0	1.0	0	0	0	0
	0	2.0	22	13	0	13
	0	3.0	36	17	0	33
	0	4.0	78	66	0	12
0.5	0.5	0	0	32	0	32
	1.0	0	9	17	17	12
	2.0	0	12	0	75	0
	3.0	0	18	0	79	0
	4.0	0	16	0	48	0
	0	0.5	0	0	0	0
	0	1.0	10	0	0	0
	0	2.0	32	0	0	0
	0	3.0	40	17	0	13,3
	0	4.0	76	58	0	50

Farklı gelişim dönemlerindeki domates fidelerine ait kotiledon ve yaprak eksplantlarında bitki rejenerasyonu üzerine etkisi belirlenmiştir. Kotiledon eksplantları için bitkilerin GM besi ortamına ekiminden sonra 8,10, 12 ve 14 günlük domates fidelerinin eksplantları 3 mg/L BA ve 0.1 mg/L IAA içeren rejenerasyon besi ortamında değerlendirilmiştir. Yaprak eksplantlarında ise bitkilerin GM besi ortamına

ekiminden sonra 20, 30 ve 40 günlük domates fidelerin yaprak eksplantları 4 mg/L Kinetin ve 0.1 mg/L IAA içeren rejenerasyon besi ortamında değerlendirilmiştir. Yaprak eksplant olgunluğunun bitki rejenerasyonu üzerine önemli derecede etkisi bulunamamıştır (Tablo 8.3). Kotiledon eksplantlarında eksplant yaşının bitki rejenerasyonu üzerine önemli derecede etkisi görülürken yaprak eksplantlarında rejenerasyon üzerine etkisi saptanamamıştır. Kotiledon eksplantlarında en yüksek rejenerasyon 8 ile 10 günlük domates fidelerinde elde edilirken 12 ve 14 günlük domates fidelerinde rejenerasyon oldukça azalmıştır. Ekplant yaşının rejenerasyon üzerin etkisi tablo 8.2’de verilmiştir.

Tablo 8.2. Eksplant yaşının kotiledon eksplantlarında bitki rejenerasyon üzerine etkisi

Ekimden itibaren çimlenen fideler (gün)	Bitki rejenerasyonu kotiledon %
8	84
10	78
12	65
14	46

Tablo 8.3. Eksplant yaşının yaprak eksplantlarında bitki rejenerasyon üzerine etkisi

Ekimden itibaren çimlene fideler (gün)	Bitki rejenerasyonu kotiledon %
20	76
30	78
40	72

8.2. *Agrobacterium* Aracılı Gen Aktarımının Optimizasyon

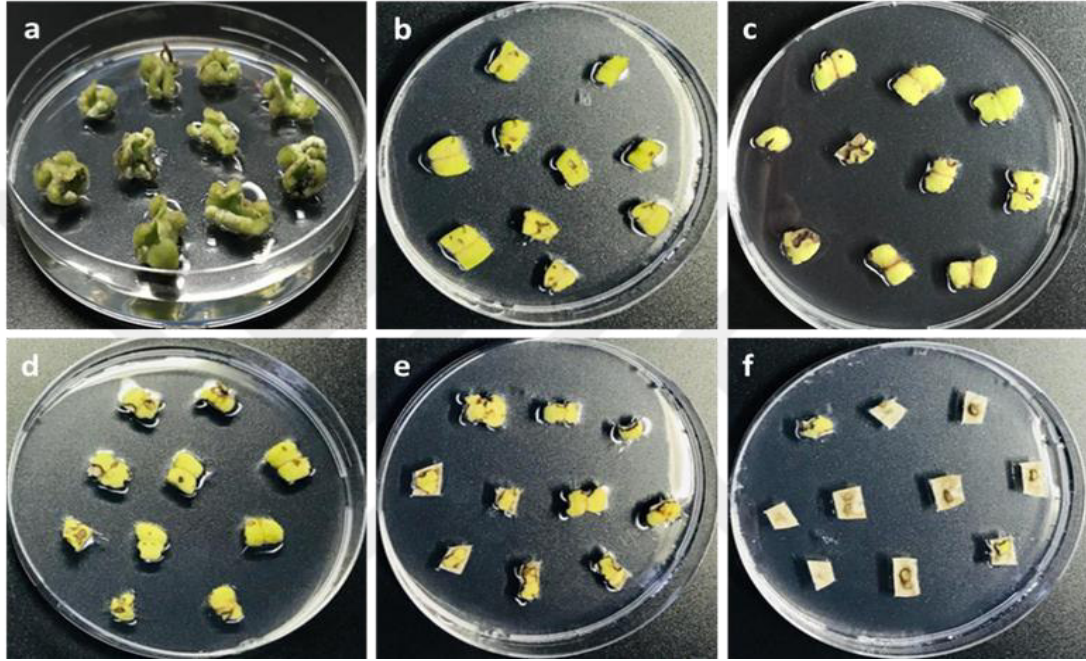
8.2.1. Bitki Gen Aktarımı Üzerine Eksplantın Etkisi

Bu çalışmada iki farklı eksplant kullanılarak doku kültürü optimizasyonu yapılmış ve her iki eksplant kaynağından yüksek oranda bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. *Agrobacterium* aracılı gen aktarımını optimize etmek için aynı eksplant kaynakları kullanılmıştır. Yapılan ön denemelerde *Agrobacterium* ile gen aktarımında kotiledon yapraklarından transgenik bitki, elde edilirken yapraklardan bitki elde edilememiştir. Ön denemelerden sonra yapılan tüm optimizasyon çalışmalarında eksplant olarak kotiledon yapraklar kullanılarak çalışmalara devam edilmiştir. Bitkisel rejenerasyon için en uygun koşulları sağlamak için yapılan bu çalışmada sürgün rejenerasyon verimini etkileyen antibiyotiklerin etkisi, bakteri suşu, bakteri yoğunluğu gibi farklı faktörler optimize edilmiştir.

8.2.2. Higromisin Konsantrasyonun Belirlenmesi

Kotiledon eksplantlarının higromisinin farklı dozlarına (0, 5, 10, 15, 20, 30 mg/L) tepkileri içeren rejenerasyon ortamında test edilmiştir. Higromisin içermeyen

rejenerasyon besi ortamında 15 gün sonra rejenerasyon gözlenmiştir (Şekil 8.3). Farklı konsantrasyonlarda higromisin içeren besi ortamlarındaki eksplantlarda kahverengileşme ve artan konsantrasyona bağlı olarak nekroz oluşumu tespit edilmiştir. Higromisinin en düşük konsantrasyonunda (5 mg/L) bitki rejenerasyonu engellemiş olmasına karşın kotiledon eksplantlarında doku kararması çok düşük oranda gerçekleşmiştir. Yapılan higromisin testi sonuçları, domates transformantlarının seçimi için 10 mg/L higromisin optimum olduğu belirlenmiştir.



Şekil 8.3. Transgenik olmayan 15 günlük domates eksplantlarında farklı higromisinin bitki rejenerasyonu üzerine etkisi. a: Kontrol, higromisin içermeyen besi ortamı, b: 5 mg/L higromisin, c: 10 mg/L higromisin, d: 15 mg/L higromisin, e: 20 mg/L higromisin, f: 30 mg/L higromisin, sırasıyla nekrozun oluşumu sonrasında bitki rejenerasyonu engellenmiştir

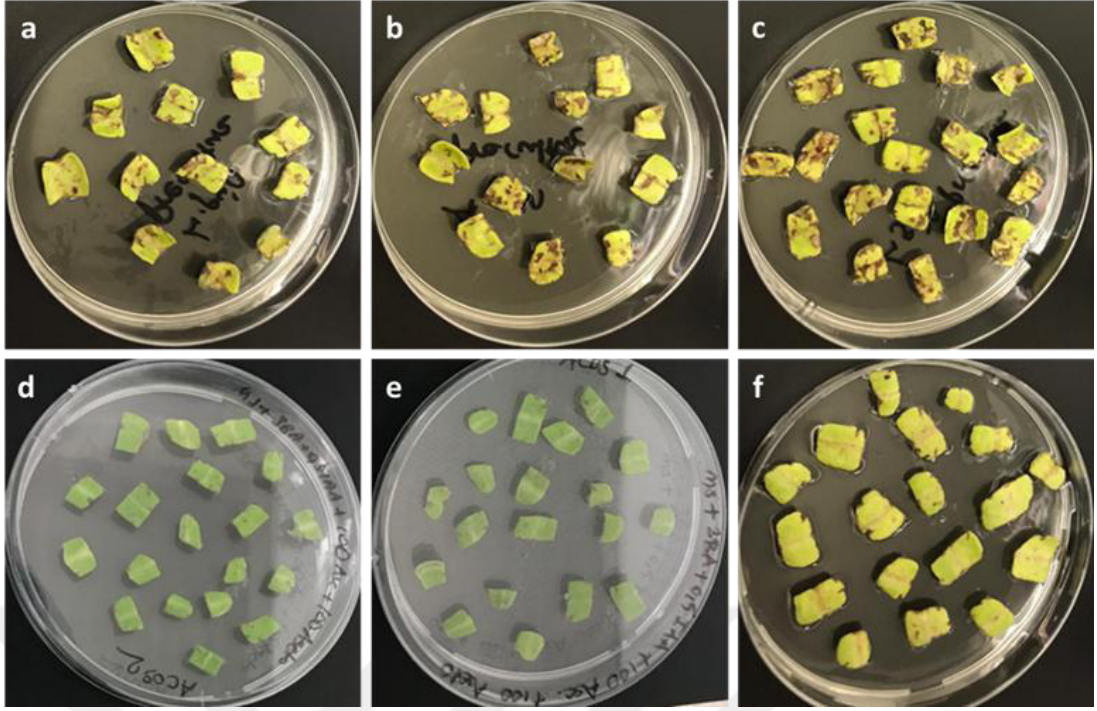
8.2.3. *Agrobacterium* Suş, Konsantrasyon ve İnokülasyon Besi Ortamının Bitki Gen Aktarımı Üzerine Etkisi

Domates bitkilerinde dokunun kararması sonucu transformasyon etkinliği ve transgenik bitki elde edilmesi yüksek oranda engellenmiştir. Bu çalışmada domates gen aktarımında, plazmid pK11.1R'yi barındıran *AGL1* ve *GV3101* *A. tumefaciens* suşları kullanılmıştır. Kotiledon eksplantlarında ölüm oranları *Agrobacterium* ile inokülasyondan 3 hafta sonra belirlenmiştir. Yapılan ön değerlendirmeler sonucunda *GV3101* (%15) suşunun doku ölümü üzerine etkisinin çok düşük olduğu, buna karşın *AGL* (%65) suşunun ise çok yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 8.4). Bu sonuca göre daha sonra yapılan tüm transformasyon çalışmalarında *GV3101* suşunun kullanılmasına karar verilmiştir.

Transformasyon etkinliği üzerine farklı *Agrobacterium* konsantrasyonları ile farklı inokulasyon besi ortamları test edilmiştir. İnokulasyon besi ortamı olarak LB ve MS besi ortamları kullanılmış ve MS besi ortamının transformasyon çalışmalarındaki etkinliği en yüksek bulunmuştur (Tablo 8.4). LB besi ortamı inokulasyon besi ortamı olarak kullanıldığı zamanlarda ko-kültüvasyon sırasında eksplantlar üzerinde bakterinin aşırı büyümesinden dolayı doku nekrozunda artışlar tespit edilmiştir. Doku nekrozunun artmasına paralel olarak transforme olan bitkilerin rejenerasyonu negatif etkilenmiştir ve dolayısı ile elde edilen bitki sayısı MS besi ortamına göre % 72 oranında daha düşük olarak belirlenmiştir. OD₆₀₀ 0.6 *Agrobacterium* konsantrasyonunun inokulasyon besi ortamı olarak MS kullanıldığı zaman transformasyon etkinliğinin en yüksek (%44) ve ardından sırasıyla OD₆₀₀ 0.8 (%24) ve OD₆₀₀ 0.1'i (%16) olarak bulunmuştur (Tablo 8.4). Sonuçlar, transformasyon etkinliği üzerine *Agrobacterium* suşu, inokulasyonda kullanılan bakteri konsantrasyonuu ile inokulasyon besi ortamının başarılı transgenik bitki eldesine önemli etkisinin olduğunu göstermiştir (Tablo 8.4).

Tablo 8.4. Transformasyon etkinliği üzerine *Agrobacterium* konsantrasyonunun ve inokulasyon besi ortamının etkisi

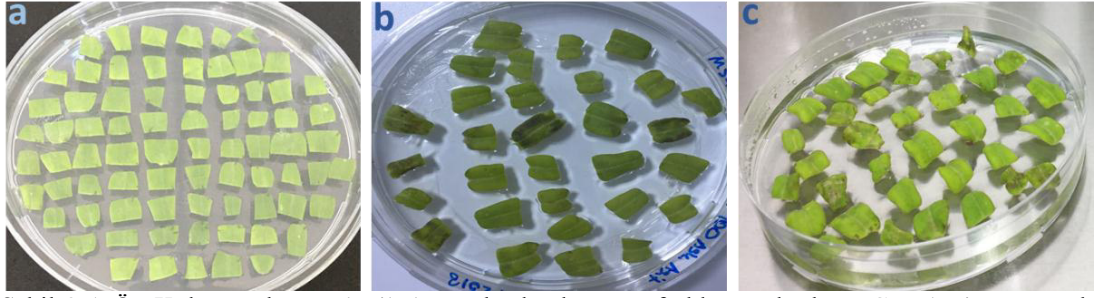
Inokulasyon Ortamı	<i>Agrobacterium</i> Konsantrasyonu (OD ₆₀₀)	Transformasyon (%)	Etkinliği
MS	0,1	16	
MS	0,6	44	
MS	0,8	24	
LB	0,1	32	
LB	0,6	24	
LB	0,8	6	



Şekil 8.4. *Agrobacterium* konsantrasyonunun ve inokülasyon besi ortamının eksplant doku karaması üzerine etkisi: a; LB OD₆₀₀= 0,1, b; LB OD₆₀₀= 0,4, c; LB OD₆₀₀= 0,8, d; MS OD₆₀₀= 0,1, e; MS OD₆₀₀= 0,6, f; MS OD₆₀₀= 0,8

8.2.4. Bitki Gen Aktarımı Üzerine Ön-kültür ve Ko-kültürasyon Sürelerinin Etkisi

Agrobacterium aracılı gen aktarımında doku kararmasından kaynaklanan eksplant ölümünün önüne geçmek amacı ile eksplantlar bitki rejenerasyon besi ortamı üzerinde ön kültüre tabi tutulmuştur. Domates ekplantları ön kültüre alınmadan doğrudan *Agrobacterium* ile muamele edildiklerinde dokuların kahverengileşmesi ve canlılık kaybı gibi aşırı duyarlı bir tepkiye yol açarak (Şekil 8.5) eksplantın ölümüyle sonuçlanmaktadır. Bunun bir sonucu olarak aşırı doku kararması olan eksplantlarda, *Agrobacterium*'un aşırı büyümesine ve bakteriyel kontaminasyonun artmasına neden olmuştur. Bu problemlerin önüne geçmek için ön kültürleme süresini optimize etmek gerekmektedir. Eksplantlar, *Agrobacterium* ile inoküle edilmeden 12 saat boyunca rejenerasyon besi ortamında sıcaklık ve karanlıkta bekletilmesi eksplant canlılığı ve sürgün rejenerasyonu üzerine önemli etkisinin olduğunu göstermiştir (Şekil 8.5).



Şekil 8.5. Ön-Kültüre alınan kotiledon eksplantlarının farklı sürelerde PCM besi ortamında inkubasyonu. a: 12 saat b: 24 saat c: 48 saat

Ayrıca ko-kültürasyon ve bakteri inokülasyon sürelerinin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kotiledon eksplantları hem inokülasyon hemde inokülasyon sonunda yıkama ortamlarında 10 dakikadan daha fazla bekletildiğinde hücrelerin parçalanmasına (lisis) neden olduğu belirlenmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalar optimum inokülasyon ve ko-kültürasyon sürelerinin sırasıyla 10 dk ve 2 gün olarak belirlenmiştir. İki günden daha fazla yapılan ko-kültürasyon süresinin *Agrobacterium*'un aşırı büyümesinden kaynaklanan doku ölümlerine neden olduğu belirlenmiştir. İki günden daha az olan ko-kültürasyon sürelerinin ise eksplantlarda doku kararması olmamasına ve düşük rejenerasyona neden olduğu belirlenmiştir (Tablo 8.5).

Tablo 8.5. Ön kültür, inokülasyon ve ko-kültürasyon sürelerinin gen aktarımı üzerine etkisi

Ön Kültür Zamanı (Gün)	Bakteri Enfeksiyon Zamanı (dak.)	Ko-kültürasyon (Gün)	Transformasyon Etkinliği
1	10	1	% 18
1	10	2	% 24
1	10	4	% 11
2	10	1	% 17
2	10	2	% 42
2	10	4	% 15
4	10	1	% 1
4	10	2	% 4
4	10	4	% 2

8.2.5. Bitki Gen Aktarımı Üzerine Antibiyotiklerin Etkisi

Gen aktarım çalışmaları için seçici marker genler önem arz etmektedir. *Agrobacterium* hücrelerinin ko-kültürü sonrası uzaklaştırılması için etkili antibiyotikler gereklidir. *Agrobacterium* enfeksiyonundan sonra transforme olan hücrelerin transforme olmayan hücrelerden ayırt etmek için seçim ajanını olarak farklı antibiyotikler kullanılmaktadır. Negatif bitki seçiminin etkinliği, bitki genotipine bağlı

olarak kullanılacak antibiyotiklere bağlıdır. Bu nedenle gen aktarım çalışmalarına başlamadan önce ko-kültüvasyon sonrasında *Agrobacterium*'un gelişiminin engellenmesi ve transgenik bitki hücrelerinin seleksiyonu için kullanılacak antibiyotikler ve dozajlarının optimize edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, *Agrobacterium*'un büyümesini engellemek için Timentin ve Sefotaksim antibiyotikleri farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Transforme olan bitki hücrelerinin seleksiyonunda ise higromisin antibiyotiği seleksiyon besi ortamlarına eklenmiştir. Tez kapsamında farklı sefotaksim ve timentin konsantrasyonlarının iki bakteri suşu üzerindeki etkisi test edilmiştir (Tablo 8.6). Bakteri gelişimine göre antibiyotiklerin eksplantlar üzerindeki etkisi seleksiyon besi ortamına alındıktan 15 gün sonra belirlenmiştir. (Tablo 8.6). Sefotaksimin (500 mg/L) ve timentinden (320 mg/L) tüm bakteri suşlarının büyümesinde daha etkili olduğunu göstermiştir. 500 mg/L sefotaksim ve 80 mg/L timentin birlikte kullanıldığında *Agrobacterium*'un büyümesinin daha iyi engellendiği belirlenmiştir.

Tablo 8.6. Domates ekplantlarının rejenerasyonu üzerine farklı konsantrasyonlarda cefotaxime ve timentin etkisi.

Cefotaxime (mg/L)	Timentin (mg/L)	Eksplant üzerinde <i>Agrobacterium</i> Büyümesi (%)
300	0	80
400	0	35
500	0	20
0	160	85
0	320	28
500	80	5

8.3. Genom Düzenlenmiş Domates Bitkilerinin Elde Edilmesi

8.3.1. *PDS* ve *ACO* Genlerinin Domates Bitkisinde Tanımlanması

8.3.1.1. *PDS* Geninin Domates Bitkisinde Tanımlanması

Arabidopsis thaliana PDS3 (AtPDS:NM117498) geni homolog nükleotid sekansları için Phytozome (phytozome.jgi.doe.gov) veri tabanı kullanılarak referans domates genomunu BLAST yapılarak araştırılmıştır. Blast sonucunda Domateste *SIPDS* (Solyc03g123760.2) olarak tek bir kopya gen tanımlanmıştır.

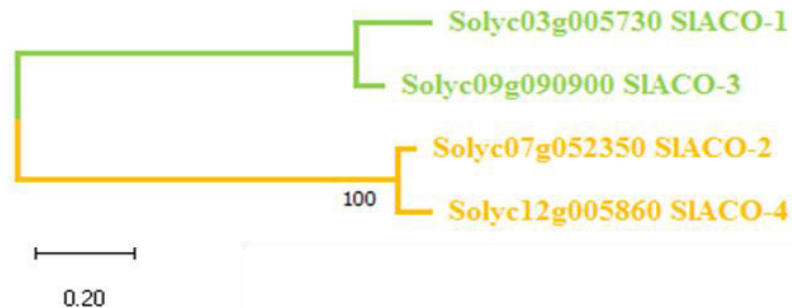
8.3.1.2. *ACO* Genlerinin Domates Bitkisinde Tanımlanması ve Özellikler

Akonitaz gen ailesine ait genler, domates referans genomunda metot isminde belirtilen biyoinformatik analizler kullanılarak yapılmıştır. Pfam veri tabanları

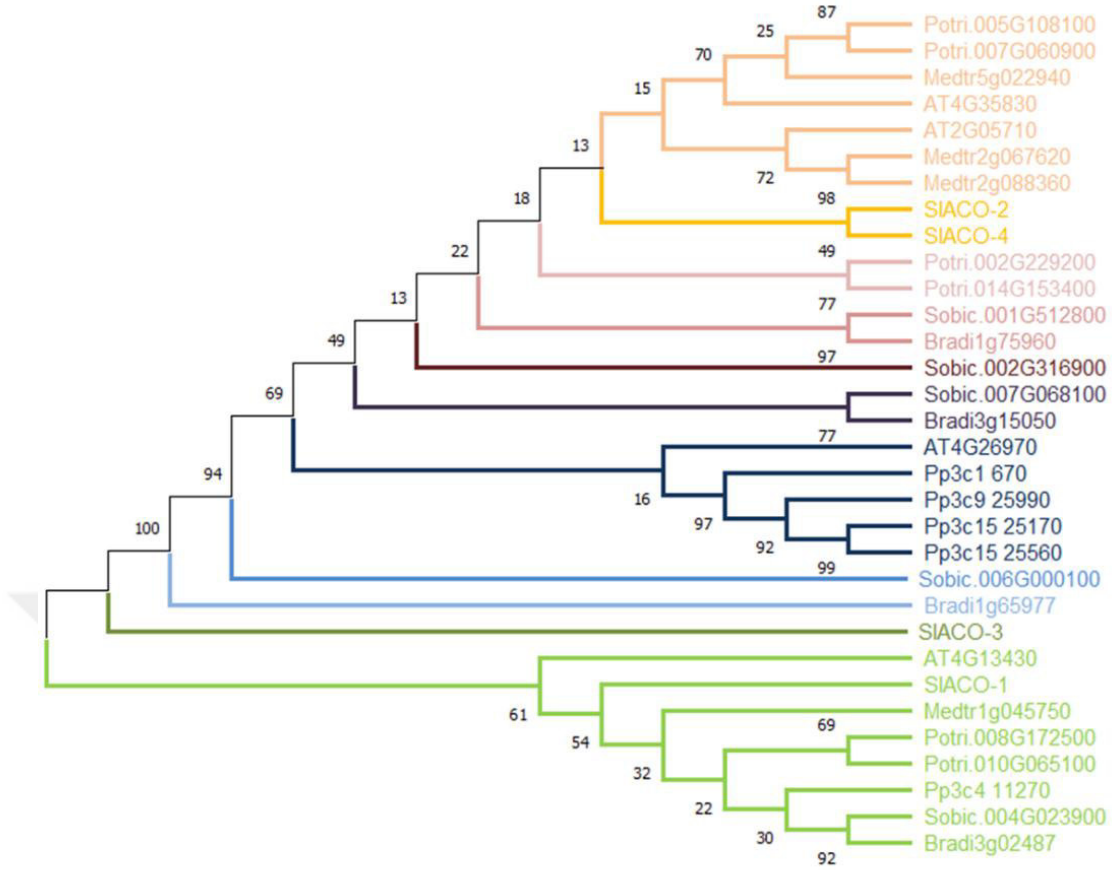
taranarak gerçekleştirilen domain sekansları Phtozome veri tabanında BLAST araması sonucunda 4 varsayılan *ACO* geninin Aconitaz domaini kodladığını gösterilmiştir ve bu genler *ACO* gen ailesine ait olduğu belirlenmiştir. Toplamda, Aconitaz domaini içeren 4 protein dizisi, domates genomunda, HMM profil analizi kullanılarak da doğrulanmıştır. Domates bitkisinde tanımlanan genlere ait protein sekansları EK-10’da sunulmuştur. Genlere ait amino asit uzunlukları, protein moleküler ağırlıkları, İzoelektrik noktası ve protein subselüler lokalizasyonları EK-9’da verilmiştir. Domateste tanımlanan *ACO* proteinlerinin özellikleri de ExPASy veri tabanında (https://web.expasy.org/compute_pi/) analiz edilmiştir.

8.3.1.3. *ACO* Gen Ailesinin Filogenetik Analizi

Domates bitkisinde *ACO* genleri arasındaki evrimsel ilişkileri karakterize etmek için, MEGAX yazılımı kullanılarak filogenetik bir analiz gerçekleştirilmiş ve sonuçlar domates ve 6 model bitki türündeki *ACO* proteinleri ile karşılaştırılmıştır. Domates ve diğer model bitkilerdeki benzerliklerini karşılaştırmak amacı ile *A. thaliana*, *P. trichocarpa*, *Medicago truncatula*, *P. patens*, *B. distachyon*, ve *S. Bicolor* bitkilerine ait *ACO* genlerinin protein dizileri phtozome veri tabanından indirilmiştir. Altı model bitkide toplam 33 *ACO* geni bulunurken *A. thaliana* ve domates bitkisinde 4 adet *ACO* geni belirlenmiştir. Domates bitkisinde belirlenen 4 Adet *ACO* geninin kendi aralarında hizalanması sonucunda da filogenetik ağaç oluşturulmuştur. *ACO1* ve *ACO3* genleri aynı grupta yer alırken *ACO2* ve *ACO4* genleri aynı grupta yer almıştır. (Şekil 8.6). Gösterildiği gibi *ACO1* ve *ACO3* genleri sadece aconitase süperfamily domaini içermektedir. *ACO2* ve *ACO4* genleri ise aconitase süperfamily domainine ek olarak Aconitase swivel süperfamily domainine sahiptirler.



Şekil 8.6. Domates *ACO* proteininin Megax yazılımı ile hizalanıp Neighbor-Joining (NJ) metodu filogenetik ağaç oluşturulması.

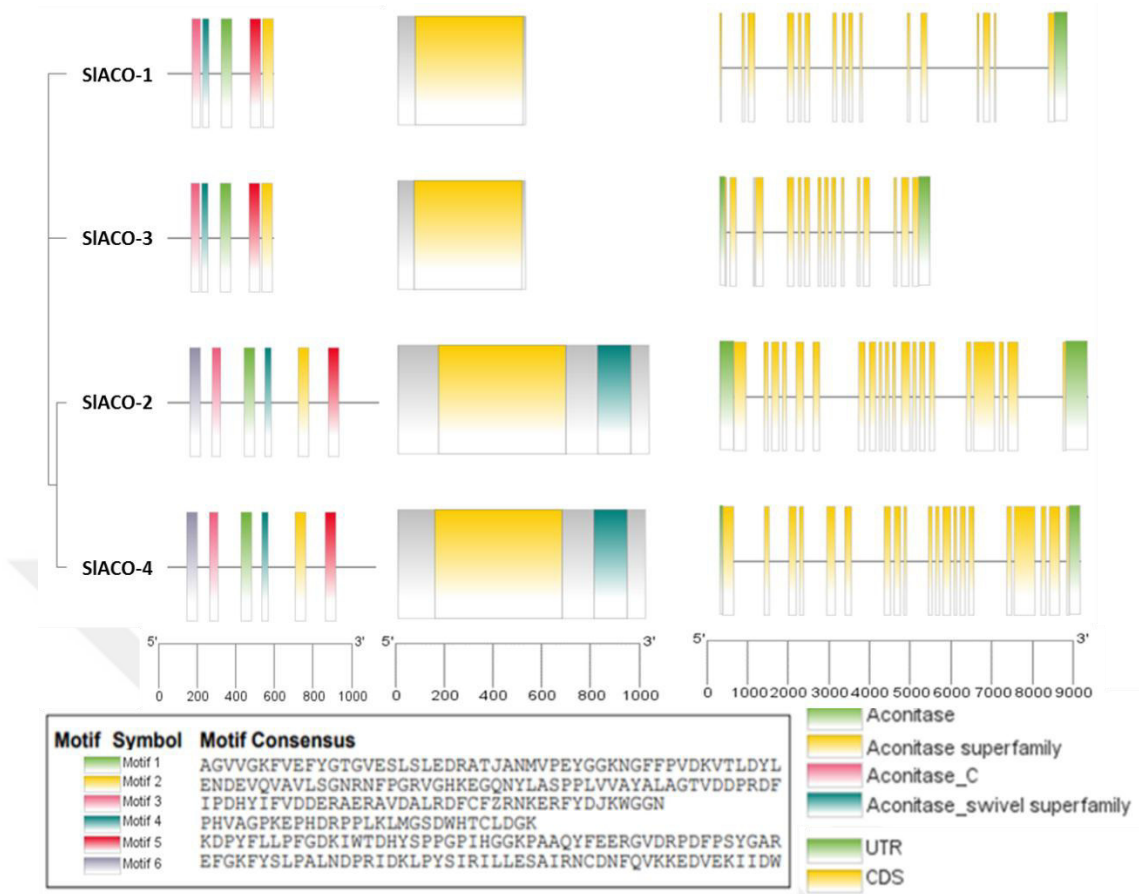


Şekil 8.7. Akonitaz proteinin Megax yazılımı kullanılarak model organizmalarda filogenetik ağaç oluşturulması.

8.3.1.4. İntron/Exon Yapısı ve Motif Analizi

Öngörülen ekson-intron yapısı, Domates bitkisinde *ACO* genlerinin varyasyonu hakkında bir fikir edinmek için analiz edilmiştir. Her *ACO* geninin, CDS dizlerine karşılık gelen genomik dizilerle karşılaştırarak ortaya çıkarılmıştır. Akonitaz genlerinin yapısal çeşitliliği ile ilgili daha ileri bilgiler elde etmek için *ACO* ailesi üyeleri içindeki ekson/intron yapıları TBtools yazılımı kullanılarak gösterilmiştir. Domates *ACO1* geni 17, *ACO3* geni 15, *ACO2* ve *ACO4* geni ise 20 ekzon içerdiği belirlenmiştir. Bunlara ek olarak *ACO* genlerinin intron uzunluğu domates bitkisinde oldukça değişken olarak gözlemlenmiştir.

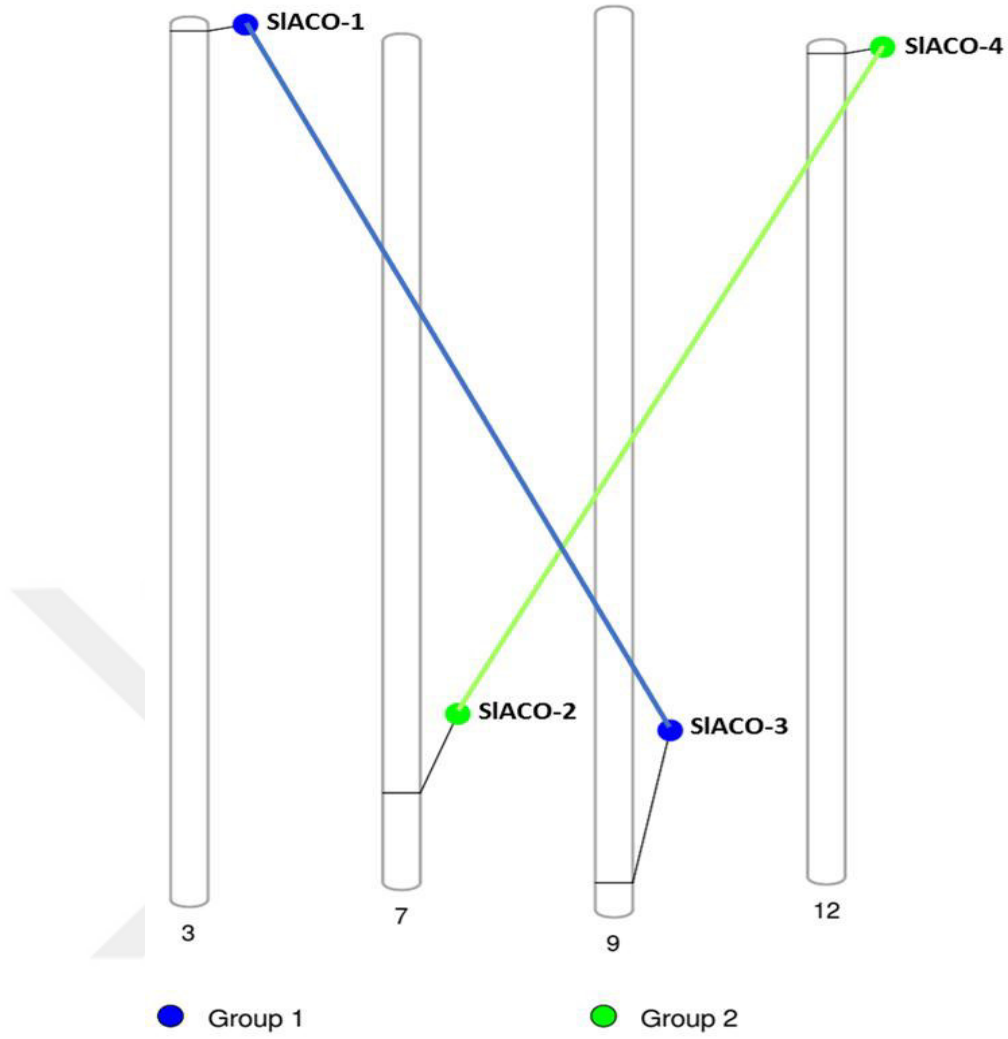
ACO genlerinin filogenetik ilişkisi ve sınıflandırması, motif analizi ile desteklenmiştir. *ACO* proteinlerinin Altı (6) korunmuş motifi, MEME süiti kullanılarak motif analizi yapılmıştır. *ACO1* ve *ACO3* genlerinde 5 adet benzer motifler sahipken (motif 1,2,3,4 ve 5) *ACO2* ve *ACO4* (motif 1,2,3,4,5 ve 6) genleri de aynı motiflere sahiptir (Şekil 8.8).



Şekil 8.8. Filogenetik ilişkiye dayanan *ACO* proteinlerinin korunmuş motifleri *ACO* genlerinin korunmuş motiflerin domates bitkisinde dağılımı, MEME veri tabanı ile analiz edildi. On motif farklı renklerle işaretlenmiştir. *ACO* proteinlerinin filogenetik ilişkisi MEME veri tabanından elde edilen *ACO* motif dizleri.

8.3.1.5. Kromozom Lokasyonu ve Gen Duplikasyonlarının Belirlenmesi

Domates bitkisinde tespit edilen 4 *ACO* geninin, kromozomlar üzerinde lokasyonları TBtools yazılımı kullanılarak görselleştirilmiştir. Şekil 8.9’ da gösterildiği gibi her bir *ACO* geni farklı kromozomlar üzerinde yer almaktadır. Gen duplikasyon olayları, domates *ACO* gen ailesinde analiz edilmiştir. *ACO1/ACO3* ve *ACO2/ACO4* genleri arasında segmental duplikasyonlar olduğu belirlenmiştir. Bu genlerin eş anlamlı oranı (K_s), eş anlamlı olmayan oran (K_a) ve K_a/K_s hesaplanmıştır. Sonuçlar tablo 8.7’ de gösterilmiştir.



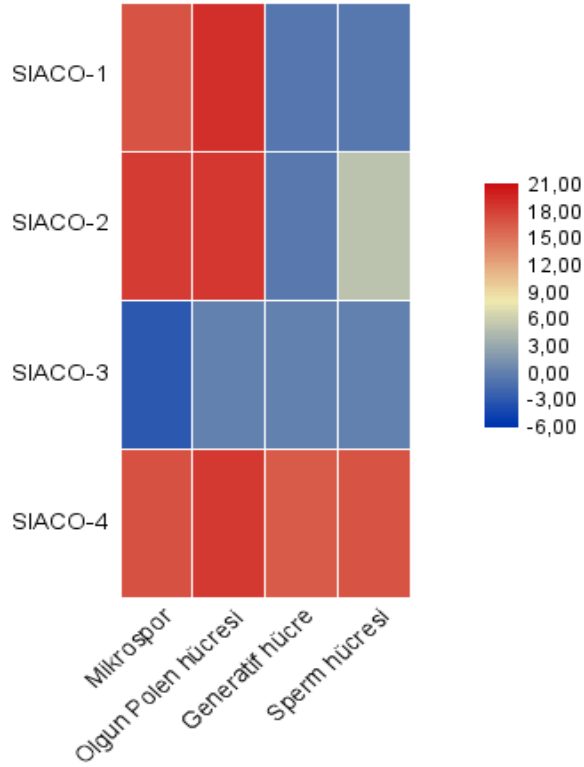
Şekil 8.9. *ACO* genlerinin kromozom üzerinde yerleri ve gen duplikasyonlarının şematik gösterimi. Segmental duplikasyon gösteren *ACO* genleri farklı çizgiler ile birbirine bağlanmıştır.

Tablo 8.7. Gen duplikasyon ve genlerin evrimi

LOCUS_1	LOCUS_2	Ka	Ks	Ka/KS	Duplikasyon	Zaman (MYÖ)
SIACO-1	SIACO-3	0,1002	0,7474	0,134065	Segmental	1,061966825
SIACO-2	SIACO-4	0,0628	0,5448	0,115272	Segmental	0,665583998

8.3.1.6. Domates *ACO* Genlerinin İn-sliko İfadesinin Belirlenmesi

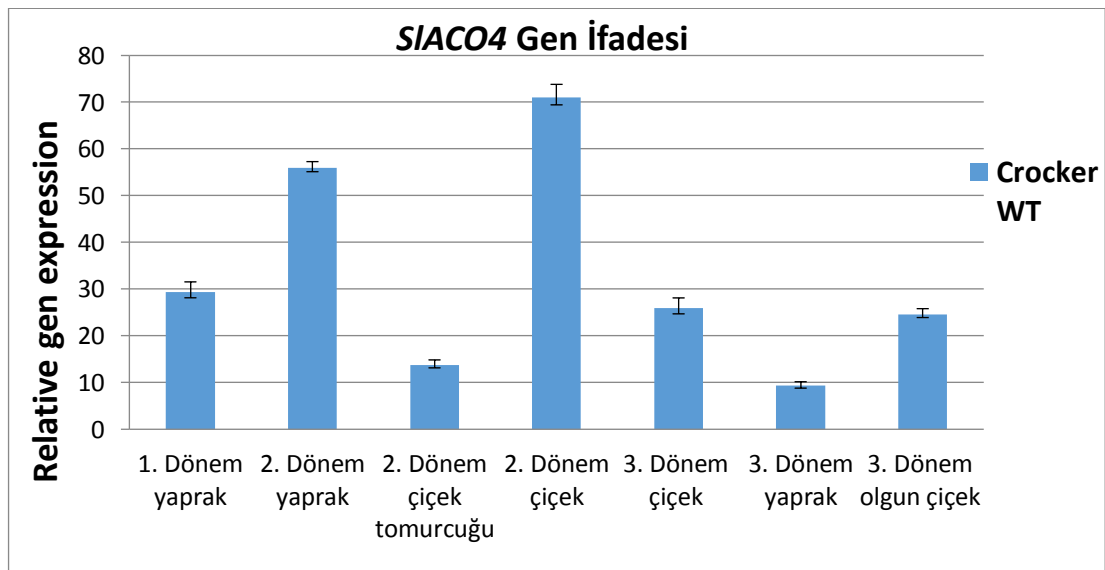
Domates bitkilerinde *ACO* genlerinin fonksiyonel gen ifade analizini incelemek için sperm hücresi gelişimi ile ilişkili RNA-seq verilerini kullanılmıştır (Liu, Lu et al. 2018). Çalışmada ele alınan mikrospor, olgun polen hücresi, generatif hücre ve sperm hücresinde *SIACO4* geni yüksek ifade edilmiştir. *SIACO3* geni tüm bu dokularda ifadesi bulunmazken *SIACO1* ve *SIACO2* genleri sadece mikrospor ve olgun polen hücresinde ifade göstermiştir (Şekil 8.10).



Şekil 8.10. Tomates ACO genlerinin in-siliko gen ifadesi

8.3.1.7. *SIACO4* Geninin RT-qPCR ile Belirlenmesi

SIACO4 genin farklı dönemlerde ve farklı dokularda gen ifadesini belirlemek amacıyla RT-qPCR yapılmıştır. *SIACO4* genin ifadesi şekil 8.11’de gösterilmiştir. *SIACO4* geni farklı dönemlerde elde edilen yaprak ve çiçek organlarının tamamında gen ifadesi göstermiştir. *SIACO4* genin en yüksek gen ifadesi bitkilerin çiçeklenme döneminde çiçek organının olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 8.11. Crocker domates çelidinde *SIACO4* genin RT-qPCR sonuçları

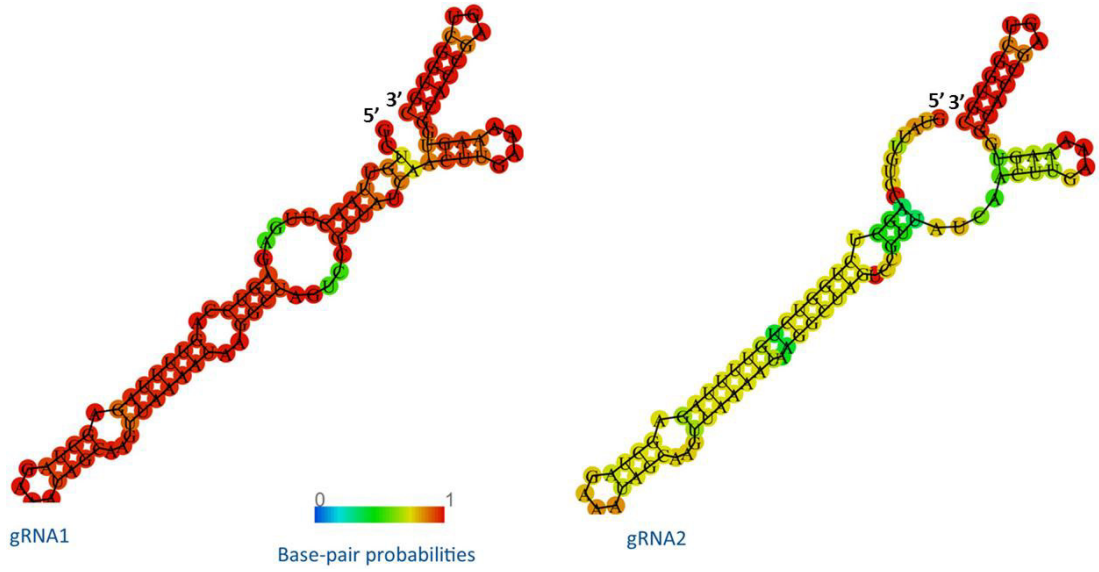
8.3.2. gRNA'ların Tasarlanması ve Etkinliği

CRISPR tabanlı gen susturma, çeşitli hücre tipleri ve organizmalarda yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu sistemde, tek bir rehber RNA (sgRNA), Cas9 proteinlerini belirli genomik hedeflere yönlendirmektedir. CRISPR sistemi ile etkin bir genom düzenlemenin en büyük zorluğu ve ilk adımı, sgRNA'nın hedefe yönelik mutasyon etkinliğini (on-target) ve hedef dışı mutasyon oluşturma (off-target) profilini önceden doğru şekilde tahmin etmek gerekmektedir. Son yıllarda yapılan etkin gRNA tasarlanması üzerine yapılan çalışmalarda gRNA seçimi için birçok araç geliştirilmiş ve aynı zamanda etkin gRNA'ların belirli özelliklere sahip olması gerektiği öne sürülmüştür (Doench, Fusi et al. 2016, Liang, Zhang et al. 2016, Chuai, Ma et al. 2018, Liu, Zhang et al. 2020). gRNA tasarlamak için bu çalışmada Benchling software ve CRISPR-P 2.0 online programlar kullanılmıştır. Dizayn edilen gRNA'ların özellikleri EK7'de verilmiştir. Şekil 8.12'de gRNA'nın sekonder yapısı gösterilmiştir. Tablo 8.8'de ise gRNA ların forward ve reverse sekansları gösterilmiş, primerler sentezletilmeden önce 5' ucuna *AarI* restriksiyon enzim bölgesi eklenmiştir. Çalışmada kullanılan gRNA'lar içersinde On-Scoru 0,4'ün üzerinde olanlar mutasyon oluşturmıştır. Sonuç olarak, CRISPR/Cas9 sisteminin en temel basamağı olan gRNA tasarlanmasında On-scoru etkin bir parametre olduğu ortaya konmuştur.

Tablo 8.8. Tasarlanan gRNA'ların froward ve revese dizileri

gRNA İsmi	Hedef gen	gRNA dizisi
sgRNA1 forward	<i>PDS</i>	ATTGCTGTAACTTGAGAGTCCA
sgRNA1 reverse	<i>PDS</i>	AAACTGGACTCTCAAGTTAACAGC
sgRNA2 forward	<i>PDS</i>	ATTGGTATTGTCCAGCTCTGGTCT
sgRNA2 reverse	<i>PDS</i>	AAACAGACCAGAGCTGGACAATAC
sgRNA1 forward	<i>ACO</i>	ATTGGTTGAGAACAGGGGTAACGG
sgRNA1 reverse	<i>ACO</i>	AAACCCGTTACCCCTGTTCTCAAC
sgRNA2 forward	<i>ACO</i>	ATTGGGGGATCATTGAGAGCAGGT
sgRNA2 reverse	<i>ACO</i>	AAACACCTGCTCTGAATGATCCCC

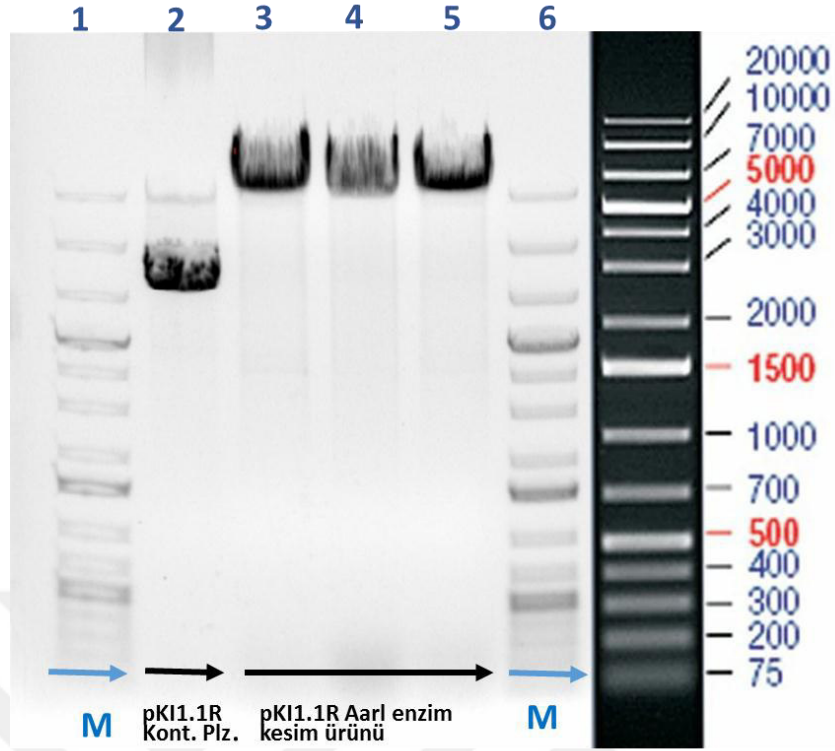
*ATTG: AarI kesim enzimi için eklenmiştir.



Şekil 8.12. ACO gRNA1 RNAfold webserver görüntüsü. A. gRNA ve gRNA scaffold ile oluşturduğu sekonder yapıları B. gRNA sekonder yapısı

8.3.3. CRISPR/Cas9 Bitki İfade Vektörünün Oluşturulması

Domates gen aktarımında Cas9 nükleaz kompleksi ve gRNA'nın hücrelere transfer edilmesinde bitki ifade vektörü olarak pKI1.1R vektörü kullanılmıştır. Kullanılan bu vektör dikotiledon bitki olan *Arabidopsis thaliana* da gen susturma amacı ile kullanılmış ve etkinliğinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Tsutsui and Higashiyama 2017). *Agrobacterium* aracılı gen aktarımında kullanılan vektör, standart enzim kesimi ve ligasyon süreçlerinden oluşan klasik klonlama teknikleri ile oluşturulmuştur. Kullanılan plazmit ile ilgili ayrıntılı bilgi EK-6'da sunulmuştur. Bu vektörde insan kodon optimize Cas9 endonükleaz enzimi *AtRPS5A* (*Ribozomal Protein S5 A*) promotorü tarafından ifade edilirken, gRNA ise *AtU6-26* promotorü ile yönlendirilmektedir. İlk olarak primer olarak sentezletilen gRNA'ların restriksiyon enzim ile kesilmiş bir vektöre klonlama yapmadan önce komplementerleri ile çift iplikli hale getirilmeli ve aynı zamanda 5'ucu fosfat eklenmesi gerekmektedir. Forward ve reverse primerler *T4 polinükleotid kinaz* ile karıştırılarak yüksek sıcaklıktan düşük sıcaklıklara yavaş yavaş soğutulmuş, fosfatlar ve hidrojen bağları oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılacak olan pKI1.1R vektörü *AarI* restriksiyon enzimi ile kesim yapıldıktan sonra vektör fast alkaline fosfataz enzimi ile fosfat uçları uzaklaştırılmıştır. Kesim ürünleri %0,6'lık agaroz jelde yürütülerek jelden izole edilmiş (Şekil 8.13) ve Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 spektrofotometre ile konsantrasyonları belirlenmiştir (Tablo 8.9).



Şekil 8.13. pKI1.1R vektörünün *AarI* restriksiyon enzimi ile kesimi. Lane 1 ve 6: GeneRuler 1 kb Plus DNA marker SM1334. Lane 2: pKI1.1R kontrol plazmit 18.557 bç. Lane 3-5: pKI1.1R plazmitinin *AarI* restriksiyon enzimi ile kesim ürünü.

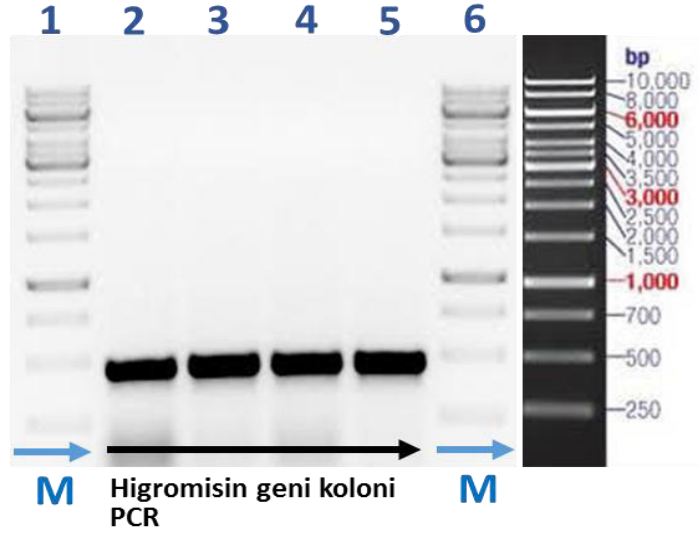
Tablo 8.9. *AarI* restriksiyonu enzimi ile kesilen pKI1.1R plazmitlerin konsatrasyonu

Örnek Adı	260/280	260/230	DNA konsantrasyonu
pKI1.1R <i>AarI</i> Kesim Ürünü 1	2.06	2.18	56 ng/ul
pKI1.1R <i>AarI</i> Kesim Ürünü 2	1,96	2,00	48 ng/ul
pKI1.1R <i>AarI</i> Kesim Ürünü 3	2,04	2,08	61 ng/ul

Çift iplikli yapılan gRNA'lar ile ligasyon ürünü oluşturularak bir gece 4 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra kompetan *E. Coli* bakterisine aktarılmıştır.

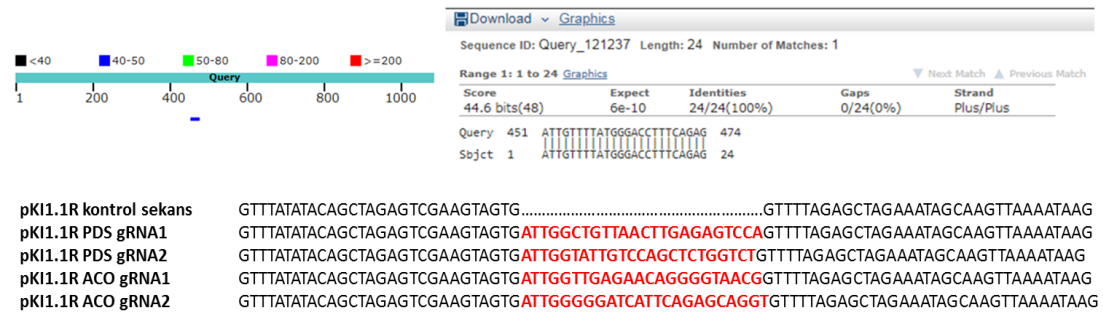
8.3.4. PKI1.1R+gRNA Plazmitlerinin Kompetan *E. coli*'ye Transferi

Bir gece inkübasyon sonucunda 10 ul ligasyon ürünü kompetan *E. Coli* dh5α suşuna ısı-şok yöntemi ile transfer edilerek bakteriler LB besim ortamında bir gece büyütülmüş ve tek koloniler elde edilmiştir. Tek koloniler seçilerek PCR yapılmıştır. *E. coli* suşunda pKI1.1R plazmitinin varlığı plazmitte bulunan *HptII* genine spesifik primerler ile PCR yapılarak 455 bp'lik eklenen bant elde edilmiştir (Şekil 8.14).



Şekil 8.14. pKI1.1R plazmiti içeren *E.coli* bakterilerinin *HptII* geni ile koloni PCR yapılması. Lane 1 ve 6: GeneRuler 1kb DNA markör (SM0311). Lane 2: *PDS* gRNA1. Lane 3: *PDS* gRNA2. Lane 4: *ACO* gRNA1. Lane 5: *ACO* gRNA2.

Koloni PCR sonucunda belirlenen pozitif koloniler sıvı LB kültürde büyütüldükten sonra stok oluşturulmuş ve aynı zamanda bu bakterilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmit izolasyonu sonrasında plazmitlerin kalitesi ve miktarı Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 ile belirlenmiştir. Daha sonra plazmitler 100 ng/ul olacak şekilde seyreltilerek klonlanan gRNA'ların plazmit içerisine aktarılıp aktarılmadığını kontrol edilmesi için plazmitlerde nükleotid dizilemesi yapılmıştır. Bu işlem hizmet alımı şeklinde Sanger dizileme ile gerçekleştirilmiştir. Dizilenen sekanslar NCBI Blast aracılığı ile sRNA'lar kontrol edilmiştir. Yapılan kontrol Şekil 8.15'teki gibi belirlenmiştir.

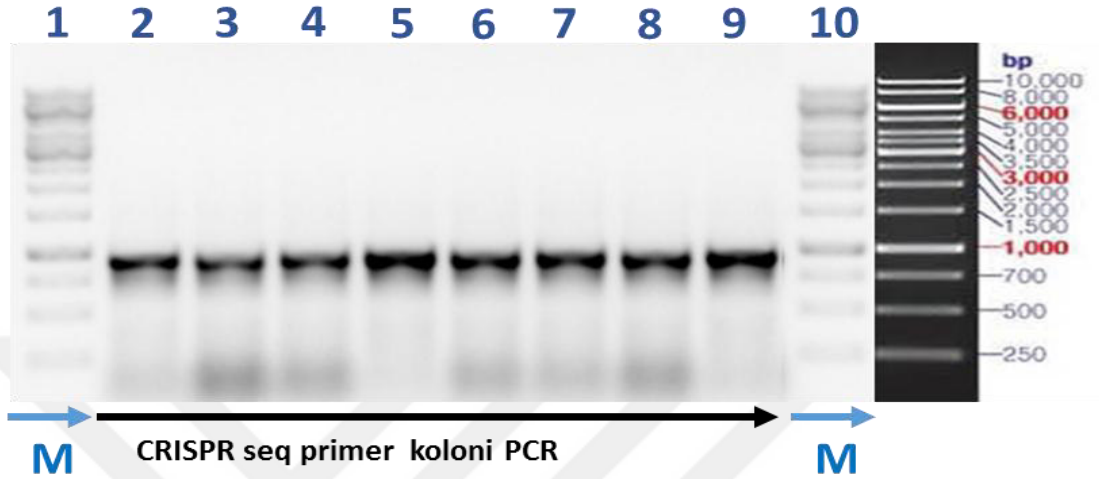


Şekil 8.15. Sanger dizileme sonucunda gRNA'ların kontrol edilmesi

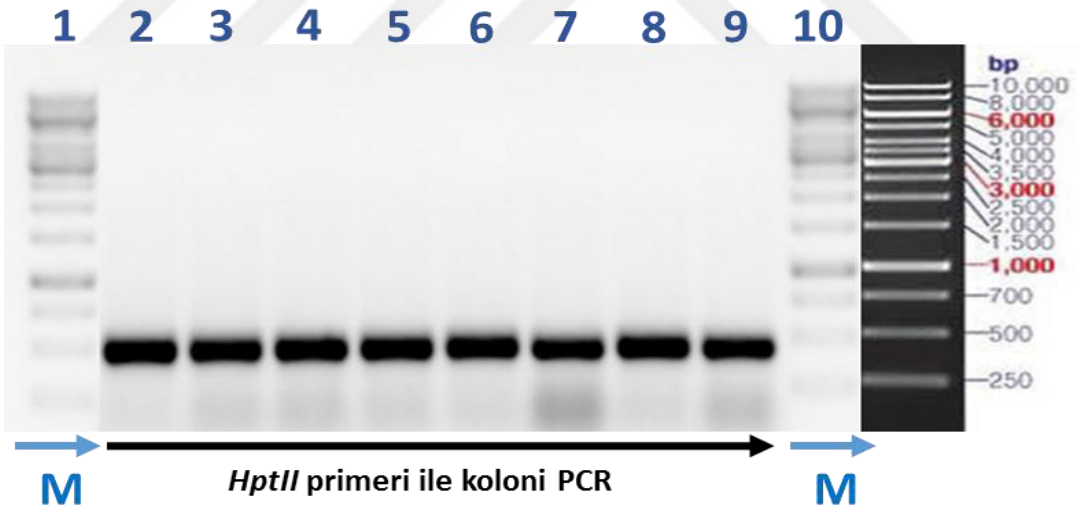
8.3.5. PKI1.1R+gRNA plazmitlerinin Kompetan *Agrobacterium* Gv3101 suşuna transferi

Sanger dizileme sonucunda gRNA klonlaması başarılı olan plazmitler *Agrobacterium* GV3101 suşuna elektroporasyon yöntemi ile transfer edilmiştir. BGM katı besiy ortamında 2 gün süre büyümeye bırakıldıktan sonra oluşan koloniler PCR ile

doğrulanmıştır. Koloni PCR pKI1.1R plazmitine komplementer CRISPR Seq primerleri ve *HptII* primerleri ile yapılmış ve sırasıyla 906 bp (Şekil 8.16) ve 455 bp (Şekil 8.17) elde edilmiştir. Doğrulama yapılan bateriler stok oluşturularak gen aktarım çalışmasında kullanılmıştır.



Şekil 8.16. *Agrobacterium* Gv3101 koloni PCR yapılması. Lane 1 ve 6: GeneRuler 1kb DNA markör (SM0311). Lane 2-3: PDS gRNA1. Lane2: PDS gRNA2. Lana3: ACO gRNA1. Lane 4: ACO gRNA2.



Şekil 8.17. *Agrobacterium* Gv3101 hptII primerleri ile koloni PCR yapılması. Lane 1 ve 6: GeneRuler 1kb DNA markör (SM0311). Lane 2-3: PDS gRNA1. Lane2: PDS gRNA2. Lana3: ACO gRNA1. Lane 4: ACO gRNA2.

8.3.6. *Agrobacterium* Aracılı Gen Aktarımı ve Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Elde Edilmesi

PDS ve *ACO* genlerini hedeflemek için *Agrobacterium* GV3101 suşu kullanılarak 8 günlük domates fidelerinin kotiledon yapraklarına transformasyon yapılmıştır. Her bir gRNA için toplam 50 kotiledon eksplantı kullanılmıştır.

Transformasyondan 10-12 gün sonra kallus oluşumu başlamış ve 30 gün sonra ise varsayımsal genom düzenlenmiş bitkiler oluşmuştur. Transformasyon sonucunda elde edilen varsayımsal transgenik ve genom düzenlenmiş hatların miktarı Tablo 8.10’da gösterilmiştir. Elde edilen bitkicikler RM besi ortamına alınarak köklendirilmiştir. Doku kültürü ortamında köklendirilen bitkiler torf içeren saksılara alınarak iklim odasında büyütülmüştür (Şekil 8.18).

Tablo 8.10. Transformasyon sonucunda elde edilen transgenik ve genom düzenlenmiş hatların miktarı

Çeşit	Binary vector	Toplam transforme edilen eksplant sayısı	Toplam Transgenik Bitki Sayısı	Genom düzenlenmiş hat sayısı	Genom düzenlenmiş bitki oranı
Crocker	PKI1.1R PDS	100	62	14	14,25 %
Crocker	PKI1.1R ACOS	100	68	18	18 %

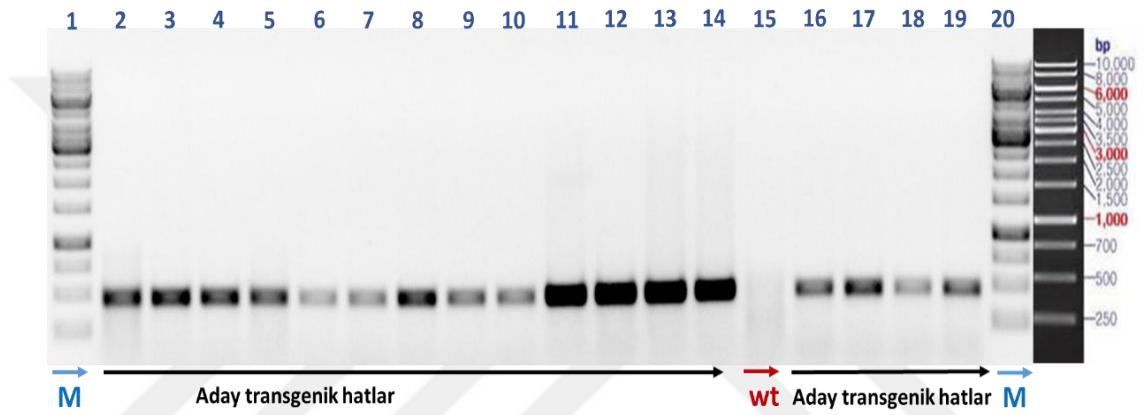


Şekil 8.18. *Agrobacterium* aracılı gen aktarım sonrasında genom düzenlenmiş bitkilerin yetiştirilmesi. (a): Trasforme edilen eksplantların seleksiyon besi ortamına alınması. (b): Rejenere olan trasngenik bitkicikler. (c): 2-3 cm boyutlarında bitkiciklerin köklendirme besi ortamına alınarak köklendirilmesi. (d-e): Köklenen trasngenik bitkilerin saksıya alınması ve akklimizasyonu nem kaybının önlenmesi. (f): Bitkilerin 30 L’lik saksılara tranferi. (g): Bitkilerin iklim odasında büyütülmesi.

8.3.7. T0 Transgenik Mutant Aday Bitkilerin Moleküler Olarak Tanımlanması

Gen aktarım çalışmalarıyla elde edilen transgenik aday domates bitkileri iklim odasında 25 °C’de 16-8 saat aydınlık/karanlık periyotta büyütülmüştür (Şekil 8.18).

Elde edilen transgenik adayı bitkilerin transgenik olup, olmadıkları PCR analizleri ile belirlenmiştir. Transgenik adayı domates bitkilerinin teyit edilmesi için *HptII*, Cas9, vira ve virD primerleri kullanılmıştır. Yapılan analiz sonucunda toplam *ACO* ve *PDS* mutant hatların tamamı transgenik olarak belirlenmiştir. Yapılan PCR sonuçlarıyla ilgili jel görüntüleri şekli 8.19’de gösterilmiştir. Transgenik oldukları belirlenen mutant hatlar muhafazaya alınarak hasat dönemine kadar yetiştirilmiştir. PCR sonucunda aday transgenik hatlarda sekans ile mutasyon analizi yapılmıştır. PCR sonucunda pozitif çıkan tüm bitkiler altkültüre alınmıştır. Albino bitkileri yavaş büyümüş ve birkaç alt kültürden sonra kahverengiye dönerek ölmüşlerdir.

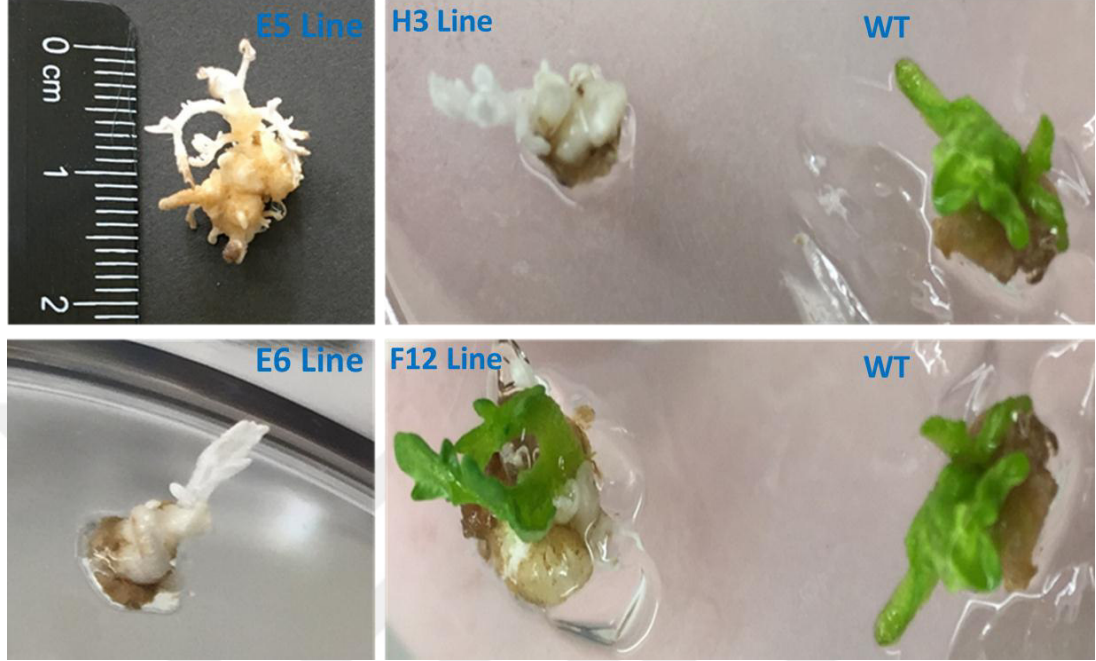


Şekil 8.19. Aday transgenik ve wt bitkilerde HptII geni ile yapılan PCR sonucu. 1 ve 20: GeneRuler 1kb DNA markör (SM0311). 1-14 ve 16-19 Aday transgenik hatlar. 15: kontrol wt

8.3.8. Genomu Düzenlenmiş Bitkilerin Morfolojik Tanımlanması

Domates bitkisinde CRISPR/Cas9 sisteminin optimize etmek ve sistemin çalışıp çalışmadığını fenotipik olarak görebilmek için fenotipik markörlerden yararlanılmaktadır. CRISPR/cas9 genom düzenleme çalışmalarında markör genlerden birisi de *PDS* genleridir ve bu gende oluşturulan mutasyon sonucunda albino fenotipler elde edilmektedir. Çalışmamızda CRISPR/Cas9 sistemimizin çalıştığını kontrol etmek ve morfolojik olarak gözlemleyebilmek amacı ile *PDS* geni markör gen olarak kullanılmıştır. *PDS* geninde mutasyon oluşturulmuş ve bu mutant bitkilerde klorofil üretimi engellenerek albino fenotipler elde edilmiştir (Şekil 8.20). *PDS* genini hedefleyen gRNA1 ile yapılan transformasyon sonucunda toplamda, 18 albino (saf beyaz), 1 adet kimerik ve 3 adet yeşil hat olmak üzere CRISPR-*PDS* yapısına sahip 22 transgenik hat elde edilmiştir. *PDS* mutant hatlarda beklenildiği gibi cüce ve albino genotipler elde edilmiş ve bu genotipler belirli bir süre yaşamını devam ettirmiştir. Buna karşın, gRNA2 ile yapılan transformasyon sonucunda toplamda 19 adet yeşil hat

elde edilmiştir. *PDS* geni hedeflenen tüm yeşil hatlarımızda higromisin geni, Cas9 geni bulunmasına rağmen yeşil bitkilerde mutasyon elde edilememiştir. Bu sonuçlar, *PDS* genini hedefleyen gRNA2'nin çalışmadığına işaret etmektedir.



Şekil 8.20. *PDS* geni hedefleniş gRNA1 ile oluşturulan Albino, kimerik ve yeşil hatlar. (E5, E6 ve H3 Line): Albino fenotip gösteren hatlar. (F12 Line): Kimerik fenotip gözlemlenen hat. (WT): gRNA içermeyen boş vektör ile transformasyon yapılan genotip.

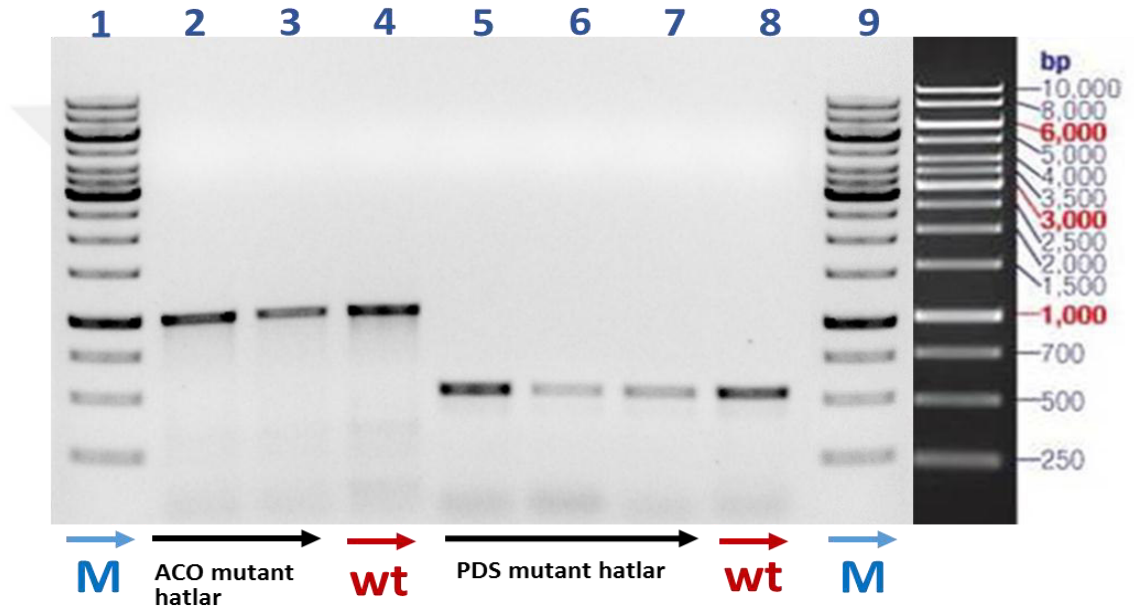
Erkek kısır hat elde etmek için *ACO* geni hedeflenmesi sonrasında toplam gRNA1 ile hedeflenen 14 hat ve gRNA2 ile hedeflenen 22 hat elde edilmiştir. Bitkiler hasat dönemine kadar iklim dolabında büyütülmüştür. *ACO* mutant hatlar morfolojik olarak WT bitkiler ile karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık tespit edilememiştir (Şekil 8.21).



Şekil 8.21. Bitkiler hasat dönemine kadar iklim dolabında büyütülmesi. (a) *ACO* mutant hatlar. (b) WT bitkiler.

8.3.9. Genom Düzenlenmiş Bitkilerde Mutasyon Analizi

ACO ve *PDS* geninde meydana gelen mutasyonları belirlemek için transgenik hatlardan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. *ACO* geni ve *PDS* genine spesifik primerler gRNA1 ve gRNA2 bölgelerini kapsayacak şekilde NCBI primer3 programı kullanılarak tasarlanmıştır. Bu primerler kullanılarak PCR ile *ACO* ve *PDS* genleri amplifiye edilmiştir. PCR sonucunda *ACO* geni için 1059 bp, *PDS* geni için ise 506 bp beklenen bantlar elde edilmiş ve jelden ekstrakte edilmiştir (şekil 8.21).



Şekil 8.21. CRISPR/Cas9 ile elde edilen mutant hatlarda ve wt bitkilerde *ACO* ve *PDS* genlerinin amplifikasyonu

PCR ürünleri pGEM®-T Easy vektore klonlanarak *E.coli*'ye aktararak mavi beyaz kolonilerden seçim yapılmıştır. Elde edilen beyaz koloniler PCR ile *ACO* ve *PDS* spesifik primerler ile amplifiye edilmiştir. PCR ile doğrulamanın ardından her bir mutant hat için 4 koloniden plazmit izolasyonu yapılarak ayrı ayrı sekansa gönderilmiştir. Sekans sonuçları WT bitkilerin sekansı ile alignmant yapılarak mutasyon analizleri yapılmıştır. Mutasyon oluşması beklenen gRNA hedef bölgesinin PAM sekansının 4 baz upstream bölgesinde meydana gelen mutasyonlar belirlenmiş ve şekil 8.20'de gösterilmiştir.

PDS geninde meydana gelen mutasyonlar analiz edildiğinde albino fenotip gösteren E5 hattında PAM sekansının 4 bp üst (upstream) bölgesinde T nükleotidi eklenmiştir. Buna karşın albino E6 hattında ise 1 adet T nükleotidi delesyona

uğramıştır. Albino fenotip üreten H3 hattında PAM sekansının 72 bp upstream bölgesinde T nükleotidinde delesyon meydana gelmiştir. Mutasyon analizi yapılan kimerik F12 hattında ise PAM sekansının 23 downstream bölgesinde T nükleotidi C nükleotidi ile değişime uğrayarak SNP oluşmuştur (Şekil 8.22). *PDS* geninde meydana gelen mutasyonların tamamının homozigot olduğu belirlenmiştir. WT ve *PDS* genlerinde meydana gelen mutasyonlar şekil 8.22’de açıkça gösterilmiştir.

SLPDS - Exon2		gRNA1		PAM		Mut. Fenotip türü	
WT	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA		Yeşil	
	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	+1		
E5	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	+1	Albino	
	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	+1		
	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	-1		
E6	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	-1	Albino	
	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	-1		
	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	-1		
F12	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	S1	Kimerik	
	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	S1		
	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	S1		
	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	-1		
	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	-1	Albino	
H3	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	-1		
	TATGGCAGGTTTACTGTTATTTTCAGTAAATGCCTCAAATGGACTTGTTCCTGCTGTTAACTTGAGAGT.CCAAGG	AGG	TAGTT	CAGCTTATCITTGGAGCTCGA	-1		

Şekil 8.22. PDS geninde meydana gelen mutasyon analizleri.

SIACO4 geni hedeflenerek oluşturulan mutasyonlar WT bitkilerinin sekanslarına göre analiz edilmiştir. ACO1.3. mutatt hattında PAM sekansından 4 bp üst (upstream) bölgesinde 2 baz A nükleotidinde homozigot delesyon meydana gelirken, yine aynı mutant hattın sekansında PAM sekansının 115 bp upstream bölgesinde 2 T nükleotidinde insersiyon ve delesyonlar oluşmuştur. ACO1.1 mutatt hattında PAM sekansından 4 bp upstream bölgesinde 13 baz homozigot delesyon meydana gelmiştir. WT ve *SIACO4* genlerinde meydana gelen mutasyonlar şekil 8.23’de açıkça gösterilmiştir.

		gRNA1		PAM		Mutasyon type	
WT	CCCAAAGAAAG...TTTTTTTTTTGGGTTTACAAATCC,,,,,ACGGAAATTGTTGAGAACAGGGGTACGGCGG	AGG	TAGTT	CAGTTCTGATCTGAGATGT			
ACO1.3	CCCAAAGAAAG...TTTTTTTTTTGGGTTTACAAATCC,,,,,ACGGAAATTGTTGAGAACAGGGGTACGGCGG	AGG	TAGTT	CAGTTCTGATCTGAGATGT	-2 bp (A), -2 bp (T)		
ACO1.3	CCCAAAGAAAG...TTTTTTTTTTGGGTTTACAAATCC,,,,,ACGGAAATTGTTGAGAACAGGGGTACGGCGG	AGG	TAGTT	CAGTTCTGATCTGAGATGT	-2 bp (A), +2 bp (T)		
ACO1.3	CCCAAAGAAAG...TTTTTTTTTTGGGTTTACAAATCC,,,,,ACGGAAATTGTTGAGAACAGGGGTACGGCGG	AGG	TAGTT	CAGTTCTGATCTGAGATGT	-2 bp (A), +1 bp (T)		
ACO1.1	CCCAAAGAAAG...TTTTTTTTTTGGGTTTACAAATCC,,,,,ACGGAAATTGTTGAGAACAGGGGTACGGCGG	AGG	TAGTT	CAGTTCTGATCTGAGATGT	-13 bp		
ACO1.1	CCCAAAGAAAG...TTTTTTTTTTGGGTTTACAAATCC,,,,,ACGGAAATTGTTGAGAACAGGGGTACGGCGG	AGG	TAGTT	CAGTTCTGATCTGAGATGT	-13 bp		
ACO1.1	CCCAAAGAAAG...TTTTTTTTTTGGGTTTACAAATCC,,,,,ACGGAAATTGTTGAGAACAGGGGTACGGCGG	AGG	TAGTT	CAGTTCTGATCTGAGATGT	-13 bp		

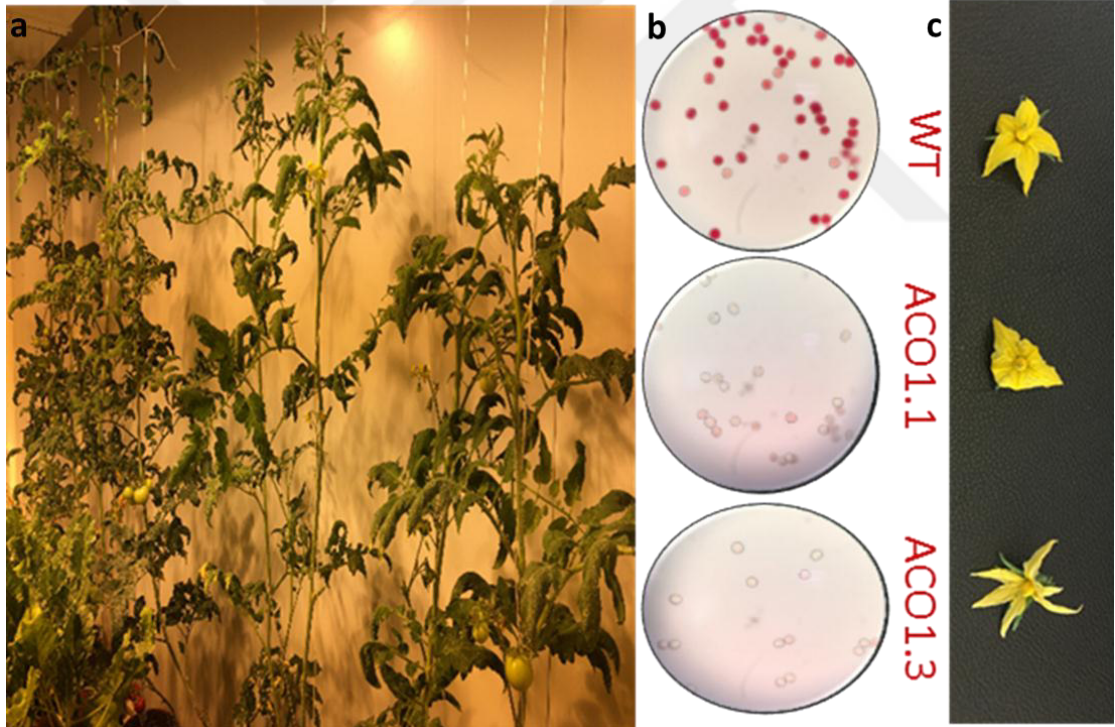
Şekil 8.23. *SIACO* geninde meydana gelen mutasyon analizleri.

8.3.10. *SIACO4* Mutant Hatlarda Polen Canlılığını Kontrolü ve Tohum Oluşumunun Belirlenmesi

Denemede yer alan *SIACO4* mutant domates bitkileri ve wt çeşitlerin çiçek tozu canlılıklarını saptamak amacıyla TTC canlılık testleri uygulanmıştır. TTC canlılık testinde kırmızı renkte olan çiçek tozları ‘canlı’, pembe boyananlar ‘yarı canlı’ ve hiç boyanmayanlar ise ‘cansız’ olarak değerlendirmeye alınmıştır (Tablo 8.10). Denemede yer alan çeşitlerde yapılan TTC uygulamasında çeşitler arasındaki farklılık belirlenmiştir (Şekil 8.24b).

Tablo 8.10. Wt ve mutant bitkilerde polen canlılıklarının kontrolü

Genotipler	Canlılık düzeyleri		
	Canlı %	Yarı canlı %	Cansız %
WT	85,10	10,63	4,25
ACO1.1 mutanı	4	12	84
ACO1.3 mutanı	2	11	87



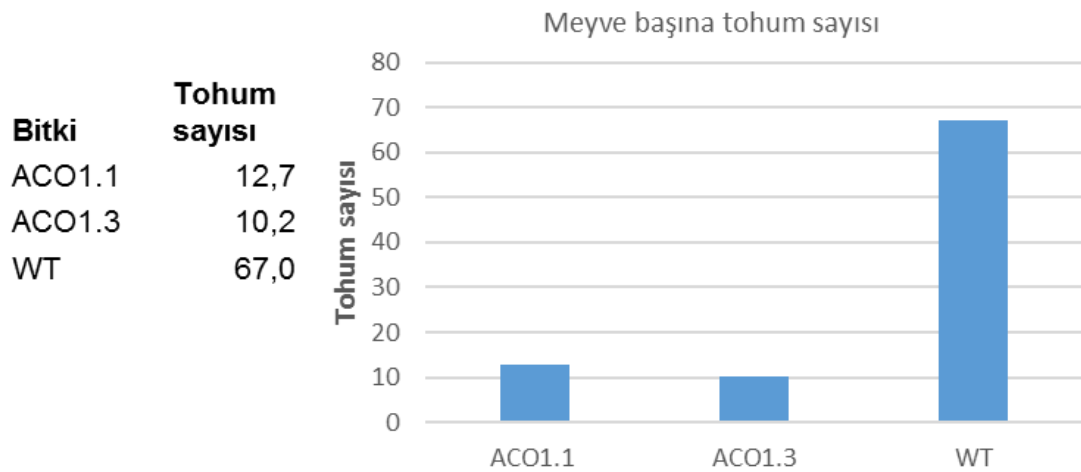
Şekil 8.24. Wt ve *SIACO4* mutant bitkilerin: a) İklim odasında büyütülmesi. b) TTC testi ile polen canlılığın ışık mikroskop görüntüsü. c) Wt ve *SIACO4* mutant bitkilerin çiçek yapılarının görüntüsü.

Polen canlılıkları belirlenen mutant hatlarda polen oluşumu engellendiğinden dolayı bu hatların meyvelerinde tohum oluşumu gözlenmemesi gerekir. Meyve olgunlaşması tamamlanan domates bitkilerinde hasat yapılarak tohum oluşumları kontrol edilmiştir. Bunların yanı sıra bitkilerde meyve şekilleri meyve odacık sayısı ve

bitkilerde oluşan salkım sayısı mutant ve wt bitkiler ile karşılaştırılmıştır. WT ve *SIACO4* mutant hatlarda salkım sayısı 7 olarak belirlenirken bitkilerin meyve odacık sayıları ise 2 olarak gözlemlenmiş, mutant ve kontrol bitkilerinde farklılık gözlemlenmemiştir. Şekil 8.24c’de gösterildiği gibi Wt ve mutant hatların, çiçek yapısı, çiçek rengi gibi diğer morfolojik özellikler bakımından da farklılık gözlemlenmemiştir. Şekil 8.25’de görüldüğü gibi Wt, ACO1.1 ve ACO1.3 mutant hatlarında 10 adet meyvenin toplam tohum sayısı hesaplanarak ortalaması alınmış ve meyve başına tohum sayıları belirlenmiştir. Wt bitkilerin meyve başına tohum sayısı 67 olarak gözlemlenirken ACO1.3 mutant hattında 10.2 olarak gözlemlenmiştir. WT bitkiler göre mutant hatlarda %85 tohum oluşumu engellenmiştir (Şekil 8.26).

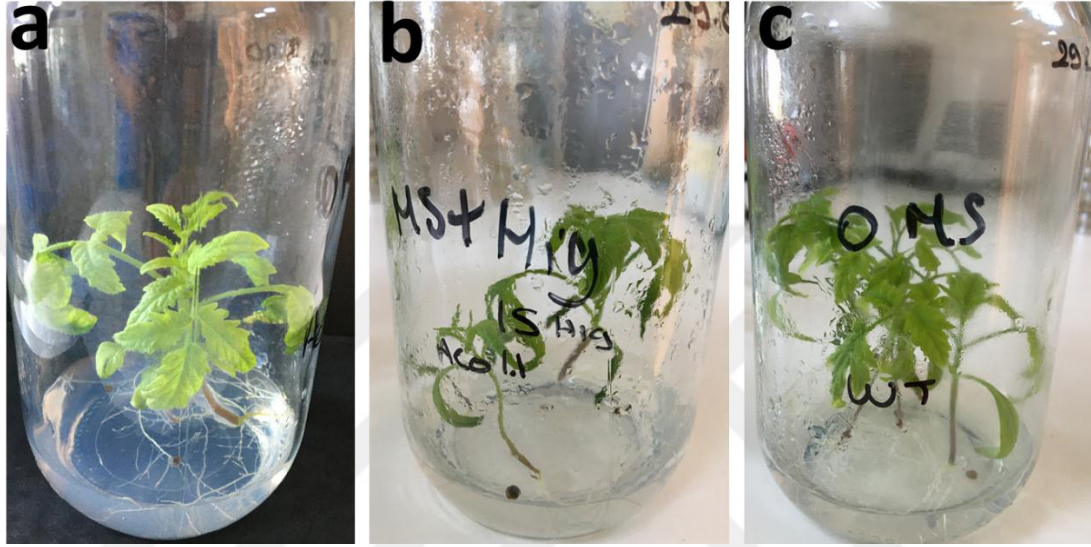


Şekil 8.25. WT ve *SIACO4* mutant bitkilerin olgunlaşma sonrasında hasat edilen meyvelerin ve meyvede oluşan tohumların görüntüsü



Şekil 8.26. Wt ve *SIACO4* mutant bitkilerde elde edilen meyve başına tohum sayısı

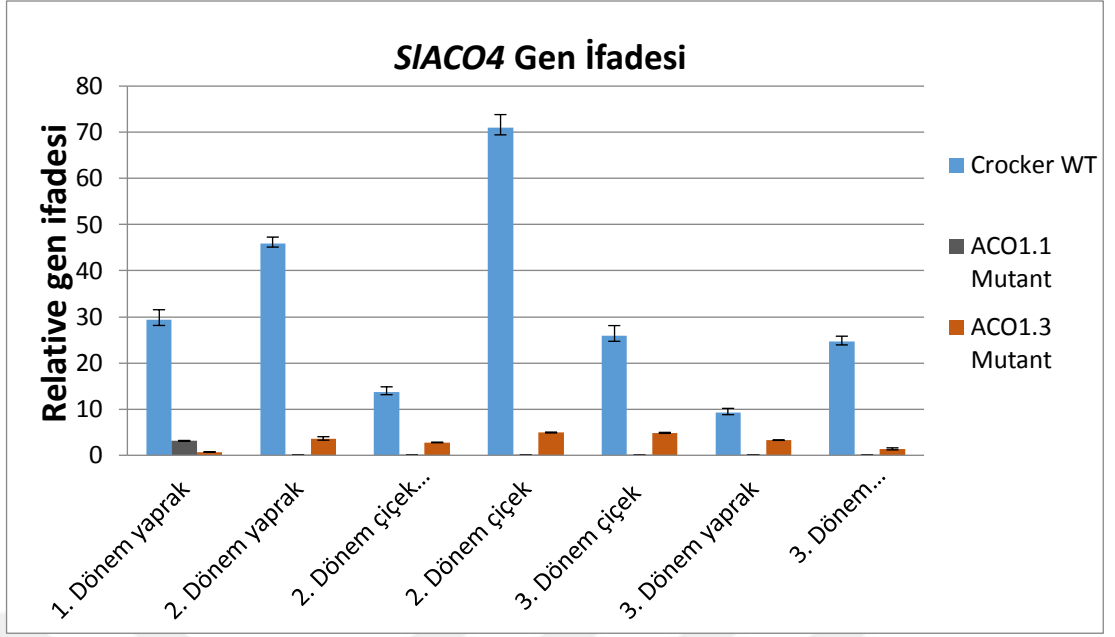
T0 bitkilerindene elde edilen T1 tohumları çimlenme testine tabi tutulmuştur (Şekil 8.26). WT bitkilerden elde edilen tohumlar MS besi ortamında %98 oranında çimlenme gösterirken ACO1.1 mutant hattı %60 ACO 1.3 mutant hattı ise %40 çimlenme göstermiştir. *SIACO4* mutant hattına ait tohumların çimlenmesinde meydana gelen azalmalar, bitkiler yetiştirilme döneminde çiçekleri kapatılmamıştır ve buna bağlı olarak mutant hatların WT bitkilerden polen kaçıışı olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 8.27. Transgenik T1 tohumlarının MS besi ortamında çimlendirilmesi. (a): ACO1.3. T1 transgenik mutant hattı. (b): ACO1.1. T1 transgenik mutant hattı. (c): WT bitkileri.

8.3.11. Genomu Düzenlenmiş Mutant Bitkilerde *ACO* geninin RT-qPCR ile Belirlenmesi

CRISP/Cas9 sistemi sonucunda elde edilen mutant hatlar ve wt bitkilerde *SIACO4* genin ifadesi RT-qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. Bitkilerden çiçeklenme döneminde örnek alınmış ve RNA izole edilmiştir. Elde edilen RNA'lar cDNA sentezledikten sonra RT-qPCR çalışmalarında kullanılmıştır. *SIACO4* genin WT ve mutant hatlarda ifade sonucu şekil 8.28'de gösterilmiştir. RT-qPCR sonucunda WT bitkilerde *SIACO4* genin ifadesi farklı dokularda 13-71 kat arasında değişiklik göstermiştir. ACO1.1 mutant hattı sadece 1 dönem yaprak örneğinde 3 kat artış gösterirken diğer dokularda ifadesi ortalama 4,5 kat azalmıştır. ACO1.3 mutant hattında ise tüm dokularda en düşük 1 dönem yaprakta 0,6 kat en yüksek ise 2. Dönem çiçek organında 4,9 ifade göstermiştir. RT-qPCR 3.2 kat artarken mutant hatlarda ise gen ifadesi elde edilememiştir.



Şekil 8.28. WT ve *SIACO4* mutant bitkilerde farklı zamanlarda ve farklı dokular *SIACO4* genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi

9. TARTIŞMA

Doku kültürü çalışmaları, bitki rejenerasyon ortamı, eksplant kaynağı ve özellikle bitki genotipinden önemli ölçüde etkilendiği bilinmektedir (Alatar, Faisal et al. 2017). Bu ve önceki doku kültürü çalışmalarında bitki rejenerasyonun bir genotipten diğerine büyük oranda değiştiğini göstermiştir (Alatar et al. 2017). Domateste in vitro sürgün oluşumu genotip, bitki büyüme düzenleyicileri, eksplant çeşidi ve kültür koşulları gibi birçok faktörden etkilenir. *Solanum lycopersicon* cv. Bobcat ve Crocker çeşitlerinde kotiledon ve yaprak eksplantlarının rejenerasyon verimliliği değerlendirildi. Crocker çeşidinde çeşitli doku kültürü koşullarında en yüksek bitki rejenerasyon oranı elde edilmiştir. Yaprak eksplantlarından bitki rejenerasyonu elde etmek için kültür ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonu arasında, farklı IAA ve Kinetin konsantrasyonlarında en yüksek rejenerasyona ulaşılmıştır. BA içeren Ortamlarda ise yapraktan rejenerasyon oldukça düşük bulunmuştur. Buna karşın BA içeren ortamlarda kotiledon eksplantlarından rejenerasyon oldukça yüksek olarak bulunmuştur. Kotiledon eksplantlarından sürgün oluşumu yüzdesi %12 ile %83 arasında değişmiştir ve bitki rejenerasyonu, her iki çeşitte BA içeren MS ortamında en yüksek gerçekleşmiştir. Sitokininlerin bir oksin ile kombinasyon halinde sinerjik etkisi, Microtom (Pino, Lombardi-Crestana et al. 2010, Cruz-Mendivil, Rivera-López et al. 2011), Rio Grande (Khoudi, Nouri-Khemakhem et al. 2009, Prihatna, Chen et al. 2019), Pusa Ruby (Sarker, Islam et al. 2009) gibi farklı domates çeşitlerinde gösterilmiştir. Sonuçları, domates bitkisinde kotiledon eksplantlarından yüksek bitki rejenerasyonu için eksplant olarak iyi bir seçim olduğunu gösteren önceki çalışmalardan elde edilen önerilerle tutarlıdır. Bu nedenle, Crocker' çeşidini *Agrobacterium* aracılı gen aktarımını optimizasyonu için materyal olarak kullandık.

Etkili bir gen aktarım sistemi, bitki ıslahçılarının arzuladığı bir yöntemdir ve genetik manipülasyon dönüşümünün kullanılması, gen işlevinin test edilmesi ve genom düzenleme gibi işlevsel genomik çalışmaları için gereklidir (An, Wang et al. 2014, Wang, Chen et al. 2019). Bu çalışmada ticari Crocker domates çeşidi için bitki rejenerasyon sistemi, *Agrobacterium* aracılı gen aktarımının ve CRISPR/Cas9 genom düzenlemesi için etkin bir protokol oluşturulmuştur. Günümüzde, farklı domates çeşitleri ve genotiplerinde *Agrobacterium* aracılı gen aktarımı için etkin bir protokol geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Tüm domates çeşitlerini kapsayan etkin gen

aktarım protokolü bulunmamaktadır (Sun, Uchii et al. 2006, Arshad, Waheed et al. 2014). Bu çalışma ile ticari domates çeşitlerinde transgenik bitki elde etmek için başarılı bir *Agrobacterium* aracılı transformasyonuna ek olarak, kotiledon ve yaprak eksplantlarını kullanarak in vitro rejenerasyon yöntemini optimize ettik.

Agrobacterium suşuna bağlı olarak timentin ve sefotaksim *Agrobacterium*'un engellenmesinde kullanılan etkili antibiyotiklerdir. Kullanılan bu antibiyotiklerin domates bitkisinin rejenerasyonu üzerine toksik etkisi bulunmamaktadır. Birçok bitki transformasyon çalışmalarında timentin (160 mg/L- 320 mg/L) tek kullanıldığı zaman yeterli bulunurken domates bitkisinde tek başına etkili olamadığı belirlenmiştir. *Agrobacterium* eliminasyonu için domates bitkisinde sefotaksimin daha etkin olduğu yapılan bu çalışmada gösterilmiştir. Domates gen aktarımı üzerine yapılan çalışmalarda sefotaksimin domates gen aktarımında etkin olduğunu göstermiştir. Higromisin, gen aktarım çalışmalarında birçok bitki türünde sıklıkla kullanılan bir seleksiyon ajanıdır (Prihatna, Chen et al. 2019). Sonuçlarımız, domates eksplantlarının higromisine çok duyarlı olduğunu göstermiş, bu nedenle çok düşük higromisin konsantrasyonlarında transgenik hücrelerin seleksiyonu yapılabileceği belirlenmiştir.

Agrobacterium farklı suşları, gen aktarımı verimliliğini etkileyebilir çünkü farklı suşlar, farklı virülans seviyelerinde olabilir, bunun yanı sıra çeşitli konak tipleri ile etkileşime sahip olabilir. Hipervirülan suş olan AGL1 ve GV3101'in diğer bitkilerdeki en güçlü transformasyon suşu olduğu bildirilmiştir (Hansen 2000, Khanna, Paul et al. 2007). Gen aktarım çalışmalarında kullanılan her iki *Agrobacterium* suşunda da domates bitkisinde gen aktarımı yapılmakta, ancak AGL1, GV3101 ile karşılaştırıldığında daha fazla GUS pozitif bitki geliştirildiği için GV3101'i önerilmektedir (Chetty, Ceballos et al. 2013). Bu çalışmada iki *Agrobacterium* suşunun etkinliği değerlendirilmiştir. Fakat AGL-1 suşu domates eksplantlarında doku kararmasına neden olduğundan dolayı GV3101 suşunun bundan sonra yapılacak gen aktarımında kullanılması tavsiye edilmektedir.

Agrobacterium suşunun etkisi olduğu gibi bakteri yoğunluğunun ve inokülasyon besi ortamının bitki rejenerasyonu üzerin etkisi olduğu belirlenmiştir. Domates transformasyon çalışmalarında *Agrobacterium* konsantrasyonu OD600= 0.1-1.0 arasında değişen konsantrasyonlarda kullanılmıştır (Qiu, Diretto et al. 2007, Gao, Shen et al. 2009, Vinoth, Gurusaravanan et al. 2013). Gen aktarım çalışmasında kullanılan bakteri hücre yoğunluğu, transformasyon verimliliğinde anahtar rol oynamaktadır.

Agrobacterium konsantrasyonu, domates bitkisinde de transformasyon verimliliğini artırmada en önemli faktördür. Bazı türler için, inokülasyon sırasında bakteri hücre yoğunluğundaki artış, transformasyon etkinliğini artırmıştır ve çok düşük bir *Agrobacterium* konsantrasyonu kullanıldığı zaman transforme hücre elde edilememiştir (Davis, Lineberger et al. 1991, Cheng, Fry et al. 1997). Benzer şekilde, yüksek *Agrobacterium* konsantrasyonları gen transferinin etkinliğini artırabilir, ancak domates dokusunda nekroz oluşumuna neden olabilir. Bu nedenle, enfeksiyon potansiyeli yüksek, nispeten düşük bir konsantrasyon seçilmelidir. Yapılan bu çalışma sonucunda ticari domates çeşidi Croker için doku nekrozun en az transformasyon başarısının en yüksek bulunduğu en iyi *Agrobacterium* konsantrasyonu OD₆₀₀=0,6 olarak belirlenmiştir.

Ko-kültüvasyon süresi bitkilere *Agrobacterium* aracı gen aktarımında transformasyon etkinliğinin artırılmasında bir diğer kritik faktördür (Van, Ferro et al. 2010). Genel olarak, daha uzun bir ko-kültüvasyon süresi, *Agrobacterium* kontaminasyonu ve doku nekrozu ile sonuçlanabilir. *Agrobacterium* konsantrasyonu ile birlikte ko-kültüvasyon süresi ve inokülasyon süresi birbiriyle ilişkili adımlardır. Bu nedenle, *Agrobacterium* aracılı gen transferini optimize ederken, bu adımlar kombinasyon halinde çalışılmalıdır. Bitki eksplantlarının *Agrobacterium* ile inokülasyonundan önce ön-kültürünün bazı bitki türleri üzerinde olumlu etki gösterirken, bazılarında ise olumsuz etki göstermiştir (Dong and McHughen 1993, Egnin, Mora et al. 1998). Domates bitkisinde farklı ön kültürleme süreleri çalışılmış ve 24 saat ön kültür süresinin *Agrobacterium* aracılı gen aktarımında transformasyon etkinliğinin artırıldığı belirlenmiştir. Ko-kültüvasyon süresinin kısaltılması sonucunda transformasyon etkinliğinin azaldığı bulunurken, transformasyon süresinin uzatılması durumunda domates eksplantları üzerinde aşırı bakteri büyümesine bağlı olarak doku nekrozu sonucunda eksplan ölümü gerçekleşmiştir. Bu çalışmada optimum ko-kültüvasyon süresi 2 gün olarak belirlenmiştir.

Bitkilerdeki akonitazlar TCA ve glioksilat döngülerinde önemli roller oynar. *ACO* gen ailesinin domates bitkisinde kapsamlı bir analizini gerçekleştirilmiştir. Domates bitkisinde 4 *ACO* geni tanımlanmıştır. Duplikasyon analizi sonucunda domates bitkisinde iki *ACO* gen ailesi iki duplikasyon olayı sonucunda meydana gelmiştir ve *ACO* gen ailesinde tandem duplikasyon gözlenmemiştir. Yapılan biyoinformatik analizler domates bitkilerinin tüm *ACO* genlerinin sitozolik akonitazlar

olduğunu ve bu genomlarda mitokondriyal izoformları tespit edilememiştir. 12 kara bitkisinde *ACO* genlerinin genom çapında analizi biyoinformatik araçlar kullanılarak yapılmış ve tüm bu bitkilerde *ACO* genlerinin mitokondriyal formu tespit edilmemiştir (Wang, Yang et al. 2016).

Çalışmada *PDS* ve *SLACO4* geni hedeflemek için tüm olası gRNA'lar online yazılımlar kullanılarak listelenmiş ve puanlanmıştır. En yüksek hedef etkililik skoruna göre en iyi iki gRNA (gRNA1 ve gRNA2) seçilmiştir. Benchling (<https://benchling.com/>), ve CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) online araçları kullanılarak gRNA'lar seçilmiştir. gRNA1 ve gRNA2 puanlandıktan sonra, gRNA1 ve gRNA2'nin pKI1.1R vektörüne klonlanması gerçekleştirildi. CRISPR-P 2.0 çevrimiçi aracının (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) son zamanlar CRISPR/Cas9 çalışmalarında etkin gRNA seçilmesi için sıklıkla kullanılmaktadır (Liu, Ding et al. 2017). Benchling ve CRISPR-P 2.0 programları kullanılması ile elde edilen gRNA'ların etkinliğinde On-skorunun önemli olduğu ve bu değer 0.4'den büyük olması gerektiği belirlenmiştir.

Bugüne kadar bitki ıslahında en yaygın kullanılan F1 hibrit tohumları, yüksek verimlilik, adaptasyon kabiliyetinin yüksek olması ve hastalık direnci açısından avantajları olan heterosis mekanizmasıyla üretilmesidir. Domates, havuç ve biber gibi birçok bahçe bitkisinde, anterlerin dışı çiçeklerden elle çıkarılması (emaskülasyon) işleminden dolayı işçilik maliyeti ve buna bağlı olarak tohum üretim maliyeti artar (Chen ve Liu, 2014). Ek olarak erkek kısırlığının uygulanması, hibrit tohum maliyetlerini düşürmek ve yüksek çeşit saflığı sağlamak için etkili bir yaklaşımdır (Kim ve Zang 2018). Crane (1915) tarafından yapılan ilk açıklamadan bu yana, domates erkek kısırlığı birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir ve şimdiye kadar yaklaşık 50 erkek kısırlık mutanti rapor edilmiştir (Gorman ve ark. 1997; Quinet ve ark. 2014; Liu ve ark. 2019). Bu spontan erkek steril mutantlar, hibrit tohum üretiminde erkek kısırlığının kullanılması için mükemmel bir sistemdir. Son zamanlarda genom düzenleme teknikleri, çeşitli tipte bölgeye özgü nükleazlar kullanarak istenen genom pozisyonunda kalıtsal mutasyonları azaltma yeteneğini göstermiştir (Gaj ve ark. 2013). Genom düzenleme araçları içerisinde CRISPR/Cas9 sistemi, bitkiler dahil olmak üzere birçok organizmada hızlı bir şekilde güçlü bir genom düzenleme aracı olarak ortaya çıkmıştır (Jung ve ark. 2019). Bu genom düzenleme sisteminde, mutasyon hedef bölgede doğru ve verimli bir şekilde elde

edilmektedir ve genomd zenlenmiş bitkiler, yaygın olarak kullanılan bitki ıslahı teknikleriyle geliştirilen bitkilerden farklı olmama avantajına sahiptir. Bu alışmada, TCA döngüsünde görev alana akonitaz hidrataz enzimin üretilmesinde görev alan geninin kodlama bölgelerinin genom düzenleme prosedürü ile silinen domates hatları elde ettik. Domatesler, TCA döngüsünde bulunan sitratın izositrata dönüşümünden sorumlu dört *ACO* geni içermektedir. Yağ asit metabolizması ile yakında ilşkili oldu bilinen TCA döngüsü bitkilerde enerji kaynağı olarakda bilinirler. CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak *SIACO4* geninin damain içeren korunmuş bölgesinde mutasyon oluşturduk. 68 T0 transgenik bitkiden 14 homozigot mutant bitki elde ettik. Elde edilen bu hatların çiçeklerinde polen oluşumu engellenmiştir. QPCR analizi sonucunda transgenik domatesler polen gelişiminde yer aldığı  nerilen *SIACO4* geninin mutasntların çoğunda ifade edilmediğini ya da zayıf bir şekilde ifade edildiği belirlenmiştir. Bu alışma sonucunda erkek kısırlığı CRISPR/Cas9 sistemi aracılığıyla üretildi ve bu sistem, elit hatlarda hızlı bir şekilde kullanılabilir ve geleneksel ıslah yöntemlerine kıyasla daha kolay uygulanabilir.

Bu çalışmada, ticari bir domates olan Crocker eşidinin bitki doku kültürü parametreleri optimize edilerek etkili bir bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. Aynı zamanda *Agrobacterium tumefaciens* aracılı transformasyon ile ilgili faktörler optimize edilerek ilk kez recelcitrant bitki olan ticari domates (*Solanum lycopersicum* cv. Crocker) eşidi için hızlı ve tekrarlanabilir bir *Agrobacterium tumefaciens* aracılı transformasyon prosedürü oluşturulmuştur. İncelenen tüm faktörlerin, transformasyon verimliliğini arttırmak için temel olduğu bulunmuştur. Özetle, Ticari domates çeşidinde optimize edilmiş bir *Agrobacterium* aracılı CRISPR/Cas9 sistemi geliştirdik. *SIPDS* geninde genom düzenlemenin başarısı, vektör yapımı için stratejimizin uygun olduğunu ve belirgin şekilde daha geniş bir aralıkta genom düzenlemesini mümkün kıldığını göstermektedir. Ticari domates çeşidinde bu optimize edilmiş CRISPR/Cas9 sisteminin gen işlevi çalışmalarını kolaylaştırmak için etkili bir araç olarak kullanılabilir.

10. KAYNAKLAR

- Afroz, A., et al. (2010). Enhanced regeneration in explants of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) with the treatment of coconut water. *African Journal of Biotechnology*, 9(24), 3634-3644.
- Alagoz, Y., et al. (2016). Manipulating the biosynthesis of bioactive compound alkaloids for next-generation metabolic engineering in opium poppy using CRISPR-Cas 9 genome editing technology. *Scientific reports*, 6, 30910.
- Ali, A., et al. (2012). Cytokinin-cytokinin interaction ameliorates the callus induction and plant regeneration of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Acta Agronomica Hungarica*, 60(1), 47-55.
- Ali, Z., et al. (2018). Pea early-browning virus-mediated genome editing via the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Virus research*, 244, 333-337.
- Anwar, R., et al. (2019). Tomatoes: A Model Crop of Solanaceous Plants. In *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*.
- Apel, W., and Bock, R. (2009). Enhancement of carotenoid biosynthesis in transplastomic tomatoes by induced lycopene-to-provitamin A conversion. *Plant Physiology*, 151(1), 59-66.
- Arnaud, N., et al. (2007). The iron-responsive element (IRE)/iron-regulatory protein 1 (IRP1)–cytosolic aconitase iron-regulatory switch does not operate in plants. *Biochemical Journal*, 405(3), 523-531.
- Arora, L., and Narula, A. (2017). Gene editing and crop improvement using CRISPR-Cas9 system. *Frontiers in plant science*, 8, 1932.
- Ashakiran, K., et al. (2011). Genotype specific shoots regeneration from different explants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) using TDZ. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1(2), 107-113.
- Bahurupe, J., et al. (2013). CALLUS INDUCTION AND PLANTLET REGENERATION IN TOMATO (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.). *Journal of Cell & Tissue Research*, 13(2).
- Bai, L., et al. (2002). Agrobacterium mediated barnase gene transfer of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Henan University (Natural Science)*, 32(3), 16-19.
- Barrangou, R., et al. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712.
- Bastet, A., et al. (2019). Mimicking natural polymorphism in eIF 4E by CRISPR-Cas9 base editing is associated with resistance to potyviruses. *Plant biotechnology journal*, 17(9), 1736-1750.
- Belhaj, K., et al. (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant methods*, 9(1), 1-10.
- Bell, C. C., et al. (2014). A high-throughput screening strategy for detecting CRISPR-Cas9 induced mutations using next-generation sequencing. *BMC genomics*, 15(1), 1-7.
- Bennardo, N., et al. (2009). Limiting the persistence of a chromosome break diminishes its mutagenic potential. *PLoS Genet*, 5(10), e1000683.
- Bhatia, P., and Ashwath, N. (2005). Effect of duration of light: dark cycles on in vitro shoot regeneration of tomato. *Asian J Plant Sci*, 3, 255-260.

- Bhaya, D., et al. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics*, 45, 273-297.
- Bhupendra, K., et al. (2014). Establishment and optimization of agrobacterium-mediated transformation and regeneration of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Biosciences (IJB)*, 4(10), 51-69.
- Bolotin, A., et al. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551-2561.
- Borek, S., and Nuc, K. (2011). Sucrose controls storage lipid breakdown on gene expression level in germinating yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) seeds. *Journal of plant physiology*, 168(15), 1795-1803.
- Borrelli, V. M., et al. (2018). The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9 technology. *Frontiers in plant science*, 9, 1245.
- Bouzroud, S., et al. (2020). Down Regulation and Loss of Auxin Response Factor 4 Function Using CRISPR/Cas9 Alters Plant Growth, Stomatal Function and Improves Tomato Tolerance to Salinity and Osmotic Stress. *Genes*, 11(3), 272.
- Brooks, C., et al. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiology*, 166(3), 1292-1297.
- Brouns, S. J., et al. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321(5891), 960-964.
- Bruce, W. B., et al. (2002). Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal of experimental botany*, 53(366), 13-25.
- Budman, J., and Chu, G. (2005). Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. *The EMBO journal*, 24(4), 849-860.
- Carrari, F., et al. (2003). Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. *Plant Physiology*, 133(3), 1322-1335.
- Cercós, M., et al. (2006). Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization. *Plant Molecular Biology*, 62(4-5), 513-527.
- Čermák, T., et al. (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome biology*, 16(1), 232.
- Char, S. N., et al. (2017). An Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant biotechnology journal*, 15(2), 257-268.
- Chaudhry, Z., et al. (2010). Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. Moneymaker. *Pak. J. Bot*, 42(1), 155-163.
- Chen, L., et al. (2018). Evidence for a specific and critical role of mitogen-activated protein kinase 20 in uni-to-binucleate transition of microgametogenesis in tomato. *New Phytologist*, 219(1), 176-194.
- Chen, M., et al. (2009). Relationship between accumulation of organic acid and organic acid-metabolizing enzymes during apricot fruit development. *Journal of Fruit Science*, 26(4), 471-474.
- Chen, L., & Liu, Y. G. (2014). Male sterility and fertility restoration in crops. *Annual review of plant biology*, 65, 579-606.
- Chen, X., et al. (2007). A cell nanoinjector based on carbon nanotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), 8218-8222.

- Chetty, V., et al. (2013). Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Reports*, 32(2), 239-247.
- Chuai, G., et al. (2018). DeepCRISPR: optimized CRISPR guide RNA design by deep learning. *Genome biology*, 19(1), 80.
- Colombo, N., and Galmarini, C. R. (2017). The use of genetic, manual and chemical methods to control pollination in vegetable hybrid seed production: a review. *Plant Breeding*, 136(3), 287-299.
- Cong, L., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- Consortium, T. G. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635.
- Costan, A., et al. (2020). Interactive effects of salinity and silicon application on *Solanum lycopersicum* growth, physiology and shelf-life of fruit produced hydroponically. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 732-743.
- Coyago-Cruz, E., et al. (2018). Antioxidants (carotenoids and phenolics) profile of cherry tomatoes as influenced by deficit irrigation, ripening and cluster. *Food chemistry*, 240, 870-884.
- Crane, M. B. (1915). Heredity of types of inflorescence and fruits in tomato. *Journal of Genetics*, 5(1), 1-11.
- Craig, A. (1907). Mendel's law applied in tomato breeding. *Proc Soc Hort Sci*, 5, 24-27.
- Cruz-Mendivil, A., et al. (2011). A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of tomato cv. Micro-Tom from leaf explants. *HortScience*, 46(12), 1655-1660.
- Çetintas, V. B., et al. (2017). Bagisiklik Yanitindan Genom Tasarimina; CRISPR-Cas9 Sistemi/From the Immune Response to the Genome Design; CRISPR-Cas9 System. *Türkiye Klinikleri. Tıp Bilimleri Dergisi*, 37(1), 27.
- D'Halluin, K., et al. (2013). Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction. *Plant biotechnology journal*, 11(8), 933-941.
- da Silva Dias, J. C. (2014). Guiding strategies for breeding vegetable cultivars. *Agricultural Sciences*, 5(1), 9.
- Darwin, C., and Costa, J. T. (2009). *The annotated origin: a facsimile of the first edition of on the origin of species*: Harvard University Press.
- Daunay, M. C., et al. (2007). Iconography and history of Solanaceae: Antiquity to the 17th century. *Horticultural Reviews*, 34, 1-111.
- Davis, A. J., and Chen, D. J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational cancer research*, 2(3), 130.
- de Toledo Thomazella, D. P., et al. (2016). CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *BioRxiv*, 064824.
- Deng, L., et al. (2018). Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 system. *Journal of genetics and genomics= Yi chuan xue bao*, 45(1), 51.
- Deng, W., et al. (2015). CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(38), 11870-11875.

- Dhall, R. (2010). Status of male sterility in vegetables for hybrid development. A review. *Advances in Horticultural Science*, 263-279.
- Doench, J. G., et al. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology*, 34(2), 184-191.
- Du, K., et al. (2016). Morphological structure and transcriptome comparison of the cytoplasmic male sterility line in Brassica napus (SaNa-1A) derived from somatic hybridization and its maintainer line SaNa-1B. *Frontiers in plant science*, 7, 1313.
- Du, M., et al. (2020a). A biotechnology-based male-sterility system for hybrid seed production in tomato. *Plant j.*
- Du, M., et al. (2020b). A biotechnology-based male-sterility system for hybrid seed production in tomato. *The Plant Journal*, 102(5), 1090-1100.
- Duvick, D. N. (2005). The contribution of breeding to yield advances in maize (Zea mays L.). *Advances in agronomy*, 86, 83-145.
- El-Siddig, M. A., et al. (2011). Agrobacterium-mediated transformation of tomato plants expressing defensin gene. *Int J Agric Res*, 4, 323-334.
- Feng, Z., et al. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell research*, 23(10), 1229-1232.
- Gaj, T., et al. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*, 31(7), 397-405.
- Gimenez-Ibanez, S., et al. (2017). JAZ 2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. *New Phytologist*, 213(3), 1378-1392.
- Glowacka, B. (2004). Influence of light colour on micropropagation of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.). *Biotechnologia*, 2, 168-175.
- Godishala, V., et al. (2011). Plant regeneration via somatic embryogenesis in cultivated tomato (Solanum lycopersicum L.). *Journal of Cell and Tissue Research*, 11(1), 2521.
- Gorman, S. W., et al. (1997). Male sterility in tomato. *Critical reviews in plant sciences*, 16(1), 31-53.
- Gök, Z., and Tunalı, B. (2016). CRISPR-Cas İmmün Sisteminin Biyolojisi, Mekanizması ve Kullanım Alanları. Kırıkkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, Uluslararası Mühendislik Araştırma ve Geliştirme Dergisi. *International Journal of Research and Development*, 8(2).
- Gupta, R. M., and Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *The Journal of clinical investigation*, 124(10), 4154-4161.
- Haft, D. H., et al. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*, 1(6), e60.
- Haque, E., et al. (2018). Application of CRISPR/Cas9 genome editing technology for the improvement of crops cultivated in tropical climates: recent progress, prospects, and challenges. *Frontiers in plant science*, 9, 617.
- Harrison, M. M., et al. (2014). A CRISPR view of development. *Genes & development*, 28(17), 1859-1872.
- Havey, M. J. (2004). The use of cytoplasmic male sterility for hybrid seed production. In *Molecular biology and biotechnology of plant organelles* (pp. 623-634): Springer.
- Hayashi, M., et al. (1995). Cytosolic aconitase participates in the glyoxylate cycle in etiolated pumpkin cotyledons. *Plant and cell physiology*, 36(4), 669-680.

- Hayut, S. F., et al. (2017). Targeted recombination between homologous chromosomes for precise breeding in tomato. *Nature communications*, 8(1), 1-9.
- Heazlewood, J. L., et al. (2004). Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *The Plant Cell*, 16(1), 241-256.
- Hsu, P. D., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, 31(9), 827-832.
- Hu, J., et al. (2014). Mitochondria and cytoplasmic male sterility in plants. *Mitochondrion*, 19, 282-288.
- Hu, J., et al. (2018). The interaction between DELLA and ARF/IAA mediates crosstalk between gibberellin and auxin signaling to control fruit initiation in tomato. *The Plant Cell*, 30(8), 1710-1728.
- Ishag, S., et al. (2009). Effects of growth regulators, explant and genotype on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Omdurman). *Int. J. Sustain. Crop Prod*, 4(6), 7-13.
- Ishino, Y., et al. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429-5433.
- Ito, Y., et al. (2015). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(1), 76-82.
- Iyama, T., and Wilson III, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, 12(8), 620-636.
- Jaberolansar, N., et al. (2010). Tomato and tobacco phytoene desaturase gene silencing by virus-induced gene silencing (VIGS) technique.
- Jacobs, T. B., et al. (2017). Generation of a collection of mutant tomato lines using pooled CRISPR libraries. *Plant Physiology*, 174(4), 2023-2037.
- Jansen, R., et al. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jekimovs, C., et al. (2014). Chemotherapeutic compounds targeting the DNA double-strand break repair pathways: the good, the bad, and the promising. *Frontiers in oncology*, 4, 86.
- Jiang, W., et al. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic acids research*, 41(20), e188-e188.
- Jiang, Z., et al. (2020). Characterization of Organic Acid Metabolism and Expression of Related Genes During Fruit Development of *Actinidia eriantha* ‘Ganmi 6’. *Plants*, 9(3), 332.
- Jinek, M., et al. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Jung, Y. J., et al. (2020). Knockout of SIMS10 Gene (Solyc02g079810) Encoding bHLH Transcription Factor Using CRISPR/Cas9 System Confers Male Sterility Phenotype in Tomato. *Plants*, 9(9), 1189.
- Jung, Y. J., Lee, H. J., Bae, S., Kim, J. H., Kim, D. H., Kim, H. K., ... & Kang, K. K. (2019). Acquisition of seed dormancy breaking in rice (*Oryza sativa* L.) via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of OsVP1 gene. *Plant Biotechnology Reports*, 13(5), 511-520.

- Karaağaç, O., And Balkaya, A. (2009). Sebzelerde Erkek Kisirliği Meka İzması Da Yarla İarak F1 Hibrit Tohum Üretimi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 24(2), 114-123.
- Karginov, F. V., and Hannon, G. J. (2010). The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Molecular cell*, 37(1), 7-19.
- Kaul, M. L. (2012). *Male sterility in higher plants* (Vol. 10): Springer Science & Business Media.
- Khan, M. S., et al. (2006). Facile plant regeneration from tomato leaves induced with spectinomycin. *Pakistan Journal of Botany*, 38(4), 947.
- Kim, J., et al. (2020). Site-Specific Gene Knock-Out and On-Site Heterologous Gene Overexpression in *Chlamydomonas reinhardtii* via a CRISPR-Cas9-Mediated Knock-in Method. *Frontiers in plant science*, 11, 306.
- Kim, Y. J., & Zhang, D. (2018). Molecular control of male fertility for crop hybrid breeding. *Trends in plant science*, 23(1), 53-65.
- Klap, C., et al. (2017). Tomato facultative parthenocarp results from Sl AGAMOUS-LIKE 6 loss of function. *Plant biotechnology journal*, 15(5), 634-647.
- Knapp, S. (2005). Taxonomic additions for *Solanum* section Geminata (Solanaceae) in Peru. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 248-253.
- Knapp, S. (2008). A revision of the *Solanum havanense* species group and new taxonomic additions to the Geminata clade (*Solanum*, Solanaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 405-458.
- Koonin, E. V., et al. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current opinion in microbiology*, 37, 67-78.
- Koseoglou, E. Wageningen University, <http://edepot.wur.nl/422311> (2017).
- Lang, Z., et al. (2017). Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(22), E4511-E4519.
- Langner, T., et al. (2018). CRISPR crops: plant genome editing toward disease resistance. *Annual review of phytopathology*, 56, 479-512.
- Lei, Y., et al. (2014). CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Molecular plant*, 7(9), 1494-1496.
- Li, C., et al. (2017). A high-efficiency CRISPR/Cas9 system for targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Scientific reports*, 7, 43902.
- Li, H., et al. (2017). Tomato transcription factor SIWUS plays an important role in tomato flower and locule development. *Frontiers in plant science*, 8, 457.
- Li, J.-F., et al. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology*, 31(8), 688-691.
- Li, R., et al. (2019). CRISPR/Cas9-Mediated SINPR1 mutagenesis reduces tomato plant drought tolerance. *BMC plant biology*, 19(1), 1-13.
- Li, R., et al. (2018). Reduction of tomato-plant chilling tolerance by CRISPR-Cas9-mediated SICBF1 mutagenesis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(34), 9042-9051.
- Li, X., et al. (2018). Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Frontiers in plant science*, 9, 559.
- Li, Y., et al. (2018). Can the world's favorite fruit, tomato, provide an effective biosynthetic chassis for high-value metabolites? *Plant Cell Reports*, 37(10), 1443-1450.
- Liang, G., et al. (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Scientific reports*, 6(1), 1-8.

- Liang, Z., et al. (2014). Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(2), 63-68.
- Lin, T., et al. (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature genetics*, 46(11), 1220-1226.
- Liu, G., et al. (2020). Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 35-44.
- Liu, H., et al. (2017). CRISPR-P 2.0: an improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants. *Molecular plant*, 10(3), 530-532.
- Liu, J., et al. (2021). Rapid generation of tomato male-sterile lines with a marker use for hybrid seed production by CRISPR/Cas9 system. *Molecular breeding*, 41(3), 1-12.
- Liu, X., Yang, M., Liu, X., Wei, K., Cao, X., Wang, X., ... & Huang, Z. (2019). A putative bHLH transcription factor is a candidate gene for male sterile 32, a locus affecting pollen and tapetum development in tomato. *Horticulture research*, 6(1), 1-11.
- Liu, L., et al. (2018). Transcriptomics analyses reveal the molecular roadmap and long non-coding RNA landscape of sperm cell lineage development. *The Plant Journal*, 96(2), 421-437.
- Liu, L., et al. (2020). CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis of SILBD40, a lateral organ boundaries domain transcription factor, enhances drought tolerance in tomato. *Plant Science*, 301, 110683.
- Lloyd, A., et al. (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(6), 2232-2237.
- Lu, Y., et al. (2020). Targeted, efficient sequence insertion and replacement in rice. *Nature biotechnology*, 1-6.
- Makarova, K. S., et al. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 722-736.
- Makarova, K. S., et al. (2017). SnapShot: class 2 CRISPR-Cas systems. *Cell*, 168(1), 328-328. e321.
- Mamidala, P., and Nanna, R. S. (2011). Effect of genotype, explant source and medium on in vitro regeneration of tomato. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 3(3), 45-50.
- Mansour, W. Y., et al. (2008). Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*, 36(12), 4088-4098.
- Mao, Y., et al. (2017). Heritability of targeted gene modifications induced by plant-optimized CRISPR systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(6), 1075-1093.
- Mao, Z., et al. (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell cycle*, 7(18), 2902-2906.
- Mariani, C., et al. (1990). Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, 347(6295), 737-741.
- Martí, R., et al. (2016). Tomato as a source of carotenoids and polyphenols targeted to cancer prevention. *Cancers*, 8(6), 58.
- Martín-Pizarro, C., and Posé, D. (2018). Genome editing as a tool for fruit ripening manipulation. *Frontiers in plant science*, 9, 1415.
- Martínez-Fortún, J., et al. (2017). Potential impact of genome editing in world agriculture. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(2), 117-133.

- Marton, I., et al. (2010). Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiology*, 154(3), 1079-1087.
- McCormick, S., et al. (1986). Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 5(2), 81-84.
- McEachern, M. J., and Haber, J. E. (2006). Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 111-135.
- Meng, X., et al. (2015). Physiological changes in fruit ripening caused by overexpression of tomato SlAN2, an R2R3-MYB factor. *Plant Physiology and Biochemistry*, 89, 24-30.
- Meng, X., et al. (2017). Construction of a genome-wide mutant library in rice using CRISPR/Cas9. *Molecular plant*, 10(9), 1238-1241.
- Mimitou, E. P., and Symington, L. S. (2009). Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in biochemical sciences*, 34(5), 264-272.
- Moeder, W., et al. (2007). Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology*, 63(2), 273-287.
- Mojica, F., et al. (1995). Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular microbiology*, 17(1), 85-93.
- Mojica, F. J., et al. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*, 36(1), 244-246.
- Mojica, F. J., et al. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174-182.
- Moore, J. K., and Haber, J. E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 16(5), 2164-2173.
- Moscou, M. J., and Bogdanove, A. J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326(5959), 1501-1501.
- Namitha, K. K., and Negi, P. S. (2013). Morphogenetic Potential of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. 'Arka Ahuti' to Plant Growth Regulators. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(2), 220-225.
- Navarre, D. A., et al. (2000). Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiology*, 122(2), 573-582.
- Nekrasov, V., et al. (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature biotechnology*, 31(8), 691-693.
- Nekrasov, V., et al. (2017). Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Scientific reports*, 7(1), 1-6.
- Nishimasu, H., et al. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949.
- Nonaka, S., et al. (2017). Efficient increase of γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Nunes-Nesi, A., et al. (2013). Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. *Current opinion in plant biology*, 16(3), 335-343.

- Ortigosa, A., et al. (2019). Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of Sl JAZ 2. *Plant biotechnology journal*, 17(3), 665-673.
- Pacher, M., and Puchta, H. (2017). From classical mutagenesis to nuclease-based breeding—directing natural DNA repair for a natural end-product. *The Plant Journal*, 90(4), 819-833.
- Parmar, N., et al. (2017). Genetic engineering strategies for biotic and abiotic stress tolerance and quality enhancement in horticultural crops: a comprehensive review. *3 Biotech*, 7(4), 1-35.
- Pawar, B., et al. (2012). Zeatin induced direct in vitro shoot regeneration in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *The Bioscan*, 7(2), 247-250.
- Pawluk, A., et al. (2018). Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 12.
- Peyret, P., et al. (1995). Structure, genomic organization, and expression of the *Arabidopsis thaliana* aconitase gene plant aconitase show significant homology with mammalian iron-responsive element-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 270(14), 8131-8137.
- Pourcel, C., et al. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151(3), 653-663.
- Prasanth, K., and Kumary, I. S. (2014). Utilization of male sterility for hybrid seed production in vegetables. *Current Horticulture*, 2(2), 3-14.
- Price, H. L., and Drinkard, A. W. (1908). Inheritance in tomato hybrids. *Molecular and General Genetics MGG*, 1(1), 402-403.
- Prihatna, C., et al. (2018). A novel tomato fusarium wilt tolerance gene. *Frontiers in microbiology*, 9, 1226.
- Puchta, H. (2017). Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. *Current opinion in plant biology*, 36, 1-8.
- Qiu, D., et al. (2007). Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. *Scientia horticulturae*, 112(2), 172-175.
- Quinet, M., Bataille, G., Dobrev, P. I., Capel, C., Gómez, P., Capel, J., ... & Lozano, R. (2014). Transcriptional and hormonal regulation of petal and stamen development by STAMENLESS, the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) orthologue to the B-class APETALA3 gene. *Journal of experimental botany*, 65(9), 2243-2256.
- Rai, A. C., et al. (2013). Engineering drought tolerant tomato plants over-expressing BcZAT12 gene encoding a C2H2 zinc finger transcription factor. *Phytochemistry*, 85, 44-50.
- Raiola, A., et al. (2014). Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. *Mediators of inflammation*, 2014.
- Rashid, R., and Bal, S. S. (2010). Effect of hormones on direct shoot regeneration in hypocotyl explants of tomato. *Notulae Scientia Biologicae*, 2(1), 70-73.
- Rodríguez-Leal, D., et al. (2017). Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell*, 171(2), 470-480. e478.
- Romero, I., et al. (2011). Virus-induced gene silencing in detached tomatoes and biochemical effects of phytoene desaturase gene silencing. *Journal of plant physiology*, 168(10), 1129-1135.
- Rothan, C., et al. (2019). Trait discovery and editing in tomato. *The Plant Journal*, 97(1), 73-90.

- Ruf, S., et al. (2001). Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature biotechnology*, 19(9), 870-875.
- Sadka, A., et al. (2000). Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiologia Plantarum*, 108(3), 255-262.
- Saleh-Gohari, N., and Helleday, T. (2004). Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic acids research*, 32(12), 3683-3688.
- Sander, J. D., et al. (2011). Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nature methods*, 8(1), 67-69.
- Sander, J. D., and Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32(4), 347-355.
- Sapranaukas, R., et al. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 39(21), 9275-9282.
- Scarano, D., et al. (2017). "In Silico identification and annotation of non-coding RNAs by RNA-seq and De Novo assembly of the transcriptome of Tomato Fruits." *PLoS One* 12(2): e0171504.
- Scheben, A., et al. (2017). Towards CRISPR/Cas crops—bringing together genomics and genome editing. *New Phytologist*, 216(3), 682-698.
- Schnarrenberger, C., and Martin, W. (2002). Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. *European Journal of Biochemistry*, 269(3), 868-883.
- Seed, K. D., et al. (2013). A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature*, 494(7438), 489-491.
- Shan, Q., et al. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(8), 686-688.
- Sharma, M. K., et al. (2009). A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. *Journal of biosciences*, 34(3), 423-433.
- Sherkar, H., and Chavan, A. (2014). Studies on callus induction and shoot regeneration in Tomato. *Science Research Reporter*, 4(1), 89-93.
- Shimatani, Z., et al. (2018). Herbicide tolerance-assisted multiplex targeted nucleotide substitution in rice. *Data in brief*, 20, 1325-1331.
- Shrivastav, M., et al. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research*, 18(1), 134-147.
- Singh, H., et al. (2017). Tomato grafting: a global perspective. *HortScience*, 52(10), 1328-1336.
- Stoddard, B. L. (2011). Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure*, 19(1), 7-15.
- Sudha, M., et al. (2006). Economic impact of commercial hybrid seed production in vegetables on farm income, employment and farm welfare—A case of tomato and okra in Karnataka. *Agricultural Economics Research Review*, 19(347-2016-16782), 251-268.
- Sun, X., et al. (2015). Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Scientific reports*, 5(1), 1-10.
- Tanambell, H., et al. (2019). Screening of in vitro health benefits of tangerine tomatoes. *Antioxidants*, 8(7), 230.
- Tashkandi, M., et al. (2018). Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant signaling & behavior*, 13(10), e1525996.

- Tomlinson, L., et al. (2019). Using CRISPR/Cas9 genome editing in tomato to create a gibberellin-responsive dominant dwarf DELLA allele. *Plant biotechnology journal*, 17(1), 132-140.
- Toubiana, D., et al. (2019). "Combined network analysis and machine learning allows the prediction of metabolic pathways from tomato metabolomics data." *Communications biology* 2(1): 1-13.
- Tsutsui, H., and Higashiyama, T. (2017). pKAMA-ITACHI vectors for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology*, 58(1), 46-56.
- Ueta, R., et al. (2017). Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
- Ulusik, S., et al. (2016). Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. *Nature biotechnology*, 34(9), 950-952.
- Veillet, F., et al. (2019). Transgene-free genome editing in tomato and potato plants using agrobacterium-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 402.
- Virmani, S., and Ilyas-Ahmed, M. (2001). Environment-sensitive genic male sterility (EGMS) in crops.
- Voytas, D. F., and Gao, C. (2014). Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges. *PLoS Biol*, 12(6), e1001877.
- Wang, L., et al. (2017). Reduced drought tolerance by CRISPR/Cas9-mediated SIMAPK3 mutagenesis in tomato plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(39), 8674-8682.
- Wang, T., et al. (2018). Tomato DCL2b is required for the biosynthesis of 22-nt small RNAs, the resulting secondary siRNAs, and the host defense against ToMV. *Horticulture research*, 5(1), 1-14.
- Wang, T., et al. (2019). CRISPR technology is revolutionizing the improvement of tomato and other fruit crops. *Horticulture research*, 6(1), 1-13.
- Wang, Y.-M., et al. (2016). Molecular Evolution and Expression Divergence of the Aconitase (ACO) Gene Family in Land Plants. *Frontiers in plant science*, 7, 1879.
- Wang, Y., et al. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature biotechnology*, 32(9), 947-951.
- Wang, Z., et al. (2018). A novel DCL2-dependent miRNA pathway in tomato affects susceptibility to RNA viruses. *Genes & development*, 32(17-18), 1155-1160.
- Waters, C. A., et al. (2014). The fidelity of the ligation step determines how ends are resolved during nonhomologous end joining. *Nature communications*, 5(1), 1-11.
- Wayase, U., and Shitole, M. (2014). Effect of plant growth regulators on organogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Dhanashri. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 20(2), 65.
- Wilson, Z. A., et al. (2011). The final split: the regulation of anther dehiscence. *Journal of experimental botany*, 62(5), 1633-1649.
- Wold, M. S. (1997). Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual review of biochemistry*, 66(1), 61-92.
- Wolter, F., and Puchta, H. (2017). Knocking out consumer concerns and regulator's rules: efficient use of CRISPR/Cas ribonucleoprotein complexes for genome editing in cereals. *Genome biology*, 18(1), 1-3.

- Wu, Z., et al. (2011). Establishment of regeneration and transformation system of *Lycopersicon esculentum* microtom. *Biotechnology Journal International*, 53-60.
- Xu, W., et al. (2019). Multiplex nucleotide editing by high-fidelity Cas9 variants with improved efficiency in rice. *BMC plant biology*, 19(1), 1-10.
- Xu, X., et al. (2020). CRISPR/Cas derivatives as novel gene modulating tools: possibilities and in vivo applications. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3038.
- Yarra, R., et al. (2012). Overexpression of a wheat Na⁺/H⁺ antiporter gene (TaNHX2) enhances tolerance to salt stress in transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 111(1), 49-57.
- Ye, J., et al. (2017). An InDel in the promoter of Al-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER9 selected during tomato domestication determines fruit malate contents and aluminum tolerance. *The Plant Cell*, 29(9), 2249-2268.
- Yin, K., and Qiu, J.-L. (2019). Genome editing for plant disease resistance: applications and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1767), 20180322.
- Yin, Y., et al. (2018). BZR1 transcription factor regulates heat stress tolerance through FERONIA receptor-like kinase-mediated reactive oxygen species signaling in tomato. *Plant and cell physiology*, 59(11), 2239-2254.
- Yoon, Y.-J., et al. (2020). Genome Editing of eIF4E1 in Tomato Confers Resistance to Pepper Mottle Virus. *Frontiers in plant science*, 11, 1098.
- Yu, Q.-h., et al. (2017). CRISPR/Cas9-induced targeted mutagenesis and gene replacement to generate long-shelf life tomato lines. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
- Zhang, D., et al. (2018). Construction of a multicontrol sterility system for a maize male-sterile line and hybrid seed production based on the ZmMs7 gene encoding a PHD-finger transcription factor. *Plant biotechnology journal*, 16(2), 459-471.
- Zhang, D., et al. (2020). CRISPR/Cas: a powerful tool for gene function study and crop improvement. *Journal of Advanced Research*.
- Zhang, F., et al. (2010). High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 12028-12033.
- Zhang, S., et al. (2018). Knockout of SIMAPK3 reduced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(34), 8949-8956.
- Zhang, S., et al. (2018). Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. *BMC plant biology*, 18(1), 1-12.
- Zhang, W., et al. (2012). Factors affecting regeneration of tomato cotyledons. *Bioscience Methods*, 3.
- Zheng, Z., et al. (2016). Genome-wide study of the tomato SIMLO gene family and its functional characterization in response to the powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici*. *Frontiers in plant science*, 7, 380.
- Zhou, F., et al. (2008). High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant biotechnology journal*, 6(9), 897-913.

- Zhou, H., et al. (2016). Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 editing system. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Zhou, R., et al. (2019). Physiological response of tomatoes at drought, heat and their combination followed by recovery. *Physiologia Plantarum*, 165(2), 144-154.
- Zouine, M., et al. (2017). "TomExpress, a unified tomato RNA-Seq platform for visualization of expression data, clustering and correlation networks." *The Plant Journal* 92(4): 727-735.



EK-1 BİTKİ MATARYELLERİNİN ÖZELLİKLERİ

Bobcat

ÜRÜN: DOMATES



Segment:	OTURAK DOMATES
Üretim Tipi:	Açık Tarla
Tüketim Şekli:	Taze
Erkencilik:	Orta erkenci
Yetiştirme Dönemi:	İlkbahar, yaz
Renk:	Kırmızı

Verim, güçlü bitki ve kapama

- Yüksek verimli bir çeşittir
- Albenisi yüksek sert meyvelerinin rengi kırmızıdır
- Meyveleri uiform yapıdadır ve yeşil omuz görülmez
- İklim geçişlerine adaptasyon kabiliyeti yüksektir
- Nakliye dayanaklı meyvelerinin raf ömrü yüksektir
- Bitki kapaması çok iyidir, meyvelerini güneşten korur

Bobcat çeşidinin özellikleri (<https://www.syngenta.com.tr/Bobcat>)

CROCKER

ÜRÜN: DOMATES



Segment:	SIRIK SALKIM DOMATES
Üretim Tipi:	Sera
Tüketim Şekli:	Taze
Erkencilik:	Erkenci
Yetiştirme Dönemi:	İlkbahar - Yaz
Renk:	Kırmızı

En gösterişli salkım!
Güçlü ve açık bitki yapısına sahip, boğum arası kısa bir çeşittir.
Tepe devamlılığı çok iyidir.
Mart-Nisan-Mayıs dikimlerine uygun erkenci bir çeşittir.
İklim geçişlerine ve yüksek sıcaklıklara adaptasyon kabiliyeti yüksektir.
Üretim boyunca salkım yapısını bozmaz, meyve dökülmesine karşı toleransı çok yüksektir.
Orta sertlikteki meyvelerinin çatlama karşı toleransı çok yüksektir.
Meyvelerinde yeşil omuz görülmez.
Kaliks yapısı ve parlak kırmızı meyve rengi sayesinde albenisi çok yüksek kaliteli meyveye sahiptir.
Meyve şekli yuvarlak olup, irilik ve şekil standardı yüksektir.
Bir salkım ortalama 750-900 gr, tane meyvesi ise ort. 115-120 gr'dır

Crocker çeşidinin özellikleri (<https://www.syngenta.com.tr/Crocker>)

EK-2 BESİ ORTAMLARININ HAZIRLANIŞI VE BİLEŞENLERİ

Liquid Media

Luria Broth (LB) g/L (himedia)

Luria Broth 25
121 °C’de 15 dk otoklavda sterilizasyon.

MS Media gr/L (Duchefa)

MS 4.4
Sükroz 30
pH 5.8’e 1M NaOH ile ayarlanır 121 °C’de 20 dk otoklavda sterilizasyon yapılır.

SOC Media

Yeast extract 5
Tryptone 20
NaCl 0.584
KCl 0.186
MgSO₄ 2.4
pH 7.5’e 1M NaOH ile ayarlanır ve 121 °C’de 20 dk otoklavda sterilizasyon yapılır. Otoklavdan sonra 20 ml %20’lik filtre ile steril edilen glukoz eklenir.

Hoagland Solutions

Macronutrientler	Stok solusyon (g/L)	Stok
solüsyondan alınan (ml/L)		
1 M KNO ₃	101.11	3
1 M NH ₄ H ₂ PO ₄	115.03	0.5
1 M Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236.15	2
1 M MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.48	1
0.5% (w/v) Fe-EDTA	5.00	0.5

Micronutrientler

Stok solüsyondan alınan (ml/L)	Stok solusyon (g/L)	
H ₃ BO ₃	2.86	1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81	1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22	1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.051	1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.09	1
pH 5.8’e 1M NaOH ile ayarlanır 121 °C’de 20 dk otoklavda sterilizasyon yapılır. Otoklavdan sonra filtre sterilizasyonu yapılan Fe-EDTA eklenir.		

Solid Media

LB Agar g/l (himedia)

Luria Broth 25

Agar 15

121 °C’de 15 dk otoklavda sterilizasyon.

MS Media gr/L (Duchefa)

MS 4.4

Sükroz 30

Phytigel 2.8

pH 5.8’e 1M NaOH ile ayarlanır 121 °C’de 20 dk otoklavda sterilizasyon yapılır.

EK-3 TAMPONLAR VE SOLÜSYONLAR

Agaroz Jel Elektroforez

Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) (50 X)

Tris Base	242 g
Glacial Acetic Acid	57.1 ml
EDTA (0.4 M, pH 8.0)	125 ml
Distilled water added to	1000 ml

Loading Buffer (6X)

Bromophenol blue	0.25 %
Xylene cyanol FF	0.25 %
Sucrose in water	40 %

Ethidium Bromide Solution

Ethidium Bromide (10 mg/ml)	100 µl/l
TAE Buffer (1X)	1 l

Rekombinant Kolonilerin Seçimi

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)

X-Gal	20 mg
Dimethylformamide	1 ml
Solüsyon -20 °C’de saklanır ve ışıktan korunur.	

IPTG (Isopropyl--D-thiogalactoside)

IPTG	100 mg
dH ₂ O	1 ml
Solüsyon filtre ile steril edilerek -20 °C’de saklanır.	

Kompetan *E. coli* Hücrelerin Hazırlanmasında Kullanılan Tamponlar

Buffer 1

Potassium acetate	30 mM
RuCl ₂	100 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerol (87 %)	8.6 ml
The volume was completed to 50 ml with dH ₂ O and filter sterilized.	

Buffer 2

MOPS	10 mM
RuCl ₂	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerol (87 %)	8.6 ml
Adjusted pH 6.5 with 0.2 M KOH. The volume was completed to 50 ml with dH ₂ O and filter sterilized.	

EK-4 KİMYASAL, ENZİMLER ve ANTİBİYOTİKLER

DNA Markörler

O'GeneRuler 100 bp DNA ladder	Thermo fisher
O'GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder	Thermo fisher

Kitler

Plasmid isolation Kit (Midi)	Macherey- Nagel
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey- Nagel
RNeasy mini isolation kit	Qiagen
RNA protect solution	Qiagen
RNAase Free DNAase set	Qiagen
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Biorad
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Biorad
FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Ki	Favorgen
pGEM-T easy cloning kit	Promega

Enzimler

Lysozyme	Sigma
Proteinase K	Sigma
RNAase A	Sigma
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher
EcoRI	Thermo Fisher
HindIII	Thermo Fisher
AarI	Thermo Fisher
T4 Polynucleotid Kinase	Thermo Fisher
Taq polymerase	Takara
Phusion DNA polymerase	Thermo Fisher
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	NEB (Biolab)
T4 DNA ligase	Thermo Fisher

Kimyasallar

Agar	HiMedia
Agaroz	Sigma
Amonyum persülfat	Sigma
Amonyum sülfat	Sigma
Ampisilin	Sigma
Borik asit	Merck
Bovine serum albumin	Sigma

Bromophenol blue	Sigma
β -merkapt ethanol	Sigma
CaCO ₃	Sigma
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Sigma
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sigma
DMSO	Merck
Dimethylformamide	Sigma
Etanol	Merck
Etidyum Bromür	Sigma
Fe ₂ (SO ₄) ₃	Sigma
Fenol-Kloroform	Ambresco
Glasiyal Asetik Asit	Merck
Gliserol	Sigma
Glukoz	Merck
HCl	Sigma
H ₂ SO ₄	Merck
IPTG	Sigma
İzoamilalkol	AppliChem
İzopropanol	Merck
Kanamisin	Sigma
KCl	Merck
Kloroform	Merck
KNO ₃	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
Lizozim	Sigma
Luria Broth	Sigma
Mannitol	Merck
Metanol	Sigma
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma
MOPS	Sigma
MnCl ₂ .4H ₂ O	Merck
Murashige Skoog	Duchefa
NaCl	Merck
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Sigma
NaNO ₃	Sigma
NaOH	Merck
NH ₄ Cl	Sigma
NH ₄ H ₂ PO ₄	Sigma
Potasyum asetat	Merck
Phytigel	Sigma
RuCl ₂	Sigma
SDS	Merck
Sodyum asetat	Merck
Sodyum sitrat	Merck
Sükroz	Merck
Tris-HCl	Merck
Tryptone	Sigma
X-Gal	Sigma

Xylene cyanol FF
Yeast extract
ZnSO₄.7H₂O

Sigma
Merck
Merck

Antibiyotik ve Hormon stok solüsyonlarının hazırlanması

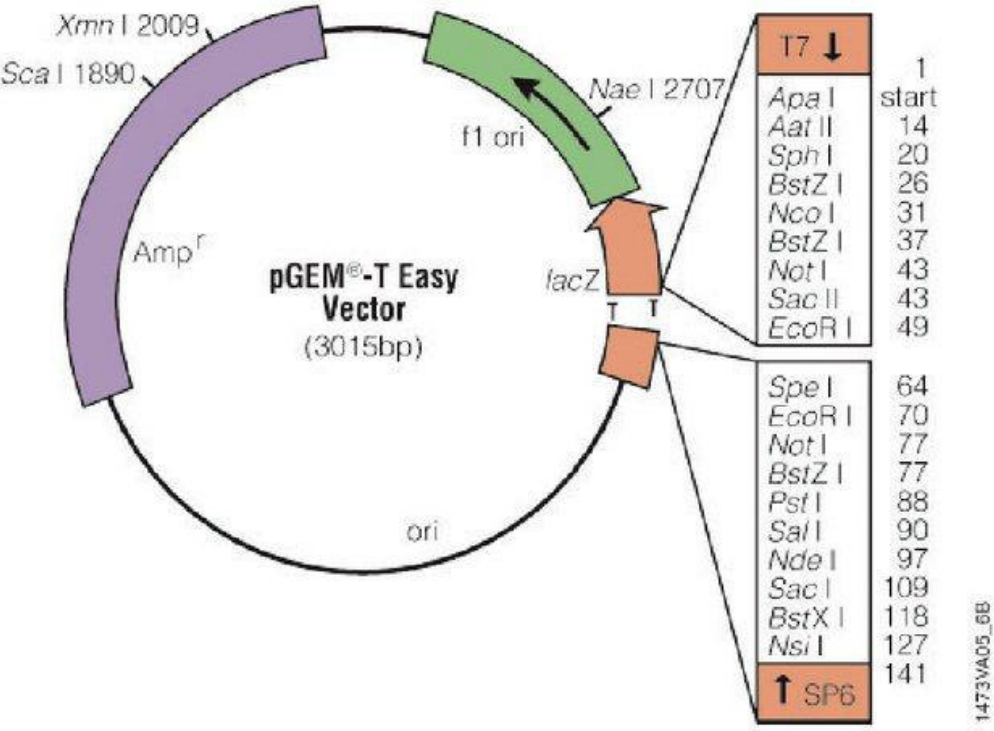
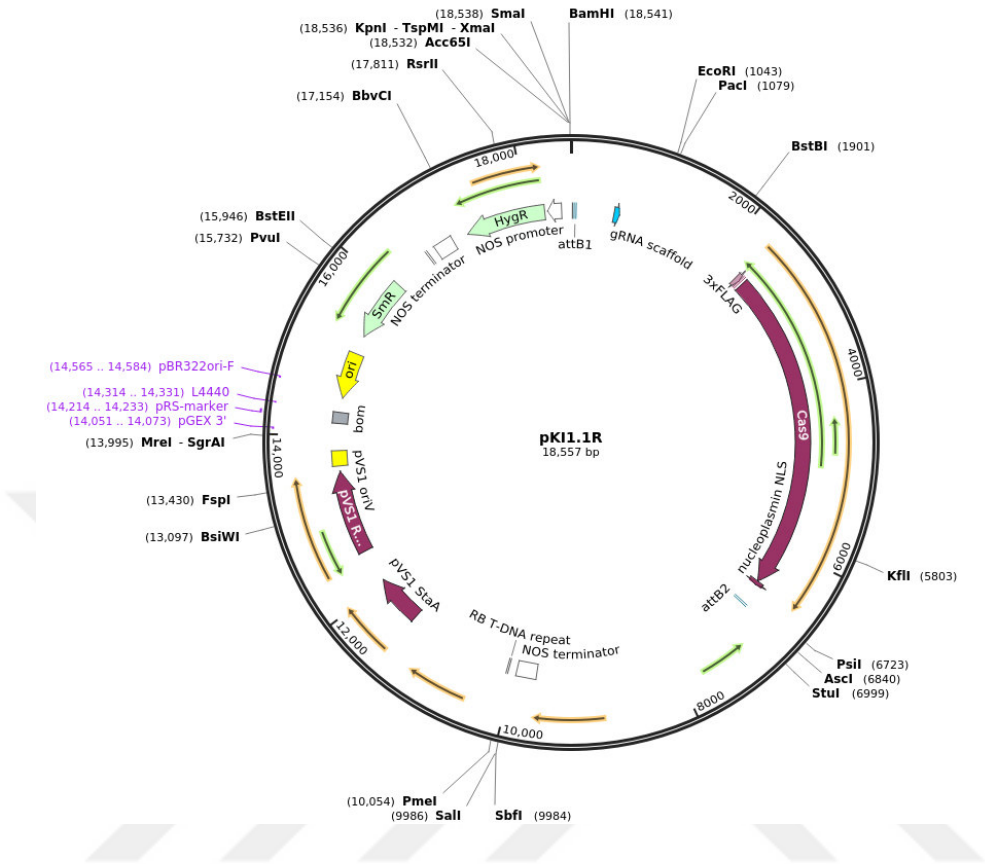
Antibiyotik Adı	Stok Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon	Marka Katolog Numarası
Ampicillin sodium salt,	100 mg/ ml dH ₂ O	100 µg/ml	Sigma- A9518
Kanamycin Sulfate	50 mg/ml dH ₂ O	25 or 50 µg/ml	Biobasic KB0286
Spectinomycin, Dihydrochloride	100 mg/ml ethanol	100 µg/ml	PhytotechLab S742
Gentamycin Sulfate	30 mg/ml dH ₂ O	30 µg/ml	Biobasic GB0217
Carbenicillin disodium salt	100 mg/ml dH ₂ O	100 µg/ml	PhytotechLab C346
Rifampicin	10 mg/ml DMSO	100, µg/ml	PhytotechLab R501
Timentin	160 mg/ml dH ₂ O	160 µg /ml	Plant Media 42010012-5
Hygromycin B	10 mg/ml H ₂ O	-	PhytotechLab H397
Cefotaxime	500 mg/ml ethanol	500 µg/ml	PhytotechLab C380
Indole-3-Acetic Acid (IAA)	2 mg/ml KOH or Ethanole	-	PhytotechLab I885
6-Benzylaminopurine (BA)	2 mg/ml H ₂ O	-	Sigma B3408-5G
Kinetin	2 mg/ml H ₂ O	-	Sigma K3378-25G

EK-5 PRİMER LİSTESİ

Primer Name	Sequence 5'-3'	PCR Ürünü
Acos Tomato Seq F	CACTTTCCGATCGCTGAGGT	1059 bp
Acos Tomato Seq R	AAGCAGTGGAGCAAGTCATTT	
PDS Tomato Seq F	ACTGTGAAATATCCTTATGGCAGG	506 bp
PDS Tomato Seq R	CCGGAATATCACCTGCACCA	
<i>hptII</i> F (higromisin)	CGAAAAGTTTCGACAGCGTC	450 bp
<i>hptII</i> R (higromisin)	GGTGTCGTCCATCACAGTTTG	
<i>SLUBI-F</i> (QPCR)	CCAAGATCCAGGACAAGGAA	186 bp
<i>SLUBI-R</i> (QPCR)	AAGCCTCTGAACCTTTCCAG	
TomatAcoQPCR-F	TCGCTGAGGTGGAGATACGGTGT	84 bp
TomatAcoQPCR-R	AACAGGGGTAAACGGCGGCAG	
M13 F seq primer (-20)	GTAAAACGACGGCCAGT	-
M13 R seq primer (-20)	GTTTTCCTCAGTCACGAC	

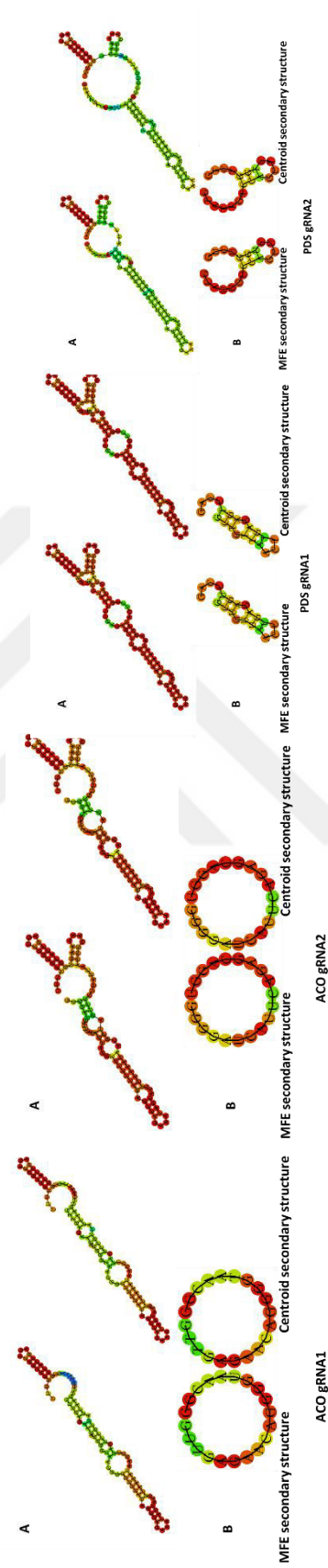
EK-6 PLAZMİT BİLGİSİ

Created with SnapGene®



EK-7 gRNA ÖZELLİKLERİ

gRNA adı	On-Score	Micro-Score	% GC	Region	Off-Target	17. N (A/T)	RNA free enerji kcal/mol	TSL	GSL	CBP	TBP	IBP
ACO gRNA1	0,7728	55.26	55	Exon1	0	A	0	2	0	5	14	0
ACO gRNA2	0.2230	67.36	55	Exon2	0	A	0	3	0	4	8	0
PDS gRNA1	0.4570	69.83	45	Exon2	0	T	-1.30	3	0	4	10	0
PDS gRNA2	0.168	68.26	50	Exon3	0	G	-1.0	3	0	8	14	0



EK-8 SANGER SEKANS SONUÇLARI

>PDS gRNA1 + pKI1.1R plasmid_sample_

GCTCGCGGCCGCTCGTTGACACGGAACTCGACTTGCCCTCCGCACAATACATCATTTCTTCTTAGCTTTTTTCTTCTTCTCGTTCATACAGT
TTTTTTTTGTTTATCAGCTTACATTTCTTGAACCGTAGCTTTCGTTTTCTTCTTTTAACTTTCCATTCCGAGTTTTGTATCTTGTTTCATAGTT
TGTCCAGGATTAGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTTCATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAA
GGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCCATTTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAAAAC
AATCTTCAAAAGTCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTG **ATTGGCTGTTAACTTGA**
GAGTCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGAGTCGGTGCTTTTTTTTT
TTGCGGCCGCGATCCCTCAACTTTTGATTGCTATTTGCAGTGCACCTGTGGCGTTCATCACATCTTTGTGACACTGTTGCACTGGTCATTG
CTATTACAAAGGACCTTCCTGATGTTGAAGGAGATCGAAAGTAAGTAAGTGCACGCATAACCATTTTCTTCCGCTCTTTGGCTCAATCCATT
TGACAGTCAAAGACAATGTTTAACCAAGCTCCGTTTGATATATTGTCTTTATGTGTTTGTTCGAAGCATGTTTAGTTAATCATGCCTTTGATTGAT
CTTGAATAGGTTCCAAATATCAACCTGGCAACAAAACCTGGAGTGAGAAACATTGCATTCTCGGTTCTGGACTCTGCTAGTAAATTATGT
TTCAGCCATATCACTAGCTTTCTACATGCCTCAGGTGAATTCATCTATTTCCGTTCTTAACATTTTCGGTTAATTAAAGCACGAACACCATTACT
GCATGTTGAAAGCTTGATAAACTATCGCCACCAATTTATTTTTGTTGAA

>PDS gRNA2 + pKI1.1R plasmid_sample_

AGGCTCGCGGCCGCTCGTTGACACGGAACTCGACTTGCCCTCCGCACAATACATCATTTCTTCTTAGCTTTTTTCTTCTTCTCGTTCATACA
GTTTTTTTTGTTTATCAGCTTACATTTCTTGAACCGTAGCTTTCGTTTTCTTCTTTTAACTTTCCATTCCGAGTTTTGTATCTTGTTTCATAG
TTTGTCCAGGATTAGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTTCA TTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAA
AAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCCATTTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAAA
ACAATCTTCAAAAGTCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTG **ATTGGTATTGTCCAG**
CTCTGGTCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGAGTCGGTGCTTTTTTT
TTTTGCGGCCGCGATCCCTCAACTTTTGATTGCTATTTGCAGTGCACCTGTGGCGTTCATCACATCTTTGTGACACTGTTTGCACTGGTCAT
TGCTATTACAAAGGACCTTCTGATGTTGAAGGAGATCGAAAGTAAGTAAGTGCACGCATAACCATTTTCTTCCGCTCTTTGGCTCAATCCA
TTTGACAGTCAAAGACAATGTTTAACCAAGCTCCGTTTGATATATTGTCTTTATGTGTTTGTTCGAAGCATGTTTAGTTAATCATGCCTTTGATTG
ATCTTGAATAGGTTCCAAATATCAACCTGGCAACAAAACCTGGAGTGAGAAACATTGCATTCTCGGTTCTGGACTCTGCTAGTAAATTAT
GTTTCAGCCATATCACTAGCTTTCTACATGCCTCAGGTGAATTCATCTATTTCCGTTCTTAACATTTTCGGTTAATTAAAGCACGAACCCCATTA
CTGCATGTAGAAGCTTGATAAACTATCGCCACCAATTTATTTTTGTTGCGAAATGTTACTTTCTCAGTATGCAGCTTTGAAAAGAACAAAA

>ACO gRNA1 + pKI1.1R plasmid_sample_

GGCCCCGCGGCCGCTCGTTGACACGGAACTCGACTTGCCCTCCGCACAATACATCATTTCTTCTTACCTTTTTTCTTCTTCTCGTTCATAC
AGTTTTTTTTGTTTATCAGCTTACATTTCTTGAACCGTAGCTTTCGTTTTCTTCTTTTAACTTTCCATTCCGAGTTTTGTATCTTGTTTCATA
GTTTGTCCAGGATTAGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTTCATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAA
AAAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCCATTTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAA
ACAATCTTCAAAAGTCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTG **ATTGGTTGAGAAACA**
GGGGTAACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGAGTCGGTGCTTTTT
TTTTTTCGGGCCGCGATCCCTCAACTTTTGATTGCTATTTGCACTGCACCCTAT

>ACO gRNA2 + pKI1.1R plasmid_sample_

CTCCGCGGCGCTCGTTGACAACGGAACTCGACTTGCCCTCCGCACAATACATCATTTCTTCTTAGCTTTTTTCTTCTTCTCGTTCATACAGT
TTTTTTTTGTTTATCAGCTTACATTTCTTGAACCGTAGCTTTCGTTTTCTTCTTTTAACTTTCCATTCCGAGTTTTGTATCTTGTTTCATAGTT
TGTCCAGGATTAGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTTCATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAA
GGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCCATTTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAAAAC
AATCTTCAAAAGTCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTG **ATTGGGGATCATTAG**
AGCAGGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGAGTCGGTGCTTTTTTTTT
TTGCGGCCGCGATCCCTCAACTTTTGATTGCTATTTGCAGTGCACCTGTGGCGTTCATCACATCTTTGTGACACTGTTTGCACTGGTCATTG
CTATTACAAAGGACCTTCTGATGTTGAAGGAGATCGAAAGTAAGTAAGTGCACGCATAACCATTTTCTTCCGCTCTTTGGCTCAATCCATT
TGACAGTCAAAGACAATGTTTAACCAAGCTCCGTTTGATATATTGTCTTTATGTGTTTGTTCGAAGCATGTTTAGTTAATCATGCCTTTGATTGAT
CTTGAATAGGTTCCAAATATCAACCTGGCAACAAAACCTGGAGTGAGAAACATTGCATTCTCGGTTCTGGACTTCTGCTAGTAAATTATGT
TTCAGCCATATCACTAGCTTTCTACATGCCTCAGGTGAATTCATCTATTTCCGTTCTTAACATTTTCGGTTAATTAAAGCACGACACCATTACTG
CATGTAAGAGCTTGATAAACTATCCCCACCATTTATTTTTGGTGCAAAATGGGTAATTTCTAAGTATGCAGCTTTGAAAT

EK-9 DOMATES ACO PROTEİN ÖZELLİKLERİ

Transcript ID	Gene Name	Chromosome	Locations Start	end	Strand	CDS (bp)	Protein length (A.A.)	Protein Molecular Weight (kDa)	pI	GRAVY	No of Intron/Exon	Subcellular localization
Solydc03g005730.2	SIACO-1	3	509260	517653	Reverse	2946	981	107,154	6,52	-0,16	14:15	Cytoplasmic
Solydc07g052350.2	SIACO-2	7	60857014	60865452	Forward	2988	995	108,201	7,29	-0,178	19:20	Cytoplasmic
Solydc09g090900.2	SIACO-3	9	70308264	70313045	Forward	1518	505	55,388	6,61	-0,221	14:15	Cytoplasmic
Solydc12g005860.1	SIACO-4	12	509260	517653	Reverse	1530	509	55,276	7,02	-0,223	19:20	Cytoplasmic

EK-10 DOMATES ACO PROTEIN SEKANSLARI

>Solyc03g005730.2

MAASSAIASSSTTFINKKDVGLSAFSSQASFSVQTARKRISKRIVSVMTQPQTERKPATTGTSVKTGMTMT
EKILAKASDKPDVSPGDNVWVNVVDVLMTHDVCGPSIGIFKKEFGQNAKVWDREKLVIIPDHYIFTTDE
RANRNVLDILRDFCNEQNIKYFYDIKDLGNFRANPDYKGVCHVALAQEGHCRPGEVLLGTDSTCTAGA
FGQFATGIGNTDAGFVLGTGKILLKVPPTLRFVMDGEMPDYLLAKDLILQIIGEISVAGATYKAMEFVGT
TVESLTMEERMTLCNMVVEAGGKNGVIPADKTTYDYLEGRTSVPYEPVYSDEGARYLKEYRFDVSKLE
PLVAKPHSPDNRALARECKDVKIDRVYIGSCTGGKTEDFMAAAKVFLASGKKVKVPTFLVPATQKVWM
DVYSLPVPGSGGKTCSQIFEEAGCDTPASPCGACLGPKDITYARMNEAQVCVSTTNRNFPGRMGHKE
GQIYLASPYTAAASALTGYVTDPREFLQ

>Solyc07g052350.2

MYSNTARKYSSSAASSLLRASSSVTRPLASTSTAHAAPCRAGAASGNQQRYSSTLRSLRCSVPRWSHG
DWKSPISLTAQIRTAAPALNGFHRKLATMAAENPFKGILTGLPKPGGGEFGKFYSPALNDPRIDKLPYSIR
ILLESAIRNCDNFQVKKEDVEKIIDWENSAPKLVEIPFKPARVLLQDFTGVPVVDLACMRDAMNNLGS
DSDKINPLVPVDLVIDHSVQVDVTRSENAVQANMELEFQRNKERFAFLKWGSNAFQNMMLVPPGSGIV
HQVNLEYLGRVVFNREGLLYPDSVVGTDSTTMDGLGVAGWGVGGIEAEAAMLGQPMMSVLPVGVG
FKLSGNLRNGVTATDLVLTVTQMLRKHGTVGKFEVYFEGMSGLSLADRATIANMAPEYGATMGFFP
VDHVTLQYLKLTGRSDETVGMVESYLRANMFVDYKEPQQEKVYSSYLNLDLADVEPCLSGPKRPHD
RVPLKEMKSDWHACLDNKVGFKGFAVPKEVQDKVAKFSFHGQPAELKHGSVIAAITSCTNTSNPSVM
LGAALVAKKASELGLHVKPWVKTSAPGSGVVTKYLLKSGLQKYLNQGFNIVGYGCTTCIGNSGDLD
ESVASAISENDIVAAAVLSGNRNFEGRVHALTRANYLASPLVAYALAGTVDIDFEKDPIGVGKDGKD
VYFRDIWPSTEEIAEVVQSSVLPDMFKSTYEAITKGNTMWNELSVPTTKLYQWDPKSTYIHEPPYFKGM
TMDPPGPHGVKDAYCLLNFGDSITTDHISPAGSIHKDSPAARYLMERGVDRRDFNSYGSRRGNDEIMAR
GTFANIRLVNKLNGEVGPKTVHIPSGEKLVSFDAAMKYKSAGQSTIILAGAEYGSRSSRDWAAKGPM
LGVKAVIAKSFERIHRNLVGMGIVPLCFKAGEDADTLGLTGQERYTIDL PENISEIRPGQDVTVQTDTGK
SFTCVVRFDTEVELAYFNHGGILQYVIRQLTKQ

>Solyc09g090900.2

MASFSTSTYCLSKNVVFLSDFSPLNQFPTQSPRRRFSKKIVSMITQPSSRMPATTGTSVKSWMTMTEKLL
ARTSEKLHVVPGENLWVNVVDVLMTNDITGPGAIGVFKREFGENAKVWDREKVVVIPDHYIFTADERAN
RNVDTLRDFCNEQNIKYFYDIKDLGNFQANPDYKGVCHIALAQEGHCRPGEVLLGTDSTCTAGAFGQ
FASGIGNTDAGFVLGTGKILLKVPPTIRFVLDGEIPNYILAKDLILQVIGEISVAGATYKTMEFVGTAVESL
TMEERMTLCNMVIEAGGKNGVIPADKTTYDYLDKDTTVHYEPVYSDEQARFLAKYHFDISKLEPLVAK
PHSPGNRALARECEDVKIDRVYIGSCTGGKTEDFMAAAKVFLASGKKVKVPTFLVPATQKVWMDLYTI
PVPSGGKTCSQIFEDAGCDTPASPCGACMGGPRDTHARLNEPQVCVSTTNRNFPGRMGHKEGQIYLA
SPYTAAASALTGHVTDPRDFLQ

>Solyc12g005860.1

MYVSSSVHIKPNFFTSFPVSKSLSKSTGAYCSSGYSSLSFSSTFRSLRWRYGVDWKSPISLTSQIRTAAVTP
VLNNFRRLTTPMASGNPFKGILTSPLPKPGGGEFGKYSLPALNDPRIDKLPYSIRILLESAIRNCDNFQVK
KEDVEKIIDWENTSPKLAIEIPFKPARVLLQDFTGVPVVDLACMRDAMNKLGSNADKINPLVPVDLVID
HSVQVDVARSENAVQANMELEFQRNKERFAFLKWGSNAFRNMLVPPGSGIVHQVNLEYLGRVVFNR
EGLLYPDSVVGTDSTTMDGLGVAGWGVGGIEAEATMLGQPMMSVLPVGVGFKLSGKLRSGVTATD
LVLTVTQMLRKHGTVGKFEVYGDGMGELSADRATIANMSPEYGATMGFFPVDHVTQYLKLTGRS
DETVMIEAYLRANMFVDYNEPQHEKVYSSCLYLDLAEVEPCVSGPKRPHDRVPLKEMKSDWHSCLD
NKVGFKGFAVPKDAQEKVVKFSFHGQHAELKHGSVIAAITSCTNTSNPSVMLGAALVAKKACDLGLN
VKPWVKTSAPGSGVVTKYLLQSGLQKYLNEQGFNIVGYGCTTCIGNSGDLDESVS AISENDIVAAV
LSGNRNFEGRVHPLTRANYLASPLVAYALAGTVDIDFDEKPIGVGKDGNSVYFRDIWPSTEEIAEVVQ
SSVLPDMFKSTYEAITKGNNMWNQLSVPATSLYSWDTSSYIHEPPYFKDMTMDPPGPHGVKDAYCLL
NFGDSITTDHISPAGSIHKDSPAAYLNERGVDRRDFNSYGSRRGNDEIMARGTFANIRIVNKLNGEVG
PKTIHIPSGEKLVSFDAAMKYKSAGQDTIILAGAEYGSRSSRDWAAKGPMLLGVKAVIAKSFERIHRNL
VGMGIVPLCFKAGEDADSLGLTGHERYTIDL PENISEIRPGQDVTVQTDTGKSFTCVVRFDTEVELAYFN
HGGILPYVIRQLSQQ

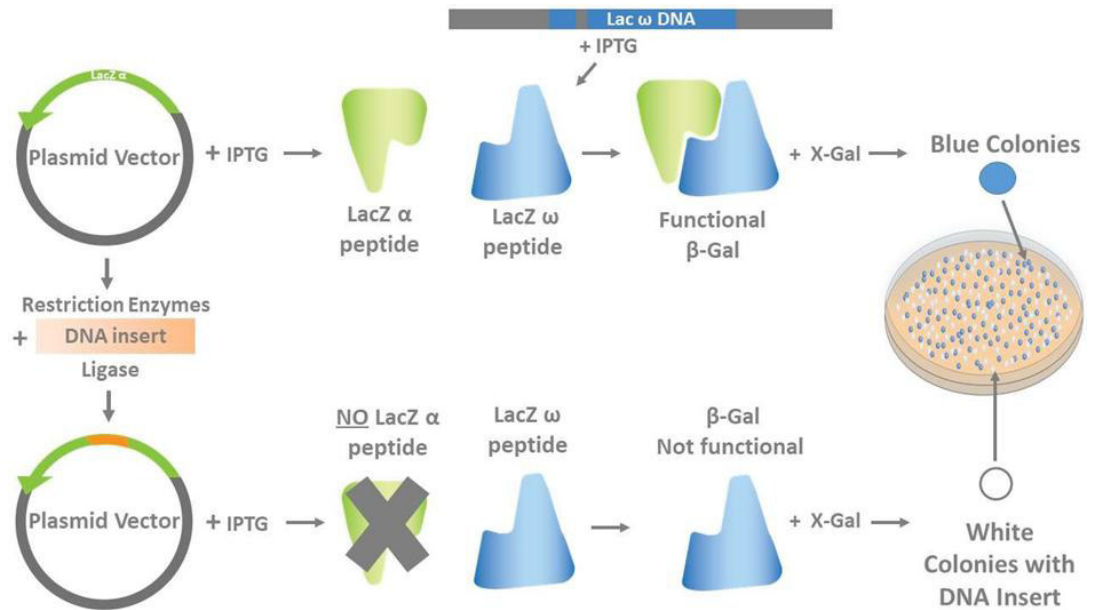
EK-11 BAKTERİ KOLONİLERİN MAVİ-BEYAZ TARANMASI

X-Gal ve IPTG Petrilerini Kullanımı

Bakteri kolonilerinin mavi-beyaz seçilimi, klonlama deneylerinde rekombinant bakterileri tespit etmek için sıklıkla kullanılan popüler ve etkili bir moleküler biyoloji aracıdır. Bu tekniğin esasında, glikoz ve galaktoz oluşturmak için laktozu metabolize eden *E. coli*'deki lacZ α geni tarafından kodlanan tetramerik bir enzim olan β -galaktosidazın enzimatik aktivitesi yer alır. Alternatif olarak, β -galaktosidaz farklı bir substrat olan X-Gal'i hidrolize ederek mavi bir pigment oluşturmak üzere dimerize olan 5-bromo-4-kloro-indoksil ile sonuçlanır.

α -tamamlama olayı, β -galaktosidazı güçlü bir moleküler klonlama aracı haline getirmiştir. α -tamamlamada, bakterilerde lacZ ω geninin spesifik bir fragmanının silinmesi, aktif olmayan bir β -galaktosidaz ile sonuçlanan silinen fragmanı içeren bir plazmidin varlığıyla anlaşılır. Klonlamada, rutin olarak kullanılan plazmitler, lacZ α geninin bir bölümünü içerirken, *E. coli* konakçı suşu, bir lacZ ω delesyon mutasyonu içerir. Bu nedenle, transformasyon sırasında, delesyon içeren bakteriler, silinmiş lacZ α segmentini içeren plazmidi aldığında, fonksiyonel β -galaktosidaz üretilir. Bununla birlikte, bakteri tarafından alınan plazmit, lacZ α gen segmentini bozan bir DNA parçası (klonlama işlemi sırasında restriksiyon bölgeleri kullanılarak plazmide bağlanan ilgili DNA) taşıyorsa, rekombinant bakteriler oluşur. Daha sonra, alfa tamamlama gerçekleşemez ve işlevsel bir β -galaktosidaz oluşmaz.

Transformasyondan sonra mavi-beyaz koloni seleksiyonu gerçekleştirmek için, lacZ ω gen ekspresyonunun bir indükleyicisi olan İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid (IPTG) ile birlikte X-Gal eklenir. Mavi koloniler, fonksiyonel β -galaktosidaz içeren bakterilerdir ve bu da transformasyon sırasında alınan plazmidin ilgili DNA'yı içermediğini gösterir. Aksine, beyaz koloniler, eklenen rekombinant DNA'yı taşıyan plazmidi alıp lacZ α genini bozduktan sonra fonksiyonel β -galaktosidaz üretmediklerinden, mavi rengi üretmek için X-Gal'i metabolize edemezler. Bu beyaz koloniler rekombinant bakterileri içermektedir. (Şekil 1).



Gerekli Kimyasallar ve Malzemeler

- X-Gal (GoldBio Katalog # X4281C)
- Dimethylformamide (DMF)
- dH₂O
- Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG (GoldBio Katalog # I2481CE)
- Seleksiyon için uygun antibiyotik
- Agar besiyeri (isteğe bağlı)
- Petri kapları

20 mg/ml X-Gal Stok Çözeltisinin hazırlanışı

1. 15 ml polipropilen santrifüj tüpüne 200 mg X-Gal [CAS 7240-90-6, mw. = 408.63 g / mol]) tartılır.
2. 10 mL Dimetilformamid (DMF) eklenir ve X-Gal'i çözmek için vortekslenir.
3. -20 ° C'de saklanır. Işıktan korumak için santrifüj tüpünü alüminyum folyo ile sarılmalıdır. .

Not: X-Gal solüsyonu, uygun şekilde kullanılmadığı sürece 6-12 ay stabildir. X-Gal solüsyonunun sık sık küçük ölçekli kullanımı olacaksa, bozunmayı en aza indirmek için solüsyondan 1 ml parçalar şeklinde yapılmalıdır.

IPTG - 100mM (100X) Stok Çözeltisi

1. 0,238 g IPTG'yi tartılır [CAS 367-93-1, mw. = 238,3 g / mol]).
2. 10 ml steril H₂O eklenerek Tamamen çözülür.
3. IPTG Stoğunu 0,22 μ m filtreden geçirerek steril edilir.
5. 1 ml'lik kısımlar halinde -20 ° C'de 1 yıla kadar saklanabilir.

1. Yöntem

1. Seçici antibiyotik içeren otoklavlanmış büyüme ortamını petri kaplarına dökülür ve steril kabin içinde donmaya bırakılır.
2. Her petrinin yüzeyine 40 μ l 100 mM IPTG ve 120 μ l X-Gal (20 mg/ml) eklenir ve tüm yüzeye yayılır.

Not: Petri kenarlarının eşit şekilde yayılması zordur ve yanlış pozitifler verebilir. En iyi sonuçlar için mümkünse plakanın ortasındaki koloniler seçilmelidir.

3. X-Gal / IPTG kaplı ortamı, kullanmadan önce yaklaşık 30 dakika steril kabin içinde kurutulur.
4. Transform olmuş kompetan hücreler bu platlara yayılır ve mavi koloniler oluşana kadar (genellikle ~ 24 saat) 37 ° C'de ters inkübe edilir.

BİLİMSEL YAYINLAR

SCI and SCI- Expanded Dergilerde Yayınlanmış Makaleler

Q Scoru

- Q1 Aksoy, H. M., Kaya, Y., Ozturk, M., **Seçgin, Z.**, Onder, H., & Okumus, A. (2017). *Pseudomonas putida*–Induced response in phenolic profile of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.) infected by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Biological Control*, 105, 6-12. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.001
- Q1 Kavas, M., Gökdemir, G., **Seçgin, Z.**, & Bakhsh, A. (2020). Ectopic expression of common bean ERF transcription factor PvERF35 promotes salt stress tolerance in tobacco. *Plant Biology*, 22(6), 1102-1112. doi.org/10.1111/plb.13167.
- Q1 Kavas, M., Yıldırım, K., **Seçgin, Z.**, & Gökdemir, G. (2020). Discovery of simple sequence repeat (SSR) markers in hazelnut (*Corylus avellana* L.) by transcriptome sequencing and SSR-based characterization of hazelnut cultivars. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 35(5-6), 227-237. doi.org/10.1080/02827581.2020.1797155.
- Q2 **Seçgin, Z.**, Kavas, M., Yıldırım, K. (2021). Optimization of *Agrobacterium*-mediated Transformation and Regeneration for CRISPR/Cas9 Genome Editing of Commercial Tomato Cultivars. *Turkish Journal Of Agriculture And Forestry*. doi: 10.3906/tar-2009-49.
- Q2 Poku, S. A., **Seçgin, Z.**, & Kavas, M. (2019). Overexpression of Ks-type dehydrins gene OeSRC1 from *Olea europaea* increases salt and drought tolerance in tobacco plants. *Molecular Biology Reports*, 46(6), 5745-5757. doi.org/10.1007/s11033-019-05008-x.
- Q3 Ozturk, M., Eroglu, Z., & **Seçgin, Z.** (2019). First report of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* as the causal agent of black rot disease on red cabbage in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 101(3), 795-795. doi.org/10.1007/s42161-019-00262-1.
- Q4 **Seçgin, Z.**, Gökdemir, G., Atabay, E. S., Kızıldoğan, A. K., & Kavas, M. (2020). Development of new total RNA isolation method for tissues with rich phenolic compounds. *Turkish Journal of Biochemistry*, 45(4), 343-350. doi.org/10.1515/tjb-2019-0375.

Diğer dergilerde Yayınlanmış makaleler

- **Seçgin, Z.**, Arvas, Y. E., Ssendawula, S. P., & Yilmaz, K. (2018). Selection of Root-Knot Nematode Resistance in Inbred Tomato Lines Using CAPS Molecular Markers. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 1(1), 10-

KONFERANS BİLDİRİLERİ

Uluslararası Konferans Bildirileri

- 1 **Seçgin, Z.**, Okumuş, A., Arslanoğlu, F., & Kaya, Y. (2016). Yozgat Ada Çayı (A Biotechnological Approaches on Yozgat Sage (*S. yosgadensis* Freyn & Bornm.) *I. International Bozok Symposium*. Yozgat, Turkey.
- 2 Kaya Y., **Seçgin Z.**, Okumuş A., (2016). Marker assisted selection for resistance to tomato spotted Wilt virus in tomato genotypes by SCAR and CAPS markers. *International Congress on Fundamental and Applied Sciences*. ID-ICFAS2016: 1281. İstanbul, Turkey.
- 3 Imanzhanov M., **Seçgin Z.**, Kavas M., (2017). Transcriptome-wide analysis of hazelnut MYB and bHLH transcription factor family members during leaf development. *International Green Biotechnology Congress*. 139. İstanbul, Turkey.
- 4 Kavas, M., & **Seçgin, Z.** (2017). In Silico Analysis Of AP2 Transcription Factors In Hazelnut. Presented At The Costas 2017.
- 5 Aslan Ş. E., **Seçgin Z.**, Gökdemir G., Kavas M., (2017). Functionial Evaluation of ERF Gene Cloned from Salt Tolerant Common Bean in Transgenic Tobacco Plant. *International DNA Day And Genome Congress*. IDDGC17-OP-159. Kırşehir, Turkey.
- 6 Sancak, D., **Seçgin, Z** and Kavas M., (2017). Optimization of Tissue Culture and Regeneration Parameters. *International Dna Day And Genome Congress*. IDDGC17-OP-160. Kırşehir, Turkey.
- 7 Poku, A.S., **Seçgin, Z.**, Kavas, M., (2018). Cloning of common bean LEA gene and functional evaluation in tobacco plant. Presented At The *7th International molecular Biology And Biotechnology congress*, Konya.
- 8 **Seçgin, Z.**, Kamara H.I., Kavas, M., (2018). Development of transcriptome based SSR marker in hazelnut. Presented At The 7th International molecular Biology And Biotechnology congress, Konya.
- 9 Öztürk, M., **Seçgin, Z.**, & Kavas, M. (2018). CRISPR is a new tool to better understand population diversity of plant pathogenic bacteria. Presented At *The 7th International molecular Biology And Biotechnology congress*, Konya.
- 10 Yıldırım, K., **Seçgin, Z.**, Şenyer, A., Cansu, C., & Kavas, M. (2019). Conferring Multiple Resistance to DNA Viruses in Plants with the CRISPR Cas9 Genome Editing Technology. Presented at the *1st PlantEd Conference Plant Genome Editing - State of the Art*, Novi sad.
- 11 **Seçgin, Z.**, Gökdemir, G., Şenyer, A., & Kavas, M. (2019). Development of Male Sterile Lines of Tomato Using CRISPR-Cas9 System. Presented at the *1st PlantEd Conference Plant Genome Editing - State of the Art*, Novi sad.
- 12 Arvas, Y. R., Karakütük, S., Kuyumcu, G., Akçay, K., **Seçgin, Z.**, & Kaya Y., (2017). A Biotechnological Approaches on Karacadağ Rice. *International Diyarbakır Symposium*. Diyarbakır, Turkey.

Ulusal Kongre Bildirileri

- 1 Okumuş, A., & **Seçgin Z.**, (2016). Kendilenmiş Domates Islah Hatlarının Domates Lekeli Solgunluk Virüsüne Dirençliliklerinin (Tswv) SCAR Moleküler Markörleri ile Seleksiyonu. *I. Ulusal Tarımsal Biyoteknoloji Kongresi*. Samsun, Turkey.
- 2 **Seçgin Z.**, & Okumuş, A., (2016). Hibrit Domates Bitkisinin Farklı Eksplantlarından Sentetik Tohum Üretimi ve Saklama Sürelerinin Optimizasyonu. *I. Ulusal Tarımsal Biyoteknoloji Kongresi*. Samsun, Turkey.
- 3 Akbulut, M. K., Okumuş, A., & **Seçgin Z.**, (2016). Mısır (Zea mays) Genotiplerinde Genetik Farklılığın Renk Spektrofotometresi ve Moleküler Markörle Belirlenmesi. *I. Ulusal Tarımsal Biyoteknoloji Kongresi*. Samsun, Turkey.
- 4 **Seçgin Z.**, Okumuş, A., Akbulut, M. K., Şafak, H., Türe, E., Akçay, K., Doğan T.B., Akcan Ç., & Gürün, H., (2016). Sentetik Tohum Teknolojisi. *I. Ulusal Tarımsal Biyoteknoloji Kongresi*. Samsun, Turkey.
- 5 Uslu A.F., Arslanoğlu Ş. F., & **Seçgin Z.**, (2016). *Calamintha nepeta* var. *nepeta*, *Satureja spicigera* ve *Trachystemon orientalis* (L.) Üzerine Araştırmalar. *III. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu*. Antalya, Turkey.
- 6 Yetiş C., Arslanoğlu Ş. F., & **Seçgin Z.**, (2016). Doğadan Sofraya Gelen Şifa. *III. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu*. Antalya, Turkey.
- 7 İlgü R. G., Arslanoğlu Ş. F., Yancı O., & **Seçgin Z.**, (2016). Karadeniz Bölgesinde Bitkisel Drog Olarak Tüketilen Ornithogalum Türleri. *III. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu*. Antalya, Turkey.
- 8 Kaya Y., **Seçgin, Z.**, Kuyumcu, G., Karakütük, S., Akçay, K., & Arvas, Y.E., (2016). Tarımsal Üretimde Genetiği Değiştirilmiş Bitkiler ve Küresel Isınma. *Bursa Tarım Kongresi*. Bursa, Turkey.

PROJELER

- | | |
|------------------------------|---|
| 2014-2016
OMÜ- BAP | Domates Genotiplerinde Farklı Besi Ortamlarının Kallus Gelişimine Etkileri ve Genotipik Farklılığın Moleküler Markörlerle Analizi. PYO.ZRT.1904.15.014. (Yardımcı Araştırmacı). |
| 2018-2020
OMÜ- BAP | CRISPR/Cas9 Sistemi Kullanılarak Erkek Kısır Domates Bitkilerinin Geliştirilmesi.
Proje No: PYO.ZRT.1901.17.010 (Yardımcı Araştırmacı). |
-