

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ASMADA (*Vitis vinifera* L.) CRISPR/CAS9 GENOM DÜZENLEME
TEKNOLOJİSİ ile KÜLLEMeye (*Erysiphe necator*) DAYANIKLI BİTKİLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Selcen DOĞAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ASMADA (*Vitis vinifera* L.) CRISPR/CAS9 GENOM DÜZENLEME
TEKNOLOJİSİ ile KÜLLEMeye (*Erysiphe necator*) DAYANIKLI BİTKİLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Selcen DOĞAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASMADA (*Vitis vinifera* L.) CRISPR/CAS9 GENOM DÜZENLEME
TEKNOLOJİSİ ile KÜLLEMeye (*Erysiphe necator*) DAYANIKLI BİTKİLERİN
GELİŞTİRİLMESİ

Selcen DOĞAN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından
123Z703 nolu proje ile desteklenmiştir.

OCAK 2024

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASMADA (*Vitis vinifera* L.) CRISPR/CAS9 GENOM DÜZENLEME
TEKNOLOJİSİ ile KÜLLEMeye (*Erysiphe necator*) DAYANIKLI BİTKİLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Selcen DOĞAN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 12/01/2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nedim MUTLU (Danışman)

Prof. Dr. Ali SABİR

Doç. Dr. Hatice İKTEN

Doç. Dr. Münevver AKSOY

Dr. Öğr. Üyesi Hilal Betül KAYA AKKALE

ÖZET

ASMADA (*Vitis vinifera* L.) CRISPR/CAS9 GENOM DÜZENLEME TEKNOLOJİSİ ile KÜLLEMeye (*Erysiphe necator*) DAYANIKLI BİTKİLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Selcen DOĞAN

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Ocak 2024; 97 sayfa

Dünya çapında asma yetiştiriciliğinde ekonomik açıdan en büyük kayıplar *Erysiphe necator*'un neden olduğu külleme hastalığından kaynaklanmaktadır. Dünyada toplam üzüm üretiminin yaklaşık %90'ına karşılık gelen çeşitlerin oluşturduğu *Vitis vinifera* L. türüne ait asmaların yaklaşık tamamının bu hastalığa hassas olduğu kabul edilmektedir. Patojenin dünyadaki üzüm yetiştirme bölgelerine yayılmış olması, bağcılıkta sık ilaçlama programlarının kullanımını gerektirmektedir. Bu amaçla kullanılan kimyasallar, yetiştiriciler için ek üretim maliyeti olmakla birlikte bağda çalışanlar ve bağda bulunan faydalı organizmaların sağlığını da olumsuz etkilemektedir. Son yıllarda pek çok araştırma, S (susceptible) genleri olarak tanımlanan, bitki ve patojen arasındaki uyumlu etkileşime olanak sağlayan genlerin dirençli tür ıslahında kullanım potansiyeli bulundurduğunu göstermektedir. *MLO* adı verilen lokuslarda bulunan *S*-genlerinin susturulması ile bitkilere külleme direnci kazandırılabilmesine yönelik çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. *A. thaliana*, arpa, domates gibi bitkilerde bu uygulamanın başarılı sonuçları, asmada *MLO* genleri ile gerçekleştirilecek gen susturma çalışmaları için umut olmuştur.

Çalışmada, CRISPR teknolojisinin uygulama alanlarından; gen susturma ve baz düzenlemesi birlikte kullanılarak *MLO* ve *ALS* (asetolaktat sentaz) genlerinde mutasyonlar oluşturulması hedeflenmiştir. Bunun için *Agrobacterium tumefaciens* ve CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak, ilgili kılavuz RNA'lardan asmaya hem geçici hem de kalıcı olarak aktarılanların seçilmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, *MLO* genlerini susturmaya yönelik hazırlanmış vektör tasarımının yanında *ALS* (asetolaktat sentaz) genlerini hedefleyen ek bir tasarım, bitkiye *A. tumefaciens* EHA105 suşu aracılığıyla entegre edilmiştir. Bunun için öncelikle *ALS* genlerine yönelik hazırlanan transformasyon vektörünün ilgili genlerde baz değişimi (C→U(T)) gerçekleştirmesi, Prolin (*ALS1* geni için Pro 74, *ALS2* geni için Pro175) amino asidinin Serin'e dönüştürülmesi hedeflenmiştir. Bu değişikliğin bitkilerde sülfonil üre grubu herbisitlere karşı dayanım geliştirdiği literatürde yer alan çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir. Geçici transformasyon sonrası seçilen embriyojenik kalluslar sülfonil üre grubu herbisit seleksiyonundan geçirilerek bitki rejenerasyonları sağlanmıştır.

Çalışma sonunda Siyah Kışmış çeşidinde rejenere edilen 132 bitkinin 28'inde transformasyonun kalıcı olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Bunlar arasında 2 bitkide Gly177 rezidülerde tek baz mutasyonları izlenmiştir. Geçici entegrasyonun değerlendirildiği, kalan 104 bitkide mutasyon izlenmemiştir. Çalışmadan elde edilen

sonuçların, asmada Siyah Kışmış çeşidinde izlenecek gen aktarma çalışmalarında etkin olarak kullanılabileceği, transgen taşımayan ve *MLO* genleri yönünden mutant bitkilerin elde edilmesi için ise gelecekte yapılacak çalışmalara yol göstereceği beklenmektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: *ALS* Genleri, Asma (*V. vinifera* L.), CRISPR, Klorosülfuron Dayanımı, Külleme, *MLO* Genleri, Sitidin Baz Düzenleyici, Transgen Taşımayan

JÜRİ: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Ali SABİR

Doç. Dr. Hatice İKTEN

Doç. Dr. Münevver AKSOY

Dr. Öğr. Üyesi Hilal Betül KAYA AKKALE

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF POWDERY MILDEW (*Erysiphe necator*) RESISTANT PLANTS IN GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.) THROUGH CRISPR/CAS9 GENOME EDITING TECHNOLOGY

Selcen DOĞAN

PhD Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Nedim MUTLU

January 2024; 97 pages

The economic losses in grape cultivation worldwide are largely attributed to the powdery mildew disease caused by *Erysiphe necator*. It is generally accepted that almost all varieties of *Vitis vinifera* L., which represent approximately 90% of the total grape production worldwide, are susceptible to this disease. The global spread of the pathogen necessitates frequent pesticide applications in viticulture. The chemicals used for this purpose not only result in additional production costs for growers but also adversely affect the health of workers in the vineyard and beneficial organisms present in the vineyard. In recent years, numerous studies have indicated the potential use of genes known as S (susceptible) genes, which enable a harmonious interaction between the plant and pathogen, in breeding for resistance. Various research has explored the possibility of imparting powdery mildew resistance to plants by knocking out S-genes located in loci called *MLO*. Successful outcomes of such applications in plants like *A. thaliana*, barley, and tomatoes have provided hope for gene knock-out studies targeting *MLO* genes in grapevine.

In this study, the application of CRISPR technology aims to create mutations in *MLO* and *ALS* (acetolactate synthase) genes through the combined use of gene knock-out and base editing. *Agrobacterium tumefaciens* and the CRISPR/Cas9 system are employed to select both transient and stable transfers of guide RNAs prepared for grapevines. In this context, in addition to the vector design prepared for knocking-out *MLO* genes, an additional design targeting *ALS* (acetolactate synthase) genes has been integrated into the plant using *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 strain. For this purpose, the transformation vector prepared for *ALS* genes is designed to perform a base substitution (C→U(T)) in the relevant genes, converting Proline (Pro 74 for *ALS1* gene and Pro 175 for *ALS2* gene) amino acid to Serine. Numerous studies in the literature have demonstrated that this modification imparts resistance to sulfonylurea herbicides in plants. The embryogenic calli used in the transformation studies have been exposed to a sulfonylurea herbicide to monitor the events of transient transformation.

At the end of the study, it was determined that 28 out of 132 plants regenerated in Black Khismish variety transformed in a stable manner. Among them, single-base mutations were observed in the Gly177 residues in 2 plants. No mutations were observed in the remaining 104 plants evaluated for transient transformation. The results obtained from the study are expected to be effectively used in gene transfer studies to be followed

in the Black Khismish variety, and they are anticipated to guide future studies for obtaining non-transgenic and mutant plants in terms of *MLO* genes.

KEYWORDS: *ALS* Genes, Chlorsulfuron resistance, CRISPR, Cytidine Base Editor, Grapevine (*V. vinifera* L.), *MLO* Genes, Powdery mildew, Transgen free

COMMITTEE: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Ali SABIR

Assoc. Prof. Dr. Hatice İKTEN

Assoc. Prof. Dr. Münevver AKSOY

Assist. Prof. Dr. Hilal Betül KAYA AKKALE

ÖNSÖZ

Tarımsal biyoteknoloji, günümüzde tarım sektörünü dönüştüren ve gelecekteki gıda güvenliği, verimlilik ve sürdürülebilirlik açısından önemli bir rol oynayacak olan dinamik bir alanı temsil eder. Bu alandaki hızlı gelişmeler, bitki yetiştiriciliği, hayvancılık ve gıda endüstrisinde çeşitli zorluklara yenilikçi çözümler sunma potansiyeli taşımaktadır.

Bu tez, tarımsal biyoteknolojinin çeşitli yönlerini ve uygulama alanlarını incelemektedir. Temel genetik prensipleri, gen düzenleme teknikleri, transgenik bitkilerin geliştirilmesi ve diğer yenilikçi yaklaşımlar bu çalışmanın odak noktalarını oluşturmaktadır. Tezin temel amacı, tarımsal biyoteknoloji alanındaki en son bilimsel gelişmeleri anlamak ve bu teknolojilerin tarımın farklı alanlarında nasıl kullanılabileceğini değerlendirmektir.

Bu çalışmanın tamamlanmasında emeği geçen herkese teşekkür etmek istiyorum. Ancak, bu yoğun ve zorlu süreçte bana her adımda rehberlik eden danışmanım Prof. Dr. Nedim MUTLU'ya özel bir minnettarlık ifade etmek isterim. Sadece bir akademisyen değil, aynı zamanda içtenlikle paylaştığı bilgisi, cesaretlendirmeleri ve yönlendirmeleri ile bir öğretmen ve rehber olmuştur. Tez çalışmamın her aşamasında sağladığı değerli görüşleri ve bilgisi, bu çalışmanın kalitesini artırmama yardımcı oldu, destekleriniz için çok teşekkür ederim.

Değerli tavsiye ve yorumlarıyla tezin son şeklini verilmesine katkı sunan tez savunma jürimde bulunan Prof. Dr. Ali SABİR, Doç. Dr. Hatice İKTEN, Doç. Dr. Münevver AKSOY ve Dr. Öğr. Üyesi Hilal Betül KAYA AKKALE'ye teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tecrübelerini paylaşan tüm Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, bilgi birikimleri ve öğrencilere yönelik gösterdikleri ilgi nedeniyle minnettarlığımı ifade etmek isterim. Bu çalışma, sizlerin sağladığı ortamda şekillendi ve gelişti.

Tez materyalinin sağlanmasında desteklerinden ötürü Prof. Dr. Ali SABİR'a ve Manisa Bağcılık Enstitüsüne teşekkürlerimi sunarım.

Biyoinformatik çalışmalarına desteklerinden ötürü başta Dr. İnanç SOYLU'ya ve laboratuvar ve arazi çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen çok değerli MUTLU Lab. ekibine teşekkür eder, her birisine başarılı bir akademik hayat dilerim.

Bu tez çalışmasına ARDEB 1002-b nolu program çerçevesinde, 123Z703 nolu proje kapsamında destek veren TÜBİTAK'a ayrıca teşekkür ederim.

Hayatta karşılaştığım zorlukları aşmam için bana güç ve azim veren sevgili babam Doğan YILDIRIM ve rahmetli annem Emsal YILDIRIM'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Son olarak hayat arkadaşım Dr. Güray DOĞAN ve canımız, biricik oğlum Ozan Ali DOĞAN, size teşekkür ederim ki, sizin yanımda olduğunuzu bilmenin verdiği güvenle bu zorlu ama bir o kadar da heyecan verici yolda ilerleyebildim. Birbirimizin başarılarına sağlık ve huzurla tanık olabilmek dileklerimle.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Dünyada ve Türkiye’de Bağcılığa Genel Bir Bakış.....	4
2.2. Külleme (Powdery Mildew) Hastalığı ve Asmada Külleme Zararı.....	4
2.3. Asmada Külleme Kontrolü	6
2.4. MLO Gen Ailesi	8
2.4.1. MLO proteinlerinin yapısı ve filogenetik analizi	8
2.4.2. MLO proteinlerinin külleme hassasiyeti oluşumundaki rolleri.....	10
2.4.3. MLO proteinlerinin bitkideki diğer fonksiyonları.....	11
2.4.4. Asmada külleme hassasiyetinde rol oynayan MLO proteinlerinin incelenmesi	11
2.5. Gen Düzenleme Yöntemleri.....	12
2.5.1. Bağışıklık tepkisinden genom mühendisliğine; CRISPR-Cas9 teknolojisinin dönüşümü.....	13
2.5.2. CRISPR-Cas gen düzenleme araçları.....	15
2.6. Asmada CRISPR-Cas ile Genom Düzenleme Çalışmaları	18
2.7. CRISPR-Cas Bileşenlerinin Bitkiye Gönderilmesi.....	23
2.7.1. Bitkilerde <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen transformasyonu	23
2.7.2. Asmada <i>Agrobacterium</i> aracılığıyla yapılan gen transformasyonu çalışmaları.....	27
3. MATERYAL VE METOT	32
3.1. Materyal	32
3.1.1. Kullanılan bitki materyali ve yetiştiriciliği	32
3.1.2. Kullanılan vektör plazmitler ve bakteriyel suşlar	34

3.1.3.	Kullanılan besi ortamları, kimyasallar, enzimler, hazır kitler, tampon çözeltiler ve solüsyonlar	35
3.1.4.	Kullanılan primerler	39
3.2.	Metot	40
3.2.1.	Biyoinformatik Çalışmalar	40
3.2.1.1.	<i>MLO</i> genleri ile ilgili yapılan biyoinformatik çalışmalar	41
3.2.1.2.	<i>ALS</i> genleri ile ilgili yapılan biyoinformatik çalışmalar	42
3.2.2.	Mikrobiyolojik Çalışmalar	43
3.2.3.	Moleküler Çalışmalar	46
3.2.3.1.	<i>MLO</i> ve <i>ALS</i> genlerine özgü sentetik tasarımların sentezlettirilmesi, moleküler olarak işlenip, transformasyon vektörlerinin oluşturulması	46
3.2.4.	Gen transformasyonu ve doku kültürü çalışmaları	48
3.2.4.1.	Embriyogenik kallusların indüklenmesi ve sürdürülmesi	48
3.2.4.2.	Seleksiyon dozlarının belirlenmesi (Kill-curve testleri)	51
3.2.4.3.	Embriyogenik kalluslara <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı çalışmaları	52
3.2.4.4.	Geçici ve stabil entegrasyonun sağlandığı bitkilerin belirlenmesi	52
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA	55
4.1.	Biyoinformatik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular	55
4.1.2.	<i>MLO</i> genleri ile ilgili yapılan biyoinformatik çalışmalardan elde edilen bulgular	55
4.1.3.	<i>ALS</i> genleri ile ilgili yapılan biyoinformatik çalışmalardan elde edilen bulgular	58
4.2.	Moleküler Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular	61
4.2.1.	<i>MLO</i> ve <i>ALS</i> genlerine özgü sentetik tasarımların sentezlettirilmesi, moleküler olarak işlenip, transformasyon vektörlerinin oluşturulması çalışmalarından elde edilen bulgular	61
4.3.	Gen Transformasyonu ve Doku Kültürü Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular	65
4.3.1.	Embriyogenik kallusların indüklenmesi ve sürdürülmesi ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular	65

4.3.2. Seleksiyon dozlarının belirlenmesi (Kill-curve testleri) ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular	70
4.3.3. Embriyogenik kalluslara <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı çalışmalarından elde edilen bulgular	73
4.3.4. Geçici ve stabil entegrasyonun sağlandığı bitkilerin belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular.....	75
5. SONUÇLAR	82
5. KAYNAKLAR.....	84
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Asmada (Vitis vinifera L.) Crispr/cas9 Genom Düzenleme Teknolojisi ile Küllemeye (Erysiphe necator) Dayanıklı Bitkilerin Geliştirilmesi*” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

12/01/2024

Selcen DOĞAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

Cas9 : CRISPR İlişkili Protein 9

CRISPR : Kümelenmiş Düzenli Aralarla Ayrılmış Kısa Palindromik Tekrarlar

DNA : 2-Deoksiribonükleik Asit

gRNA : Kılavuz RNA

OD : Optik Yoğunluk

OIV : Uluslararası Üzüm ve Şarap Teşkilatı Hükümetlerarası Organizasyonu

PAM : Protospacer Adjacent Motif

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PM : Powdery Mildew

RE: Restriksiyon Enzimi

RNA : Ribonükleik Asit

UV : Ultraviyole

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>MLO</i> proteinin tahmini şematik modeli. Bir ekstraselüler N-terminus ve yedi transmembran (TM) alanına sahip sitoplazmik C-terminus bölgesi. C-terminus kalmodulin bağlanma domaini (CaMBD), savunma tepkisinde sinyalleme mekanizmasını düzenler (Filiz ve Vatansever 2018)	8
Şekil 2.2. Bazı bitki türlerinde <i>MLO</i> gen ailesi üyelerinin filogenetik şeması (Feechan vd. 2008)	9
Şekil 2.3. Papilla Hipotezi'ne göre külleme dayanımı. a) etkin kimyasal içeriğe sahip güçlü papilla sebebiyle penetrasyon yapamamış apresoryum yapısı; b) zayıf papilla yapısına sahip dokuya penetrasyon yaparak haustorium yapısı oluşturmuş bir apresoryum (Hückelhoven 2014).....	10
Şekil 2.4. Asmanın <i>E. necator</i> ile inokulasyonu sonrası <i>MLO</i> genlerinin gösterdiği gen ifadesi seviyeleri (Feechan vd. 2008).....	12
Şekil 2.5. Sınıf 2 CRISPR sisteminde doğrulanmış genom düzenleme araçları ve kesim yeri mimarisi. Cas9, tip II sistemi temsil eder ve crRNA ve tracrRNA tarafından yönlendirilir. RNP formu uyumlu PAM dizisini tanır ve crRNA ile protospacer arasında dizi benzerliği olduğunda helikal yapının açılmasını sağlar. Tip V'de Cas12a, Cas12b, Cas12e ve Cas14'ü içeren çeşitli alt tipler doğrulanmıştır, her alt tip farklı bir mimari gösterir. Cas12a için yalnızca crRNA gereklidir, diğer alt tipler için ek bir tracrRNA gereklidir. Cas14, hem ssDNA hem de dsDNA kesme aktivitesini gösterir. dsDNA kesimi için bir PAM gerekliliği vardır. En iyi karakterize RNA nükleaz Cas13, Tip VI'ya aittir. PFS dizisinin tanınmasıyla, crRNA-Cas13 kompleksi ssRNA kesme aktivitesini tetikler. Hedef tanıma sonrasında, Cas13, yan ürün olarak ssRNA aktivitesi ile donatılmıştır. (Moon vd. 2019)	14
Şekil 3.1. a) Sultani Çekirdeksiz ve Italia üzüm çeşitlerine ait çelikler; b), c) Saksılara toplu olarak dikilmiş çelikler; d) Köklenmiş bir çelik; e), f) Seradaki çelikler ve saksılara aktarılmış çeşitlerin genel görüntüsü.	32
Şekil 3.2. Aktif vejetatif dönemdeki asmalardan bir görüntü	33
Şekil 3.3. a) pFGC-pcoCas9 (Addgene, Plazmit # 52256); b) pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della (Addgene, Plazmit #91694) haritaları	34
Şekil 3.4. (a) Sultani Çekirdeksiz, (b) Crimson Seedless, (c) Michele Palieri ve (d) Chardonnay çeşitlerine ait somak görüntüleri.....	49
Şekil 3.5. (a) Kültüre alınan somak yapıları, (b) Crimson Seedless, Michele Palieri ve Italia çeşitlerinin somakları, (c) Somaklara uygulanan sterilizasyon işleminden bir görüntü, (d) Italia çeşidinde ait bir anterin filament yapısıyla birlikte mikroskop altında çekilmiş bir görüntüsü ve (e) embriyojenik kültür başlatma ortamına alınmış anterler .	50
Şekil 3.6. (a) GS1CA ortamındaki Michele Palieri anterlerinden gelişen kalluslar, (b) GS1CA ortamındaki Chardonnay yapraklarından gelişen kalluslar (c) GS1CA	

ortamındaki Michele Palieri yapraklarından gelişen kalluslar, (d) GS1CA ortamındaki Michele Palieri yapraklarından gelişen kalluslar, (e) LCM ortamı ile seyreltilmiş <i>Agrobacterium tumefaciens</i> solüsyonları, (f) Kallusların 50 ml'lik steril falkon tüplere yerleştirilmesi, (g) Bakteri solüsyonu içindeki kalluslar.....	53
Şekil 4.1. AtMLO2, At MLO6 ve At MLO12 protein sekanslarının asmada MLO gen üyeleri ile Genius Prime programı ile hizalanması sonucunda elde edilen soy ağacı görüntüsü.....	56
Şekil 4.2. Siyah Kişmiş çeşidinde kılavuz RNA'lar VvMLO6a, VvMLO7, VvMLO9, VvMLO11'e ait Sanger sekanslama sonucu elde edilmiş kromatogramlar; a) VvMLO6a'ya ait olan kromatogram; b) VvMLO7'ye ait olan kromatogram; c) VvMLO9'a ait olan kromatogram; d) VvMLO11'e ait olan kromatogram. Her dört şekilde de gri ile işaretli alan kılavuz RNA sekansını, sarı ile işaretli alan ise PAM sekansını ifade etmektedir.....	58
Şekil 4.3. SIALS1, SIALS2, VvALS1 ve VvALS2 proteinlerinin Clustal Omega programı ile çoklu sekans hizalama görüntüsü. Kırmızı dikdörtgen içine alınmış bölgeler nokta mutasyonu sonucu klorsülfüron direnci sağlayan P (Proline) rezidüleri temsil etmektedir.....	59
Şekil 4.4. Siyah Kişmiş çeşidinde kılavuz RNA'lar VvALS1 ve VvALS2'ye ait Sanger sekanslama sonucu elde edilmiş kromatogramlar; a) VvALS1'e ait olan kromatogram; b) VvALS2'ye ait olan kromatogram (Her iki şekilde de gri ile işaretli alan kılavuz RNA sekansını, sarı ile işaretli alan ise PAM sekansını ifade etmektedir)	60
Şekil 4.5. MLO genlerine yönelik tasarlanan gRNA konstraklarının SnapGene yazılımında oluşturulmuş görselleri (Gri: AtU3 promotör, Mavi: pre-tRNA, Yeşil: gRNA, Turkuaz: gRNA iskeleti, Kırmızı: PolyA Tail sekanslarını göstermektedir)	61
Şekil 4.6. ALS genlerine yönelik tasarlanan gRNA konstraklarının SnapGene yazılımında oluşturulmuş görselleri (Gri: AtU3 promotör, Mavi: pre-tRNA, Yeşil: gRNA, Turkuaz: gRNA iskeleti, Kırmızı: PolyA Tail sekanslarını göstermektedir)	62
Şekil 4.7. a) MLO; b) ALS genlerine yönelik tasarlanan konstrakları taşıyan pUC-kan-wz vektörünün <i>E.coli</i> DH5α'ya transformasyonu sonrası (standart heat shock metodu) elde edilen bakteri kolonileri; c) Liyofilize şekilde laboratuvara gelen gRNA konstraklarını taşıyan tüpler	63
Şekil 4.8. MLO, ALS konstrakları ve klonlama vektörü 91694'ün restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra %0.8 (kütlece) agaroz ve %0.005 etidyum bromür içeren jelde 100V potansiyel farkla 1 saat yürütüldükten sonraki görüntüsü (solda) ve beklenen parçaların UV ışık altında jelden kesildikten sonraki jelin son görüntüsü (sağda). 1. ve 6. kuyucuklarda Hibrigen© 100bp, 5. ve 10. kuyucuklarda Hibrigen© 1kb referans markörü bulunmaktadır. 2. kuyucukta MLO konsrakına ait kesilen parçalar, 3. kuyucukta ALS konsrakına ait kesilen parçalar, 4. kuyucukta pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della (Addgene #91694)'ya ait kesilen parçalardan görüntüler.....	63

- Şekil 4.9.** a) Ligasyon ürünlerinin ve lineer vektör plazmitlerin *E.coli* DH5 α 'ya transformasyonu sonrası (standart heat shock metodu) elde edilen VvMLO-52256; b) VvALS-91694'ye ait katı hücre kültürleri 64
- Şekil 4.10.** a) VvMLO-52256; b) VvALS-91694 ligasyon ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra %0.8 (kütlece) agaroz ve %0.005 etidyum bromür içeren jelde 100V potansiyel farkla 1 saat yürütüldükten sonraki görüntüsü. M1 kuyucukları Hibrigen© 1kb, M2 kuyucuğu Hibrigen© 100bp referans markörü göstermektedir 65
- Şekil 4.11.** a) Embriyojenik kallus indüklenme ortamlarına yerleştirilmiş anterler; b) 4-6 hafta sonunda Michele Palieri anterlerinden PIV1 ortamında gelişen sarı-krem renkteki embriyojenik kalluslar; c) Michele Palieri anterlerinden PIV4 ortamında gelişen kalluslar; d) Chardonnay anterlerinden PIV ortamında gelişen kallus yapıları; e) Italia çeşidi anterlerinden PIV4 ortamlarında gelişen kallus yapıları; f) Siyah Kışmış anterlerinden PIV4 ortamlarında gelişen kallus yapıları; g) Siyah Kışmış anterlerinden PIV1 ortamlarında gelişen kallus yapıları; h) Sultani Çekirdeksiz anterlerinden PIV4 ortamında gelişen kallus yapıları 68
- Şekil 4.12.** a), b) PIV ortamında indüklenen Michele Palieri yapraklarına ait kalluslar; c) PIV4 ortamında gelişen Chardonnay yapraklarına ait kalluslar; d) PIV1 ortamında gelişen Sultani Çekirdeksiz yapraklarına ait kalluslar; e) PIV1 ortamında gelişen Siyah Kışmış anterlerine ait kalluslar; f) PIV ortamından gelişen Italia yapraklarına ait kalluslar 69
- Şekil 4.13.** Asma çeşitlerinin yaprak ayası ve yaprak saplarının embriyojenik kallus indüklenme ortamlarındaki kallus gelişimleri (a) Crimson Seedless yaprak ayalarının PIV1 ortamındaki gelişimleri, (b) Michele Palieri yaprak ayalarının PIV4 ortamındaki gelişimleri, (c) Italia yaprak ayalarının PIV4 ortamındaki gelişimleri, (d) Michele Palieri yaprak saplarının PIV4 ortamındaki gelişimleri, (e) Crimson Seedless yaprak saplarının PIV4 ortamındaki gelişimleri ve (f) Italia yaprak saplarının PIV4 ortamındaki gelişimleri..... 69
- Şekil 4.14.** a), b) Italia çeşidine ait embriyojenik kallusların sırasıyla 2 mg/L; c), d) 4 mg /L fosfinotrisin dozlarına maruz bırakılması; e), f), g), h) 2 hafta sonra petrilerin görüntüleri 70
- Şekil 4.15.** a), b) Italia çeşidine ait embriyojenik kallusların sırasıyla 5 mg/L; c), d) 6 mg /L fosfinotrisin dozlarına maruz bırakılması; e), f), g), h) 2 hafta sonra petrilerin görüntüleri 71
- Şekil 4.16.** a), b) Italia çeşidine ait embriyojenik kallusların sırasıyla 8 mg/L; c), d) 10 mg /L fosfinotrisin dozlarına maruz bırakılması; e), f), g), h) 2 hafta sonra petrilerin görüntüleri 71
- Şekil 4.17.** a) Sultani Çekirdeksiz çeşidine ait embriyojenik kallusların sırasıyla 50 mg/L; b) 100 mg /L; c) 150 mg/L; d) 200 mg/L kanamisin dozlarına maruz bırakılması; e), f), g), h) 2 hafta sonra petrilerin görüntüleri 72

- Şekil 4.18.** a) Italia çeşidine ait embriyojenik kallusların sırasıyla 20 ng/mL; b) 30 ng/mL; c) 40 ng/mL; d) 50 ng/mL; e) 60 ng/mL klorsülfüron dozlarına maruz bırakılması; f), g), h), ı), j) 2 hafta sonra petrilerin görüntüleri 73
- Şekil 4.19.** a) Siyah Kışmış çeşidine ait anter kültüründe gelişen çeşitli aşamadaki embriyolar; b) Sultani Çekirdeksiz çeşidine ait anter kültürlerinden gelişen çeşitli aşamadaki embriyolar; c) Siyah Kışmış çeşidinde kotiledonlu aşamada bir embriyo; d) Gelişimlerini sürdürmeleri için MG2 ortamlarına aktarılmış somatik embriyolar 74
- Şekil 4.20.** a), b) Siyah Kışmış çeşidinde bitkiye dönüşmüş embriyolar; c), d) Köklenmiş Siyah Kışmış çeşidine ait bitkiler; e) Aklimatize edilmiş bir bitki..... 74
- Şekil 4.21.** V1, V2, V3, V4, V5 bitkilerinin a) 52256-2; b) kanamisin; c) actin primer çiftleriyle koşulan PCR ürünlerinin %0.8 (kütlece) agaroz ve %0.005 etidyum bromür içeren jelde 100V potansiyel farkla 1 saat yürütüldükten sonraki görüntüsü (Agaroz jellerin ilk ve son kuyucukları 100 bp Hibrigen© referans markörü içermektedir. Kuyucuklardaki ‘P’ pozitif kontrolleri temsil etmekte olup PCR reaksiyonlarında vektör plazmitler, ‘N’ negatif kontrolleri temsil etmekte olup PCR reaksiyonlarında su kullanılmıştır.)..... 76
- Şekil 4.22.** V1, V2, V3, V4, V5 bitkilerinin *MLO6a*, *MLO7*, *MLO9*, *MLO11*, *ALS1* ve *ALS2* gRNA primer çiftleriyle koşulan PCR ürünlerinin %0.8 (kütlece) agaroz ve %0.005 etidyum bromür içeren jelde 100V potansiyel farkla 1 saat yürütüldükten sonraki görüntüsü (M kodlu kuyucuklar 1 kb Himedia© referans markörü içermektedir) 77
- Şekil 4.23.** a) Kontrol grubu Siyah Kışmış çeşidinde *VvALS2* bölgesinin Sanger sekans kromotogramı; b) V76 bitkisinde *VvALS2* bölgesinin Sanger sekans kromotogramı; c) V77 bitkisinde *VvALS2* bölgesinin Sanger sekans kromotogramı 80
- Şekil 4.24.** a) V76 bitkisinde G177’de *VvALS2* hedefinin, kontrol grubu *VvALS2* hedefi ile ClustalO programı ile hizalanması sonucu elde edilen görsel; b) V77 bitkisinde G177’de *VvALS2* hedefinin, kontrol grubu *VvALS2* hedefi ile ClustalO programı ile hizalanması sonucu elde edilen görsel (kırmızı kareler C>A mutasyonunu göstermektedir) 80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı bitki türlerinde belirlenmiş <i>MLO</i> gen sayıları (Ievieno vd. (2016)’dan uyarlanmıştır)	9
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve hazır kitlere ait bilgiler.....	35
Çizelge 3.2. Kullanılan primerlere ait bilgiler	39
Çizelge 3.3. İkili (Binary) vektörlere ait bilgiler	46
Çizelge 3.4. Kullanılan RE kesim reaksiyonlarına ait bilgiler.....	47
Çizelge 3.5. <i>MLO</i> ve <i>ALS</i> genleri için kurulan ligasyon reaksiyonlarına ait bilgiler	48
Çizelge 3.6. Embriyojenik kallus indüklemeye ve sürdürme için kullanılan kültür ortamlarına ait bilgiler.....	50
Çizelge 3.7. Embriyojenik kallusların aktarıldığı farklı ortamlar ve içerikleri.....	54
Çizelge 4.1. CRISPR-Cas9 sistemi ile susturulması planlanan <i>MLO</i> genlerine ait tanımlayıcı bilgiler	55
Çizelge 4.2. <i>MLO</i> genleri için kullanılacak gRNA’lere ait sekans bilgileri ve çeşitli performans değerleri	57
Çizelge 4.3. Domates ve asma <i>ALS1</i> ve <i>ALS2</i> genlerine ait sekans ve diğer bazı tanımlayıcı bilgiler	59
Çizelge 4.4. Hedeflenen <i>ALS</i> genleri için kullanılan gRNA’lere ait sekans bilgileri ve çeşitli performans değerleri.....	60
Çizelge 4.5. Anter, yaprak ayası ve yaprak sapı eksplantlarındaki embriyojenik kallus oluşum tepkileri.....	66
Çizelge 4.6. Asma çeşitlerinde anter eksplantlarından gelişen embriyo sayıları ve bitkiye dönüşüm oranları.....	75
Çizelge 4.7. Transgen taşıyan asmaların gRNA bölgelerine göre sahip oldukları mutasyonlar	77

1. GİRİŞ

Üzüm (*Vitis vinifera* L.), dünyada yaygın olarak yetiştirilen bir asma türüdür. 7000 yıldan fazla süredir ekilmekte olan asma dışında çok az ürün asma ile aynı kültürel etkiye sahip olabilmıştır. Bağcılığın dünyada önemli tarım faaliyetlerin başında gelmesindeki etkenlerin başında asma yetiştiriciliğinin iklim ve toprak istekleri yönüyle diğer meyve türlerine nazaran daha az seçici olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir (Akkurt vd. 2018; Alleweldt ve Possingham 1988). Dünya genelinde geniş bir coğrafyada yetiştirilen asma, hem sofralık üzüm tüketimi hem de şarap üretimi için temel hammaddelerden biri olarak öne çıkmaktadır. Ekonomik değeri sadece üzüm ve şarap endüstrisine dayanmamakla birlikte, aynı zamanda meyve suyu, kurutulmuş üzüm, sirke ve diğer ürünlerin üretiminde de kullanılan çok yönlü bir bitkidir. Kültürel olarak, asma, birçok medeniyetin geleneksel damak zevkini ve festivallerini şekillendirmiştir. Ayrıca, asma bağları ve şarapçılık, birçok bölgede turistik cazibe merkezleri oluşturarak kültürel mirasa ve bölgesel ekonomiye katkı sağlamaktadır. Bu çerçevede, asmanın ekonomik ve kültürel önemi, hem tarımsal üretim hem de gastronomik zenginlik bağlamında dünya genelinde derin bir etki bırakan bir bitki olarak öne çıkmaktadır. Bu bağlamda, asmanın Türkiye'deki ekonomik ve kültürel önemi, tarım sektöründen gastronomiye uzanan geniş bir yelpazede, Türk toplumunun günlük yaşamında ve kültüründe de belirgin bir rol oynamaktadır.

International Organisation of Vine and Wine Intergovernmental Organisation (OIV)'nin 2022 yılı istatistik raporuna göre dünyada sofralık, şaraplık ve kurutmalık üzüm üretimi toplam 7,3 milyon hektar alanı kapsamaktadır. Türkiye ise bu üretimin %50'sini elinde bulunduran 5 ana üretici ülkeden biridir. Ayrıca, Türkiye dünya pazarında 2022 yılı verilerine göre kuru üzüm üretiminde 395 bin ton ile birinci sırayı çekmekte, sofralık üzüm üretiminde ise 2,2 milyon ton ile Hindistan'dan hemen sonra üçüncü sırada gelmektedir (Anonymous 1). Geçmişte bağ yetiştiricileri yerel koşullarına uygun lokal çeşitleri tercih ederken, 19. yüzyılın ikinci yarısı itibariyle, asmada filokseranın (*Phylloxera vastatrix radiclecola*) neden olduğu zararlar nedeniyle asma yetiştiriciliğinde köklü bir değişikliğe gidilmiştir (Alleweldt vd. 1990). Dünyada mevcut bağcılık faaliyetleri, filoksera böceğine dayanıklı Amerikan asma anaçları üzerine aşılı *Vitis vinifera* L. bağcılığı şeklinde yapılmaktadır (Ergül vd. 2017). Üzüm çeşitlerinin çoğu, Avrasya'da ortaya çıkan ancak Kuzey Amerika'ya özgü yabani asmalarda evrimleştiği düşünülen patojenlere ve zararlılara karşı oldukça hassas olan *Vitis vinifera* türünden elde edilir. Bu hastalık etmenlerinden olan, asklı mantarlar sınıfından *Erysiphe necator* (*Uncinula necator*), asmada külleme (PM) hastalığının nedensel ajanı, tesadüfi olarak Avrupa'ya 1850'lerde Kuzey Amerika'dan girmiş ve o zamandan bu zamana bağcılık üretiminde önemli kayıplar oluşturmuştur (Pessina 2016). Dünyada toplam üzüm üretiminin yaklaşık %90'ına karşılık gelen çeşitlerin oluşturduğu *Vitis vinifera* L. türüne ait asmaların yaklaşık tamamının bu hastalığa hassas olduğu kabul edilmektedir (Miclou vd. 2012). Külleme, yapraklar üzerinde kül şeklinde görünüme sahip olup yaprakların fotosentez aktivitelerini önemli derecede olumsuz etkilemekte, tanelerde ise meşinleşme yaparak tanenin çatlamasına neden olmaktadır. Üzüm yetiştiriciliğinde %70'e kadar varan verim kayıplarına neden olabilen külleme, asmaların başlıca hastalık etmenidir (Pearson ve Gadoury 1992).

Asmada külleme kontrolünde budama, fungusit uygulamaları, dayanıklı hibrit çeşitlerin kullanımı ve R (direnç) genlerinin asma ıslah programlarına dahil edilmesi gibi

farklı yaklaşımlar benimsenmektedir. Ancak bu stratejiler bazı sınırlandırıcı yönlere sahiptir. Bunlar, kimyasal kullanımında patojenin fungusitlere karşı direnç geliştirmesi, çevre ve sağlık yönünde gelişen olumsuz etkilerdir.

Kuru üzüm ihracatında dünyada önemli bir konuma sahip Türkiye’de ise asma üretimi açısından uygun ekolojiye sahip olursa da dünya standartlarını yakalamada çeşitli açılardan geri kalındığı, hatta gerekli önlemlerin alınmaması durumunda kurutmalık üzüm ihracatında mevcut pozisyonun kaybedebileceği vurgulanmaktadır (Ünal ve Soltekin 2018). Ünal ve Soltekin (2018), kuru üzüm sektörü ile ilgili yaptıkları stratejik değerlendirmede, üzüm üretiminde organik ve iyi tarım uygulamaları gibi çevre dostu yaklaşımların eksikliği ve kurutmalık üzüm için yapılan yetiştiricilikte bilinçsiz kimyasal kullanımından kaynaklı kalıntı problemini Türkiye’de kurutmalık üzüm sektörünün zayıf yönleri olarak değerlendirmişlerdir. Bir diğer açıdan, külleme ile mücadelede kullanılan kimyasallar çevre ve insan sağlığını tehdit etmekle birlikte üretim maliyetlerini önemli oranda arttırarak üreticilerin girişimcilik potansiyelini sınırlandırmaktadır. Üzüm yetiştiriciliğindeki kimyasal uygulamaların ön planda olduğu bu yaklaşım, yetiştiriciler için artan üretim maliyetlerine dönüşmekle kalmamakta, aynı zamanda bu kimyasallar bağda çalışanlar ve bağda bulunan faydalı organizmaların sağlığı üzerinde olumsuz etkiler barındırmaktadır. Ayrıca bağcılıkta kullanılan yoğun ilaç uygulamaları karbon emisyonlarını hızla arttırmaktadır (Wan vd. 2020). Özetle, asmada külleme kontrolünde fungusit kullanımının uzun vadede çevre üzerinde olumsuz etkiler gösteriyor olması, özellikle şaraplık üzüm üretiminde faydalı organizmalara zarar vermesi ve üretici sağlığını tehdit etmesi, fungusit kullanımının külleme mücadelesindeki kullanım etkinliğini cazip kılmamaktadır. Bu nedenle küllemeye dayanıklılık kazandıracak etkin direncin üzüm çeşitlerine entegre edilmesi, bağcılığın kimyasal girdilere olan bağımlılığını azaltarak, hızla artan dünya nüfusunun gıda ihtiyacının iklim değişikliğinin tarımsal verimliliğe olumsuz etkilerinin altında sürdürülebilir nitelikte karşılanabilmesi için büyük önem arz etmektedir.

Bir diğer yaklaşım olan külleme kontrolünün dirençli asma çeşitleri ile sağlanması, dirençli hibritlerin düşük kaliteleri nedeniyle pazar talebini karşılamaması olarak değerlendirilmektedir. Dominant *R* genlerinin ıslah programlarına dahil edilmesinde ise asma gibi vejetatif olarak çoğaltılan çok yıllık bitkilerin genetik olarak tek tip olmasından kaynaklı yeni mutasyonlara sahip olamayacağından *R* genleri ile kazandırılan dirençliliğin, bir süre sonra etkisini yitireceği rapor edilmektedir (Pessina 2016).

Son yıllarda yapılan çok sayıda araştırma, *S* (susceptible-yatkınlık) genleri olarak tanımlanan, bitki ve patojen arasındaki uyumlu etkileşime neden olan genlerin dirençli tür ıslahında kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Uyumluluğu önemli ölçüde kolaylaştıran genlerin değiştirilmesi, daha geniş spektrumlu ve dayanıklı bir direnç sağlayabilmektedir (van Schie ve Takken 2014). *S* genleri konak-patojen etkileşim süreçlerinin farklı aşamalarında duyarlılığı kolaylaştırarak, enfeksiyona katkıda bulunmaktadır. Konak-patojen uyumluluğuna izin veren genler, bağışıklık sinyallesinin negatif regülatörlerini kodlayan genler ve patojenin metabolik ve yapısal ihtiyaçlarını karşılayarak patojenin çoğalmasına izin veren genler olarak sınıflandırılmaktadır (van Schie ve Takken 2014). Literatürde *S* genlerinin susturulması ile bitkiye külleme direnci kazandırılan çalışmalar yer almaktadır. Bu kapsamda *S* genlerinden spesifik *MLO* (mildew locus O) genlerinin susturulması ile bitkilere külleme

direnci kazandırılabilir.

Bu çalışmanın temel amacı, Türkiye’de ve dünyada asma (*V. vinifera*) yetiştiriciliği kapsamında değerlendirildiğinde pazar değeri yüksek Sultani Çekirdeksiz, Siyah Kışmış, Italia, Crimson Seedless, Michele Palieri ve Chardonnay çeşitlerinde külleme hastalığına karşı dirençli ve/veya transgen taşımayan (Cas9 ve kılavuz genler) hatlar geliştirilmesinin olanaklarının belirlenebilmesidir. Bu amaçla CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisi ve Agrobacterium aracılı gen transformasyonu yöntemi ile asmada külleme ile ilişkili 4 *MLO-S* geninin susturulmasına ve 2 *ALS* (asetolaktat sentaz) geninde spesifik bazların yeniden biçimlendirilmesine yönelik çalışmalar yürütülmüştür.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Dünyada ve Türkiye’de Bağcılığa Genel Bir Bakış

2023 yılı itibariyle 200 milyar dolarlık bir pazar hacmine sahip olan asmanın, önümüzdeki beş yıl içinde %7,1’lik bir büyüme göstermesi öngörülmektedir (Anonymous 2). Türkiye, bu büyük pazarın gelişimine etki eden önemli bir oyuncu olup, üretimin %50’sini gerçekleştiren ana üreticilerden biridir (Anonymous 1). Türkiye, dünya genelinde bağ alanları bakımından 467.093 hektarlık alan ile 5. sırada yer almaktadır.

Bağcılık faaliyetlerinin yoğun olduğu ülkeler arasında, yıllık üzüm üretimi 4 milyon ton ve üzeri olan altı ülke bulunmaktadır. Son istatistiklere göre, dünya genelindeki yaklaşık 15,6 milyon tonluk üzüm üretiminin %20’sini Çin karşılamaktadır. Çin’i sırasıyla İtalya, Fransa, ABD, İspanya ve Türkiye takip etmektedir. Sofralık üzüm üretiminde ise Türkiye, Çin ve Hindistan’dan sonra üçüncü sırayı çekmektedir. Kurutmalık üzüm ihracatında ise Türkiye uzun yıllardır birinci sırada oynamaktadır (Anonymous 1).

Türkiye, dünyanın bağcılık için en uygun iklim kuşağında yer almaktadır. Asmanın gen merkezlerinin kesiştiği ve ilk kez kültüre alındığı coğrafyanın merkezinde konumlanmış olması, Türkiye’yi zengin bir bağcılık kültürüne ve genetik potansiyele sahip kılmaktadır (Çelik vd. 1998). Bu tarihi ve köklü bağcılık geçmişi, ülkemizin asma üretiminde önemli bir rol oynamasına olanak tanımaktadır. Türkiye’nin bağcılık alanındaki pozisyonu, ülkenin bağcılık sektöründeki önemini ve katkısını yansıtmaktadır. Ayrıca, 2023 yılı verilerine göre Türkiye, dünya pazarında 279 bin ton kuru üzüm ihracatıyla birinci sırayı almıştır. Türkiye’nin kuru üzümde net bir ihracatçı olması, ülkenin kendi ihtiyaçlarını karşılayabilecek düzeyde üretim gerçekleştirmesi ve dünya pazarlarında rekabet avantajı elde etmesiyle ilişkilidir. İthalatının neredeyse olmaması, Türkiye’nin kuru üzümdeki güçlü pozisyonunu ve küresel talebi karşılamadaki başarısını yansıtmaktadır.

Dünya genelinde yaygın olarak bulunan asma türleri içinde en önemlisi, halen dünya üzüm üretiminin %90’dan fazlasını sağlayan *Vitis vinifera* L.’dir. Bu tür, küresel bağcılık sektöründe belirleyici bir rol oynamakta ve dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Ancak *Vitis vinifera* L. türüne ait asmaların yaklaşık tamamının *Erysiphe necator* (*Uncinula necator*) patojen etmeninin neden olduğu külleme hastalığına hassas olduğu kabul edilmektedir (Miclou vd. 2012).

2.2. Külleme (Powdery Mildew) Hastalığı ve Asmada Külleme Zararı

Külleme, obligat biyotrofik patojenlerin neden olduğu bir hastalıktır. Bu patojenler, Erysiphales sınıfında bulunan tek bir familyaya (Erysiphaceae) ait olan asklı mantarlardır. Külleme etmeni patojenler, süs bitkileri, tahıllar ve çeşitli meyveleri içeren 1000’e yakın kapalı tohumlu bitki türünü etkileyebilen yaklaşık 100 türe sahiptir (Qui vd. 2015). Külleme hastalığının temel belirtisi, patojenin enfekte ettiği bölgedeki fungal kolonilerin oluşturduğu unsu görüntüdür. Bu patojenler yaprak, gövde, çiçek ve meyveleri enfekte edebilme yeteneğine sahiptir (Qui vd. 2015).

Küllemenin en yaygın inokulum kaynağı, eşeysiz mantar sporlarının (konidiyum) komşu bitkilere yayılımıdır (Pessina vd. 2016). Konidiyumlar, konukçu bitkiye yerleştikten sonra ilk 60 saniyede esteraz ve kütinaz aktivitesine sahip hücre dışı bir matriks üreterek sporları konukçuya tutunur. Sporlar 30-60 dakika içinde çimlenir ve hif yapısını oluşturmaya başlar. Apresoryum hücreleri, yaklaşık 10 saatte kütikilden penetrasyon gerçekleştirirler. 2 saat sonra ise apresoryumlar, dar ve ensiz çıkıntılardan oluşan penetrasyon kancası adı verilen yapıları oluştururlar. Bu kancalar, turgor basıncı ve çeşitli enzimatik aktivitelerle hücre duvarını penetre eder. Başarılı bir penetrasyon durumunda, apresoryumlar sitoplazmaya doğru haustoryum yapısı oluşturur. Haustoryum, konukçu-patojen ilişkisinin kurulmasını sağlayan bir yapıdır ve su ile besin maddelerini emer. Haustoryumlar, patojenin bitkiden heksoz, amino asit ve vitamin ileten ve konak bitkisinin savunma mekanizmasını baskılayan bazı spesifik proteinlerini serbest bırakmasına yardımcı olur. Parazitik ilişki kurulduktan sonra hifler uzar ve konukçunun yüzeyine dağılarak dairesel beyazımsı renkte veya transparan koloniler oluşturur. Oluşan koloniler zaman içinde grimsi, kırmızımsı veya kahverengimsi renklere dönüşebilir ve birkaç gün sonra enfekte bölgede konidiyumlar oluşmaya başlar (van Shie ve Takken 2014).

E. necator, 1850'li yıllarda Avrupa'ya girmiş ve o zamandan bu yana özellikle asmada önemli kayıplara neden olmuştur. Bu patojen, asmada yeşil bütün aksamaları enfekte edebilir, ancak yapraklar özellikle küllemeye hassastır. Özellikle yaprakların yarısı oluşumunu tamamladığı dönemde hastalığa karşı hassasiyetin arttığı bilinmektedir. Asmada meyveler ise oluşumlarının ilk iki haftası içinde *E. necator*'a karşı hassastır. Küllemenin zararı, asma meyvelerinde asitliği artırarak şeker oranını düşürmekte ve bu nedenle meyve kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. *Erysipha necator*'un eşeyli ve eşeysiz askosporları, yaprağın farklı bölgelerinde farklı zararlara neden olmaktadır. Eşeyli askosporlar yaprağın alt yüzeyinde klorotik benekler oluştururken, eşeysiz askosporlar (konidiyum) yaprak üst yüzeyinde grimsi unsu benekler meydana getirmektedir. Şiddetli külleme enfeksiyonları, üzümde nekrotik lekelerin oluşumuna ve yaprakların dökülmesine neden olabilmektedir. *E. necator*, asmada kış aylarında tomurcuk içlerinde açık formda veya yaprak, sürgün ve hatta tanelerde kapalı formda klaistotesium şeklinde yaşamaktadır. Soğuk kış koşulları, açık formdaki tomurcuklarda yaşayamamalarına neden olduğundan, ilkbaharda yaşanacak külleme enfeksiyonlarının kaynağı klaistotesiumlar olacaktır (Gadoury vd. 2012).

E. necator'un gelişmesi ve sporlanması için optimum bağıl nem koşulları yaklaşık %85'tir, ancak suda sporlar çimlenemez. Çimlenme için uygun sıcaklık aralığı 23°C-30°C'dir ve optimum sıcaklık 26°C olarak rapor edilmiştir (Gadoury vd. 2012; Van Shie ve Takken 2014; Qui vd. 2015). Külleme, 6°C-32°C arasında gelişebilir; ancak, 35°C ve üzeri sıcaklıklar sporların çimlenmesini engelleyebilir. 40°C'ye maruz kalan sporlar ise ölebilir. Sıcaklık, küllemenin inkübasyon periyodunu doğrudan etkiler. Hastalık, gelişimi için optimum sıcaklık olan 26°C'de 5 günde gelişirken, 9°C'de 25 günde gelişir. *E. necator*, UV ışığına duyarlı bir patojendir. Doğrudan güneş ışığından uzak bulunmak, patojenin gelişimini olumlu yönde etkileyebilir. Sporların su içinde çimlenmesi sınırlı olsa da yağışlı mevsimlerde şiddetli külleme salgınlığının nedeni, yağışın patojeni doğrudan güneş ışığından koruyarak hastalığın etkili bir şekilde kendini göstermesine olanak tanımasıdır. Ayrıca, yağışlar askosporların dağılmasını olumlu yönde etkileyebilir (Gadoury vd. 2012; Van Shie ve Takken 2014; Qui vd. 2015; Pessina vd. 2016).

2.3. Asmada Külleme Kontrolü

Asmada külleme kontrolünde budama, fungusit uygulamaları ve dayanıklı çeşitlerin kullanımı gibi farklı yaklaşımlar benimsenmektedir. Budama ile bitki yüzeyindeki nemin azaltılması ve bitkinin güneş ışığına maruziyetinin artırılması amaçlanır böylece hastalığın yayılmasının önüne geçilmesi hedeflenir. Ancak budama külleme zararından korunmada etkili bir yöntem olarak değerlendirilmemektedir.

Bir diğer yaklaşım olan fungusit kullanımı ise pek çok dezavantaj barındırmaktadır. Sülfür bazlı kimyasal ve organik fungusitler *E. necator*'un neden olduğu külleme hastalığında sıklıkla kullanılmaktadır. Bunların kullanımı, patojenin direnç geliştirmesine izin vermemek ve organik tarımda kullanılabilirlik olmak gibi avantajlar bulundurmaktadır (Gadoury vd. 2012). Özellikle *E. necator*'un kontrolünde kullanılan benzimadole, ergosterol biyosentez inhibitörleri ve quinone-outside inhibitörleri sülfür bazlı fungusitlerden daha etkindirler. Ancak bunların devamlı kullanımı patojende tek baz mutasyonuna neden olarak patojenin direnç geliştirmesine neden olabilmektedir (Gadoury vd. 2012). Bu tip fungusitlere dirençli çok fazla *E. necator* ırkı bulunmaktadır. Fungusitlerin kullanımında zamanlama oldukça önem taşımaktadır. Hava durumu, bitkinin fenotipik yapısı ve ontojenik yani bitki yaşlandıkça gelişen direnç gibi faktörler uygulama zamanını etkilemektedir. Asmada meyvelerin küllemeye hassas olduğu dönem çok kısadır ve bu kısa dönemde fungusit uygulamasının yapılması kritik önem taşımaktadır (Gadoury vd. 2012, Pessina vd. 2016). Küllemeye karşı fungusit uygulamalarının bir başka dezavantajı ise etkin bir kontrol için çok fazla fungusit kullanılmasının gerekliliğidir. 2007 yılında Avrupa'da yapılan bir çalışma 2001-2003 yılları arasında Avrupa'da uygulanan fungusitlerin %67'sinin, Avrupa tarım alanlarının sadece %3,3'ünde üretilen asma için kullanıldığını rapor etmiştir (Pessina 2016). Yaygın fungusit kullanımının çevresel etkileri önemli bir endişe kaynağıdır. Bu kimyasalların toprak, su ve hava kalitesini olumsuz etkileyerek ekosistemlere zarar verebileceği bilinmektedir. Fungusitlerin hedefte olmayan organizmalara olan etkileri de göz ardı edilmemelidir. Bu kimyasallar, istenmeyen canlı türlerine, özellikle de tozlaşma yapan böceklerle ve diğer doğal düşmanlara zarar verebilir. Kimyasal kalıntılar, üzüm bağlarında ve çevresindeki ekosistemlerde uzun süreli kalıcılık gösterebilir. Bu da hem insan sağlığı hem de ekosistem sağlığı açısından potansiyel riskler oluşturabilir. Özetle, asmada külleme kontrolünde fungusitler yüksek maliyetli, çevre üzerinde olumsuz etkileri olan, asmada özellikle şarap üretiminde faydalı organizmalara zarar veren ve üretici sağlığını tehdit eden hastalık kontrol araçlarıdır. Bağcılıkta fungusit kullanımının sürdürülebilir ve çevre dostu alternatiflerle dengelenmesi gerekliliğini bir kez daha vurgulamak doğru olacaktır.

Külleme kontrolünün dirençli asma çeşitleri ile sağlanması ise külleme kontrolünde uygulanan bir diğer yaklaşımdır. Vitis'in pek çok türü olmasına karşın ticari değeri olan *Vitis vinifera*'dır. *V. vinifera*'da en çok tarımı yapılan Chardonnay, Pinot Noir, Merlot, Cabernet Sauvignon kültür çeşitleri küllemeye oldukça hassastır (Barba vd. 2014). Asma (*V. vinifera*) Avrasya kökenli olmasına karşın *E. necator* Kuzey Amerika orijinlidir ve Kuzey Amerika kökenli diğer başka Vitis türlerinde kolonize olmuşlardır. Bu durum, *Vitis vinifera* gibi asma türlerinin *E. necator*'a hassas olmasına neden olmuştur, buna karşın Kuzey Amerika'daki asmanın yabani akrabaları kısmen ya da tamamen *E. necator*'a dirençlidir (Cadle Davidson vd. 2011). *Vitis vinifera*'nın ve Kuzey Amerika'dan *Vitis rotundifolia*, *Vitis rupestris*, *Vitis riparia* ve *Vitis aestivalis* gibi

dirençli akrabaları ile çaprazlanması ile dirençli hibritler geliştirilmiştir. Fuller vd. (2014), bir projeksiyon çalışmasında külleme dirençli hibrit asmaların Kaliforniya üzüm üretimine yılda 48 milyon dolar maliyet tasarrufu kazandırma potansiyeli bulunduğunu analiz etmişlerdir. Ancak dirençli hibritlerin düşük kaliteleri nedeniyle üzüm yetiştiriciliğinde kurutmalık, şaraplık ve sofralık alt sektörlere her durumda hitap edemeyebileceğini vurgulamışlardır.

Bitki ıslah programlarında patojen ve zararlılara karşı direnç kazandırmak için tipik olarak dominant R (direnç) genleri kullanılır. Ancak direnç tek bir patojenden türetilmiş moleküler paternin tanınmasına dayandığı için dirençlilik dar bir spektrumda gerçekleşir ve patojenin genleri tek baz mutasyonu gibi mekanizmalarla bunun kolayca üstesinden gelir (van Schie ve Takken 2014). Asmadaki duruma gelinecek olursa *Vitis rotundifolia* R genlerinden *REN* ve *RUN*, küllemeye karşı direnç ıslah programlarında kullanılmaktadır. R genleri ve patojenlerin avirülens faktörleri, beraber evrimleşme (coevolution) için mükemmel bir örnektir. Ancak patojenlerin geçirdiği mutasyonlar, bitkinin R genleri ile kazandığı direnci aşabilmektedir. Asma gibi klonlama yöntemleriyle çoğaltılan çok yıllık bitkiler genetik olarak tek tip olduklarından yeni mutasyonlara sahip olamayacaktır. Bu nedenle asmada R genleri ile kazandırılan dirençlilik, bir süre sonra etkisini yitireceğinden elverişli bulunmamaktadır (Caffier ve Laurens 2005).

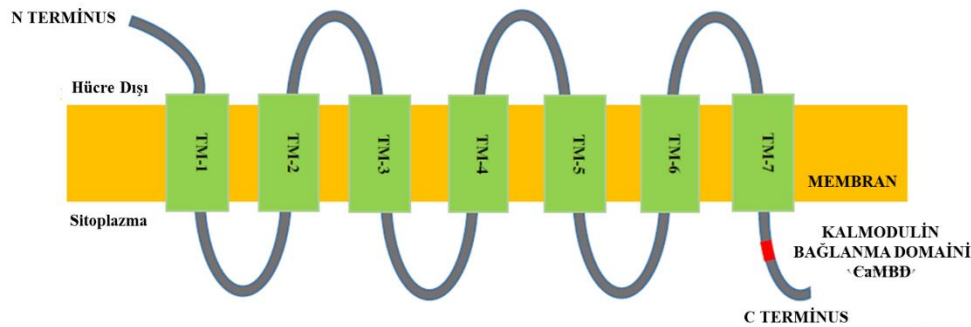
Son yıllarda pek çok araştırma, S genleri olarak tanımlanan, bitki ve patojen arasındaki uyumlu etkileşime neden olan genlerin direnç ıslahında kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu uyumluluğu kritik olarak kolaylaştıran bir bitki geninin değiştirilmesi, daha geniş spektrumlu ve dayanıklı bir direnç türü sağlayabilmektedir (van Schie ve Takken 2014). Ancak S genleri patojen için bir uyumluluk faktörü olmaktan başka işlevlere de sahip olduğundan, mutasyonlarının neden olduğu yan etkiler ile birlikte değerlendirilmelidir. S genleri konak-patojen etkileşim süreçlerinin farklı aşamalarında duyarlılığı kolaylaştırarak enfeksiyona katkıda bulunmaktadır. Bu genler, konak-patojen uyumluluğuna izin veren genler, bağışıklık sinyalleme sinin negatif regülatörlerini kodlayan genler ve patojenin metabolik ve yapısal ihtiyaçlarını karşılayarak patojenin çoğalmasına izin veren genler olarak sınıflanmaktadır (van Schie ve Takken 2014). S genlerinin susturulması ile bitkiye külleme direnci kazandırılan çalışmalar bulunmaktadır. S genlerinin fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar resesiftir yani fonksiyonel olmayan allel homozigot olmalıdır, heterozigotluk durumunda hassaslık devam edecektir. Ayrıca S genlerinin patojene karşı hassasiyet oluşturmaya karşı evrimsel süreçte bitkilerden kaybolmamış olması S genlerinin bitkinin fizyolojik yapısında önemli işlevleri olduğunu göstermektedir. Örneğin mutant S genlere sahip *Arabidopsis thaliana*'da anormal kök oluşumları saptanmıştır (Acevedo-Garcia vd. 2014). S genlerinin kaybı bitkiye bazı maliyetlere neden olsa da, S genleri ile sağlanan resesif direncin patojenin birçok ırkına karşı uzun ömürlü dayanıklılık sağlaması, S genlerini R genlerine kıyasla daha avantajlı kılmaktadır. Ayrıca S genlerinin susturulması neticesinde gelişen anormal kök yapıları asma gibi aşılama yönteminin kullanıldığı bitkilerde farklı anaçlar kullanılarak çözülebilir (Pessina 2016). Özetle, asmada uzun süreli külleme direncinin, S genlerinden *MLO* (Mildew Locus O) olarak tanımlanan gen ailesinde yapılacak mutasyonlar ile sağlanabileceği bildirilmiştir (Winterhagen vd. 2008; Feechan vd. 2008).

2.4. *MLO* Gen Ailesi

Bitkilere külleme direnci, spesifik *MLO* genlerinin işlev kaybı ile kazandırılabilir. Bu direnç türü, 1942'de Almanya'da rastgele mutagenез yoluyla külleme dirençli bir arpa hattında keşfedilmiştir (Jorgensen 1992). Arpa ıslahında on yıllardır başarıyla kullanılan *MLO* direnci günümüzde hala etkilidir. *MLO* direncinin en çekici özellikleri, hem ekonomik hem de çevresel nedenlerle son derece değerli iki özellik olan dayanıklılık ve geniş spektrumlu etkililiktir (Jorgensen 1992). Daha sonra pek çok *MLO* geni keşfedilmiştir, ancak bunların hepsinin S geni olarak davranmadığı belirlenmiştir (Acevedo-Garcia vd. 2014). Bitkilerde *MLO* genleri büyük ölçüde korunmuştur ve en önemlisi, bu genlerdeki fonksiyon kayıplarının domates, bezelye, buğday, biber gibi bitkilerde külleme direnci kazandırdığı saptanmıştır (Consonni vd. 2006; Acevedo-Garcia vd. 2014; Zheng vd. 2016). Farklı türlerde başarılı bir külleme direnci sağlayabilmek, farklı sayıdaki *MLO* geninin susturulmasını gerektirebilir. Örneğin, domateste tek bir *MLO* gen üyesinin susturulması külleme direnci kazanmak için yeterli iken, Arabidopsis'te 3 *MLO* gen ailesi üyesinin susturulması bitkiye külleme direnci kazandırmıştır (Consonni vd. 2006; Bai vd. 2008; Zheng vd. 2016).

2.4.1. *MLO* proteinlerinin yapısı ve filogenetik analizi

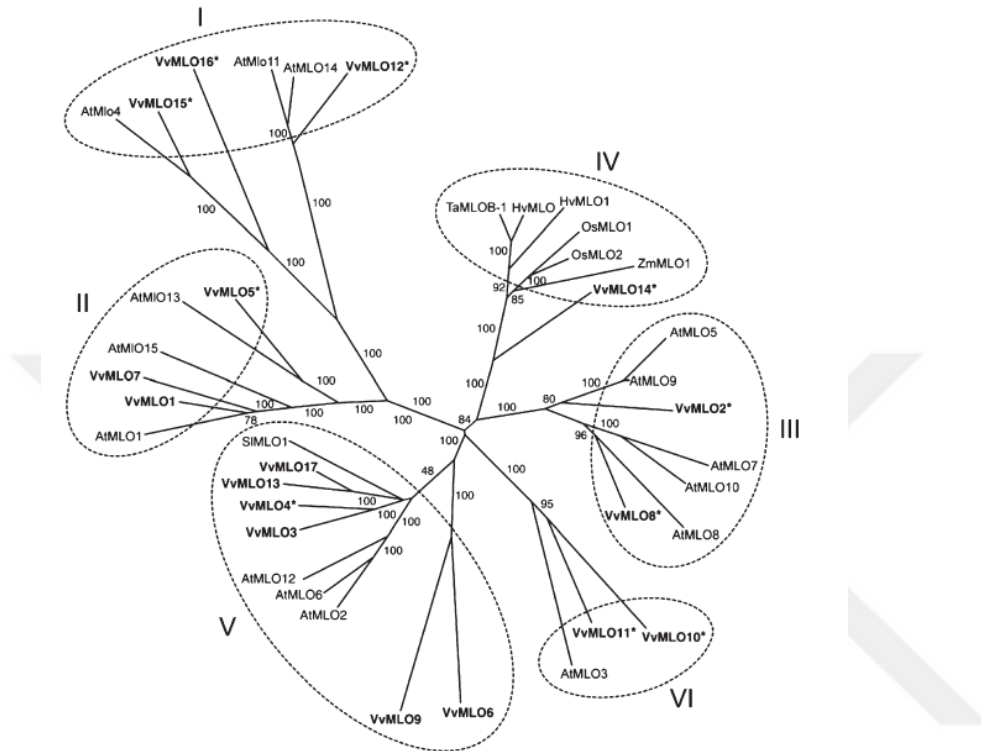
İlk kez arpada keşfedilen *MLO* genleri sonraki yıllarda haritalanarak membrana sabitlenmiş bir protein olarak karakterize edilmiştir (van Schie ve Takken 2014). *MLO* proteinlerinin 7 trans-membran domaini, 1 ekstraselüler N-terminusu ve 1 sistolik C-terminusu bulunur (Şekil 2.1). C-terminus uzunluk ve amino asit (aa) bakımından çok çeşitlidir. Örneğin, arpadaki Hv*MLO* genlerinin tam aktivitesi için calmodulin bağlanma alanının kesinlikle gereklilik taşıdığı bildirilmiştir (Kim vd. 2002).



Şekil 2.1. *MLO* proteininin tahmini şematik modeli. Bir ekstraselüler N-terminus ve yedi transmembran (TM) alanına sahip sitoplazmik C-terminus bölgesi. C-terminus kalmodulin bağlanma domaini (CaMBD), savunma tepkisinde sinyalleme mekanizmasını düzenler (Filiz ve Vatansever 2018)

MLO proteinleri, diğer proteinlerden belirgin motiflere sahip olmamaları ve farklı sekanslara sahip olmalarıyla dikkat çeker. Bu durum, *MLO* proteinlerinin biyokimyasal aktiviteleri hakkında çıkarım yapmayı zorlaştırmaktadır ve bu nedenle *MLO* proteinlerinin spesifik fonksiyonları tam olarak belirlenememiştir (Chowdhury vd. 2014). *MLO*, genetik açıdan geniş bir aileye sahiptir. Her bitki türü farklı sayıda *MLO* gen üyesine sahiptir (Çizelge 2.1). *MLO* gen ailesi 6 farklı sınıfa ayrılmıştır (Şekil 2.2). Ancak

MLO gen ailesinin pek çok üyesi külleme hassasiyetinde rol oynamamaktadır. Külleme hassasiyetinde rol alan *MLO* gen üyeleri, özellikle sınıf 4 ve 5 içerisinde bulunmaktadır. Ancak sınıf 4 ve 5 içindeki tüm *MLO*'lar S geni taşıyanlar değildir. Dicotlarda, bütün *MLO*-S genleri sınıf 5 içerisinde bulunmaktadır (Feechan vd. 2008; Acevedo Garcia vd. 2014).



Şekil 2.2. Bazı bitki türlerinde *MLO* gen ailesi üyelerinin filogenetik şeması (Feechan vd. 2008)

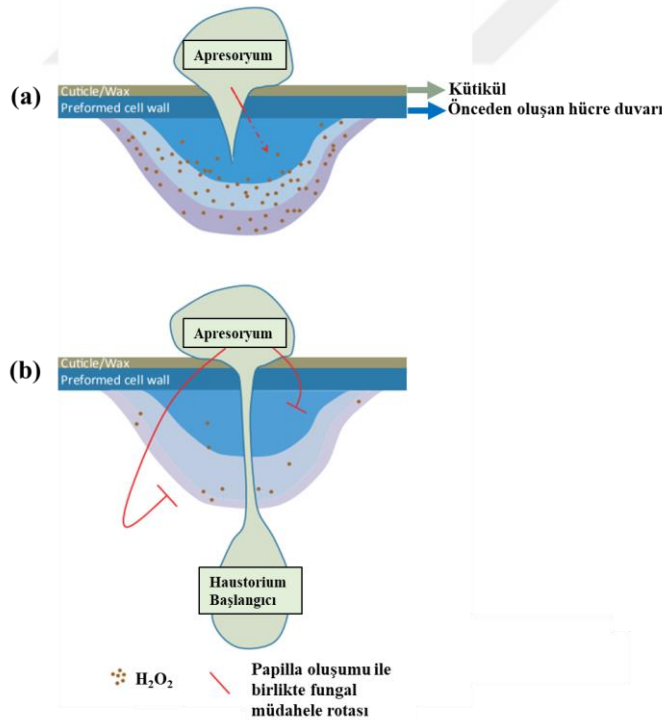
Çizelge 2.1. Bazı bitki türlerinde belirlenmiş *MLO* gen sayıları (Ievieno vd. (2016)'dan uyarlanmıştır)

Bitki Türü	<i>MLO</i> gen sayısı
<i>A.thaliana</i>	15
<i>B.rapa</i>	23
<i>C.sativus</i>	13
<i>S. lycopersicum</i>	17
<i>C. annuum</i>	15
<i>M. domestica</i>	21
<i>V. vinifera</i>	19

2.4.2. *MLO* proteinlerinin külleme hassasiyeti oluşumundaki rolleri

MLO proteinlerinin külleme oluşumundaki tam fonksiyonları belirlenmiş olmasa da, bazı araştırmalar külleme hassasiyeti ve *MLO* gen ilişkisini "Papilla Hipotezi" ile açıklamaktadır (Hückelhoven 2014). Bu hipoteze göre, *MLO* mutantlarının, *MLO* genlerinin papilla adı verilen hücre duvarı eklenti yapılarıyla ilişkili fonksiyon gösterdiği tespit edilmiştir. Papilla, protein ve çeşitli bileşiklerce zengin bir kalloz matrisinden oluşmaktadır. Papilla yapısı, plazma membran ile bitki hücre duvarının içi arasında oluşan karmaşık bir yapıdır. Bu yapı, spesifik biyokimyasal bileşenler içerebilmekle birlikte fenolikler, reaktif oksijen türleri, hücre duvarı proteinleri ve hücre duvarı polimerlerini içerebilmektedir. En yaygın olarak papilla yapısında bulunan polimerlerden biri, 1,3- β -glukan kalloz'dur (Chowdhury vd. 2014).

Külleme hassasiyeti ve papilla yapısı arasındaki ilişki incelendiğinde, papilla yapısının patojenin penetrasyon kancasının hücre duvarına girmesini engellediği görülmektedir. Yani *MLO* mutant bitkilerde külleme etmeni patojen penetrasyonunu gerçekleştiremez ve hastalık gelişmez (Hückelhoven 2014). Ancak, papilla yapısının sadece *MLO* mutantlara özgü olmadığı, külleme enfeksiyonuna maruz kalmış bitkilerde de gelişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Etkin bir papilla yapısı, kalloz, selüloz ve arabinozilan konsantrasyonlarındaki yükseklikle doğru orantılıdır (Şekil 2.3). Külleme hassas bitkilerin papilla yapıları, bitkide zamanında oluşamama, zayıf kompozisyona sahip olma ve etkin olmayan büyüklük gibi nedenlerden dolayı düşük işlevselliğe sahiptir (Chowdhury vd. 2014).



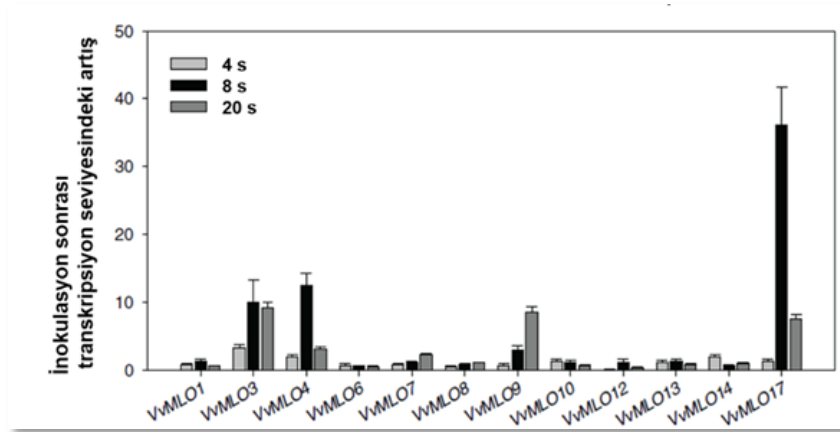
Şekil 2.3. Papilla Hipotezi'ne göre külleme dayanımı. **a)** etkin kimyasal içeriğe sahip güçlü papilla sebebiyle penetrasyon yapamamış apresoryum yapısı; **b)** zayıf papilla yapısına sahip dokuya penetrasyon yaparak haustorium yapısı oluşturmuş bir apresoryum (Hückelhoven 2014)

2.4.3. *MLO* proteinlerinin bitkideki diğer fonksiyonları

MLO proteinlerinin ana işlevleri tam olarak bilinmemekle birlikte, başta *A. thaliana* olmak üzere çeşitli türlerde yapılan çalışmalar *MLO* gen ailesi üyelerinin bitkideki farklı fizyolojik fonksiyonlarını ortaya koymaktadır (Panstruga 2005; Consonni vd. 2006). Özellikle külleme hassasiyetine neden olan *MLO* genlerinin işlevleri tam olarak açıklanabilmiş değildir. Feechan vd. (2008), *MLO* gen ekspresyonlarını farklı asma yaprak dokularının farklı zamanlardaki değişen ekspresyon seviyelerini, *MLO* genlerinin bitkide çeşitli fizyolojik proseslerde yer alıyor olmasından kaynaklı olabileceğini açıklamışlardır. *A. thaliana*'da ise *AtMLO4* ve *AtMLO11* mutantlarında anormal kök gelişimi, *AtMLO7* mutantlarda anormal polen tüpü yapıları gözlenmiştir. (Acevedo-Garcia vd. 2014). Arpada, senesens benzeri yaprak klorozu, dane veriminde düşüş, Arabidopsiste, senesens benzeri fenotip ve nekrotik patojenlere daha fazla hassaslık biberde, *CaMLO1* ve *CaMLO2*'nin susturulmasının bitki boyunu azalttığı görülmüştür (Jorgensen 1992; Consonni vd. 2006; Zheng vd. 2013). Bitkilerde *MLO* genlerinin susturulmasının sıradışı fenotiplere neden olabileceği gözardı edilmemelidir. Yine de *MLO* genlerinin istenmeyen fenotipik etkileri tüm bitkiler için genellenemez, örneğin domateste *SLMLO1* geninin susturulmasının bitki fizyolojisi üzerinde olumsuz bir etkisi saptanmamıştır (Bai vd. 2008). Özetle, aday *S* genlerini susturmak için bir gen düzenleme yaklaşımını benimsemeden önce *MLO* genlerinin işlev kaybının külleme duyarlılığını azaltabildiğine dair kanıt gerekmekte ve bu kaybın bitkiye olan maliyetinin en az seviyede bulunması önem taşımaktadır.

2.4.4. Asmada külleme hassasiyetinde rol oynayan *MLO* proteinlerinin incelenmesi

Yeni nesil DNA dizileme teknolojileri ile üzüm referans genomunun (Jaillon vd. 2007) oluşturulması asmada biyoteknolojik çalışmalara ivme kazandırmıştır. *V. vinifera* genom dizisinin araştırmacıların kullanımına sunulması, bu türdeki *MLO* gen ailesi üyelerinin belirlenmesi ve karakterize edilmesi için de bir fırsat sağlamıştır. *MLO* ailesinin üyelerinin çoğunluğunun külleme duyarlılığında bir rolü olmadığı ve olanların sınıf 4 ve 5 ile sınırlı olduğu saptanmıştır (Feechan vd. 2008). Yine de sınıf 4 ve 5 içinde yer alan tüm *MLO* üyelerinin *S*-geni olmadığı, ancak *S* gen adayları arasında tanımlanabileceği çeşitli gen ekspresyon çalışmalarıyla ortaya konulmuştur (Bai vd. 2008; Feechan vd. 2008; Winterhagen vd. 2008; Zheng vd. 2013). *MLO* genleri arasından aday *S*-genlerinin seçimi yapılırken başlıca iki filtre kullanılması tavsiye edilmektedir. Bunlar, dikotlar için seçilecek *MLO* genlerinin sınıf 5'te yer alması ve hedeflenen genin külleme etmenine bağlı olarak indükleniyor olmasıdır (Pessina 2016) Asmada *MLO* gen ekspresyonlarının değerlendirildiği çeşitli çalışmalarda, sınıf 5'te yer alan 4 genin külleme etmeni patojenin inokülasyonundan sonra yukarı regüle edildiği rapor edilmiştir (Şekil 2.4) (Feechan vd. 2008; Winterhagen vd. 2008). Bu nedenle asmada uzun süreli külleme direncinin, *S* genlerinden *MLO* olarak tanımlanan gen ailesinde yapılacak mutasyonlar ile sağlanabileceği bildirilmiştir (Feechan vd. 2008 Winterhagen vd. 2008).



Şekil 2.4. Asmanın *E. necator* ile inokulasyonu sonrası *MLO* genlerinin gösterdiği gen ifadesi seviyeleri (Feechan vd. 2008)

Asmada külleme enfeksiyonunun erken evrelerinde, *MLO* gen ekspresyonlarının takip edildiği çeşitli çalışmalarda sınıf 5'teki 3 genin külleme etmeni patojenin inokülasyonundan sonra yukarı regüle edilirken, 4. bir genin patojene yanıt vermediği rapor edilmiştir (Feechan vd. 2008, Winterhagen vd. 2008). Pessina vd. (2016), asmada RNA müdahalesi (RNAi) ile gerçekleştirdikleri çalışmada, Feechan vd. (2008) ve Winterhagen vd. (2008)'in rapor ettikleri *MLO* genlerini çeşitli kombinasyonlarda aşağı regüle ederek küllemede etkili rol oynayan *MLO* genlerini saptamışlardır. Giacomelli vd. (2019) Crispr/Cas9 genom düzenleme teknolojisi ve *Agrobacterium* aracılığıyla gerçekleştirdikleri transformasyon çalışmasında, VvMLO7 kodlu geni susturarak, uzun süreli külleme dirençli asmalar elde etmişlerdir. Wan vd. (2020), "Thompson Seedless" çeşitinde aday S genlerinden en önemli ikisi VvMLO3 ve VvMLO4 kodlu genleri Crispr/Cas9 teknolojisi yardımıyla ve *Agrobacterium* aracılığıyla susturarak külleme dirençli bitkiler geliştirmişlerdir.

2.5. Gen Düzenleme Yöntemleri

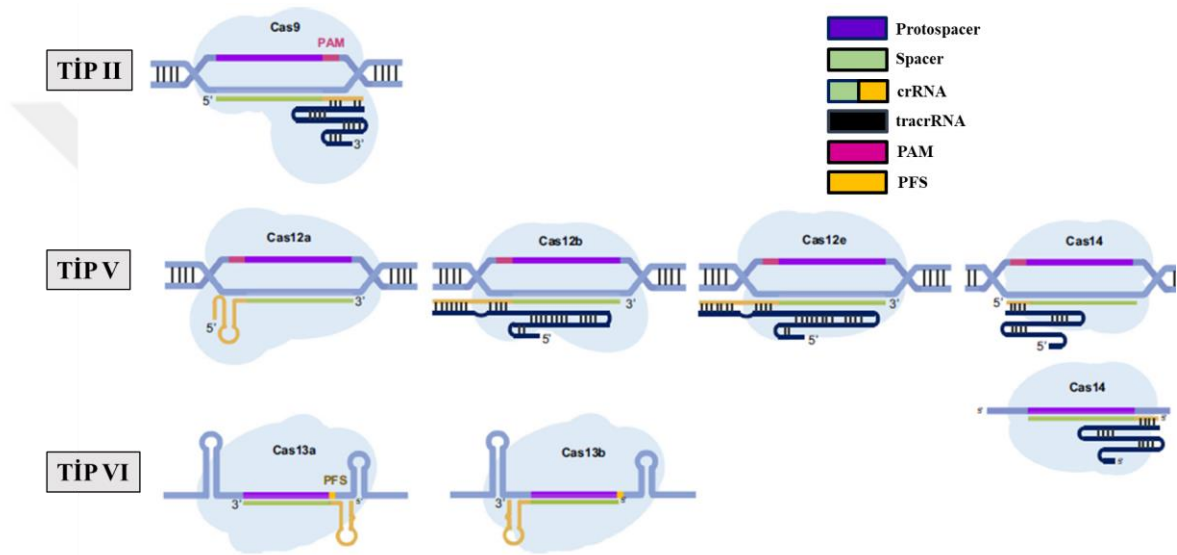
Genom mühendisliği, karmaşık gen etkileşimlerini çözümlemenin yanı sıra sentetik biyolojide yeni yollar oluşturma için mümkün olmasını sağlamıştır. Son birkaç on yılda, genom mühendisliği tekniklerindeki hem sayısal hem de uygulamaya yönelik büyük ilerlemeler dikkat çekmektedir. Çalışmada kullanılan genom düzenleme yöntemlerinden CRISPR/Cas9, hızı ve adaptasyon yeteneği nedeniyle devrim niteliğinde olsa da, genom mühendisliğini mümkün kılan ilk teknoloji değildir. Gen düzenleme, proteinlerden mühendislikle geliştirilen çeşitli yöntemleri içerir; bunlar arasında çinko parmak nükleazlar (ZFN'ler), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) ve homing endonükleazlar olarak da adlandırılan meganükleazlar bulunmaktadır. Gen düzenleme alanında kullanılan birçok yöntemin araştırmacılara getirdiği kısıtlamalara karşın, CRISPR/Cas9, kullanım kolaylığı ve çok yönlülüğü nedeniyle genom mühendisliği alanında hızla benimsenmiştir. Bu bölümde, CRISPR/Cas9'ın temel prensipleri ve bu teknolojinin asmada kullanım alanları detaylı bir şekilde ele alınacaktır.

2.5.1. Bağışıklık tepkisinden genom mühendisliğine; CRISPR-Cas9 teknolojisinin dönüşümü

Patojenler, özellikle virüsler, tek hücreli organizmalar için de tehdit oluşturur, bu nedenle bu organizmaların genomlarını korumak için bir savunma mekanizmasına ihtiyaçları duyarlar. Geçmişte, bakterilerin savunma mekanizması olarak sadece doğal restriksiyon enzimlerine sahip oldukları düşünülüyordu. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar, bakterilerin patojenlere karşı kazanılmış bağışıklık sistemleri geliştirebileceğini ortaya koymuştur. Bu bağlamda, günümüzde CRISPR-Cas olarak bilinen bu sistemin, arkelerin %84'ünde ve bakterilerin yaklaşık %45'inde bulunduğu bilinmektedir (Maeder ve Gerbach, 2016). Prokaryot organizmaların savunma mekanizması olan "düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri" veya kısaca CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) bölgeleri, kazanılmış bağışıklık sisteminin temelini oluşturur. Bu bölgeler, ilk keşfedildiklerinde *Escherichia coli*'de yapılan bir çalışma sırasında Apoptoz İnhibitör Protein (IAP) gen dizisi analiziyle ortaya çıkmıştır. Bu kısa DNA dizilerin, palindromik yapılarıyla dikkat çeker ve her iki yönde de aynı okunan dizilerdir. Aralarında bulunan aralayıcı (spacer) adı verilen DNA bölgeleri, kazanılmış bağışıklık sisteminin belleğini oluşturan temel öğelerdir. Bu aralayıcı bölgeler, genellikle bir virüsün veya plazmidin nükleik asitlerinden prokaryot genomuna alınır. Aynı virüsle tekrar karşılaşıldığında, aralayıcı diziler tanıma bölgesi olarak işlev görür ve istilacı genomu parçalayarak savunma mekanizmasını harekete geçirir. CRISPR lokusundaki tekrar bölgeleri genellikle genomlar arasında korunsun da, farklı organizmalarda bu oranlar değişebilir. Tekrar dizilerinin uzunlukları 21-48 baz çifti arasında değişirken, aralayıcı bölgelerin uzunlukları 26-72 baz çifti arasında değişiklik gösterir. Ayrıca, bir genomda birden fazla CRISPR lokusu bulunabilir (Jiang ve Marraffini 2015). CRISPR lokusunun yukarı akış bölgesinde bulunan ve "lider dizi" olarak adlandırılan korunmuş bölgeler, transkripsiyonun yönünü belirlemektedir. Bu bölgeler, CRISPR sisteminin temel birer unsuru olan Cas gen bölgeleri ile birlikte önemli bir işlevi yerine getirir. Prokaryot bağışıklık sistemi için kritik öneme sahip olan Cas genleri genellikle CRISPR sisteminin yakınında konumlanmıştır. Cas proteinlerinin helikaz ve nükleaz gibi özelliklere sahip olmaları, DNA dizilerini açma ve kesme yetenekleri sunar. Bu şekilde, Cas proteinleri nükleik asitlerle etkileşim kurarak nükleaz, helikaz veya RNA bağlanma proteini olarak çeşitli aktivitelerde bulunabilirler. Bağışıklık yanıtının farklı aşamalarında görev alan özelleşmiş Cas proteinleri mevcuttur. CRISPR-Cas sistemleri büyük ölçüde iki sınıfa ayrılmıştır: tip I, III ve IV'ü içeren 1. sınıf sistemler, yabancı nükleik asitleri yok etmek için çoklu protein kompleksleri kullanırken, tip II, V ve VI'yı içeren 2. sınıf sistemler tek proteinler kullanır (Makarova vd. 2020). Bu bölümde, gen düzenleme aracı olarak kullanılan doğal Cas nükleazlarının genel bir değerlendirmesi yapılacak ve performansı iyileştirilmiş, yaygın olarak kullanılan biyomühendislik varyantları tanımlanacaktır.

Cas9 nükleazları, tip II CRISPR-Cas sistemlerinin birer bileşeni olarak, hedef bölgelerde çift iplikli kesiklere (kısaltma, DSB, İngilizce double strand kelimelerinin baş harflerini temsil etmektedir) neden olan RNA tarafından yönlendirilen DNA endonükleazlardır (Gasiunas vd. 2012; Garneau vd. 2010) (Şekil 2.5). Cas9'un iki ayrı nükleaz alanı vardır, HNH ve RuvC, sırasıyla hedef ve hedef olmayan ipliği keser (Gasiunas vd. 2012; Jinek vd. 2012). İki nükleazdan birinin devre dışı bırakılması bir Cas9 nikaz (nCas9) oluşturur, bu da sadece bir DNA ipliğini keser. Her iki nükleaz

alanının devre dışı bırakılması ölü Cas9 (dCas9) oluşturur, bu yapı da hedef DNA'ya bağlanır (Qi vd. 2013). nCas9, DSB'leri gerektirmeyen hassas genom düzenleme gerçekleştiren baz editörleri ve prime editörleri için kullanışlıdır (Anzalone vd. 2020), ve dCas9, belirli genomik alanlara yakın etkenleri çekmek için bir iskelet yapı olarak hizmet eder. dCas9, transkripsiyonu düzenlemek, epigenetik kontrolleri değiştirmek, canlı hücreleri görüntülemek ve diğer amaçlar için yaygın olarak kullanılır (Wang vd. 2016; Nakamura vd. 2021). Yabani tip SpCas9'un ökaryotik hücrelerde güçlü bir aktivitesi olmasına rağmen, özellikle hassas genom düzenleme, örneğin baz düzenleme ve prime düzenleme gibi uygulamalar için spesifik PAM gereksinimi uygulamalarını sınırlar (Anzalone vd. 2020). Bu sorunla başa çıkmak için birçok Cas9 ortolog ve çeşitli PAM dizi tercihleri olan varyantlar karakterize edilmiş ve gen düzenleme uygulamalarında kullanılmıştır (Collias ve Beisel, 2021).



Şekil 2.5. Sınıf 2 CRISPR sisteminde doğrulanmış genom düzenleme araçları ve kesim yeri mimarisi. Cas9, tip II sistemi temsil eder ve crRNA ve tracrRNA tarafından yönlendirilir. RNP formu uyumlu PAM dizisini tanımlar ve crRNA ile protospacer arasında dizi benzerliği olduğunda helikal yapının açılmasını sağlar. Tip V'de Cas12a, Cas12b, Cas12e ve Cas14'ü içeren çeşitli alt tipler doğrulanmıştır, her alt tip farklı bir mimari gösterir. Cas12a için yalnızca crRNA gereklidir, diğer alt tipler için ek bir tracrRNA gereklidir. Cas14, hem ssDNA (tek zincirli DNA) hem de dsDNA (çift zincirli DNA) kesme aktivitesini gösterir. dsDNA kesimi için bir PAM gerekliliği vardır. En iyi karakterize RNA nükleaz Cas13, Tip VI'ya aittir. Protospacer çevreleyen dizinin (PFS) tanınmasıyla, crRNA-Cas13 kompleksi ssRNA kesme aktivitesini tetikler. Hedef tanıma sonrasında, Cas13, yan ürün olarak ssRNA aktivitesi ile donatılmıştır. (Moon vd. 2019)

Bir başka cas proteini Cas12 tip V nükleazları, tek bir RuvC benzeri yapı içerir ve hem hedef hem de hedef olmayan iplikleri keser. Cas12 tip nükleazlar PAM bölgelerinin aşağısında yarı çapraz uçlar oluşturur (Zetsche vd. 2015). Cas12a (Cpf1), gen düzenleme aracı olarak kullanılan ilk Cas12 nükleazıdır (Zetsche vd. 2015). Cpf1, yalnızca bir crRNA'ya ihtiyaç duyar ve pre-crRNA'yı olgun crRNA'ya kendi işleyebilme özelliği, çoklu gen düzenleme için avantajlıdır (Zetsche vd. 2017). Hem bir crRNA hem de tracrRNA gerektiren Cas12b ise insan hücrelerinde ve bitkilerde gen düzenleme

başarısına ulaşmıştır (Strecker vd. 2019; Ming vd. 2020)

Son olarak Sınıf I'de yer alan Cas13 nükleazları, tip VI CRISPR-Cas sistemlerine ait olup iki HEPN (Hepatitis C virus-like Endonuclease) alanı içeren RNA tarafından yönlendirilen ribonükleazlardır. Bu nükleazlar, pre-crRNA'yı olgun crRNA'ya işleyebilir. Cas13a, Cas13b, Cas13d, Cas13X, Cas13Y ve Cas13bt gibi birçok Cas13 nükleazı, memeli hücrelerinde stabil ve güçlü gen susturma aktivitesine sahiptir (Abudayyeh vd. 2017; Cox vd. 2017; Konermann vd. 2018; Kannan vd. 2021; Xu vd. 2021a). LwaCas13a'nın, pirinç protoplastlarında endojen genleri etkili bir şekilde susturabildiği rapor edilmiştir (Abudayyeh vd. 2017). Ayrıca, Cas13a kullanılarak transkript takibi ve nükleik asit tespiti de mümkündür (Abudayyeh vd. 2017; Gootenberg vd. 2017). Cas13b'nin katalitik olarak etkisiz bir formu (dCas13b), ADAR2'nin adenozin deaminaz alanına füzyon yapılarak A'dan I'ye ve C'den U'ya düzenleme yapan RNA baz editörleri oluşturulabilir (Cox vd. 2017; Abudayyeh vd. 2019). Son zamanlarda, Cas13X, Cas13Y ve Cas13bt gibi Cas13 nükleazları, memeli hücrelerinde RNA susturma ve baz dönüşümü için tanımlanmış ve geliştirilmiştir (Kannan vd. 2021; Xu vd. 2021a).

Bakteri ve arkelere ait en yaygın CRISPR sistemleri olan Tip 1 CRISPR sistemleri, birden çok alt birim efektörü içermeleri nedeniyle gen düzenleme uygulamalarında sınırlı kullanılabilmektedir. Önceki prokaryotlarda yapılan çalışmalar, endojen tip I CRISPR-Cas sistemlerinin programlanabilirliğinin, endojen genlerin düzenlenmesini ve gen ekspresyonunu değiştirmeyi başarabileceğini göstermiştir (Xu vd. 2021b). Tip I-E sistemlerinin, Cas efektörlere transkripsiyon aktivatörleri veya repressörlerinin kaynaştırılması ile insanlarda (Pickar-Oliver vd. 2019) ve bitkilerde gen ekspresyonunu değiştirebileceği bildirilmiştir (Young vd. 2019).

Diğer tip CRISPR-Cas sistemlerine genel olarak bakılacak olursa, Type III CRISPR-Cas sistemleri genellikle RNA'ya yönlendirilen birkaç Cas proteini kullanır, ancak son zamanlarda tanımlanan III-E olarak adlandırılan bir alt tip, hedef RNA'yı tanımak ve kesmek için tek bir protein efektörü kullanır (birden çok Cas7 proteini ve bir putatif Cas11 benzeri proteini içeren bir füzyon) (van Beljouw vd. 2021). *Desulfonema ishimotonii*'de tanımlanan Cas7-11 (DiCas7-11), herhangi bir ikincil kesme aktivitesi olmadan güçlü bir RNA baskılama aktivitesine sahiptir (Özcan vd. 2021). Son zamanlarda, CRISPR-Cas nükleazlarının atası olarak tanımlanan ve gen düzenleme alanında kullanılan IscB ve TnpB proteinleri tespit edilmiştir. Bu proteinler, Cas9 ve Cas12'in atası olabilecek IS200/IS605 transpozon ailesinin üyelerini kodlar. İkisi de hedef bölgelerde çift iplikli kesikler oluşturabilen ve insan hücrelerinde gen düzenleme için kullanılabilen RNA tarafından yönlendirilen nükleazlar olarak tanımlanmıştır (Karvelis vd. 2021; Altae-Tran vd. 2021).

2.5.2. CRISPR-Cas gen düzenleme araçları

CRISPR-Cas araçları, belirli bir hedefe bağlanmak üzere programlanabilir ve bu, hedefin sınırlı bir aralığı içindeki DNA veya RNA üzerinde manipülasyon için bir platform sağlar. Bu bölümde, CRISPR-Cas araçlarının çok yönlülüğü ve bunların kesme, hassas gen düzenleme ve epigenetik değişiklikler için nasıl optimize edildiği konusunda genel bir bakış sunulmaktadır.

Homolog olmayan uç birleştirme (kısaltma, NHEJ, İngilizce non-homologous end

joining kelimelerinin baş harflerini temsil etmektedir), DSB'leri (kısaltma, DSB, İngilizce double strand break kelimelerinin baş harflerini temsil etmektedir) onarmak için baskın olan bir yol olarak kabul edilir. Bu, her zaman hedef bölgelerde indel'lerle (kısaltma, indel, İngilizce insertion ve deletion kelimelerinden türetilmiştir) sonuçlanan hata eğilimli bir yoldur. Daha büyük ve öngörülebilir bir silme oluşturmak için, bir homing endonükleazın (örneğin, I-TevI gibi) veya başka bir Cas nükleazın (örneğin, SaCas9 veya NmCas9 gibi) kesme motifleri Cas9'a birleştirilebilir (Wolfs vd. 2016; Bölükbaşı vd. 2018). Ayrıca, sitidin deaminaz ve urasil DNA glikozilaz ile birleştirmeler, hedeflenen sitidin deaminasyonunu ve çıkarmayı tetikleyebilir, böylece deaminasyona uğramış sitidinden DSB'ye kadar öngörülebilir silmeler oluşturabilir (Wang vd. 2020; Lin vd. 2021). Daha büyük segmentleri silmek için genellikle eşleştirilmiş gRNA'lar kullanılır (Cong vd. 2013).

HDR (Kısaltma, HDR, İngilizce homology-directed repair kelimelerinin baş harflerini temsil etmektedir) ile DNA çift iplik kırıklarının onarılmasına izin veren hassas düzenlemelerin yapılabilmesi için homolog sekanslara sahip bir donör fragmentin bir Cas nükleaz ile birlikte gönderilmesi gerektiği kabul edilmektedir. Bununla birlikte, HDR tabanlı gen modifikasyonunun kullanımı, düşük verimliliği nedeniyle (özellikle bitkilerde) sınırlıdır (Gao 2021). Gen hedefleme verimliliğini artırmak için birçok strateji geliştirilmiştir. Örneğin, daha iyi stabilite veya daha yüksek kopya sayısına sahip donörleri kullanmak, HDR onarımını kolaylaştırmak için yeni türde donörleri benimsemek, Cas nükleaz kırılma bölgesine yakın donörleri çekmek, DNA onarım yollarını manipüle etmek, belirli hücre döngü fazlarından ve hücre tiplerinden faydalanmak ve Cas nükleaz aktivitesini artırmak bunlara örnek teşkil etmektedir (Gao, 2021). MMEJ (Kısaltma, MMEJ, İngilizce microhomology-mediated end joining kelimelerinin baş harflerini temsil etmektedir) aracılığıyla yapılan onarımlar, hedef lokuslarda iki mikro-homolog sekans arasında hassas silmeler oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Gao, 2021). MMEJ tabanlı silmeler önceden tahmin edilebilir ve silme fragmentleri tasarlanabilir, bu da hedeflenen ve öngörülebilir silme oluşturma'nın güçlü bir yolunu sunar (Ata vd. 2018; Shen vd. 2018; Xie vd. 2021). Özetle, MMEJ onarımını kullanma yaklaşımları, HDR aracılı gen hedefleme için kullanışlı alternatifler sunmaktadır.

CRISPR-Cas araçlarından bazı editörler, hedeflenen baz dönüşümlerini çift sarmallı DNA kırıklarına ihtiyaç duymadan oluştururlar. Sitozin baz editörleri (CBE) (Kısaltma, CBE, İngilizce cytidine base editor kelimelerinin baş harflerini temsil etmektedir) (Hess vd. 2016; Komor vd. 2016; Ma vd. 2016; Nishida vd. 2016) ve adenin baz editörleri (ABE'ler) (Kısaltma, ABE, İngilizce adenine base editor kelimelerinin baş harflerini temsil etmektedir) (Gaudelli vd. 2017), deaminazları CRISPR sistemleri ile birleştirerek sırasıyla C:G'den T:A'ya ve A:T'den G:C'ye baz geçişleri üretmek için geliştirilmiştir. CBE'lerde, sitozin deaminazı sitozinleri (C) serbest bırakılan tek sarmallı DNA'da urasilere (U) dönüştürür ve U:G uyumsuzluğu, sonunda bir T:A baz çiftine yol açacak şekilde U:A'ya onarılabilir. Dahası, urasil glikozilaz inhibitörü (UGI) ile birleştirme, U'ların çıkarılmasını önleyebilir ve CBE'lerin düzenleme verimliliğini önemli ölçüde artırabilir (Anzalone vd. 2020). ABE'lerde adenin deaminazı adeninleri (A) inosinlere (I) dönüştürür, ki bunlar guaninler (G) olarak tanımlanabilir. Doğal tek sarmallı DNA adenin deaminazı olmadığı için, şu anda kullanılan DNA adenin deaminazları, E. coli tRNA özgül adenin deaminazlarından dönüştürülmüştür (Gaudelli vd. 2017). Ayrıca,

yakın zamanda geliştirilen baz editörleri C-G baz dönüşümleri gerçekleştirebilir. Ancak, bu baz editörlerinin verimliliği ve ürün saflığı düşük olarak rapor edilmiştir (Koblan vd. 2021; Zhao vd. 2021).

Baz editörlerin verimliliğini, hassasiyetini ve özgünlüğünü artırmak için birçok strateji kullanılmıştır. Bu stratejiler arasında (1) deaminazın verimliliğini artırmak için daha yüksek aktiviteye sahip bir deaminaz kullanımı (Anzalone vd. 2020) veya örneğin, R-loop oluşturmaya kolaylaştırmak için tek sarmallı DNA (ssDNA) bağlayıcı protein alanı kullanarak ssDNA bölgesinin maruz kalma süresini uzatma (Zhang vd. 2020); (2) düzenleme hassasiyetini artırmak için doğal veya mühendislik deaminazları ile birleştirme, hedef dışı düzenlemelerini azaltmak için dizi bağlam tercihleri olan deaminazlar (Anzalone vd. 2020); (3) deaminazın uzamsal konumunu değiştirme (Anzalone vd. 2020; Li vd. 2020; Nguyen Tran vd. 2020) veya birden fazla deaminaz kopyası kullanma (Anzalone vd. 2020); (4) CBE'lerin indel'lerini azaltma için UGI kopya sayısını artırma veya Gam'ı kullanma (Anzalone vd. 2020); (5) ssDNA veya RNA'ya daha düşük afiniteye sahip mühendislik deaminazı kullanarak yanlış hedef etkileri azaltma (Anzalone vd. 2020; Jin vd. 2020); ve (6) bazı epigenetik modifikasyonların belirli APOBEC ve AID deaminazlarının aktivitelerini baskılamasını önlemek için alternatif veya mühendislik deaminazları kullanma (Anzalone vd. 2020) yer almaktadır. Liu vd. (2022), CRISPR ile ilgili hazırladıkları derlemelerinde, yukarıda 6 madde ile sıraladıkları bu iyileştirmelerin, baz editörlerinin performansını önemli ölçüde artırmakla birlikte, etkin baz değişimleri ve hedeflenen tek baz geçişlerini oluşturabilmek için daha da optimize edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Diğer CRISPR-Cas gen düzenleme araçlarına kısaca değinmek gerekirse, bunlardan prime editörler, baz değişimleri ve hassas DNA eklemeleri ve silmeleri gerçekleştirmek için güçlü araçlardır. Bu editörler, mühendislik Cas9 nikaz (H840A)-ters transkriptaz (RT) füzyon proteini ve bir prime editing guide RNA (pegRNA) içerir (Anzalone vd. 2019). PegRNA, istenen düzenlemeleri kodlayan bir ters transkripsiyon şablonu (RTT) içerir ve ters transkripsiyonu başlatmak için nükleaz tarafından kesilmiş DNA zincirinin 3' uçlarına hibridizasyon için bir primer bağlama bölgesi (PBS) içerir. Ters transkripsiyon sonrasında RT şablonu ters transkribe edilir, 3' DNA ucu ardından 5' DNA ucu oluşturarak istenen düzenlemenin hedef bölgeye entegre edilmesini sağlar. (Anzalone vd. 2019). Gen aktivasyon ve gen baskılama rolleri olan transkripsiyon düzenleyicilerini devre dışı bırakılmış CRISPR-Cas sistemleri ile birleştirmek, hedef genlerin ifadesini düzenlemek için kullanılabilen bir diğer CRISPR-Cas9 gen düzenleme aracıdır (Gilbert vd. 2013, 2014). CRISPR interferans (CRISPRi) sistemlerinin ilk nesli, devre dışı bırakılmış Cas9'u veya dCas9-represif etki alanlarını (Qi vd. 2013; Gilbert vd. 2013) kullanırken, CRISPR aktivasyonu (CRISPRa) sistemlerinin ilk nesli devre dışı bırakılmış Cas9'u VP64 gibi tek transaktivatör etki alanlarıyla birleştirir (Gilbert vd. 2013). Son olarak epigenetik modifikasyonların CRISPR-Cas gen düzenleme araçlarıyla nasıl manipüle edildiğine değinmek gerekirse, epigenetik modifikasyonlar birçok genin ifadesini düzenler ve birçok hücresel süreçte esas rol oynar. Epigenetik kontrolü araştırmak ve hedeflenmiş epigenetik modifikasyonlar oluşturmak için çeşitli CRISPR tabanlı araçlar geliştirilmiştir. Esasen, birçok CRISPRa/CRISPRi etki alanı, epigenetik modifikasyonların ifadesini düzenler (Nakamura vd. 2021). Bu CRISPR epigenetik mühendislik araçları genellikle standart CRISPRa/CRISPRi'ye göre daha düşük oranda değişiklikleri indükler, ancak değişiklikler daha uzun süreli olabilir (Chavez vd. 2016;

Nakamura vd. 2021). Yeni geliştirilen CRISPRoff, artık yüzlerce hücre bölünmesi boyunca uzun süreli DNA metilasyonu ve gen baskılama başlatabilir (Nun̄ez vd. 2021). Uygun epigenetik etki alanlarını bağlayarak, CRISPR epigenetik mühendislik araçları hedefin yakınında istenen çeşitli epigenetik modifikasyonlara ulaşabilir, örneğin, DNA metilasyonu/demetilasyonu, histon metilasyonu/demetilasyonu ve histon asetilasyonu/deasetilasyonu gibi.

CRISPR-Cas sistemleri, biyolojik araştırmalarda genom manipülasyon araçları olarak kullanılarak biyoloji alanında devrim yaratmıştır. Farklı türlerdeki CRISPR-Cas nükleazları ve bunların mühendislikle oluşturulan varyantları, biyoteknolojik araştırmaların çeşitli alanları için geliştirilmiştir. CRISPR tabanlı gen düzenleme araçları sadece DNA'nın çift zincirini kesme işlevini aşarak büyük ölçüde genişletilmiştir. Şu anda mevcut olan CRISPR-Cas sistemleri, gelecekte yeni fonksiyonel elementlerle birleştirilerek genom mühendisliği araştırmaları için sürekli genişleyen potansiyele sahiptir. Çalışmada bu araçlardan gen susturma çalışmaları için CRISPR-Cas9 ve baz düzenleme çalışmaları için PmCDA1 ile kaynaştırılmış CRISPR-nCas9 kullanılmıştır.

2.6. Asmada CRISPR-Cas ile Genom Düzenleme Çalışmaları

Prokaryot kökenli CRISPR-Cas genom düzenleme teknolojisi, bitki biyoteknolojisini tüm beklentilerin ötesinde değiştirmiştir. 2012'de bilim insanları, CRISPR-Cas'ı bir genom düzenleme aracı olarak kullanmanın yolunu buldular. Yıl 2013 olduğunda bitkilerdeki uygulaması başarıyla gerçekleştirildi. Güçlü ve yüksek hedef spesifikliği ile programlanabilirlik özelliklerine sahip olan CRISPR-Cas, bitki türlerinin hassas genetik manipülasyonuna olanak tanır, bu da yararlı agronomik özelliklere sahip germplazmalar oluşturma ve yeni, daha sürdürülebilir tarım sistemleri geliştirme fırsatı sunar. Bu bölümde, CRISPR-Cas tarafından gerçekleştirilen gen düzenleme araçlarından özellikle gen susturma ve baz düzenleme gibi en yeni, hassas gen düzenleme teknolojilerine odaklanarak asma özelinde yapılan çalışmalar üzerinden bilgiler sunulacaktır.

CRISPR/Cas9 aracılığıyla genom düzenleme, üzümde tartarik asit (TA) biosentezinde görev alan L-idonat dehidrogenaz (IdnDH) genini hedef alarak 'Chardonnay' çeşidinde ilk kez 2016 yılındaki bir çalışmada rapor edilmiştir. Ren vd. (2016), Chardonnay süspansiyon hücre kültürlerinde SpCas9 varyantı ile L-idonate dehidrogenase geninde (IdnDH) yaptıkları mutasyon çalışmasında, hücre hatlarında indel mutasyonlar tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, CRISPR/Cas9 sisteminin üzümde hassas genom düzenleme için etkili ve özgün bir araç olduğunu rapor etmişlerdir.

Wang vd. (2016), yaygın olarak yetiştirilen asma türü olan *Vitis vinifera*'nın beş farklı çeşidinde, CRISPR/Cas9 hedef bölgelerini tespit etmeye yönelik yaptıkları çalışmalarında gelecekte asma genomlarını düzenlemek için kullanılabilecek, kullanıcı dostu bir veritabanı oluşturmuşlardır. Çalışmada, asma genomlarından toplam 35767960 potansiyel CRISPR/Cas9 hedef bölgesi tespit edilmiştir.

Malnoy vd. (2016), çalışmalarında asma çeşidi Chardonnay bitkilerinin protoplast hücrelerine saf CRISPR/Cas9 ribonükleoproteinlerinin (RNP'ler) doğrudan entegrasyonunu incelemişlerdir. Hedef olarak, asmada küllemeye karşı direnci artırmak amacıyla *MLO-7* adlı bir duyarlı gen seçmişlerdir. Ayrıca çalışmada etkili protoplast

dönüşümü için Cas9 ve sgRNA'ların molar oranı optimize edilmiştir. Hedeflenen mutajenezin ekleme ve silme oranı hedefli derin dizileme (NGS) (Kısaltma, NGS, İngilizce Next Generation Sequencing kelimelerinin baş harflerini temsil etmektedir) kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, CRISPR/Cas9 RNP'lerin protoplast sistemine doğrudan entegrasyonunun hedeflenmiş gen düzenlemeyi mümkün kıldığını ve DNA'sız genomu düzenlenmiş üzüm bitkilerinin üretilmesinin yolunu açtığını göstermektedir.

Nakajima vd. (2017)'de, *Vitis vinifera* L. türü Neo Muscat çeşidinde CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak başarılı hedefe yönlendirilmiş mutajenez rapor etmişlerdir. Bir Cas9 ifade yapısı, *Vitis vinifera* fiton desaturaz (VvPDS) genini hedef alan sentetik bir sgRNA ifade yapısı ile birlikte embriyonik kalluslara transforme edildiğinde, albino yapraklara sahip bitkiler elde etmişlerdir. DNA dizileme sonuçları, rejenere edilen bitkilerde VvPDS geninin hedef bölgesinde mutasyona uğradığını doğrulamıştır. Araştırmanın ilginç sonuçlarından bir tanesi, mutasyona uğramış hücrelerin oranı, yeni gelişen üst yapraklara kıyasla daha düşük, daha eski yapraklarda daha yüksek olarak tespit edilmiş olmasıdır. Bu sonuç, yaşı daha büyük yapraklardaki hedeflenmiş mutajenize hücrelerin oranının, tekrarlanan DNA çift sarmal kırıklarının indüksiyonu nedeniyle daha yüksek olduğunu ya da yaşlı üzüm yapraklarının hücrelerinde hassas DSB'lerin onarımının verimliliğinin azalması olarak değerlendirilmiştir.

Wang vd. (2018), çalışmalarında, VvWRKY52 transkripsiyon faktörü geni için dört rehber RNA'yı (sgRNA) CRISPR/Cas9 sistemi ile kullanmak üzere tasarlamış ve Thompson Seedless çeşidinin somatik embriyolarını kullanarak *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyonunu gerçekleştirerek transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Birinci nesil transgenik bitkilerin analizi, 72 T-DNA eklenen bitkiden 22 mutant bitkinin doğrulandığını göstermiştir. Bunlardan 15 hat biallelik mutasyonları taşıırken, 7 tanesi heterozigot olarak belirlenmiştir. Mutant bitkilerde büyük delesyonları da içeren çeşitli RNA rehberli düzenleme olayları bulunurken, tespit edilen mutasyonların çoğunluğunu daha küçük delesyonlar oluşturduğu saptanmıştır. Ayrıca, üzümdeki VvWRKY52'nin susturulmasının, *Botrytis cinerea*'ya karşı direnci artırdığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak, CRISPR/Cas9 sisteminin, üzümün ilk jenerastonda hassas genom düzenlemeye izin veren ve gen fonksiyon analizi ile asma moleküler ıslahı için kullanışlı bir araç olmayı temsil ettiği değerlendirilmiştir.

Osakabe vd. (2018), asmada plazmid aracılığıyla ve CRISPR/Cas9 ribonükleoproteinler (RNPs) aracılığıyla yapılan CRISPR deneyleri için protokoller oluşturmuşlardır. Araştırmacılar asma protoplastlarına CRISPR–Cas9 bileşenlerinin tasarımı ve transferi, sonrasında yüksek verimli hedefe yönelik mutajenezin doğrulanması, bileşenlerin plazmid aracılığıyla transformasyonunu takiben bitkilerin rejenerasyonu için adım adım bir protokol sunmuşlardır. Plazmid aracılığıyla yapılan prosedür ve CRISPR–Cas9 RNPs'nin doğrudan entegrasyonu, üzümde istenen özellikleri yüksek doğruluk ve verimlilikle modüle etmek için kullanışlı olduğu ve diğer tarım türlerine genişletilebileceği rapor edilmiştir. CRISPR–Cas9 RNPs'nin doğrudan entegrasyonunu içeren tam protokol, bitkilerin rejenerasyonu ve mutasyonların incelenmesi için 3 aydan uzun süren plazmid aracılı prosedüre kıyasla yalnızca 2-3 hafta sürebileceğini bildirmişlerdir.

Ren vd. (2019), *Vitis vinifera*'da CRISPR/Cas9 düzenleme verimini artırmak

amacıyla üç temel parametreyi değerlendirmişlerdir: tek rehber RNA (sgRNA)'nın GC içeriği, kullanılan transformant hücre çeşidi ve transgenik hücre kümelerindeki SpCas9 ifade düzeyleri. *V. vinifera* fiton desaturaz geninin ekson bölgelerini hedeflemek üzere farklı GC içeriğine sahip dört sgRNA tasarlamışlardır. 'Chardonnay' ve '41B' çeşitlerine ait süspansiyon hücreleri, transgenik hücre kümeleri olarak kullanmışlardır. Yapılan T7E1 ve PCR/RE analizleri, CRISPR/Cas9 düzenleme veriminin sgRNA'nın GC içeriği ile orantılı olarak arttığını, her iki çeşitte de %65 GC içeriğinin en yüksek düzenleme verimini sağladığını göstermiştir. Ayrıca, '41B' çeşidinde 'Chardonnay' çeşidine göre daha etkili gen düzenleme gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Farklı düzenleme verimine sahip CRISPR/Cas9 sistemlerinin farklı SpCas9 ifade seviyelerine sahip olduğu ancak sgRNA'nın GC içeriği ile karşılaştırıldığında SpCas9 ifade seviyesinin düzenleme verimini daha az etkilediğini gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar, üzümde CRISPR/Cas9 performansını optimize etmeye yönelik önemli bilgiler olarak değerlendirilmiştir.

Giacomelli vd. (2019), CRISPR-Cas9 kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada *VvMLO7* kodlu geni susturarak külleme dirençli asmalar elde etmişlerdir. Ancak çalışma bir bildiri seviyesinde kalmış ve kapsamlı bilgileri literatüre sunmamıştır.

Günümüzde üzüm genom düzenleme sistemlerinin etkinliği henüz tam anlamıyla gösterilmemiş olsa da, plazmonik CRISPR Cas12a testi adı verilen bir yöntem, üzüm kırmızı leke virüsü enfeksiyonlarının kolorimetrik olarak tespiti için yakın zamanda geliştirilmiştir. Li vd. (2019), üzüm viral enfeksiyonlarının görsel ve kolorimetrik tespiti için yeni bir plazmonik CRISPRCas12a testini tanımlamışlardır. Bu tespit sistemine göre, viral işaretin varlığı, iki DNA fonksiyonlu plazmonik altın nanopartikül arasında bir bağlayıcı olarak görev yapan tek iplikli substratın (S) parçalanmasına neden olmakta ve bu da görünür mavi-mor renk geçişine yol açmaktadır. Çalışmada, plazmonik test pratik uygulanabilirliği, ticari bağlardan toplanan üzüm örneklerinde ortaya çıkan kırmızı leke viral enfeksiyonlarının tespitiyle başarıyla gösterilmiştir.

Wan vd. (2020), "Thompson Seedless (Sultani Çekirdeksiz)" çeşidinde, aday *S* genlerinden en önemli iki geni (*VvMLO3* ve *VvMLO4*, Feechan vd. (2008) CRISPR/Cas9 ile susturarak külleme dirençli bitkiler geliştirmişlerdir. Araştırmacılar gen düzenleme oranlarını 0-38.5 % arasında saptamışlardır. Elde edilen bitkilerden dört adet *VvMLO3* mutant bitki külleme direnci göstermiştir. Ancak araştırmacılar düzenleme yaptıkları çoğu bitkinin yapraklarında senesens benzeri kloroz yapılarına rastlamışlardır.

Li vd. (2020), çalışmasında üzüm bağlarında (*Vitis vinifera* L.) ciddi bir endişe kaynağı olan *Plasmopara viticola* adlı omiket patojeninin neden olduğu mildiyö hastalığına odaklanmaktadır. Patogene karşı bitki direncinde önemli roller oynayan patojene bağlı 4 (PR4) proteininin bitki savunmasındaki spesifik rolü hala yeterince anlaşılamamıştır. Bu araştırmada, "Thompson Seedless" çeşidinden *VvPR4b* geninde işlev kaybı mutasyonları oluşturmak için CRISPR/Cas9 sisteminden yararlanılmış ve bunun mildiyö direncine etkisi değerlendirilmiştir. Dizileme sonuçları, mutasyonların genellikle silinmeler olarak gerçekleştiğini ve hedef dışı etkinin meydana gelmediğini göstermiştir. Yaprak diskleri kullanılarak yapılan enfeksiyon testleri, *VvPR4b* knockout hatlarının, yabancı tip bitkilere kıyasla *P. viticola*'ya karşı artmış duyarlılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu yüksek duyarlılık, stomaların çevresinde reaktif oksijen türlerinin birikiminde azalmayla birlikte değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın bulguları, *VvPR4b*'nin üzüm bağlarını mildiyöye karşı savunmada etkin bir rol oynadığını doğrulamıştır.

Sunitha ve Rock (2020), asma anacı 101-14'te yaptıkları çalışmada, transkripsiyon faktörlerinden TAS4b ve MYBA7'nin asmada PD (Pierce's Disease) ve GRBV (Grapevine Red Blotch Virus) hastalık belirtilerindeki işlevlerini test edebilecek materyaller üretmek için, CRISPR/Cas9 teknolojisini kullanarak TAS4b ve MYBA7'yi hedef alan transgenik asmalar üretmişlerdir.

Son yıllarda Ren vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, asma U3/U6 ve ubikuitin (UBQ) promotörleri, genom düzenleme sırasında Arabidopsis U6 (AtU6) ve CaMV35 promotörleri yerine sgRNA ve Cas9'un ifadesini yönlendirmek için izole edilerek kullanılmıştır. Asma promotörlerinin kullanımı, sgRNA ve Cas9'un ifadesini artırarak düzenleme verimini önemli ölçüde arttırmıştır.

Son zamanlarda, hedef dışı etkilerin değerlendirilmesi için WGS (Kısaltma, WGS, İngilizce whole genome sequencing kelimelerinin baş harflerini temsil etmektedir), Cas9 ile düzenlenmiş asma bitkilerinde kullanılmıştır. Wang vd. (2021), üç yabancı tip bitki ve yedi CRISPR/Cas9 ile düzenlenmiş bitkiyi, WGS analizi kullanarak daha derinlemesine analiz etmişlerdir ve test edilen 3,272 hedef dışı bölgenin arasında sadece bir indel mutasyonu içeren bir hedef dışı bölge tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar, CRISPR/Cas9 sisteminin asma genom düzenlemesinde yüksek özgünlük gösterdiğini göstermektedir.

Ren vd. (2020), çalışmalarında, asma hibriti 41B'de VvCCD7 ve VvCCD8 genlerini düzenlemek için CRISPR/Cas9 sisteminden yararlanmışlardır. 41B embriyo hücrelerinde transformasyon çalışmalarını yürütmüşler ve bitki rejenerasyonu sağlamışlardır. Dizileme analizi, gen düzenlemenin başarıyla 41B embriyo hücrelerindeki her iki VvCCD genini hedef almak için kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Rejenerasyonun ardından, 6 adet 41B bitkisi, CCD8-sgRNA ifade kasetini taşıyan transgenik bitkiler olarak tanımlanmıştır. Bunlardan 4'ü, ccd8 mutanlığı olup, karşılık gelen yabancı tip bitkilere kıyasla artmış sürgün dallanma yapısı göstermiştir. Ayrıca, test edilen mutantlarda öngörülen hedef dışı etkiye rastlanmamış ve hiçbir mutant bitkide hedef dışı mutasyon tespit edilmemiştir.

Ren vd. (2022), CRISPR/dCas9 sistemini asmada ilk uygulandığı çalışmadır. Araştırmacılar, asmada endojen genlerin transkripsiyonel aktivasyonu için iki transkripsiyonel aktivatör olan VP64 ve TV'yi test etmişlerdir. Hem dCas9-VP64 hem de dCas9-TV sistemlerinin, asma hücrelerinde UDP-glukoz flavonoid glikozil transferaz (UFGT) geninin transkripsiyonel aktivasyonu için yeterli derecede etkili olduğu rapor edilmiştir. dCas9-VP64 sisteminin UFGT aktivasyonundaki etkinliği yaklaşık olarak 1.6 ila 5.6 kat arasındayken, dCas9-TV sisteminin verimliliği yaklaşık olarak 5.7 ila 7.2 kat bildirilmiştir. Ayrıca, asma bitkilerinde, dCas9-TV sistemi kullanılarak soğuğa duyarlı transkripsiyon faktörü geni CBF4'ün oldukça etkili bir şekilde aktive edildiği sonucuna ulaşılmıştır. CBF4'ün ifadesi transgenik bitkilerde 3.7 ila 42.3 kat arasında artmıştır. Çalışma sonuçları, asmada gen aktivasyonunda dCas9-VP64 ve dCas9-TV sistemlerinin etkin olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Clemenens vd. (2022), vasküler bitkilerde stomaların oluşumunu indükleyen, diğer epidermal şekillendirme faktörlerine (EPF1, EPF2) karşı antagonist olarak etki eden Epidermal Patterning Factor Like 9 (EPFL9), aynı zamanda STOMAGEN olarak da bilinen gende çalışmalarını yürütmüşlerdir. Araştırmacılar, 'Sugraone' adlı yüksek

transformasyon yeteneğine sahip bir genotipte VvEPFL9-1'in işlevsel karakterizasyonu için CRISPR-Cas9 sistemi uygulamışlardır. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla embriyonik kallusta gen transferi sonrasında rejenere edilen bitki seti değerlendirme için kullanılmıştır. Birçok hat için hedef bölgedeki düzenleme profili, çoğunlukla kodlama dizisinde çerçeve kaymasına neden olan veya ikinci sistin kalıntısını etkileyen mutasyon aralığı göstermiştir. Stoma yoğunluğunun analizi, düzenlenmiş bitkilerde stoma sayısının kontrolle karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığını göstererek, EPFL9'un bir asma meyve türündeki rolünü ilk kez ortaya koymaktadır. Mutant olarak belirlenmiş üç hat daha sonra farklı çevresel koşullarda gerçekleştirilen deneylerde büyüme, fotosentez, stoma iletkenliği ve su kullanım verimliliği açısından değerlendirilmiştir. İçsel su kullanım verimliliğinin, mutant hatlarda kontrole kıyasla iyileştirilmiş olduğu rapor edilmiştir. Çalışma sonucunda, stomatal yoğunluğu düzenlemenin, değişen iklim koşullarında bağcılığın adaptasyonunu optimize etme potansiyeline sahip olduğu değerlendirilmiştir.

Tu vd. (2022), asmada antosiyanin birikiminde rol alan genler ile yaptıkları çalışmada CRISPR-Cas9 teknolojisini kullanmışlardır. Çalışmada, üzüm (*Vitis vinifera*) BAZIP grubu K'dan bir gen olan VvbZIP36'nın, antosiyanin biyosentezinin negatif bir düzenleyicisi olarak hareket ettiğini bildirilmiştir. CRISPR-Cas9 ile VvbZIP36'nın bir alelinin knock-out edilmesi, üzümde antosiyanin birikimini etmiştir. Transkriptom ve metabolom verilerinin korelasyon analizi, VvbZIP36 mutant bitkilerde çeşitli antosiyanin biyosentezi genlerinin, naringenin şalcon, naringenin, dihidroflavonollar ve cyanidin-3-O-glukozit de dahil olmak üzere ilgili metabolitlerin birikimine neden olduğunu göstermiştir. Stilben (α -viniferin), lignanlar ve bazı flavonolların (quercetin-3-O-ramnozid, kaempferol-3-O-ramnozid ve kaempferol-7-O-ramnozid dahil) sentezi önemli ölçüde inhibe edilmiş ve bu metabolizma ile bağlantılı bazı genler mutant bitkilerde aşağı regüle edildiği sonuçlarına ulaşılmıştır. Araştırmacılar, VvbZIP36'nın stilbenlerin (α -viniferin), lignanların, flavonolların ve antosiyaninlerin sentezini dengelemede rol oynayan bir antosiyanin biyosentezinin negatif bir düzenleyicisi olduğunu bildirmişlerdir.

Jiao vd. (2022), CRISPR sistemlerinden FnCas9 ve LshCas13a kullanarak bağ yaprak kıvrıcıklığı hastalığı üzerine araştırmalar yapmışlardır. Çalışmada, FnCas9 ve LshCas13a ifade edilerek, asma fideleri üzerinde optimize edilmiş bir *Agrobacterium* aracılı geçici transformasyon sistemi oluşturulmuştur. Sonuçlar, CRISPR/FnCas9 ve LshCas13a'nın asmada bağ yaprak kıvrıcıklığı hastalık etmeni GLRaV-3 (bağ yaprak kıvrıcıklığı virüsü-3) inhibisyonuna neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, pCR01-CP, pCR11-Hsp70h ve pCR11-CP olmak üzere üç vektörleri, etkin inhibisyon verimliliği sergilemiştir. LshCas13a'nın virüslere karşı daha etkili bir müdahale verimliliğine sahip olduğu bildirilmiştir. Özetle, bu çalışma, bu iki RNA hedefli CRISPR mekanizmasının asmada virüslere karşı bağışıklık sağlayabileceğini doğrulayarak meyve ürünlerinde GLRaV-3 veya diğer RNA virüslerini kontrol etmek için yeni yollar sunabileceği vurgulanmıştır.

Najafi vd. (2023), CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisi, geleneksel ıslahın birçok sınırlamasını aşabilir ve bitki iyileştirmesi ile gıda üretimi için büyük potansiyel sunabilecek bir çalışma ortaya koymuşlardır. Daha önce üzüm (*Vitis vinifera*) protoplastlarına Cas9-tek rehber RNA (sgRNA) ribonükleoprotein (RNP) komplekslerinin doğrudan teslimatı gösterilmiş olmasına rağmen (Osakabe vd. 2018), düzenlenmiş protoplastlardan bitki rejenerasyonu bildirilmemiştir. Bu çalışmada,

embriyonik kallustan izole edilen protoplastların transfeksiyonu ve ardından rejenerasyonu ile transgen içermeyen üzüm bitkileri elde etmek için etkili bir yaklaşım tanımlanmıştır. Bunun için Thompson Seedless asma çeşidinde tek bir kopya yeşil floresan protein raportör geni (GFP) hedef alınmış ve protoplastlara RNP'lerin doğrudan gönderilmesi ile gen susturulmuştur. İki bağımsız sgRNA tarafından yönlendirilen CRISPR/Cas9 aktivitesi, GFP floresansının kaybıyla doğrulanmıştır. Çalışmada, Cas9-sgRNA RNP komplekslerinin protoplastlara aktarımı ile asmada transgen taşımayan genom düzenleme için bir protokol raporlanmıştır.

Ren vd. (2023), çalışmalarında, Lachnospiraceae bakterisi ND2006 (LbCas12a) kökenli CRISPR/Cas12a'nın tonoplastik monosakarit taşıyıcı1 (TMT1) ve dihidroflavonol-4-redüktaz 1 (DFR1) genlerini hedef alarak asma 41B hücrelerinde hedefe yönelik mutagenез oluşturmada etkin olduğunu ortaya koymuşlardır. DFR1 geninin susturulmasının, dfr1 mutant hücrelerde flavonoid birikimini değiştirdiği gözlemlenmiştir.

Yukarıda, CRISPR-Cas sisteminin farklı unsurları ile asmada yapılan gen düzenleme çalışmaları literatürde sunulan bilgiler ışığında özetlenmiştir. İlerleyen bölümlerde, CRISPR-Cas bileşenlerinin bitkiye aktarılmasında yaygın olarak kullanılan *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonu ve asma üzerindeki uygulamaları detaylı bir şekilde ele alınacaktır.

2.7. CRISPR-Cas Bileşenlerinin Bitkiye Gönderilmesi

CRISPR-Cas9 yapıları genellikle asma kallus veya hücrelerine *Agrobacterium* aracılığıyla iletilir. *Agrobacterium*'a dayalı transformasyon yöntemi genellikle etkili ve düşük maliyetlidir, ancak bazı asma çeşitleri *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı dirençli olabilir (Bouquet vd. 2006). Biolistik gönderim, fiziksel kuvvetle partikül bombardımanı ile CRISPR/Cas9 kasetlerinin iletilmesinde kullanılabilir (Kikkert vd. 2005). Alternatif olarak, polietilen glikol (PEG)-aracılığıyla yapılan transformasyon, CRISPR/Cas9 RNP'lerinin asma protoplastlarına iletilmesinde kullanılmıştır (Wang vd. 2015). Ancak bu yöntemde bitki rejenerasyonu uygulamaları sınırlı kalmaktadır. Özellikle tarıma yönelik agronomik özelliklerin iyileştirilmesi amacıyla yapılan CRISPR çalışmalarında somut ürünler ortaya koymak önemli olduğundan, RNP uygulamalarının etkinliği sınırlı kalmaktadır. Bitki genetik mühendisliği için nanopartikül destekli transformasyon gibi yeni yaklaşımlar son zamanlarda gözden geçirilmiştir[97]. Nanopartiküller bitki transformasyonu için yük taşıyıcıları olarak hizmet edebilir, ancak bu teknolojiyi kullanırken birçok zorluk bulunmaktadır. Nanopartikül tabanlı genetik transformasyonun en büyük sorunu, transgenik bitkilerin rejenere edilebilmesinde ortaya çıkan zorluklardır (Doyle vd. 2019; Lv vd. 2020). Bu yaklaşımın asma transformasyonunda verimli olarak kullanılıp kullanılamayacağı gelecekte daha fazla araştırma gerektirmektedir. Bu bölümde ilk olarak, çalışmada CRISPR-Cas9 unsurlarını bitkiye transforme etmede uygulanan *Agrobacterium* aracılığıyla gen transformasyonu yöntemi hakkında bilgilere yer verilecektir. İkinci olarak, asmada *Agrobacterium* aracılığıyla yapılan transformasyon çalışmaları ve doku kültürü teknikleri incelenecektir.

2.7.1. Bitkilerde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen transformasyonu

Bitkilerde gen transformasyonu, genleri bir konuk bitkiye iletmek için güçlü bir

araç olarak *Agrobacterium tumefaciens* bakteri patojeni ile yapılan uygulamalara oldukça bağımlıdır. Bitki çekirdeğinde, transfer edilen DNA, bir sonraki nesile kalıtım yapabilen bitki genomuna entegre olma yeteneğine sahiptir (kalıcı transformasyon). Alternatif olarak, yabancı DNA, bitki genomuna entegre olmadan geçici olarak çekirdek içinde kalabilir ancak yine de istenen gen ürünlerini üretmek için transkribe edilebilir (geçici transformasyon) (Bülbül vd. 2023). *A. tumefaciens*'in keşfinden bitki biyoteknolojisinde geniş bir uygulamaya kadar, *A. tumefaciens* ve bitkiler arasındaki etkileşimin birçok yönü aydınlatılmıştır. Bu bölümde, *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonunun doğadaki mekanizması ve ardından biyomühendislik ile geliştirilmiş plazmitlerin kullanıldığı *A. tumefaciens* aracılı gen transformasyonu uygulamaları hakkında kapsamlı bir inceleme sunulması amaçlanmaktadır.

Agrobacterium tumefaciens, doğal olarak bitki yara bölgelerine enfekte olan ve bakteri tip IV sekresyon sistemi (T4SS) aracılığıyla bakteri hücrelerinden konuk bitki hücrelerine transfer edilen (T)-DNA ile taç ur hastalığına neden olan bir toprak fitopatojenidir. Geçen birkaç on yıl içindeki moleküler biyoloji teknolojisinin ilerlemesi ve yenilikleri sayesinde, tümöre neden olan *Agrobacterium tumefaciens* ile ilişkili çeşitli önemli bakteri ve bitki genleri tanımlanmıştır. *A. tumefaciens*'in konak hücreleriyle etkileşim biçimi hakkındaki daha kapsamlı bilgiyle birlikte, *A. tumefaciens* günümüze kadar en popüler bitki transformasyon aracı haline gelmiştir. Şimdilerde herhangi ilgi duyulan bir gen, *A. tumefaciens* ile bitkide genetik transformasyon gerçekleştirmek için çeşitli ikili vektör (binary vektör) türlerinin T-DNA bölgesindeki onkogenler ile değiştirilmek suretiyle kullanılabilir. (Hwang vd. 2017). Bu konuya detaylı bir şekilde ilerleyen bölümlerde yer verilecektir.

Agrobacterium cinsine duyulan ilk araştırma ilgisi, kök ur ve saçak kök hastalıklarının nedenlerini bulmaya dayanır. Bu konudaki ilk çalışmalar 20'den fazla farklı meyve ağacında gözlemlenen etli, pürüzlü yuvarlak yüzey morfolojisinin fark edilmesiyle başladı (Smith ve Townsend 1907). Bu tümör benzeri çıkıntılarının nedenini araştırmak için bu "taç gal hastalığı" olarak adlandırılan enfekte kök tacı dokuları izole edildi. Daha sonra *Agrobacterium tumefaciens* olarak adlandırılan bakteriler tanımlandı (Conn 1942). (Ti) plazmidi içeren *Agrobacterium tumefaciens*, birçok dikot angiosperma türünün köklerinde ve taçlarında ur oluştururken, kök indüklemeye (Ri) plazmidi taşıyan *Agrobacterium rhizogenes*, konak bitkilerinde anormal kök üretimine neden olur. Ti plazmidleri, boyut açısından 200 ila 800 kbp arasındadır. Ti-plazmidi, T-DNA adı verilen ve her iki ucunda 25 bp tekrar dizisi sınırları tanımlanan yüksek derecede korunmuş bir DNA parçasında bulunan dört farklı görünüşte genetik lokusa sahiptir. Bazı Ti plazmidleri bir T-bölgesi içerirken, bazıları birden fazla T-bölgesi içerir (Suzuki vd. 2000). Oksin, sitokinin ve opin sentaz genlerini düzenleyen üç lokus T-DNA üzerinde yer alır ve plazmidin onkojenitesini belirler. Opın sentezi düzenleyen gen, *A. tumefaciens* için özel bir besin olarak konak bitkide ifade edilmesi için gereklidir (Koncz vd. 1983). T-DNA'dan ayrı olarak dördüncü lokus, opin bileşiğinin katabolizmasını kontrol eder. Tüm genler, konak bitki hücresinde ifadeleri için gerekli sinyali taşır. Bakterinin konak hücresine enfekte olması sırasında yalnızca T-DNA, Ti-plazmidinden kesilir, transfer edilir ve nihayetinde konak bitki hücrelerinin DNA çekirdeklerine dahil edilir. Bu nedenle, Ti-plazmidi bütünüyle tümör hücrelerinde bulunmaz, çünkü görece büyük boyutları pasif olarak konak çekirdeğine veya kompleksine entegre olamaz. Oksin ve sitokinin sentezini düzenleyen genler, konak hücresinde fitohormon oranını değiştirerek

kontrolsüz hücre çoğalmasını tetikler, bu da tümör büyümesine yol açar.

Agrobacterium aracılığıyla gen aktarımı, bitki konakçısından *A. tumefaciens*'e sinyal tanıma, T-DNA'nın işlenmesi, T-DNA'nın bitki konakçısına taşınması, T-DNA'nın konakçı bitki genomuna entegrasyonu ve T-DNA'nın konakçı bitki genomunda ifadesini içeren karmaşık bir mekanizmadır. T-DNA transferinin mekanizması, Ti-plazmid üzerinde bulunan bir dizi virulent gen tarafından kolaylaştırılır (virA, virB, virC, virD, virE, virF, virG ve virH) olmak üzere en az 8 operona gruplanan yaklaşık 35 virulent gen, T-DNA'nın dışında, diğerleri (kromozomal virulent genler - chv) kromozomda bulunur (Pratiwi ve Surya 2020).

Agrobacterium aracılığıyla gen aktarımının ilk aşaması olan Agrobacterium-bitki etkileşimi bir başka deyişle sinyal tanıma, büyük ölçüde bitki kaynaklı kimyasalların, rutin olarak salgılanan organik asit bileşikler (pH 5.0-5.8) ve yara sonrası salınan fenolik bileşikler gibi, bakterilere maruz kaldığında gerçekleşir. *A. tumefaciens*'in bitki hücrelerini tanıma sinyali üç sistem içerir (Guo vd. 2019). Bunlardan ilki, bakterilerin, bitkilerin taze yara bölgesinden salgılanan asetosiringon ve α -hidroksi asetosiringon gibi fenolik bileşikler tarafından çekilmesidir (bakteriyel kemotaksi). Bakteri ve bitki hücre yüzeyi arasındaki bağlanmada, çok hücreli biyofilm oluşumu, matris gelişimi, hücre bölünmesi, biyofilm olgunlaşması gerçekleşir. İkinci olarak, ev sahibi sinyal bileşikler, bakteri hücrelerinin periplazma alanındaki transmembran protein reseptörleri (VirA) tarafından tanınır ve pozitif düzenleyici protein VirG'nin fosforilasyonunu tetikler. Üçüncü olarak, kromozomal virulent genler tarafından kodlanan ChvG/ChvI proteini, şekerden gelen asiditeyi algılar ve virG'nin bazal ifadesini etkinleştirir. Fosforile VirG, başka bir virulans geninin aktivasyonuna yol açar. Monosakkaritler, ChvE ile bağlanarak daha sonra VirA ile sinerji oluşturur dolayısıyla da sinyalleşme süreci ivme kazanır (Shimoda vd. 1990; Heindl vd. 2014).

İkinci aşama, T-DNA'nın prosesidir. Ti-plazmidlerden T-DNA'yı çıkarma süreci, VirD1 ve VirD2'nin endonükleaz görevleri ile gerçekleşir. T-DNA'nın alt zincirindeki 25 bp'lik sınır dizileri, VirD1 ve VirD2 için kesim bölgesi olarak işlev görür. VirD1, bir situs spesifik helikazdır ve çift sarmal T-DNA'yı açar. Bir nükleaz olan VirD2, T-DNA'nın alt zincirini sağ ve sol sınırdan keserek VirD2/T-zincir adı verilen tek sarmal doğrusal DNA'ya dönüştürür (Veluthambi vd. 1987). VirD2 daha sonra T-zincirin 5' ucunu sağ sınırdaki şekilde kovalent olarak kaplar ve VirD2/T-zincir kompleksi oluşturur. Kesilmiş sağ sınırın 3' ucu, T-DNA'nın alt zincirinin oluşumu için başlatma bölgesi olarak işlev görür. VirC1, sağ sınırdaki "overdrive" olarak adlandırılan DNA dizisine bağlandığında T-zincir moleküllerinin sayısını artırır (Lu vd. 2009).

Üçüncü aşama olan T-DNA'nın konakçıya taşınmasında, VirD2 ve VirE2'nin rolleri devreye girer. Hem VirD2 hem de VirE2'nin, VirD2/T-zincirini konak nükleusuna yönlendiren C-terminal nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) dizisi bulunmaktadır. VirD2/T-zinciri, çubuk benzeri bir yapı olan bakteri hücrelerinden Ti-pilus aracılığıyla çıkar ve 11 VirB ve VirD4 proteinleri tarafından oluşturulan tip IV sekresyon sistemi (T4SS) aracılığıyla çıkış yapar (Baron ve Zambryski 1996). Hidrofilik bir protein olan VirE2, bakteri sitoplazmasında birikir ve reseptör aracılı endositoz yoluyla konak hücrelerine translokasyon yapar. T-zincirin taşınmasına yardım etmenin yanı sıra, konak sitoplazmasında VirE2, T-zincir boyunca kovalent olmayan bir şekilde kaplanır ve VirD2/T-zincir/VirE2 (Ti kompleksi) olarak adlandırılan ve onu herhangi bir nükleaz

aktivitesinden koruyan bir yapı oluşturur. Bitki sitoplazmasındaki Ti-kompleksi, bitki sitoplazması içindeki endoplazmik retikulum ağı aracılığıyla bitki nükleusuna taşınır (Guo vd. 2019).

Dördüncü aşama, T-DNA'nın genoma entegrasyonudur. Agrobacterium aracılı gen transformasyonunda, T-DNA entegrasyonu ve ardından transgen ifadesi, aslında hala tam olarak anlaşılmayan son ve kritik bir aşamadır. T-DNA entegrasyonunun moleküler mekanizması, konak bitki genomunun transkripsiyonel olarak aktif veya hipometillenmiş bölgelerinde tercih edilmemekle birlikte genomda rastgele yerlerde gerçekleşir. T-DNA entegrasyon sürecindeki bazı önemli genler, kromatin oluşumu ve histon modifikasyonu ile ilişkili genlerle sınırlıdır (Gelvin 2017).

Beşinci ve son aşama T-DNA'nın ifade edilmesidir. Bitki genom hücreleriyle entegre olan bakteriyel T-DNA'nın iki olası kaderi vardır. İlk olarak, T-DNA çeşitli düzeylerde ifade edilir. İkinci olarak, T-DNA yalnızca entegre olabilir ancak ifade edilemez. Farklı düzeydeki gen ifadeleri, türden türe bağlı olarak değişir (Primrose and Twyman 2006). T-DNA'daki oksin ve sitokinin kodlayan genlerin ifadesi, her iki fitohormonun birikimine neden olur. Fitohormon oranındaki anormallikler, bitki hücrelerini kontrolsüz hücre çoğalmasına götürerek tümör büyümesine yol açar. Opine sentezi kodlayan genlerin ifadesi, Agrobacterium için özel bir besin olan opine üretir.

Yabani tip Ti-plazmidler, tümör oluşumuna neden olan onkogenlere sahip olduklarından gen taşıyıcıları olarak uygun değildir. Onkogenlerin, ve opine biyosentezi kodlayan genin silinmesiyle, plazmid onkogenik olmaktan çıkar, ancak her iki tekrar sınır dizisi de 25 baz çifti olarak kalır. Agrobacterium aracılı transformasyonun vaadi, T-DNA'ya yerleştirilen hedef bir genin , bitki genomuna entegrasyonunda bir "araç" olmasıdır. Seçilebilir işaretleyici genler, transforme edilmiş hücreleri normal hücrelerden ayırmak için T-DNA'ya eklenir, deneysel gen dizileri ile seleksiyon genleri birbirine bağlı olarak T-DNA'da bulunur. Yaygın olarak kullanılan bazı herbisit direnç işaretleyicileri fosfinotricin, klorosülfuron, sülfonamid ve glifosattır. Bakteriyel seçilebilir işaretleyiciler olarak ise trimetoprim, streptomisin, spektinomisin, sülfonamid, bleomisin, hijyenomisin, kanamisin, neomisin veya gentamisin gibi antibiyotik direnç genleri kullanılır. Zararlı etkileri azaltılmış Ti-plazmidin, büyük boyutundan dolayı *in vitro* olarak manipüle edilmesi zordur. Virülans genleri aynı hücrede T-DNA dizilerine karşı trans olarak görev yapabileceğinden, vir genleri Agrobacterium için replikasyon kökenine sahip küçük bağımsız bir plazmide transfer edilerek, bu plazmide "yardımcı vektör" olarak adlandırılmıştır. Ayrıca, virülans geninin eliminasyonu, Ti-plazmidin daha uzun transgenleri barındırmasına olanak tanır. Ayrıca bilim adamları, çoklu konakta (*E. coli* ve *A. tumefaciens*) replike olacak şekilde tasarlanmış olan "ikili vektörü" dizayn etmişlerdir. İkili vektör, sol ve sağ sınırları, çoklu konak için replikasyon kökenini, seçilebilir işaretleyici genleri ve hedeflenen genlere ait unsurları içerir. Bu mühendislik plazmidini uzun yıllardır bitkilerde gen transformasyonunda kullanılmaktadır.

Agrobakteriyel kromozom yapısına ve yerleşik Ti plazmitlerine göre, yaygın olarak kullanılan etkisiz *A. tumefaciens* suşları, C58 (Lin ve Kado 1977) ve Ach5 (Kovacs ve Pueppke 1994) adlı iki yabani izolattan türetilmiştir. *A. tumefaciens* suşları AGL1, EHA101, EHA105 ve GV3101(pMP90), nopaline tipi C58 kromozom yapısına ve pTiBo542 veya pTiC58 plazmitlerinden modifiye edilmiş Ti plazmitlere sahiptir (Hood vd. 1986; Koncz ve Schell 1986; Lazo vd. 1991). *A. tumefaciens* suşu LBA4404, Ach5

kromozom yapısına ve pTiAch5 plazmidinden türetilen octopine tipi Ti plazmitine sahiptir (Ooms vd. 1982). *A. tumefaciens* suşlarındaki agrobakteriyel genetik yapı ve modifiye edilmiş Ti plazmit kombinasyonları, çeşitli bitki türlerinin transformasyon verimliliklerini belirgin bir şekilde etkiler (Hwang vd. 2010; Hwang vd. 2013). Çalışma kapsamında literatürde asmada transformasyon çalışmalarını başarılı kılan EHA105 suşu kullanılmıştır (Bouquet vd. 2006).

Agrobacterium aracılı gen transformasyonu, birçok bitki türünde genetik modifikasyon için kullanılan bir yöntemdir. Bu uygulama, bitki genomuna kararlı, tek kopya dizilerin etkili bir şekilde eklenmesine izin vermektedir. Başarılı transformasyon için iki kritik nokta: aktif bölünen embriyonik kallus hücreleri ya da bitkinin diğer rejeneratif dokularından elde edilen hücrelerin başlangıç malzemesi olarak kullanılması ve ko-kültivasyon adımlarında fenolik bir bileşiğin (asetosiringon gibi) bakteri süspansiyon kültürlerine eklenmesidir (Hiei vd. 1997). Agrobacterium aracılığıyla yapılan gen transformasyon çalışmalarında monokotiledon veya dikotiledon bitkilerde birçok protokol rapor edilmiştir. Agrobacterium tabanlı tranformasyon yöntemlerinde uygulanan protokol, genel olarak yedi aşamadan oluşmakta olup kısaca şu şekilde özetlenebilir: (I) Tohum veya örneklerin sterilizasyonu ve inokulumun hazırlanması, (II) Eksplant hazırlığı, *A. tumefaciens* ile enfeksiyon ve kokültivasyon, (III) Transgenik bitkilerin seçimi, (IV) Bitki rejenerasyonu, (V) T0'daki bitkilerin aklimatizasyonu ve moleküler olarak tanımlanması (VI) T0'ların yetiştirilmesi ve kendilenmesi, (VII) T1 aşamasındaki bitkilerin analizi (Pratiwi ve Surya 2020)

Bu bölümde, *Agrobacterium tumefaciens*'in bitkilerde gen transformasyonu için nasıl bir araç haline geldiği incelenmiştir. Doğal bir bitki-patojen ilişkisinin biyomühendislik yoluyla nasıl geliştirildiği ve gen düzenleme aracına dönüştüğü adım adım ele alınmıştır. İlerleyen bölümlerde, asmada Agrobacterium aracılığıyla yapılan transformasyon çalışmaları ve bu süreçte asmada yaygın olarak kullanılan doku kültürü teknikleri detaylı bir şekilde açıklanacaktır.

2.7.2. Asmada Agrobacterium aracılığıyla yapılan gen transformasyonu çalışmaları

Verimli bir bitki rejenerasyon sisteminin kurulması, başarılı genetik transformasyon ve bunun sonucunda transgenik bitkilerin üretilmesi için kilit bir unsurdur. *A. tumefaciens* aracılığıyla gen transformasyonu yöntemi, diğer transformasyon yaklaşımlarıyla karşılaştırıldığında birkaç avantajı barındırır; bunlar arasında nispeten düşük maliyetle kolay uygulanabilir olması, minimal deneysel koşullara ihtiyaç duyması, genellikle düşük gen transfer kopya sayısı, ve bitki genomuna göreceli olarak stabil DNA eklenmesi olarak sıralanabilir (Gao vd. 2008; Hwang vd. 2017). Dolayısıyla, *A. tumefaciens* yöntemi, asmada eksojen gen transferleri aracılığıyla transgenik bitkiler elde etmek için hala en yaygın ve etkili yaklaşım olarak değerlendirilmektedir ve literatürde yüzlerce örneği karşımıza çıkmaktadır (Zhang vd. 2021).

Literatür incelendiğinde, asmada Agrobacterium aracılı gen transformasyonu çalışmalarında rejenerasyon yöntemlerinden, sürgün organogenezisi ve somatik embriyogenezis tekniklerinin öne çıktığı görülmektedir. Bu tekniklerden organogeneziste meristematik kitlesel dokular üzerinden sürgün organogenezisi, Thompson Seedless, Silcora ve Chardonnay gibi üzüm kültür varlıklarının yanı sıra diğer kültür varlıklar ve anaçlarda

transformasyonda başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Mezzetti vd. 2002; Xie vd. 2016; Sabbadini vd. 2019). Diğer teknik olan somatik embriyogenez, birçok odunsu çok yıllık bitki türünün mikroçoğaltım ve gen transformasyonu çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Şu ana kadar asmada genetik transformasyon çalışmaları için en başarılı yöntem, PEM (Kısaltma, PEM, İngilizce proembryonic mass kelimelerinden türetilmiştir) ve SE (somatik embriyo) ile birleştirilmiş *Agrobacterium* aracılı transformasyon olarak değerlendirilmektedir (Zhang vd. 2021). Geçen on yıl boyunca birçok araştırmacı, transformasyon verimliliğini artırmak amacıyla *Agrobacterium* aracılı transformasyon protokollerini optimize etmeye çalışmıştır (Saporta vd. 2016; Wang vd. 2018).

Asma rejenerasyonunda iki temel yaklaşımdan biri olan sürgün organogenezisi, somatik embriyogeneziden teknik olarak daha kolay bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Zhang vd. 2021). Bilindiği kadarıyla, Fabre vd. (1977), üzüm yaprağı eksplantlarından ilk *in vitro* adventif tomurcuk oluşumunu rapor etmiştir. O zamandan beri organogenez, farklı eksplantlar kullanılarak birkaç üzüm çeşidi ve anaç türü ile başarıyla elde edilmiştir, bunlar arasında petiyoller (Zhang vd. 2011), genç yapraklar (Nicholson vd. 2012), internod segmentleri (Carvalho vd. 2013) ve parçalanmış sürgün uçları (Sabbadini vd. 2019) bulunmaktadır. Ancak, bu yöntemin bir sınırlaması, organogenez sırasında oluşan adventif tomurcukların çoklu hücreden türemiş olmaları nedeniyle kimera olma eğiliminde olmasıdır (Colby vd. 1991). Bu tür kimeralardan kaçınmak için yaygın olarak benimsenen bir rejenerasyon yöntemi, somatik embriyogenez olarak karşımıza çıkmaktadır. *V. vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon'un döllenmemiş yumurtalıklarından elde edilen somatik embriyogenezin ilk raporu, Mullins ve Srinivasan (1976) tarafından yayınlanmıştır. Bugüne kadar SE'ler, zigotik embriyolar, sülük yapıları, filamentler, stigma stilleri, gövde nodal yapıları, tüm çiçekler, tomurcuklar, stamenler, gynoecia, olgun tohumlar, yumurtalıklar, yapraklar, karpetler, protoplastlar ve en yaygın eksplant türü olan anterlerden başarıyla elde edilmiştir (Zhang vd. 2021). Bu raporların hepsinde, embriyogenez, kültüre alınmış eksplantlardan embriyonik kallus oluşturulması, ardından embriyo diferansiyasyonu, embriyo çimlenmesi ve bitki rejenerasyonu ile elde edilir. Asmada embriyojenik kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonunda adventif sürgün oluşum etkinliğini etkileyen bazı faktörler rapor edilmiştir. Bunlar arasında asmanın genotipi, eksplant kaynağı ve kültür ortamı bulunmaktadır.

Genotip, *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonu çalışmalarında başarıyı etkileyen önemli bir faktördür. Asmada anaç çeşitlerin rejenerasyon kapasitesi, *V. vinifera* hibritleri ve kültür varlıklarına göre hem organogenezde hem de somatik embriyogenezde daha yüksektir. Bu çeşitler arasında, Thompson Seedless, embriyojenik kallus indüksiyon oranında en yüksek performansı sergilemektedir. Sürgün organogenezinde, üç asma anaç çeşidi (Kober 5 BB, 41 B ve SO 4), bir LN 33 hibriti ve iki *V. vinifera* kültür varlığı (Pinot Noir ve Chardonnay) karşılaştırılmıştır ve tüm test edilen genotipler farklı rejenerasyon kapasiteleri göstermiştir. Anaçlardan Kober 5 BB'te, %39'luk bir oranda en yüksek performansta organojenik kallus geliştiği bildirilmiştir. (Clog vd. 1990). Carra vd. (2016), asma genotipinin SE indüksiyonu için anahtar bir faktör olduğunu göstermiş ve sekiz asma çeşidinde yürüttükleri çalışmada, İtalia üzüm çeşidinde somatik embriyogenez tepkisinde %50 gibi önemli bir farkın olabileceğini gözlemlemiştir.

Genellikle, aynı çeşitteki farklı eksplantların sürgün organogenezisinde

indüksiyon oranları önemli ölçüde değişiklik gösterir. Internodların, yaprak segmentlerinden daha yüksek organojenik kapasiteye sahip olduğu bildirilmiştir (Carvalho vd. 2011), diğer bir çalışmada ise yaprak eksplantlarının, petiyol ve internod eksplantlarından daha yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu rapor edilmiştir. (Zhang vd. 2011). Yaprığın olgunluğu azaldıkça rejenerasyon ortamında sürgün organogenezisinin önemli ölçüde arttığı (Stamp vd. 1990)'de bildirilmiştir. Ayrıca, yaprak eksplant materyalinin bitkiden izole edilmeden önce karanlık koşullarda ve/veya sıvı ortamda ön koşullandırılmasıyla rejenerasyon kapasitesinin artırılabilmesine dair kanıtlar da bulunmaktadır (Nicholson vd. 2012). Somatik embriyogenezin ortalama yüzdesi, organ/doku türlerine bağlı olarak da değişebilir. Örneğin, yumurtalıklardan elde edilen değerlerin (%10.1) anterlerden elde edilenlerden (%4.9) yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Vidal vd. 2009). Bir başka çalışma, olgun tohumların SE indüksiyonu için eksplant olarak kullanılmasını da tanımlamıştır (Peiró vd. 2015); bu rapora göre SE, beş ay boyunca kültüre alınmadan önce kesilmiş tohumlardan elde edilebilmiştir. Son olarak, Gambino vd. (2007), beş çeşit arasından dört çeşitten elde edilen embriyojenik kallusların en yüksek yüzdelik oranlarını yumurtalık dokusundan elde ettiklerini bildirmiştir. Aynı zamanda, 110 R, Chardonnay ve Grignolino çeşitleri için anterlere kıyasla tam çiçeklerin embriyojenik kültürleri başlatmak için benzer veya daha iyi sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir.

Kültür ortamı, eksplantların farklı gelişim aşamalarında büyüme için temel besinleri sağlar ve kültür ortamının kompozisyonu başarılı bitki rejenerasyonu olasılığını belirleyen önemli bir faktördür. Ayrıca, mevcut çalışmalar üzüm rejenerasyonunun bitki hormonları ve hormon analogları tarafından nasıl etkilendiğini test etmiştir, bunlar arasında 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), N-(2-kloro-4-piridil)-N'-fenilüre (4-CPPU), 6-benziladenin (6-BA, BA), 6-benzilaminopürin (6-BAP, BAP), gibberellik asit (GA₃), indol-3-asetik asit (IAA), indol bütirik asit (IBA), naftalen asetik asit (NAA), 2-naftoksiasetik asit (NOA) ve thidiazuron (TDZ) bulunmaktadır. Bir veya birkaç hormonun eklenmesinin indüksiyon verimliliğini önemli şekilde artırabileceği bulunmuştur. Örneğin, MS ortamına 2,4-D (18 µmol L⁻¹) ve BAP (9 µmol L⁻¹) eklenmesi, SE indüksiyonunda etkili olmuştur (Maillot vd. 2016). Bitki gelişim düzenleyicilerden, GA₃, genellikle SE çimlenmesi ve bitki rejenerasyon aşamasında kullanılmıştır (Prado vd. 2010; Peiró vd. 2015). López-Pérez vd. (2008), IAA (10 µmol L⁻¹) ve GA₃ (1 µmol L⁻¹) içeren bir ortamda kültüre alınmış Crimson Seedless üzüm çeşidinin SE'lerinin %63.8'inin ve büyüme düzenleyici içermeyenlerin %49.9'unun bitki rejenerasyonu gösterdiğini bildirmişlerdir.

Farklı eksplant kaynakları ve transformasyon sürecinde kullanılan kallusun kalitesi, transformasyon etkinliğinde önemli rol oynar. Sürgün apikal meristemler, üzümde Agrobacterium aracılığıyla transformasyon için sürgün organogenezini içeren en yaygın kullanılan materyaldir (Xie vd. 2016; Sabbadini vd. 2019). Ancak, somatik embriyogenez için kullanılan diğer embriyojenik dokular arasında embriyojenik kallus, proembriyonik yapılar ve somatik embriyolar bulunmaktadır. Proembriyonik yapılar ve somatik embriyolar, yüzeylerindeki rejeneratif hücrelerin Agrobacterium'a duyarlı olması ve tek hücre kökeninden kaynaklanan kimera olmayan transformantları üretmesi nedeniyle Agrobacterium aracılığıyla transformasyon için en uygun eksplantlar olarak kabul edilmektedir (Bouquet vd. 2006).

Literatürdeki güncel bilgi, asma transformasyon çalışmalarının çoğunun

Agrobacterium spp. temelli olduğunu göstermektedir (Zhang vd. 2021). Transformasyon için seçilen *Agrobacterium* suşu ve hücre yoğunluğu transformasyon verimliliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Farklı üzüm çeşitlerinin transformasyonu için birçok farklı bakteri suşu kullanılmıştır, bunlar arasında *A. tumefaciens* suşları C58 (pMP90), EHA101, EHA105, GV3101 ve LBA4404 bulunmaktadır (Nakano vd. 1994; Jittayasothorn vd. 2011; Jiao vd. 2012). Bu suşlardan EHA105'in yüksek transformasyon oranına sahip olduğu bildirilmiştir. López-Pérez vd. (2008) kapsamlı bir çalışmada, *Agrobacterium* suşu EHA105'in, Sugraone ve Crimson Seedless (*V. vinifera* L.) asma çeşitlerinde C58 (pMP90)'a göre daha iyi bir transformasyon verimliliği sağladığını bildirmiştir.

Transformasyon çalışmalarında bakterilerin yüksek yoğunlukta kullanımının, donör eksplantın ölümüne neden olabileceği bildirilmektedir, tam tersine aşırı düşük hücre yoğunluğu uygulamaları ise genellikle azalmış bir enfeksiyon oranına yol açabilmektedir. *Agrobacterium*'un donör materyalle birlikte ko-kültüre edildiği durumlarda, 0.2-1.0 optik yoğunluk değeri (OD420, OD550, OD600 veya OD630 cinsinden) ve 108-109 bakteri hücresi mL⁻¹ değeri etkili olduğu bildirilmiştir (Zhang vd. 2021). López-Pérez vd. (2008), daha düşük bakteri yoğunluklarıyla (OD600 cinsinden 0.06 veya 0.2) ko-kültivasyonun, doku nekrozu önlediğini ve Sugraone (Superior Seedless) ve Crimson Seedless çeşitlerinde transgenik asma bitkileri elde edilebileceğini rapor etmişlerdir.

Asmada transformasyon protokollerini optimize etmede ilgili geni taşıyan dokuları seçmek için genellikle antibiyotik kanamisin direnci sağlayan seçilebilir işaretçi nptII geni, 10 ila 150 mg L⁻¹ arasında değişen kanamisin konsantrasyonları ile birlikte yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Zhang vd. 2021). Transformasyon sonrası ilgili genleri taşıyan dokuları seçmek için uygun bir antibiyotik ya da herbisit konsantrasyonu kullanmak önemlidir çünkü çok yüksek konsantrasyonlarda yanlış negatif sonuçlar elde edilebilir ve çok düşük konsantrasyonlarda yanlış pozitifler alınabilir (Martinelli ve Mandolino 1994; Dutt vd. 2007). Diğer seleksiyon genlerinden, hygromisin fosfotransferaz II (hptII) (Guan vd. 2013; Dai vd. 2015) ve fosfinotrisin-N asetil transferaz (bar) (Jardak-Jamoussi vd. 2008), sırasıyla hygromisin ve fosfinotrisin direnç sağlayan seleksiyon ajanı olarak asmada başarılı olarak kullanılmaktadır. Tez çalışması kapsamında seleksiyon ajanları değerlendirildiğinde, rutin seleksiyon protokollerinden farklı bir yaklaşım benimsenmiştir. İki haftalık fosfinotrisin ve kanamisin seleksiyonunun ardından, genomu düzenlenmiş bitkileri seçmek amacıyla klorsülfüron ile seleksiyon çalışmalarına devam edilmiştir. Literatürde, asmada geçici entegrasyonu yakalamak için kullanılan klorsülfüronun doz oranlarına dair bir bilgiye rastlanmadığından Veillet vd. (2019)'un çalışması referans alınarak, klorsülfüron ilave edilmiş ortamlarda yapılan seleksiyon çalışmalarıyla, bitkilerin gen düzenlemesi sonucu elde edilen özellikleri değerlendirilmiştir. Veillet vd. (2019), transgen içermeyen patates elde etmek amacıyla ALS genlerini hedefleyerek, transgen içermeyen dokuları ALS genlerinde yapılan sülfonilüre (SU) grubu herbisitlere dayanıklılık özelliğinden faydalanan kültür ortamlarına 40 ng/ml oranında klorsülfüron ekleyerek bitkileri seçmişlerdir. Araştırmacılar, %10 başarı ile elde ettikleri editlenmiş bitkilerden yaklaşık %12'sini transgen içermeyen olarak saptamışlardır. Tezin bu yönüne ilham kaynağı olmuş Veillet vd. (2019), ALS'de CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanarak gerçekleştirdikleri mutasyonu, diğer başka CRISPR düzenleme yaklaşımları ile birleştirilmesi ile özellikle vejetatif yollarla üretilen ve yüksek

heterozigot özelliğe sahip bitkilerde transgen bulundurmayan ancak istenen özelliğin manipüle edildiği bitkileri seçmede elverişli bir yöntem olabileceğini vurgulamışlardır. Tam da bu noktada, *ALS* genleri ve bu genlerde yapılacak baz düzenlemesinin bitkiye sağladıkları hakkında bilgi vermek doğru olacaktır.

ALS geni, dallı zincirli amino asitler için biyosentetik yolun ilk aşamasını katalize eden enzimi kodlar. Birçok çalışma, bu gendeki nokta mutasyonlarının *ALS* inhibitörlerine yani sülfonil üre grubu herbisitlere karşı baskın olarak direnç kazandırdığını göstermektedir (Zong vd. 2017, Shimatani vd. 2017, Tian vd. 2018, Hua vd. 2018, Veillet vd. 2019). Nokta mutasyonları uzun yıllardır, bitki ıslahı çalışmalarında bitkilere önemli agronomik özellikler kazandırmada kullanılan araçlardır. Nokta mutasyonları günümüz bitki biyoteknolojisinde başarılı uygulamalarına rastladığımız yukarıda bölümlerde ayrıntıları aktarılan CRISPR/Cas9 teknolojisi ile artık daha hassas ve öngörülebilir şekilde oluşturulabilmektedir. CRISPR/Cas9 baz düzenleme sistemleri günümüze kadar pirinç, domates, patates, buğday, mısır, kolza ve karpuz gibi bir dizi üründe başarıyla kullanılmıştır (Zong vd. 2017; Shimatani vd. 2017; Tian vd. 2018; Hua vd. 2018; Veillet vd. 2019). Literatürde incelendiği kadarı ile asmada *ALS* genlerini düzenlemeye yönelik herhangi bir mutasyon çalışması bulunmamaktadır. CRISPR sistemlerinden gen susturma ve baz düzenlemenin birlikte yapıldığı bir çalışmaya ise değil asmada, herhangi bir bitki çeşidinde henüz rastlanmamıştır. Bu nedenle önceki açıklamalarda belirtildiği gibi tez çalışmasında *MLO* genlerini susturmaya yönelik hazırlanacak plazmit tasarımının yanında *ALS* genlerine yönelik ek bir tasarımın bitkiye *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla entegrasyonu ile stabil entegrasyon sağlanmış bitkilerin yanında geçici olarak bitki hücrelerinde ifade olmuş ve transgen taşımayan bitkilerin de seçebilebilmesi hedeflenmiş ve çalışmalar bu doğrultuda yürütülmüştür.

Bütün bu araştırmaların ışığında, tez çalışmasında EHA105 *Agrobacterium tumefaciens* suşu ve somatik embriyogenezis temelli tekniklerin uygulamalarına yer verilmiştir.

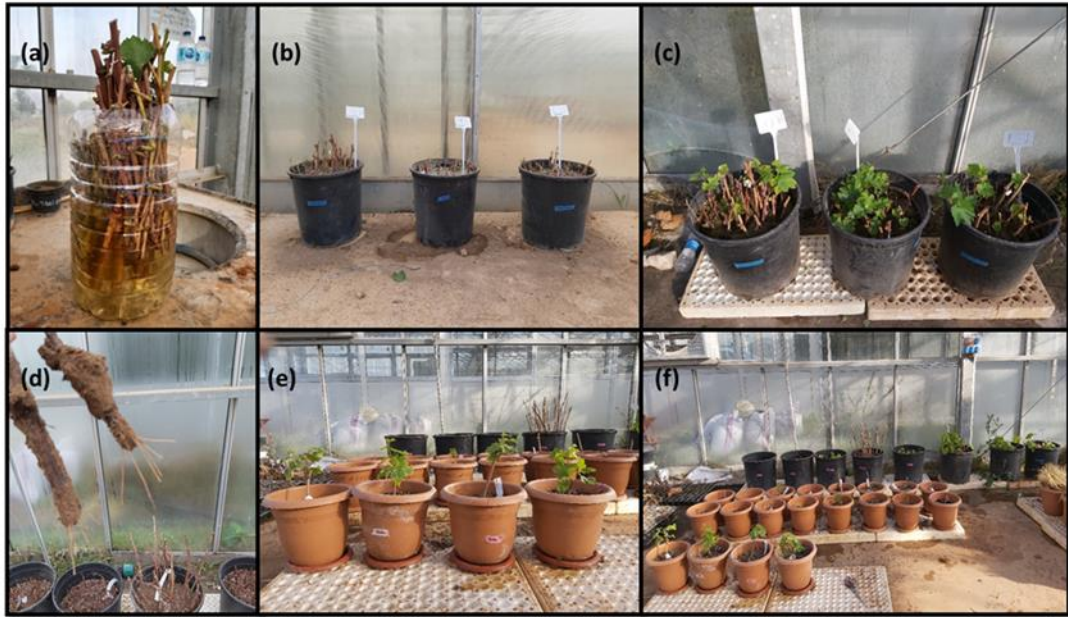
3. MATERYAL VE METOT

Bu araştırma, 2020-2024 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'ne ait deneme serasında ve moleküler biyoloji ve genetik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan bitki materyali ve yetiştiriciliği

Çalışmada bitkisel materyal olarak, 6 farklı asma çeşidine ait somak, yaprak ayası ve yaprak sapı dokuları kullanılmıştır. Çeşitlerden Michele Palieri, Sultani Çekirdeksiz, Crimson Seedless ve Italia'ya ait çelikler Selçuk Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait koleksiyon bağından, Chardonnay ve Siyah Kışmış ise Manisa Bağcılık Enstitüsü Alaşehir İstasyonu'ndan temin edilmiş ve Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'ne ait bir serada yetiştirilmiştir. Çeşitlere ait görseller Şekil 3.1'de sunulmuştur.



Şekil 3.1. a) Sultani Çekirdeksiz ve Italia üzüm çeşitlerine ait çelikler; b), c) Saksılara toplu olarak dikilmiş çelikler; d) Köklenmiş bir çelik; e), f) Seradaki çelikler ve saksılara aktarılmış çeşitlerin genel görüntüsü.

Bitki başlangıç materyali çelikler 1:2 oranında torf perlit karışımlı saksılarda öncelikle köklendirilmiş ve ardından 1:1 oranında torf ve perlit bulunduran 30 lt hacimli daha büyük saksılara aktarılmıştır. Bitki yetiştiriciliği yazları gölge tozu uygulanmış cam seralarda olmak suretiyle sürdürülmüştür. Bitkilere, ihtiyaçları göz önünde bulundurularak sulama ve denge gübresi (18-18-18) uygulamaları yapılmıştır. Aktif vejetatif dönemde (Şekil 3.2) doku kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere yaprak ayası ve yaprak sapı dokuları kültür işlemine alınmıştır.



Şekil 3.2. Aktif vejetatif dönemdeki asmalardan bir görüntü

Doku kültürü çalışmalarında kullanılan anterler ise 2-3 mm büyüklüğünde henüz polinasyona uğramamış somaklardan izole edilmiştir. Bunun için somaklar, üzüm çeşidinin gelişimine bağlı olarak Michele Palieri, Sultani Çekirdeksiz, Crimson Seedless ve Italia için Selçuk Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait koleksiyon bağından, Chardonnay ve Siyah Kışmış için ise Manisa Bağcılık Enstitüsü Alaşehir İstasyonun'ndan toplanarak soğuk zincir ile laboratuvara ulaştırılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan çeşitlere ait genel agronomik bilgiler aşağıda bildirilmiştir.

Sultani Çekirdeksiz, bazı ülkelerde 'Thompson Seedless', 'Sultanina', 'Sultana' ve 'Oval Kışniş' isimleri ile de bilinir. Salkımları orta irilikte ve normal sıklıkta, taneleri ise eliptik-yuvarlak şekilli, yeşil-sarı renkli ve ince kabukludur. Türkiye'de Ege Bölgesi ekolojisinde Ağustos ve Eylül ayında hasat edilen, sofralık, kurutmalık ve şıralık özelliklerin hepsini iyi derecede gösteren standart bir üzüm çeşididir. Omcaları güçlü büyür ve verimlidir (Çelik 2006). Külleme hastalığına hassasiyet göstermektedir (Saleh vd. 2007). Dünya üzerinde üzüm yetiştiriciliği yapılabilen yaklaşık tüm ülkelerde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Taşımaya ve muhafazaya oldukça dayanıklı bir çeşittir (Sabır ve Sabır 2017).

Italia, İtalya'da ıslah edilen sofralık bir çeşit olup bazı ülkelerde 'Ideal' adı ile de bilinir. 'Bicone' x 'Hamburg Misketi' üzüm çeşitlerinin melezlenmesi ile elde edilmiştir. İri salkımlı, yuvarlak taneli, beyaz, kalın kabukludur. 'Hamburg Misketi' genlerinden aldığı misket aromasına sahiptir. Kendine özgü aroması ve rengi ile birçok ülkede yaygın yetiştirilmektedir. Muhafaza ve yola dayanımı yüksek olup, asmaların başlıca hastalığı olan küllemeye karşı yüksek oranda hassastır (Atak 2017). Türkiye'de Marmara ve Ege Bölgeleri için önerilmektedir (Çelik 2006).

Crimson Seedless, Amerika Birleşik Devletleri'nde 'Emperor' x 'C33-199' melezlenmesi ile elde edilen, geç mevsimde olgunlaşan çekirdeksiz sofralık bir üzüm çeşididir. Salkımları oldukça iri ve kanatlıdır (Çelik 2006). Dünya üzerinde üzüm yetiştiriciliği yapılan ülkelerin yaklaşık tamamında ticari olarak üretilmekte ve kolaylıkla

3.1.3. Kullanılan besi ortamları, kimyasallar, enzimler, hazır kitler, tampon çözeltiler ve solüsyonlar

Çalışmada kullanılan besi ortamları, kimyasallar, enzimler ve hazır kitlere ait detaylı bilgiler, “gen klonlama ve mikrobiyoloji çalışmaları”, “bitki transformasyonu ve doku kültürü çalışmaları” ve “PCR analizleri” kategorilerinde Çizelge 3.1’de sunulmuştur. Tampon çözeltilerin ve stok solüsyonların hazırlanışı bu bölümün sonraki kısımlarında açıklanmıştır.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve hazır kitlere ait bilgiler

Gen Klonlama ve Mikrobiyoloji Çalışmaları			
KİMYASAL MADDELER	Kimyasal Madde	Marka	Kullanım Amacı
	Kanamisin	NeoFroxx	Bakteri seleksiyonu
	Spektinomisin	AppliChem	Bakteri seleksiyonu
	Rifampisin	AppliChem	Bakteri seleksiyonu
	Dimetil sülfoksit, DMSO >%99	Sigma-Aldrich	Çözücü
	LB (Luria Bertani) Broth	Caisson	Bakteri büyüme
	Agar (Mikrobiyoloji Sınıfı)	Sigma	Katılaştırıcı ajan
	PacI	ThermoScientific	Restriksiyon enzimi
	EcoRI	ThermoScientific	Restriksiyon enzimi
	XbaI	ThermoScientific	Restriksiyon enzimi
	T4 DNA Ligaz	ThermoScientific	Klonlama
	Gliserol, %85	Isolab	Stok hazırlama
	Kalsiyum Klorür	Merck	Kompetent hücre hazırlığı
HAZIR KİTLER	Monarch, DNA Jel temizleme kiti		PCR ürünlerinin jelden temizlenmesi
	Monarch, Plazmit Miniprep kiti		Plazmit izolasyonu
Bitki Transformasyonu ve Doku Kültürü Çalışmaları			
KİMYASAL MADDELER	Fosfinotrisin	GoldBio	Bitki seleksiyonu
	Klorsülfüron	Sigma	Bitki seleksiyonu
	Timentin (Tikarsilin/Klavulanat)	GoldBio	Agrobacterium gelişimini durdurma
	Kanamisin	NeoFroxx	Bitki seleksiyonu
	Asetosiringon	Sigma	Bitki fenolik bileşiği
	Etanol, %96	Tekkim	Sterilizasyon ve DNA izolasyonu
	Metanol, %99	Merck	Çözücü
	Tween20	Merck	Sterilizasyon
	Sukroz	Isolab	Karbon kaynağı

Çizelge 3.1'in devamı

Bitki Transformasyonu ve Doku Kültürü Çalışmaları			
KİMYASAL MADDELER	Kimyasal Madde	Marka	Kullanım Amacı
	MS Bazal Ortamı	Duchefa	Makro mikro besin kaynağı
	MS Bazal Ortamı (Vitaminli)	Duchefa	Makro mikro besin kaynağı
	Agar, Mikropropagasyon Tip I	Duchefa	Katılaştırıcı ajan
	2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D)	Duchefa	Bitki gelişim düzenleyici
	6-Benzylaminopurine (BAP)	Caisson	Bitki gelişim düzenleyici
	Naftalen asetik asit (NAA)	Caisson	Bitki gelişim düzenleyici
	Parachlorophenoxyacetate (pCPA)	Duchefa	Bitki gelişim düzenleyici
	Myoinositol	Caisson	Vitamin
	Thiamine HCl	Caisson	Vitamin
	Nikotinik asit	Caisson	Vitamin
	Piridoksin HCl	Caisson	Vitamin
	Kalsiyum Pantotenat	Caisson	Vitamin
	Biyotin	Caisson	Vitamin
	Glutamin	Sigma	Amino asit
	Fenialanin	Sigma	Amino asit
	Glisin	Sigma	Amino asit
	Kazein	Caisson	Besin içeriği
	Aktif Kömür	Merck	Besin İçeriği
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Isolab	Makro besin
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	Isolab	Şelatlama
	Sodyum Hidroksit	Isolab	pH düzenleme ve hormon stoğu hazırlama
	HCl, %37	Isolab	pH düzenleme
PCR Analizleri			
KİMYASAL MADDELER	Taq DNA Polimeraz	ThermoScientific	PCR enzimi
	DNA Ladder GeneRuler 1 kb	ThermoScientific	Markör
	DNA Ladder 1 kb plus	Hibrigen	Markör
	DNA Ladder 100 bp	Hibrigen	Markör
	Agaroz	BioMax	Jel hazırlama
	EDTA, Etilendiamintetraasetik asit	Merck	Jel elektroforezi

Çizelge 3.1'in devamı

PCR Analizleri			
KİMYASAL MADDELER	Kimyasal Madde	Marka	Kullanım Amacı
	Tris (hidroksimetil) aminometan	Merck	Jel elektroforezi
	“Borik Asit	Merck	Jel elektroforezi
	Etidyum Bromür	Merck	Jel görüntüleme
	Setil Trimetil Amonyum Bromür, CTAB Bromide	Amresco	DNA izolasyonu
	Kloroform	Merck	DNA izolasyonu
	β-Merkaptoetanol, %99	Merck	DNA izolasyonu
	İzoamil alkol, %99	Merck	DNA izolasyonu
	Sodyum Klorür	Merck	DNA izolasyonu

Mikrobiyolojik çalışmalarda, sıvı büyütme ortamları 25 g/L oranında LB besin ortamının saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Katı büyütme ortamları için 25 g LB ortamı ve 15 g agar 1 litre saf suda çözülmüştür. Sıvı ve katı bakteri büyütme ortamları 121°C'de 20 dk otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Mikrobiyolojik çalışmalar kapsamında, bakterilerin kompetent hale getirilmesinde kullanılan %15 gliserol içeren 0.1 M CaCl₂ çözeltisi için 1,11 gram CaCl₂ tartılıp 15ml gliserol ve 85ml saf su içinde çözdürülmüştür. Aynı çözelti saf su ile de hazırlanmıştır (0.1M CaCl₂). Elde edilen tüm çözeltiler, sterilizasyonun sağlanması amacıyla 121°C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Bakteri ve bitki seleksiyonunda kullanılan bütün antibiyotikler, besin ortamları 50°C sıcaklığa düştüğünde ortamlara eklenmiştir. Antibiyotiklerden, spektinomisin, kanamisin ve timentin steril saf su ile rifampisin dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözülmüştür. Stok antibiyotik çözeltileri, 0,22µm por çapında, hidrofilik selüloz asetat filtreden (Corning ®) geçirilip, steril hale getirilmiş steril mikrosantrifüj tüplerinde saklanmıştır. Antibiyotik stok çözeltileri, 6 ay boyunca -20°C'de saklanmış olup, bu süre sonunda etkinlik kayıplarını önlemek amacıyla tüm stoklar yenilenmiştir. Bitki transformasyonu çalışmalarında kullanılan 200 mM asetosiringon, 392.38 mg asetosiringonun, 6 ml etanol ve 4 ml saf su içinde çözdürülmesi ile elde edilmiştir. Filtre yöntemiyle yapılan sterilizasyondan sonra küçük hacimlerde -20°C'de saklanmıştır.

Doku kültürü ortamlarına eklenen Fe-EDTA için 200X oranında stok solüsyon hazırlanmıştır. 7.44 g Na₂EDTA·2H₂O 900 mL ultra suya eklenmiş ve çözelti neredeyse kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Ardından yavaşça 1.86 g FeSO₄·7H₂O eklenerek toplam hacim ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Çözelti +4°C koşullarda saklanmıştır. Kültür ortamlarına, otoklav ile sterilizasyon öncesinde 1 L'ye 5 mL hacimde eklenmiştir. B5 vitamin stoğu 1000X oranında, 100 myoinositol, 10 g thiamine HCl, 10 g nikotinik asit ve 1 g piridoksin HCl'nin 1 L ultra saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Küçük hacimlerde ve mikrosantrifüj tüplerde -20°C'de saklanmıştır, kullanım öncesi çözdürülerek 1 L'ye 1 ml hacimde kullanılmıştır. Vitamin T stoğu 1000X oranında, 50 g myoinositol, 1 g nikotinik asit, 1 g of thiamine HCl, 1 g pyridoxine HCl, 1 g kalsiyum pantotenat ve 0.01 g of biyotin 1 L ultra saf suda çözülmesiyle elde edilmiştir. Küçük

hacimlerde ve mikrosantrifüj tüplerde -20°C'de saklanmıştır, kullanım öncesi çözdürülerek 1 L'ye 1 ml hacim olacak şekilde kullanılmıştır. Amino asit karışımı stoğu, 1000X oranında, 100 g glutamin, 10 g fenilalanin ve 2 g glisin 1 L ultra saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır, küçük hacimlerde -20°C'de saklanmıştır, kullanım öncesi çözdürülerek 1 L'ye 1 ml hacim olacak şekilde kullanılmıştır.

Doku kültürü çalışmalarının temel öğeleri hormon çözeltilerinin hazırlanmasında, hormonların temin edildikleri firmanın önerileri dikkate alınmıştır. Hormonlardan 1 mM 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) hazırlamak için 44.2 mg 2,4-D 1 mL 10 N steril NaOH içinde çözülmüştür, tamamen çözülene kadar ultra saf su eklenerek nihai hacim 200 mL'ye tamamlanmıştır. 1 mM 6-benzilaminopürin (BAP) için 45.04 mg BAP 1 mL 10 N steril NaOH solüsyonunda çözülmüştür. Hacmi 200 mL olacak şekilde ultra saf su eklenmiştir. 1 mM naftalen asetik asit (NAA) hormon çözeltisi hazırlamak 37,24 g NAA 1 mL 10 N steril NaOH solüsyonunda çözülmüştür. Hacmi 200 mL olacak şekilde ultra saf su eklenmiştir. 1 mM pCPA stok çözeltisi, 37.3 mg pCPA'nın 1 mL 10 N steril NaOH solüsyonunda çözülmesi ve ardından son hacmin ultra saf su ile 200 mL'ye tamamlanması ile elde edilmiştir. Stok hormon çözeltileri, 0,22µm por çapında, hidrofilik selüloz asetat filtreden (Corning ®) geçirilip, steril hale getirilmiş steril mikrosantrifüj tüplerinde saklanmıştır. Hormon stok çözeltileri, 1 yıl boyunca -20°C'de saklanmış olup, bu süre sonunda etkinlik kayıplarını önlemek amacıyla tüm stoklar yenilenmiştir. Hormon stokları doku kültürü ortamlarına otoklav sonrası kültür ortamları 40-50°C sıcaklığa düştüğünde uygun miktarlarda eklenmiştir. Çalışmada kullanılan doku kültürü ortamları 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Kültür ortamlarının pH değerleri 5.8'e ayarlandıktan sonra agar eklenmiş ve sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. pH düzenlemek amacıyla 1N hidroklorik asit ve 1N sodyum hidroksit kullanılmıştır. 1N hidroklorik asit çözeltisi için, %37 HCl'den alınan 8.3 ml, saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 1N sodyum hidroksit çözeltisi ise 4 g sodyum hidroksitin 100 ml saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hormon çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan 10 N NaOH ise 40 g sodyum hidroksitin 100 mL saf suda çözülmesi ve ardından 121°C'de 20 dakika otoklavlanması ile hazırlanmıştır.

Bitki seleksiyonu aşamasında kullanılan fosfinotrisin stok çözeltisi için 50 mg fosfinotrisin 50 ml suda çözdürülmüş ve filtre sterilizasyonu yapılarak -20°C'de mikrosantrifüj tüpüne yaklaşık 1 ml olacak şekilde alikotlanarak muhafaza edilmiştir. Bir diğer bitki seleksiyonu klorsülfüron çözeltisi hazırlamak için 5 mg ürün, 5 mL ultra steril saf suda çözülerek ve filtreden geçirilmek suretiyle steril hale getirilmiştir. Küçük hacimlerde -20°C'de saklanmış, kullanım öncesi çözdürülerek kültür ortamları 40-50°C sıcaklığa düştüğünde ortamlara eklenmiştir.

DNA izolasyon çalışmalarında kullanılan izolasyon solüsyonu %2 CTAB (ağırlıkça), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA ve 100mM Tris-HCl ile hazırlanmıştır. %0,3 β-Merkaptoetanol (hacimce) çözeltiye ekstraksiyon öncesi eklenmiştir. İzolasyon prosedüründeki kloroform:izoamil alkol çözeltisi ise hacimce 24:1 oranında olacak şekilde, 1000 ml çözelti için 960 ml kloroform ve 40 ml izoamil alkolün karıştırılması ile elde edilmiştir. Jel elektroforezinde tampon çözelti olarak kullanılan 1X TBE'nin hazırlanması için 108 g tris (hidroksimetil) aminometan, 55 g borik asit ve 5,8 g EDTA 1 litre saf suya eklenip çözülmüştür. Hazırlanan 10X'lik bu çözelti saf su ile 1X konsantrasyona seyreltilmiştir.

3.1.4. Kullanılan primerler

Çalışma kapsamında, gRNA bölgelerine spesifik primerler ve transformasyonun doğrulanmasına yönelik transgenlere spesifik primerlerin sekans ve diğer çeşitli bilgileri Çizelge 3.2’de yer almaktadır. Primerler online ‘‘Primer3 Plus’’ programı yardımı ile optimum özelliklere (GC oranı, Tm dereceleri, Dimer olasılığı vs.) sahip olan ve hedef dışı etki olasılığı olmayan en başarılı aday primer çiftleri seçilerek sentezletirilmiştir. Vektör plazmitlerin T-DNA bölgelerine spesifik primerler, pFGC-pcoCas9 için Cas9 bölgesinden (Bkz. Çizelge 3.2 52256-2), pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della için aminoglikozit kinaz (Bkz. Çizelge 3.2 Kanamisin) ve sitidin demaninaz (Bkz. Çizelge 3.2 CDA) bölgelerinden tasarlanmıştır. Çalışmada kullanılan primer çiftleri Ankara BMLabosis firmasından temin edilmiştir. Liyofilize halde laboratuvarımıza ulaştırılan primerden öncelikle, firmanın talimatı doğrultusunda otoklavlanmış, nükleazdan arı saf su ile 100 mM stok çözeltiler hazırlanmıştır. Daha sonra stok primer çözeltilerinden 10 mM konsantrasyonda yeni primer çözeltileri hazırlanmış ve PCR çalışmalarında bu stoklardan gerekli miktarlarda kullanılmıştır. Primerler, -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan primerlere ait bilgiler

Primerin Kullanım Amacı	Primer Adı	Forward Sekans Reverse Sekans	Tm (°C)	Ürün Boyutu (bp)
TRANSFORMASYONUN DOĞRULANMASI	52256-2	5’CTCCAAGGTGGATCTGGTGT3’ 5’ACCTTATCGCTCAGCTTCCA3’	54	600
	Kanamisin	5’AGACAATCGGCTGCTCTGAT3’ 5’ATACTTTCTCGGCAGGAGCA3’	58	280
	Cas9-3	5’TCGAGAAGATGGATGGAACC3’ 5’CATTCCCTCGGTCACGTACT3’	58	464
	CDA	5’TACCCTTTAAGAAAGGCGACA3’ 5’TACAGCTGGACTCTTAGTGGT3’	58	820
DNA KALİTE KONTROLÜ	Actin	5’GGGATGGAGAAGTTTGGTGGTGG3’ 5’CTTCGACCAAGGGATGGTGTAGC3’	58	190

Çizelge 3.2'nin devamı

Primerin Kullanım Amacı	Primer Adı	Forward Sekans Reverse Sekans	Tm (°C)	Ürün Boyutu (bp)
KILAVUZ RNA'ların DOĞRULANMASI ve MUTASYONLARIN TESPİTİ	VvMLO6a	5'GTCCCAAACACTCCTGCTTC3' 5'GGTGCACCTGATTTGACCTT3'	53	392
	VvMLO7	5'TGGCTCCCCCATAACAATA3' 5'GCAGCCTTACCGATCCAATA3'	53	452
	VvMLO9	5'GAACCCAGAACCAGCTTCAC3' 5'AAGAGTTTGCCATGGATTGG3'	53	494
	VvMLO11	5'CACGTCGATTACTTCCATCG3' 5'GTGGGCGGCTCTCTCATAAT3'	53	286
	VvALS1	5'TCCGAAATGTGTTGCCGAGA3' 5'CCAACATACAGAACCGGCCT3'	53	514
	VvALS2	5'AGGGCAGTGACATCCTTGTG3' 5'TGCATTCCCAGGCAGCATAA3'	53	539

3.2. Metot

Çalışma kullanılan yöntemler, “Biyoinformatik çalışmalar”, “Mikrobiyolojik çalışmalar”, “Moleküler çalışmalar” ve “Gen transformasyonu ve doku kültürü çalışmaları” başlıkları altında bu bölümde incelenmiştir.

3.2.1. Biyoinformatik Çalışmalar

Çalışmada CRISPR-Cas9 sistemi ile susturulması planlanan 4 *MLO* geni ile baz düzenlemesi gerçekleştirilecek 2 *ALS* geni için gerçekleştirilen biyoinformatik çalışmalar her gen için ayrı olarak aşağıda 2 başlık altında sunulmuştur.

3.2.1.1. *MLO* genleri ile ilgili yapılan biyoinformatik çalışmalar

Asmada külleme hassasiyeti ile ilişkili 4 *MLO* geninin (*MLO6a*, *MLO7*, *MLO9*, *MLO11*) genomda yerleri biyoinformatik yöntemler ile belirlenmiştir. Tez metninin devamında “*MLO6a*, *MLO7*, *MLO9* ve *MLO11*” olarak isimlendirilecek 4 genin Feechan (2008) ve Winterhagen (2008) tarafından rapor edilen kodları ve genomdaki yerlerine ait bilgiler bulgular kısmında sunulmuştur. Susturulması planlanan 4 *MLO* genine ait sekans bilgileri National Center for Biotechnology Information Gene, NCBI ve EnsemblPlants veri tabanlarından elde edilmiştir. Bu veri tabanlarında yer alan asmaya ait genom sürümü Fransız-İtalyan Kamu Konsorsiyomu tarafından Uluslararası Üzüm Genomu Programı (IGGP) tarafından gerçekleştirilecek asma genom karakterizasyonu çalışması için 12X tüm-genom shotgun sekanslama kullanılarak hazırlanmıştır. Asmada 19 *MLO* gen üyesi, Feechan vd. (2008) çalışmasında belirlenen ve Arabidopsis'te külleme dayanıklılığıyla ilişkilendirilen *AtMLO2*, *AtMLO6* ve *AtMLO12* protein sekanslarıyla Genius Prime programı kullanılarak hizalanmış ve benzerlikleri bu çalışmanın kapsamında değerlendirilmiştir.

Hedeflenen *MLO* genleri için kılavuz RNA'ların (gRNA) tasarlanmasında, CRISPRdirect programı kullanılmıştır (Naito vd. 2015). Bu program, detaylı hedef dışı kesim için analiz kabiliyetine sahip olması, bazı önemli operasyonel parametreleri sunması (örn. Restriksiyon enzimi varlığı ve GC yüzdesi) ve tek seferde tüm gRNA'yı (hedef + iskelet, crRNA + tracrRNA) çıktı olarak sunması nedeniyle tercih edilmiştir. CRISPR-Cas9 sistemini silahlandırarak 4 gRNA, aday *MLO* genleri için ayrı olarak ve etkin bir susturma sağlamak için ilgili genlerin ekson bölgesini hedef alacak şekilde tasarlanmıştır. Buna göre tezde çalışmasında kullanılan gRNA'lere ait sekans ve operasyonel önemli parametreler bulgular kısmında sunulmuştur.

Seçilen gRNA'ların farklı asma çeşitlerinde hedef aldıkları bölgeler ile tam olarak örtüşmesi CRISPR-Cas9 sisteminin etkinliğini artırmaktadır (Jinek vd. 2012). Bu amaçla her gRNA için hedef aldıkları bölgeyi Çizelge 3.2'de yer alan gRNA'lere spesifik primerler ile PCR reaksiyonları koşulmuş, elde edilen ürünler için sekanslama hizmeti alınmıştır. Sekanslama işlemi tek yönlü (forward) Sanger metodu kullanılarak Ankara BMLabosis firması tarafından yapılmıştır. Sultani Çekirdeksiz, Italia, Crimson Seedless, Michele Palieri, Siyah Kışmış ve Chardonnay çeşitlerinde yaptırılan sekanslatırma sonuçlarına göre tasarlanan gRNA'ların asma çeşitlerindeki varlığı belirlenmiştir.

PCR çalışmaları için gerekli DNA örneklerinin izolasyonu, Doyle ve Doyle (1990)'nin bazı modifikasyonlarla temel alındığı bir protokole göre gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu için 300 mg taze asma yaprak dokuları steril tüplere alınmış, üzerine merkaptotanol içeren CTAB (%2 CTAB, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl) solüsyonundan 450 µl eklenerek ezme çubukları yardımıyla ezilmiştir; kısa bir vorteksleme işleminin ardından 65 °C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sıcak su banyosundan alınan örneklerin üzerine aynı hacimde (450 µl) kloroform-izoamil alkol (24:1 v/v) eklenerek tüpler alt-üst edilmiş, 15 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve tüplerin üst kısmında toplanan sıvı, temiz bir başka tüpe alınarak üzerlerine tekrar kloroform-izoamil alkol eklenmiş ve kloroform ile yıkama basamağı tekrar edilmiştir. Daha sonra üzerlerine 300 µl soğuk (-20°C'de muhafaza edilen) izopropil alkol ilave edilmiştir. Alt-üst edilen tüpler -20°C'de 1 gece bekletilmiş ve tekrar 15 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilerek üst kısımda toplanan sıvı atılmış ve altta toplanan peletin üzerine

300 µl % 70 etanol eklenerek 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Etanol ile yıkama işlemi tekrarlanmış ve örnekler kurumaya bırakılmıştır. Üzerlerine 100 µl steril saf su eklenen örnekler DNA'nın çözünmesinin ardından -20°C sıcaklıkta saklanmıştır.

Temel PCR karışımını hazırlamak için, öncelikle aşağıdaki bileşenler bir mikro tüp içinde birleştirilmiştir. "Master mix" olarak adlandırılan bu karışımdan 24 µl ve DNA örneğinden 1 µl miktar, PCR çalışmaları için bir araya getirildi. Çalışmada, her bir reaksiyon için 20-50 µl aralığında değişebilen örnekler oluşturulmuştur. Master mix ve DNA örneği, uygun oranlarda birleştirilerek reaksiyonlar yürütülmüştür. Aşağıda 100 µl hacimde hazırlanan master mix bileşenleri ve miktarları yer almaktadır:

- 5 µl Primer Forward (10 mM)
- 5 µl Primer Reverse (10 mM)
- 1 µl Taq DNA polimeraz (U/µL)
- 2 µl dNTP'ler (Her dNTP'nin konsantrasyonu 10 mM)
- 10 µl PCR tamponu (Taq Buffer)
- 8 µl MgCl₂ (25 mM)
- 69 µl nükleaz ari su

Yukarıdaki tarifile hazırlanan ön reaksiyon ürünleri kısa bir santrifüjün ardından PCR cihazında aşağıda detayları bildirilen programda koşulmuştur:

- I. Başlangıç Denatürasyon: 95°C, 6 dakika
- II. Döngü (30-35)
 - Denatürasyon: 95°C, 30 s
 - Primer Uyumlama (Bkz. Çizelge 3.2 T_m değerleri) °C, 30 s
 - Elongasyon: 72 °C, 60 s
- III. Final Elongasyon: 72°C, 10 dakika
- IV. Son Sıcaklık: 4°C, süresiz

PCR ürünleri %1-2 (kütlece) agaroz ve %0.005 etidyum bromür içeren TBE jelde yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yerleştirilmiş, 100V-120V potansiyel farkta, 30-45 dakika boyunca yürütülmüştür. Elektroforez sonrası agaroz jel, UV ışığına sahip sistemde görüntülenmiştir.

3.2.1.2. ALS genleri ile ilgili yapılan biyoinformatik çalışmalar

Çalışmada sitidin deaminaz baz düzenleme sistemi, asma ALS (asetolaktat sentaz) genlerinde nokta mutasyonu oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Burada temel düşünce,

ALS genine yönelik seçilen uygun nokta mutasyonu sağlayacak CRISPR-Cas9 baz düzenleme sistemini ve sistemi silahlandıracak gRNA ile *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla geçici olarak bitkiye aktarılmasıdır. Prolin197Serine mutasyonu (domates ve patatesten ALS1'deki Prolin 186'ya karşılık gelen *Arabidopsis thaliana* sekansına göre belirtilmiştir), ALS inhibitörlerinden klorosülfürona karşı direnç sağlayan mutasyonlardan biridir (Veillet vd. 2019). Yapılan biyoinformatik çalışmalar ile domatese ait ALS1 ve ALS2 genleri ve BLAST programı kullanılarak, asmaya ait (*V. vinifera*) ALS1 ve ALS2 genleri tespit edilmiş ve ClustalO programı kullanılarak iki bitkinin sahip olduğu ALS genleri hizalanmıştır. Hizalamalarda Prolin197'ye karşılık gelen bölge hedeflenerek nokta mutasyonları oluşturulması planlanmıştır.

Hedeflenen ALS1 ve ALS2 genleri için gRNA'lerin tasarlanmasında, oluşturulmak istenen asma ALS1 ve ALS2 genlerindeki sırasıyla P74 ve P175 rezidüleri hedefleyecek kılavuz RNA'lar, MLO genleri için yapılarına benzer şekilde CRISPRdirect programı ile tasarlanmıştır. gRNA'lere ait sekans ve operasyonel parametreler bulgular kısmında sunulmuştur.

Çizelge 3.2'de yer alan gRNA'lere spesifik VvALS1 ve VvALS2 primer setleri ile PCR reaksiyonları koşulmuş ve elde edilen ürünler tek yönlü (forward) olarak Sanger metodu kullanılarak Ankara BMLabosis firması tarafından sekanslanmıştır. Nokta mutasyonu gerçekleştirilecek ALS1 genindeki P74 ve ALS2 genindeki P175 rezidüleri hedefleyen gRNA'lerin, bitki materyallerinden Sultani Çekirdeksiz, Siyah Kışmış, Italia, Crimson Seedless, Michele Palieri ve Chardonnay çeşitlerindeki varlığı, sekanslama işlemi sonrası doğrulanmıştır.

3.2.2. Mikrobiyolojik Çalışmalar

Bu bölümde, çalışmada kullanılan vektör plazmitlerin ve nihai vektör tasarımlarının bitkiye aktarılmasında kullanılan DH5α ve *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşlarının çoğaltılması, kompetent hale getirilmesi ve stoklanması konuları aktarılmıştır. Ayrıca vektör plazmitlerin DH5α ve *Agrobacterium tumefaciens* EHA105'e transformasyonunda uygulanan ısı-şok ve elektroporasyon yöntemlerine değinilmiştir.

Tez çalışması kapsamında vektör plazmitler pUC-kan-wz, pFGC-pcoCas9 ve pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della'nın çoğaltılması için Addgene ve Genewiz firmaları yönergelerinde bakteri büyütme suşu olarak bildirilen *Escherichia coli* DH5α suşu kullanılmıştır. Mikrobiyal çalışmalarda, DH5α hücrelerinin çoğaltılması, kompetent hale getirilmesi ve stoklanması amacıyla Luria broth (LB) sıvı ve katı besin ortamları tercih edilmiştir. Mikrobiyal besi ortamı olarak, sıvı DH5α hücre büyütme çalışmalarında Luria broth (LB) besi ortamı ve çalkalamalı inkübatörde 37 °C ve 225 rpm koşullar ve DH5α koloni geliştirme çalışmalarında LB besiyeri ve agar içeren ortamlarda 37 °C büyüme koşulları kullanılmıştır.

LB besi ortamlarının hazırlanmasında standart ölçüler olan litre başına 25 g LB ve 15 g agar kullanılmıştır. Sıvı besi ortamları için 25 g LB 1 litre saf suda çözölmüş ve sterilizasyonu için 121°C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Besi yeri +4°C'de muhafaza edilmiştir, kullanım öncesi oda sıcaklığına düşmesi beklenmiştir. Yürütölecek çalışmaya göre uygun çeşit ve dozdeki antibiyotiklerle ya da antibiyotiksiz olarak kullanılmıştır. Katı LB besi ortamlarında standart ölçüler olan litre başına 25 g LB ve 15 g agar saf suda

çözölmüş ve 121°C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Besiyeri yaklaşık 50°C sıcaklığa düştüğünde çalışmaya göre farklılık gösterebilecek antibiyotik çeşitleri uygun dozlarda eklenerek 90x17mm plastik steril petri kaplarına dökölmüştür. Besiyerleri içerisindeki antibiyotiklerin ısı ve sıcaktan korunması amacıyla alüminyum folyolara sarılarak +4°C'de 1 ay süreyle muhafaza edilmiştir. Kullanım öncesinde +4°C'de koşullardan oda sıcaklığına alınıp bir süre bekletilmiştir.

Çalışmada kullanılan vektör plazmitlerin çoğaltılmasında DH5α suşu kullanılmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda DH5α'ya transformasyonda ısı-şok yöntemi uygulanmıştır. Yöntemin detaylarına geçmeden evvel başarılı bir transformasyonun olmazsa olmazı kompetent hücrelerden bahsetmek yerinde olacaktır. Kompetent hücreler, genellikle transformasyon için kullanılan bakteri hücreleridir. Bakteriyel transformasyon, yabancı DNA'nın hücre zarına bağlanması ve DNA'nın zarın ötesine sitoplazmaya hareket etmesini içerir. Kompetent hücre hazırlığı, bakteriyel hücrelerin zar geçirgenliği ve hücre duvarının değiştirilerek yabancı DNA'nın alınmasına olanak tanınması temeline dayanır. Farklı transformasyon yöntemleri (ısı-şok veya elektroporasyon) ile plazmid DNA'nın hücreye girmesine izin verilir ve ardından hücre zarını ve hücre duvarını onarmak için hücreler bir kurtarma ortamında inkübe edilir. Tez çalışmasında, temel prensipleri yukarıda aktarılan DH5α kompetent hücre hazırlığında ısı-şok transformasyon yöntemi uygulanmıştır. Bunun için *Escherichia coli* DH5α stok bakteri örneği ultra derin dondurucudan çıkarılmış ve steril çalışma koşullarında çözölmüştür. Bakteri LB agar ortamında çoğaltılmış ve tek bir koloni seçilmiştir. Seçilen koloni 5 ml'lik LB sıvı besi ortamına eklenmiş ve gece boyunca 37°C'de, 225 devir/dak çalkalama hızında çoğaltılmıştır. 1 litrelik LB sıvı besi ortamına 10 ml gece boyunca çoğaltılmış bakteri eklenmiş ve bakteriler 37°C'de, 225 devir/dak hızında çalkalanarak OD600 değeri 0.4-0.6 aralığına ulaşana kadar çoğaltılmıştır. Ardından bakteriler 4°C'de soğutulmuştur. 10 dakika süreyle 4000 devir/dak hızında santrifüj yaparak bakteriyi toplanmış ve süpernatantı dikkatlice atılmıştır. Bakteri peleti 250 ml 0.1 M CaCl₂ çözeltisinde yavaşça yeniden süspanse edilmiştir. Bu işlemin ardından 10 dakika süreyle tekrar 4°C'de bekletilmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant atılmış ve bakteri peleti 50 ml 0.1 M CaCl₂:15% gliserol çözeltisinde tekrar süspanse edilmiştir. Son olarak 100 µl'lik hacimde steril tüplere pay edilerek ısı-şok transformasyon çalışmalarında kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir. Kompetent hücrelerin canlılık testleri için hazırlanan kompetent stoktan bir miktar öze yardımı ile katı LB ortamlarına ekilmiştir.

Isı-şok yönteminde 100 µl hacimde pay edilerek -80°C'de saklanan bir tüp DH5α kompetent hücre solüsyonu, çözölmesi için buzun içersine yerleştirilmiştir. Transformasyonu yapılması planlanan ilgili plazmit -20°C sıcaklıktaki dondurucudan çıkartılıp eritilmiş ve içerisinde 5 µl örnek kompetent hücrenin bulunduğu tüpe eklenmiştir. Tüpe hafifçe birkaç kez parmakla vurulduktan sonra karışımı 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Hücre zarının geçici olarak açılması ve plazmidin hücreye girmesini sağlamak amacıyla bakteri-plazmid karışımı, 42°C sıcaklığa maruz bırakılmıştır, bunun için su banyosu kullanılmıştır. Hemen ardından, karışım hızla buz üzerinde alınarak soğutulmuştur. Bu adımda, hücre zarının tekrar kapanması ve plazmidin hücre içinde hapsolmesi sağlanmıştır. Son olarak, bakteri-plazmid karışımına 900 µl sıvı LB besiyeri eklenerek uygun koşullarda 1 saat inkübe edilmiştir. Bu süreç, hücrelerin plazmidi almasını ve çoğalmasını sağlamaktadır. İnkübasyonun ardından

hücreler plazmide göre uygun antibiyotiği içeren agarlı besiyerlerinde büyütülmüştür. 100 µl bakteri süspansiyonu yayma aparatı yardımı ile katı LB ortamlarına yayılmıştır. Plazmidi taşıyan hücreler, antibiyotiğe dirençli olacak ve seçilecektir.

Çalışmada, kılavuz RNA'ları taşıyan transformasyon vektörlerinin bitkiye aktarılması için *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşu kullanılmıştır. *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ile yapılan mikrobiyal çalışmalar stok hazırlama, hücre çoğaltma, kompetent hücre hazırlama ve transformasyon çalışmalarını kapsamaktadır. *A. tumefaciens* sıvı kültürleri standart Luria broth (LB) besi ortamında çalkalamalı inkübatörde 28 °C ve 225 rpm'de ve koloni geliştirme çalışmaları LB besiyeri ve agarlı petrilere 28 °C koşullarda büyütülmüştür. DH5α'dan farklı olarak *Agrobacterium tumefaciens* EHA105'in sıvı ve katı besiyerlerine, bakterinin kromozomal olarak taşıdığı dayanım olan litreye 25 mg dozunda rifampisin eklenmiştir. Hücrelerin uzun süreli muhafazası için, uygun büyüme koşullarında büyütülen sıvı bakteri kültürler ($OD_{600} = 0,8$), aynı hacimde %40'lık gliserol içeren çözelti ile karıştırılarak -80°C koşullarda saklanmıştır. Stok bakteri çözeltileri 6 aylık periyotlarda canlandırılarak stokları tazelenmiştir. Vektör plazmitlerin *Agrobacterium tumefaciens* EHA105'ya transformasyonun elektroporasyon yöntemi kullanılmıştır. Bunun için öncelikle *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 hücreleri transformasyona uygun, kompetent hale getirilmiştir. Kompetent hücre hazırlığında, ilk olarak -80°C'de saklanan *A. tumefaciens* EHA105 stoğundan bir miktar bakteri örneği alınarak rifampisin içeren sıvı LB ortamında yukarıda belirtilen *Agrobacterium* büyüme koşullarında kültüre alınmıştır. Hücre büyümesini teyit etmek amacıyla hücre kültürü ilk yoğunluk ölçümünün ardından seyreltilerek yeniden inkübasyona bırakılmıştır. OD_{600} değeri 0,8'e ulaşan kültür, 50 ml'lik falkon tüplere paylaştırılmış ve tüpler buza yerleştirilmiştir. 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilen sıvı hücre kültürleri soğutma özellikli santrifüj cihazında 4000 devir/dakika hızında, 10 dakika boyunca santrifüje maruz bırakılmıştır. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant dökülmüş ve pelet soğuk steril saf su ile tekrar çözülmüştür. Ardından hücre kültürleri tekrar 4000 devir/dakika hızında, 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlem altı defa tekrar edilmiştir. Son santrifüj sonrası süpernatant döküldükten sonra peletler 2.5 ml steril soğuk (4°C) saf su ile çözdürülmüş ve tek bir falkon tüpte birleştirilmiştir. Son santrifüj işleminin ardından pelet, 2 ml %15'lik gliserol içeren steril solüsyon ile çözdürülmüş ve steril mikrosantrifüj tüplerine her bir tüpe 100µl olacak şekilde pay edilmiştir. Hücreler -80°C sıcaklıktaki ultra derin dondurucuda saklanmıştır. Canlılık testi için, kompetent hücre stoğundan öze yardımı ile rifampisin içeren katı LB ortamlarında ekilmiştir.

Elektroporasyon yöntemiyle transformasyonda, *Agrobacterium* hücreleri ve genetik materyal, elektroporasyon cihazında bir araya getirilir. Elektrik alanına maruz bırakılan hücre zarları, kısa süreli bir şekilde geçirgen hale gelir. Elektroporasyonun etkisiyle, genetik materyal hücre zarını aşarak bakteri hücresine transfer olur. Hücreler, elektroporasyon sonrası iyileşmeleri için belirli bir süre inkübe edilir. Bu süreç, hücre zarının tekrar normale dönmesine ve genetik materyalin entegrasyonuna olanak tanır. İyileşen hücreler, seçici bir besiyerinde yetiştirilir. Bu besiyerinde, genetik materyali başarıyla transfer eden hücreler antibiyotik gibi belirli bir seçim basamağına sahip olmalıdır. Seçici besiyerde yetiştirilen hücreler, hedef genin varlığını taşıyıp taşıyamama açısından moleküler tekniklerle (PCR, RE kesim reaksiyonları gibi) kontrol edilir. Çalışmada kompetent *A. tumefaciens* EHA105 hücrelerinin elektroporasyon yöntemiyle

transformasyonu ultra derin dondurucuda muhafaza edilen *A. tumefaciens* EHA105-kompetent stokları ve -20°C dondurucuda bulunan bakteri içerisine aktarılabacak ilgili plazmit buz üzerinde çözülmüştür. Etkin bir transformasyon sağlamak amacıyla işlem öncesinde plazmit konsantrasyonu Biodrop cihazı ile ölçülmüştür. Nihai plazmit konsantrasyonu, 80 ng/μl'nin altında olacak şekilde steril saf su ile seyreltilerek ayarlanmıştır. Elektroporasyon işlemi için ilgili plazmitten 1 μl örnek, buz üzerinde çözülen *A. tumefaciens* EHA105 kompetent hücrelere eklenmiştir. Plazmid-bakteri karışımı bir saat boyunca buz üzerinde inkübe edildikten sonra, Bio-Rad® marka 2 mm'lik Gene Pulsar küvetlere aktarılmıştır. Elektroporasyon işlemi 2500 V, 25 μF kapasitans ve 400 ohm direnç ayarlarında, yaklaşık 10 ms süresince gerçekleştirilmiştir. İşlemin ardından hücre duvarlarını iyileştirmek ve transformasyon etkinliği yükseltmek amacıyla küvet içine 900 μl sıvı besiyeri eklenmiş ve küvetten mikropipet yardımıyla 2 ml mikrosantrifüj tüpe aktarılmıştır. Agrobacterium hücre kültürleri 2 saat boyunca 225 dev/dak hızında, 28°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda 100 μl bakteri süspansiyonu uygun antibiyotik içeren agarlı besiyerine steril hücre yayıcı aparat ile yayılmıştır. Katı hücre kültürü, 28°C sıcaklıkta 2 gün boyunca inkübe edilerek koloni gelişimleri değerlendirilmiştir.

3.2.3. Moleküler Çalışmalar

3.2.3.1. MLO ve ALS genlerine özgü sentetik tasarımların sentezlettilmesi, moleküler olarak işlenip, transformasyon vektörlerinin oluşturulması

Biyoinformatik çalışmalar neticesinde belirlenen gRNA'lar, VvMLO (VvMLO6a, VvMLO7, VvMLO9 ve VvMLO11) ve VvALS (VvALS1 ve VvALS2) için ayrı ayrı olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu amaçla VvMLO gRNA'leri için pFGC-pcoCas9 (Addgene #52256), VvALS genleri için ise pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della (Addgene #91694) kullanılmıştır. Transformasyonda kullanılan ikili (binary) vektörlere ait bilgiler Çizelge 3.3.'te yer almaktadır. Her iki sgRNA grubu için, gRNA'ler AtU3 promotörü yürütücülüğünde tek bir transkript olarak tasarlanmıştır. Literatürde belirtilen ile aynı olacak şekilde (her sgRNA bir preRNA sekansı ile ayrılmakta, Xie et al. 2015), tek transkriptin konakçıya ait RNA-işleyici sistem ile işlenmesi ile çok sayıda sgRNA elde edilmesi hedeflenmiştir. Tasarımların önüne ve sonuna klonlama işleminde kullanılmak üzere VvMLO konstrakı için EcoRI ve XbaI, VvALS konstrakı için ise PacI ve SpeI restriksiyon enzimi tanıma sekansları eklenmiştir. Tasarlanan konstraklar Genewiz (Çin) firmasına sentezlettilip, belirtilen transformasyon vektörlerine klonlanmıştır.

Çizelge 3.3. İkili (Binary) vektörlere ait bilgiler

İkili (Binary Vektör)	Büyüdüğü Bakteri Suşu	Bakteriyel Seleksiyonu ve Seleksiyon Kullanım Dozu	Bitki Seleksiyonu	Cas9 Mutasyonu
pFGC-pcoCas9 (Addgene #52256)	DH5α	Kanamisin, 50 μg/mL	Basta (fosfinotrisin)	-
pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della (Addgene #91694)	DH5α	Spectinomisin, 50 μg/mL	Kanamisin	D10A

MLO ve *ALS* grubu genler için tasarlanan gRNA konstrakları bakteriyel seleksiyonu kanamisin olan bir klonlama vektörüne (pUC-kan-wz) klonlanmış halde tarafımıza ulaştırılmıştır. Vektörler ilk olarak çoğaltılarak (DH5 α , standart ısı-şok metodu) ve uygun kit kullanılarak (NEB, Plasmid Purification Kit, MiniPrep) saflaştırılmıştır. Saflaştırılan klonlama vektörleri yukarıda bahsedilen, her vektör için farklı restriksiyon enzimleri kullanılarak Çizelge 3.4'te detayları belirtilen reaksiyonlar ile klonlama vektöründen çıkartılmış ve uygun kit yardımı ile saflaştırılmıştır (NEB, Gel Purification Kit).

Çizelge 3.4. Kullanılan RE kesim reaksiyonlarına ait bilgiler

Reaksiyonun Kurulum Amacı	Reaksiyon Bileşenleri (20 μ l hacim için)	Termal Döngü Cihazında İnkübasyon Sıcaklığı ve Süresi	Beklenen parça uzunlukları (bp)
pUC-kan-wz klonlama vektöründen Vv <i>MLO</i> konstraktının çıkarılması	Tango Buffer 4 μ l EcoRI 1 μ l XbaI 1 μ l Plazmid 10 μ l Su 4 μ l	37°C, 1.5 saat	689 + ana yapı
pUC-kan-wz klonlama vektöründen Vv <i>ALS</i> konstraktının çıkarılması	BamHI Buffer 2 μ l AscI 1 μ l BamHI 1 μ l Plazmid 10 μ l Su 6 μ l	37°C, 1.5 saat	1041 + ana yapı
pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della klonlama vektörünün lineer hale getirilmesi	Tango Buffer 2 μ l AscI 1 μ l BamHI 1 μ l Plazmid 3 μ l Su 13 μ l	37°C, 1.5 saat	786 + 18934 (ana yapı)
pFGC-pcoCas9 klonlama vektörünün lineer hale getirilmesi	Tango Buffer 4 μ l EcoRI 1 μ l XbaI 1 μ l Plazmid 3 μ l Su 11 μ l	37°C, 1.5 saat	32 + 13298 (ana yapı)

Saf hale getirilen lineer gRNA'ler agaroz jel elektroforezi ile doğrulandıktan sonra, Çizelge 3.4'te reaksiyonlar kullanılarak açılmış, laboratuvarımızda önceden stokları bulunan Vv*MLO* için pFGC-pcoCas9 ve Vv*ALS* için pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della transformasyon vektörlerine T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak klonlanmıştır. Ligasyon reaksiyonlarına ait detaylı bilgi Çizelge 3.5'te yer almaktadır. Elde edilen transformasyon vektörleri, PCR, RE kesimi ve sekanslama ile doğrulandıktan sonra farklı *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşuna elektroporasyon (2500V, 25 μ F kapasitans ve 400 ohm) yöntemi ile aktarılmıştır. Bu şekilde hazır hale gelen transformant *Agrobacterium tumefaciens* suşları doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. Tüm moleküler ve mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan yöntemler ilgili enzim, kit veya

kimyasalın üreticisi olan firmanın direktiflerinin harfiyen uygulanması ile yapılmıştır. Kompetent hücreler, OD₆₀₀ 1.0 değerine kadar büyütülen sıvı bakteri kültürlerinin, *E. coli* için CaCl₂, *A. tumefaciens* için saf su ile 4-6 kere yıkanması ile elde edilmiştir.

Çizelge 3.5. *MLO* ve *ALS* genleri için kurulan ligasyon reaksiyonlarına ait bilgiler

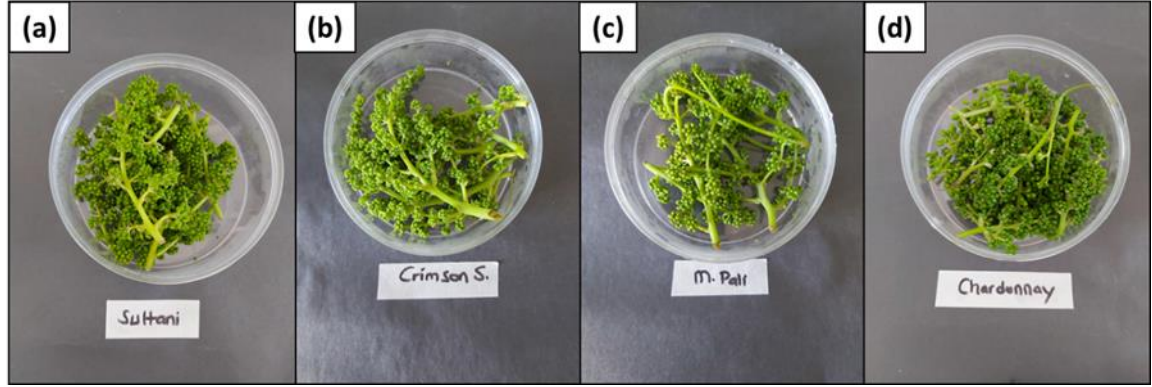
Ligasyon Reaksiyonu	Ligasyon reaksiyonu bileşenleri (20 µl hacim için)	İnkübasyon Koşulları (Sıcaklık ve Süre)
<i>MLO</i> -52256	T4 DNA Ligaz 1 µl T4 Buffer 1 µl 52256 2 µl <i>MLO</i> konstrak 7 µl su 8 µl	16°C, 18 saat
<i>ALS</i> -91694	T4 DNA Ligaz 1 µl T4 Buffer 1 µl 91694 2 µl <i>ALS</i> konstrak 7 µl su 8 µl	16°C, 18 saat

3.2.4. Gen transformasyonu ve doku kültürü çalışmaları

3.2.4.1. Embriyojenik kallusların indüklenmesi ve sürdürülmesi

Agrobacterium aracılı gen transformasyonu ve doku kültürü çalışmalarında Bouquet vd. (2006)'nın temel alındığı bir protokol izlenmiştir. Ayrıca çalışmanın ilk adımı olan embriyojenik kallus indüksiyonu için iki ortam uygulaması çalışmaya entegre edilmiştir. Literatürde asma ve diğer birçok çok yıllık bitki türlerinde benzer bir çalışmaya rastlanmadığından, Veillet vd. (2019) tarafından geçici entegrasyonu yakalamada seleksiyon ajanı olarak kullanılan klorsülfüronun dozları, transgen taşımayan bitkilerin seleksiyonunda uygulanmıştır. Özetle, bu bölümde kullanılan yöntem, Bouquet vd. (2006) ile Veillet vd. (2019)'un modifiye edilmiş bir versiyonunu içermektedir.

Doku kültürü çalışmalarında somatik embriyogenez tekniğine dayalı bir yöntem uygulandığından çalışmadaki ilk hedef embriyojenik kallusların geliştirilmesi olmuştur. Bouquet vd. (2006)'da bildirilen embriyojenik kallus indüksiyon ortamına (PIV) ek olarak Çizelge 3.6'da içerik detayları bildirilen PIV1 ve PIV4 kültür ortamları da çalışmaya dahil edilmiştir. Bunun için, yetiştirilen asmaların aktif vefetatif dönemleri dahilinde somaklarından (Bkz. Şekil 3.4) izole edilen anterleri, yaprak ayası ve yaprak sapları eksplantları kullanılmıştır.

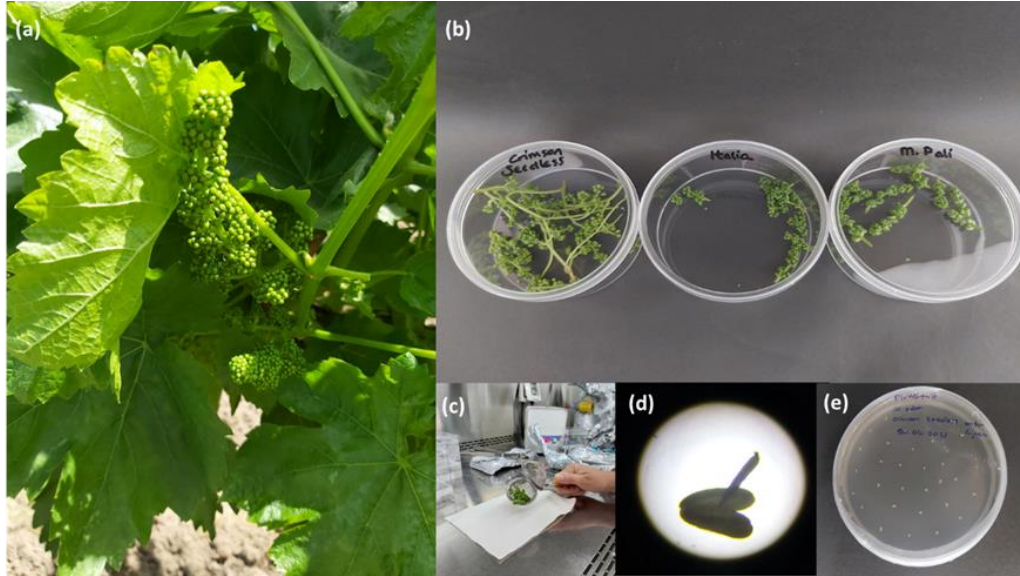


Şekil 3.4. a) Sultani Çekirdeksiz; b) Crimson Seedless; c) Michele Palieri; d) Chardonnay çeşitlerine ait somak görüntüleri

Somaklar, antesisden yaklaşık 10-12 gün önceki dönemdeki, 2-3 mm boyutunda iken toplanmıştır. Sultani Çekirdeksiz, Michele Palieri, Crimson Seedless ve Italia çeşitleri için somaklar, Selçuk Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait seralardan, Chardonnay ve Siyah Kışmış çeşitleri için ise Manisa Bağcılık Enstitüsü Alaşehir İstasyonu'ndan temin edilmiştir. Örnekler, soğuk zincir içerisinde taşınarak laboratuvarımıza ulaştırılmıştır. Kültüre alma işlemleri öncesinde somaklara +4°C'de 72 saat süreyle ön soğuklatma uygulaması yapılmıştır. Bunun için somak yapıları nemli filter kağıtları üzerinde petri kapları içinde ön soğuklatma işlemine tabi tutulmuşlardır. Soğuk uygulamasının ardından somaklar önce %70'lik etanolde 30 saniye bekletilmiş ve ardından %5'lik sodyum hipoklorit ve 1-2 damla Tween20 içeren solüsyonlarda 10 dakika süreyle bekletilerek yüzey sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir. 3 kez steril saf su ile gerçekleştirilen durulamanın ardından, somaklar steril pens ve bistüri yardımıyla açılmış, içerisindeki anterler, özellikle filamentleriyle birlikte çıkartılmasına dikkat edilerek her bir çiçekten izole edilmiş ve Çizelge 3.4'te içerik bilgileri bildirilen embriyojenik kallus başlatma ortamları olan PIV, PIV1 ve PIV4 ortamlarında kültüre alınmışlardır (Şekil 3.5). Anterler embriyojenik kallus başlatma ortamlarında 4 hafta süreyle 28°C karanlık koşullarda muhafaza edilmişlerdir. 1 aylık sürenin ardından anterlerde gelişen sarı-beyaz renkli kalluslar Çizelge 3.6'da içerikleri belirtilmiş embriyojenik kallusların sürdürülme ortamına (C1P) aktarılmıştır. C1P ortamlarında alt kültüre alma işlemleri kırık beyaz renkli ve kırılgan formdaki proembriyojenik kalluslar elde edilene kadar 4 haftada bir 28°C karanlık koşullarda sürdürülmeye devam edilmiştir. Anterler ile yapılan doku kültürü çalışmalarında her bir petriye 30 anter yerleştirilmiş ve her bir uygulama için sayıları 3-15 arasında değişiklik gösteren sayıda kültür hazırlanmıştır. Çalışmada toplam 6000 adet anter eksplantı, embriyojenik kallus tetikleme ortamlarında kültüre alınmıştır. 4-6 hafta sonra anterlerin embriyojenik kallus gelişim tepkileri incelenmiştir. Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan embriyojenik kallus oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır. Embriyojenik kallus tanımlaması, Bouquet vd. (2006)'da belirtilen kırık beyaz ve açık sarı renkte ve kolayca dağılılabilen 'friable' olarak tanımlanan veya Nakajima vd. (2020)'de bildirilen kompakt ve sert yapıdaki kalluslara göre yapılmıştır.

Çizelge 3.6. Embriyojenik kallus indüklemeye ve sürdürmeye için kullanılan kültür ortamlarına ait bilgiler

Besin Ortamının Adı	Temel Besin Ortamı İçerikleri / L	Besin Ortamında Bulunan Hormon İçerikleri / L
PIV	60 g sukroz 4.3 g MS bazal tuz Vitamin B5 5 ml Fe-EDTA 7 g agar	4.5 μ M 2,4-D 8.9 μ M BAP
PIV1	60 g sukroz 4.3 g MS bazal tuz Vitamin B5 5 ml Fe-EDTA 7 g agar	5.4 μ M pCPA 17.8 μ M BAP
PIV4	60 g sukroz 4.3 g MS basal salt Vitamin B5 5 ml Fe-EDTA 7 g agar	10.7 μ M NAA 8.8 μ M BAP
C1P	30 g sukroz 2.15 g MS bazal tuz 1 g kazein Vitamin T Amino asit karışımı 7 g agar	5 μ M 2,4-D 1 μ M BAP



Şekil 3.5. **a)** Kültüre alınan somak yapıları; **b)** Crimson Seedless, Michele Palieri ve Italia çeşitlerinin somakları; **c)** Somaklara uygulanan sterilizasyon işleminden bir görüntü; **d)** Italia çeşidine ait bir anterin filament yapısıyla birlikte mikroskop altında çekilmiş bir görüntüsü; **e)** Embriyojenik kültür başlatma ortamına alınmış anterler

Yaprak ayası ve yaprak sapı kültürleri için vivo koşullarda yetiştiriciliği yapılan asma çeşitlerinden aktif vejetasyon döneminin başladığı 2021 Nisan ayı itibarıyla sürgünlerin en uç kısmındaki ilk 5 yaprağın ayası ve yaprak sapları kullanılmıştır. Bitkiden izole edilen yaprak ayası ve sapları saf su içerisinde ve hızlı bir şekilde laboratuvarımıza getirilerek sterilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada yaprak ayaları ve sapları öncelikle 1 dk boyunca %70'lik etanolde bekletilmiş ardından yaprak ayaları %12.5'lik ve yaprak sapları %15'lik sodyum hipoklorit ve 1-2 damla Tween20 içeren solüsyonlarda bekletilerek sterilizasyonları yapılmıştır. 3 kez steril saf su ile durulanan yaprak ayaları 1 cm² ve yaprak sapları 1 cm boyutlarında kesilerek Çizelge 3.6'da detayları belirtilen embriyojenik kallus başlatma ortamlarında kültüre alınmışlardır. Kültürler 4 hafta süreyle 28°C karanlık koşullarda inkübe edilmişlerdir. 4 haftanın sonunda gelişen kalluslar Çizelge 3.6'da içeriği belirtilen embriyojenik kallusların sürdürülme (C1P) ortamına aktarılmışlardır. C1P ortamında, proembriyojenik kallus yapılarının gelişimini gözlemlemek amacıyla dört haftada bir olmak üzere, yaklaşık üç kez alt kültüre alma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Asma çeşitlerine ait yaprak ayalarının ekimi her bir petri kabına (90 x 17 mm) 16 eksplant olacak şekilde ve her uygulama için 15 petri olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Yaprak sapları ise her bir çeşitten 12 eksplant ve her uygulama için 6 tekrarlı olarak kültüre alınmıştır. Toplamda 3600 yaprak ayası ve 1080 yaprak sapı eksplantı, embriyojenik kallus tetikleme ortamlarında kültüre alınmıştır. Uygulamalar Siyah Kışmı çeşidi dışında serada yetiştiriciliği yapılan çeşitler üzerinde yapılmıştır. 4-6 hafta sonra yaprak ayası ve yaprak sapı eksplantlarının embriyojenik kallus gelişim tepkileri incelenmiştir. Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan embriyojenik kallus oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır. Embriyojenik kallus tanımlaması, Bouquet vd. (2006)'da belirtilen kırık beyaz ve açık sarı renkte ve kolayca dağılabilen 'friable' olarak tanımlanan veya Nakajima vd. (2020)'de bildirilen kompakt ve sert yapıdaki kalluslara göre yapılmıştır.

3.2.4.2. Seleksiyon dozlarının belirlenmesi (Kill-curve testleri)

Transformasyon vektörlerinden *MLO* genlerine ait tasarımları taşıyan ve bitki seleksiyon ajanı Basta dayanımı olan 52256 kodlu plazmid için farklı dozlarda fosfinotrisin dozları hazırlanmıştır. Bunun için vitaminli MS ve 30 gram sukroz içeren besin ortamlarına 2, 4, 5, 6, 8 ve 10 mg/L dozları eklenerek ortamlar hazırlanmış ve Italia çeşidine ait embriyojenik kalluslar hazırlanan bu besin ortamlarına 4'er eşit parça şeklinde yerleştirilmiştir. Her bir uygulamadan 2'şer petri 2 tekerrürlü olarak hazırlanmıştır, petriler 28°C karanlık koşullarda inkübe edilmişlerdir. Çalışmada gözlenebilir veriler elde edebilmek için özellikle açık renkli kalluslar tercih edilmiştir. Veillet vd. (2019)'da bildirilen 10 günlük sürenin ardından kallusların fosfinotrisine verdikleri tepkiler kaydedilmiştir.

Transformasyon vektörlerinden *ALS* genlerine ait tasarımları taşıyan ve bitki seleksiyon ajanı kanamisin dayanımı olan 91694 kodlu plazmid için farklı dozlarda kanamisin dozları hazırlanmıştır. Bunun için vitaminli MS ve 30 gram sukroz içeren besin ortamlarına 50, 100, 150, 200 mg/L dozları eklenerek 4 grup ortam hazırlanmış ve Sultani Çekirdeksiz çeşidine ait embriyojenik kalluslar, hazırlanan bu besin ortamlarına 4'er eşit parça olacak şekilde yerleştirilmiştir. Her bir uygulamadan 2'şer petri 2 tekerrürlü olarak hazırlanmış, 28°C karanlık koşullarda 2 hafta süreyle bekletilmişlerdir. Çalışmada gözlenebilir veriler elde edebilmek için özellikle açık renkli kalluslar tercih edilmiştir.

Veillet vd. (2019)'da bildirilen 10 günlük sürenin ardından kallusların kanamisine verdikleri tepkiler kaydedilmiştir.

Klorsülfüron doz denemesi çalışmalarında, Veillet vd. (2019) ve Veillet vd. (2020)'de bildirilen 40 ng/ml ve 30 ng/ml oranları temel alınarak oranlar oluşturulmuştur. Bunun için vitaminli MS ve 30 g/L sukroz içeren katı besin ortamları (pH 5.8) hazırlanmış, otoklavlandıktan sonra ortamlar gruplarına filtre sterilizasyonundan geçirilmiş 20, 30, 40, 50 ng/ml dozlarında klorsülfüron eklenmiştir. Italia embriyojenik kallusları 4'er eşit parça olarak ortamlara alınmış ve 28°C karanlık koşullarda 10 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Her bir doz uygulaması için 2'şer petri 2 tekerrürlü olarak hazırlanmış ve 10 gün sonra eksplantların klorsülfürona verdikleri tepkiler gözlenmiştir.

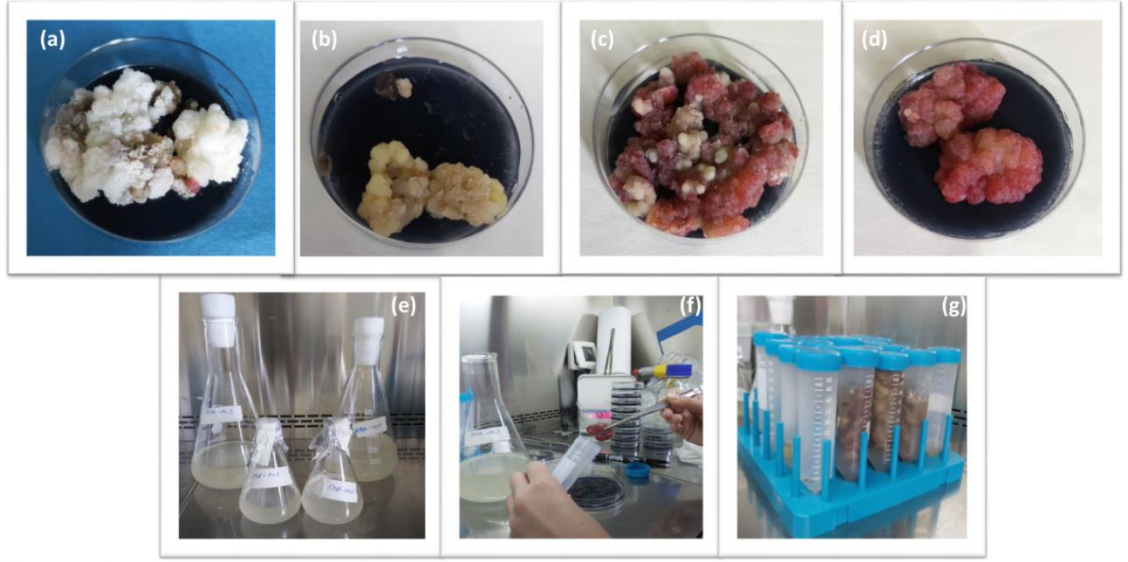
3.2.4.3. Embriyojenik kalluslara *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı çalışmaları

Embriyojenik kallusların başlatılması (PIV, PIV1 ve PIV4 ortamları) ve sürdürülmesini (C1P) takiben gelişen kalluslar *Agrobacterium tumefaciens* ile transformasyondan 4 hafta önce GS1CA kodlu ortamlara aktarılmıştır. MLO ve ALS genlerine ait transformasyon vektörlerini taşıyan EHA105 suşları, kalluslara transformasyondan 1 gün önce - 80°C'de daha önceden muhafaza edilmiş stoklarından alınarak 28° 225 rpm'de 1 gece boyunca büyütülmüş, ertesi gün OD₆₀₀ 0,6 olacak şekilde Çizelge 3.7'de ortam içerikleri belirtilen LCM ko-kültür sıvı ortamıyla seyreltilerek GS1CA ortamlarındaki kalluslarla buluşturulmuşlardır (Şekil 3.6). OD₆₀₀ okuma değerleri 0,6 olarak ayarlanmış her iki transformasyon vektörünü taşıyan *Agrobacterium* bakterilerinden 1:1 oranında bir süspansiyon hazırlanarak transformasyon gerçekleştirilmiştir. 30 dakika bakteri süspansiyonuna maruz bırakılan kalluslar, Çizelge 3.7'de yer alan katı ko-kültür (CM) ortamlarında 22°C karanlık koşullarda 2 gün inkübe edilmiş ve ardından Sel1 ortamlarına aktarılmışlardır. Bu işlemde 10 gün sonra kültürler geçici entegrasyonu yakalayabilmek adına kalluslardan fosfinotrisin ve kanamisin seleksiyonu kaldırılarak klorsülfüron içeren Sel2 seleksiyon ortamlarına aktarılmıştır. Kalluslar 28°C karanlık koşullarda inkübe edilmişlerdir. Sel2 ortamındaki kalluslar 2-3 kez 4 haftada bir olmak suretiyle Sel2 ortamlarında alt kültüre alındıktan sonra embriyoların gelişimi için timentin içeren MG1 ve MG2 ortamlarına aktarılmışlardır.

Güçlü sürgün ve kök oluşturan *in vitro* asmalar, içerisinde 1:1:1 oranında steril torf, perlit, vermikülit bulunduran küçük saksılara aktarılmış ve üstlerine plastik kaplar örtülerek 25°C, 16/8 fotoperiyod ve 7000 lux ışık intensitesine sahip iklim odasında aklimatize edilmiştir. Birkaç haftalık adaptasyonun ardından bitkiler 1:1:1 oranında steril torf, perlit, vermikülit karışımı bulunduran daha büyük saksılara transfer edilmiş ve yetiştiriciliğine sera koşullarında devam edilmiştir.

3.2.4.4. Geçici ve stabil entegrasyonun sağlandığı bitkilerin belirlenmesi

Gelişen bitkilerden DNA izolasyonları gerçekleştirilerek Çizelge 3.2'de sekans bilgileri paylaşılan primer çiftleri ile PCR reaksiyonları koşulmuştur. Bant taşıyan ve taşımayan bitkiler belirlenmiştir. Her iki profilin de mutasyon taşıma durumları Sanger sekanslama yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.6. a) GS1CA ortamındaki Michele Palieri anterlerinden gelişen kalluslar; **b)** GS1CA ortamındaki Chardonnay yapraklarından gelişen kalluslar; **c)** GS1CA ortamındaki Michele Palieri yapraklarından gelişen kalluslar; **d)** GS1CA ortamındaki Michele Palieri yapraklarından gelişen kalluslar; **e)** LCM ortamı ile seyreltilmiş *Agrobacterium tumefaciens* solüsyonları; **f)** Kallusların 50 ml’lik steril falkon tüplere yerleştirilmesi; **g)** Bakteri solüsyonu içindeki kalluslar

Çizelge 3.7. Embriyojenik kallusların aktarıldığı farklı ortamlar ve içerikleri

Besin Ortamının Adı	Besin Ortamı İçerikleri / L	Besin Ortamında Bulunan Hormon ve Diğer İçerikler / L
GS1CA (somatik embriyoların uyarılma ortamı)	60 g sukroz 2,15 g MS bazal tuzlar Vitamin B5 5 ml Fe-EDTA 2,5 g aktif karbon 7 g agar	10 µM NAA 20 µM IAA 1 µM BAP
LCM (Sıvı ko-kültür ortamı)	60 g sukroz 2,15 g MS bazal tuzlar Vitamin B5 5 ml Fe-EDTA	200 mM asetosiringon
CM (katı ko-kültür ortamı)	60 g sukroz 2,15 g MS Vitamin B5 5 ml Fe-EDTA 2,5 g aktif karbon 7 g agar	10 µM NAA 20 µM IAA 1 µM BAP 200 mM asetosiringon
Sel1	60 g sukroz 4,3 g MS bazal tuzlar Vitamin B5 5 ml Fe-EDTA 2,5 g aktif karbon 7 g agar	10 µM NAA 20 µM IAA 1 µM BAP 50 mg/L kanamisin 2 mg/L fosfinotrisin 200 mg/L timentin
Sel2	60 g sukroz 4,3 g MS bazal tuzlar Vitamin B5 5 ml Fe-EDTA 2,5 g aktif karbon 7 g agar	10 µM NAA 20 µM IAA 1 µM BAP 0,03 mg klorsülfüron 200 mg/L timentin
MG1	30 g sukroz 4,4 g vitaminli MS 5 ml Fe-EDT 7 g agar	0,03 mg klorsülfüron 200 mg/L timentin
MG2	30 g sukroz 4,4 g vitaminli MS 5 ml Fe-EDTA 7 g agar	0,03 mg klorsülfüron 200 mg/L timentin

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Biyoinformatik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

Bu bölümde *MLO* ve *ALS* genleri ile ilgili yapılan biyoinformatik araştırmalar sonucunda elde edilen bulgulara değinilmiştir.

4.1.2. *MLO* genleri ile ilgili yapılan biyoinformatik çalışmalardan elde edilen bulgular

MLO ile ilgili yapılan biyoinformatik araştırmaların sonuçları bu bölümdeki temel odak noktasını oluşturmaktadır. Bunun için öncelikle, asmada külleme hassasiyeti ile ilişkili 4 *MLO* geninin (*MLO6a*, *MLO7*, *MLO9*, *MLO11*) genomda yerleri biyoinformatik yöntemler ile belirlenmiştir. Çalışmada *MLO* genleri ve proteinlerine ait sekansların elde edilmesinde çeşitli veri tabanlarından faydalanılmıştır. Susturulması planlanan 4 *MLO* genine ait gen ve protein sekansları NCBI veri tabanından çekilmiştir. National Center for Biotechnology Information Gene, NCBI ve EnsemblPlants veri tabanlarından elde edilen *MLO* genlerine ait bilgiler Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. CRISPR-Cas9 sistemi ile susturulması planlanan *MLO* genlerine ait tanımlayıcı bilgiler

Gen *	Alternatif Gen Adı **	Alternatif Gen Adı ***	NCBI Protein ID	Bulunduğu Kromozom	Ekson Sayısı	Protein Büyüklüğü (aa)
VvMLO6a	VvMLO4	VvMLO13	XP_019076323.1	6	14	587
VvMLO7	VvMLO17	VvMLO7	NP_001268008	13	15	539
VvMLO9	VvMLO9	VvMLO8	XP_010656958.1	12	15	548
VvMLO11	VvMLO3	VvMLO11	NP_001268013.1	8	15	583

* Çalışmada kullanılan isimlendirme

** Feechan vd. (2008) tarafından kullanılan isimlendirme

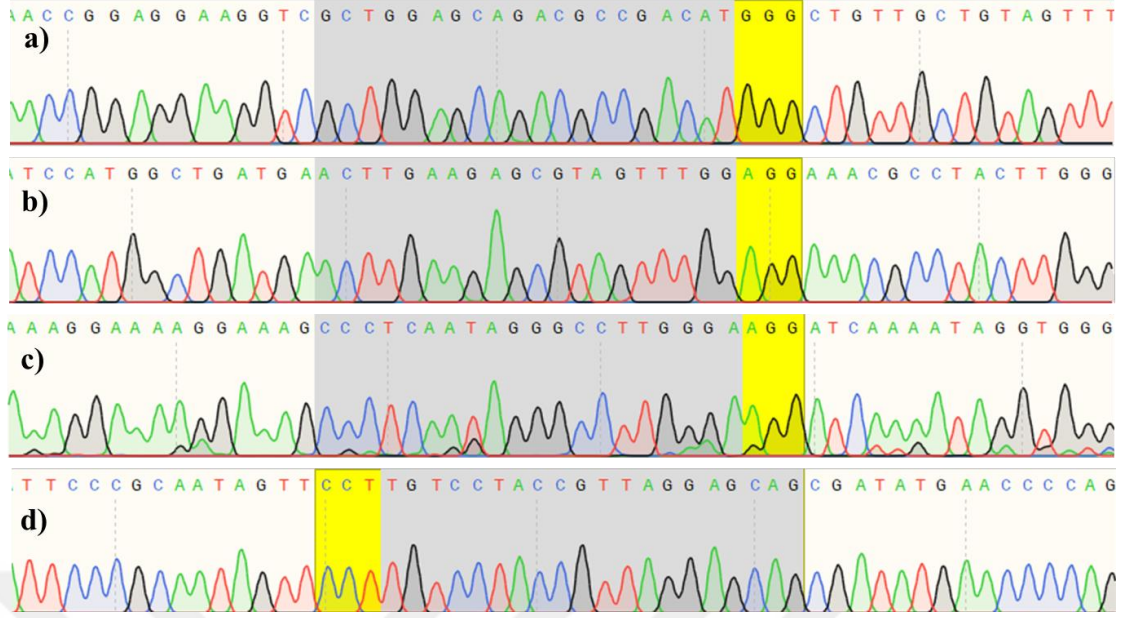
*** Winterhagen vd. (2008) tarafından kullanılan isimlendirme

Sekans bilgileri, Feechan vd. (2008)’nin külleme hassasiyeti ile ilişkilendirdiği *MLO* genleri (VvMLO3 (11), VvMLO4 (6a), VvMLO9, VvMLO17(7)) ile kıyaslanarak benzerlikleri teyit edilmiştir. Ayrıca Arabidopsis’te külleme hassasiyeti ile ilişkili AtMLO2, AtMLO6 ve AtMLO12 protein sekansları ile Genius Prime programı aracılığı ile asmadaki *MLO* gen üyeleri hizalanması sonucu elde edilen soyağacı şeması Şekil 4.1’de sunulmuştur. Buna göre AtMLO2, AtMLO6 ve AtMLO12’nin sırasıyla VvMLO11, VvMLO6a ve VvMLO7 ile ortolog olduğu teyit edilmiştir (Wan vd. 2020).

Çizelge 4.2. *MLO* genleri için kullanılacak gRNA'lere ait sekans bilgileri ve çeşitli performans değerleri

gRNA	Sekans Bilgisi	12mer off-target	20mer off-target	GC%	Bulundurduğu Kesim Bölgesi	Bulunduğu Ekson No
VvMLO6a	GCTGGAGCAGACGCCGACATGGG	1	1	65	BsaHI	1
VvMLO7	ACTTGAAGAGCGTAGTTTGGAGG	1	1	45	-	1
VvMLO9	CCCTCAATAGGGCCTTGGAAGG	1	1	55	-	2
VvMLO11	CCTTGTCTACCGTTAGGAGCAG	1	1	55	-	3

MLO genlerinin çeşitli veri tabanlarında farklı isimlendirme ve minimal farklılık gösteren amino asit dizilimlerine sahip olmalarının tespit edilmesi neticesinde tasarlanan gRNA'ların sekanslarının çalışmada kullanılan materyallerin genomdaki varlıklarını doğrulamak amacıyla ek kontroller gerçekleştirilmiştir. Susturulması planlanan genler, Çizelge 3.2'de sekans bilgileri bildirilen primer çiftlerinden Forward olanlar ile tek yönlü (forward) olarak Sanger yöntemi ile sekanslatılmıştır. gRNA'lar VvMLO6a, VvMLO7, VvMLO9 ve VvMLO11'nin varlıkları çalışma materyalleri Sultani Çekirdeksiz, Siyah Kışmış, Italia, Crimson Seedless, Michele Palieri ve Chardonnay çeşitlerinde doğrulanmıştır. Çalışmada rejenerasyon başarısı Siyah Kışmış'ten elde edildiğinden, bu çeşide ait kromotogram bilgileri Şekil 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.2. Siyah Kışmış çeşidinde kılavuz RNA'lar VvMLO6a, VvMLO7, VvMLO9, VvMLO11'e ait Sanger sekanslama sonucu elde edilmiş kromatogramlar; **a)** VvMLO6a'ya ait olan kromatogram; **b)** VvMLO7'ye ait olan kromatogram; **c)** VvMLO9'a ait olan kromatogram; **d)** VvMLO11'e ait olan kromatogram. Her dört şekilde de gri ile işaretli alan kılavuz RNA sekansını, sarı ile işaretli alan ise PAM sekansını ifade etmektedir

4.1.3. ALS genleri ile ilgili yapılan biyoinformatik çalışmalardan elde edilen bulgular

Baz düzenleme çalışmalarında kullanılan VvALS1 ve VvALS2 genlerine ait bilgiler NCBI veri tabanından çekilmiştir. Önceki bölümlerde açıklandığı üzere, Prolin197Serine mutasyonu (domates ve patatesten ALS1'deki Prolin 186'ya karşılık gelen *Arabidopsis thaliana* sekansına göre belirtilmiştir), ALS inhibitörlerinden klorosülfürona karşı direnç sağlayan mutasyonlardan biridir (Veillet vd. 2019). Domatese ait ALS1 (SlALS1) ve ALS2 (SlALS2) genleri ile asma VvALS1 ve VvALS2 genlerini tanımlayıcı bilgiler Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Domates ve asma *ALS1* ve *ALS2* genlerine ait sekans ve diğer bazı tanımlayıcı bilgiler

ALS Geni	NCBI Gen ID	Bulunduğu Kromozom	Ekson Sayısı	Protein Büklüğü (aa)	Nokta Mutasyonu Bölgesi
<i>SIALS1</i>	101247891	3	1	659	Proline 186 rezidü
<i>SIALS2</i>	101254112	7	1	657	Proline 184 rezidü
<i>VvALS1</i>	NC_012020.3	14	1	547	Proline 74 rezidü
<i>VvALS2</i>	NC_012022.3	16	1	656	Proline 175 rezidü

Yapılan biyoinformatik çalışmalar ile domatese ait *ALS1* ve *ALS2* genleri ve BLAST programı kullanılarak, asmaya ait (*V. vinifera*) *ALS1* ve *ALS2* genleri tespit edilmiş ve ClustalO programı kullanılarak iki bitkinin sahip olduğu *ALS* genleri hizalanmıştır. Hizalamalarda Prolin197'ye karşılık gelen bölge hedeflenerek nokta mutasyonları oluşturulması planlanmıştır. Yapılan hizalamadan elde edilen sonuçlar Şekil 4.3'te sunulmuştur.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment		
VvALS2	ALARSSMIRNVLP ¹ RHEQGGIFAADGYARASGRPGVCLTSSGPGATNIIISGIADANFDSIP	166
SIALS1	ALTRSNIIIRNVLP ¹ RHEQGGVFAAEGYARATGFPGVCIATSGPGATNLVSLDALDLSIP	177
SIALS2	ALTRSNIIIRNVLP ¹ RHEQGGVFAAEGYARATGFPGVCIATSGPGATNLVSLDALDLSIP	175
VvALS1	ALTRSNIIIRNVLP ¹ RHEQGGVFAAEGYARASGRPGVCIATSGPGATNLVSLDALDLSIP	65
	::*::*****:*:*:*:*:*:*::*****:*:*:*:*:	
VvALS2	IVAITGQVPRGLMGTDAFQEVLIDITRPITKFNHVLVDVEDIPTVKEAFLATSGRPG	226
SIALS1	IVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVMDEVIDPVRWEAFFLA ² KSGRPG	237
SIALS2	IVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVMDEVIDPVRWEAFFLA ² KSGRPG	235
VvALS1	IVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVDVEDIPTVKEAFLATSGRPG	125
	*****::*****:*:*:*:*:*:*::*****:*:*:*:*:	
VvALS2	PVLIDSIDIQELVVPNNMKPIMLPGNASRLPKLPEKAHLEIIVRLISVS ³ KRPVVYAGG	286
SIALS1	PVLIDVPKDIIQQQLVIPNMWDQPMRLPGYSRLPKLPNEMLLEQIVRLISESKKPVLVYVG	297
SIALS2	PVLIDVPKDIIQQQLVIPNMWDQPMRLPGYSRLPKLPNEMLLEQIVRLISESKKPVLVYVG	295
VvALS1	PVLIDVPKDIIQQQLVVPNNMKGLQPGYTFRLPKSPKAHLEQIVRLISESKRPVLVYVG	185
	*****:*:*:*:*:*:*::~*****:*:*:*:*:	

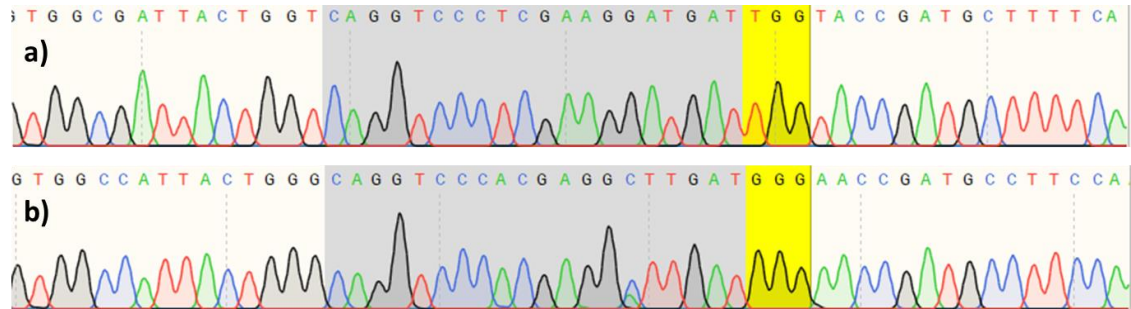
Şekil 4.3. *SIALS1*, *SIALS2*, *VvALS1* ve *VvALS2* proteinlerinin Clustal Omega programı ile çoklu sekans hizalama görüntüsü. Kırmızı dikdörtgen içine alınmış bölgeler nokta mutasyonu sonucu klorsülfüron direnci sağlayan P (Proline) rezidüleri temsil etmektedir.

Çalışmada nokta mutasyonu oluşturulmak istenen asma *ALS1* ve *ALS2* genlerindeki sırasıyla P74 ve P175 rezidüleri hedefleyecek kılavuz RNA'lar, CRISPRdirect programı ile tasarlanmıştır. gRNA'lara ait sekans ve operasyonel parametreler Çizelge 4.4'te yer almaktadır.

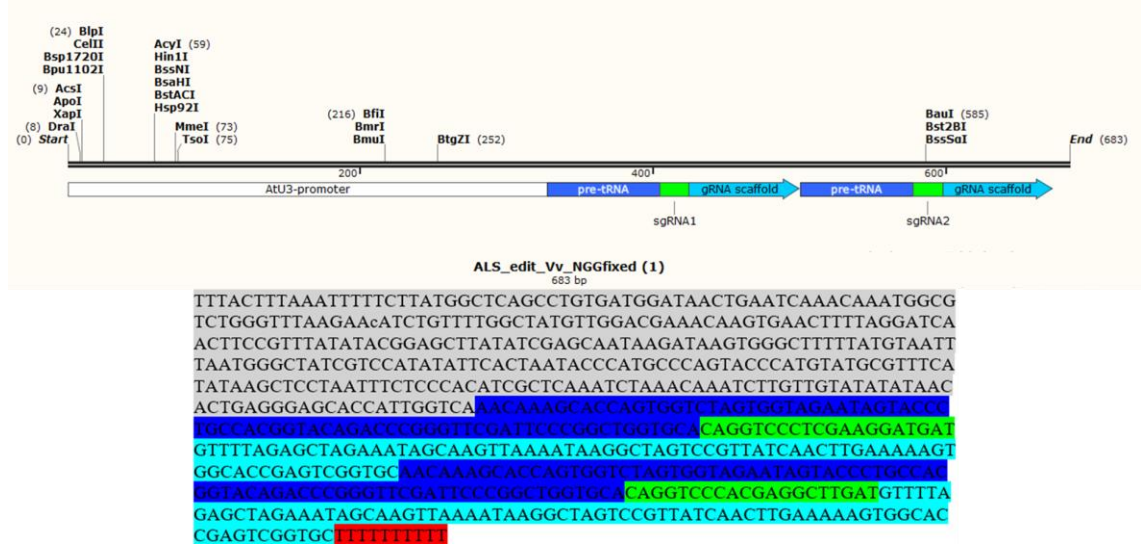
Çizelge 4.4. Hedeflenen *ALS* genleri için kullanılan gRNA'lara ait sekans bilgileri ve çeşitli performans değerleri

gRNA	Sekans Bilgisi	12mer off-target	20mer off-target	GC%	Bulundurduğu Kesim Bölgesi	Bulunduğu Ekson No
VvALS1	CAGGTCCCTCGAAGGATGATTGG	4	1	55	-	1
VvALS2	CAGGTCCCACGAGGCTTGATGGG	7	5	60	-	1

VvALS1 ve VvALS2 genlerinde yapılması planlanan baz düzenlemesi için özel olarak tasarlanmış gRNA'ların doğrulama çalışmaları, Sultani Çekirdeksiz, Siyah Kışmış, Italia, Crimson Seedless, Michele Palieri ve Chardonnay çeşitlerinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, gRNA bölgeleri, Çizelge 3.2'de sekans bilgileri belirtilen primer çiftleri ile PCR ile çoğaltılmış ve ardından Çizelge 3.2'deki forward primerler kullanılarak tek yönlü (forward) olarak Sanger yöntemi ile sekanslatırılmıştır. gRNA'lar VvALS1 ve VvALS2'nin varlıkları çalışma materyalleri Sultani Çekirdeksiz, Siyah Kışmış, Italia, Crimson Seedless, Michele Palieri ve Chardonnay çeşitlerinde doğrulanmıştır. Çalışmada rejenerasyon başarısı Siyah Kışmış'ten elde edildiğinden, bu çeşide ait kromotogram bilgileri Şekil 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4.4. Siyah Kışmış çeşidinde kılavuz RNA'lar VvALS1 ve VvALS2'ye ait Sanger sekanslama sonucu elde edilmiş kromatogramlar; **a)** VvALS1'e ait olan kromatogram; **b)** VvALS2'ye ait olan kromatogram (Her iki şekilde de gri ile işaretli alan kılavuz RNA sekansını, sarı ile işaretli alan ise PAM sekansını ifade etmektedir)

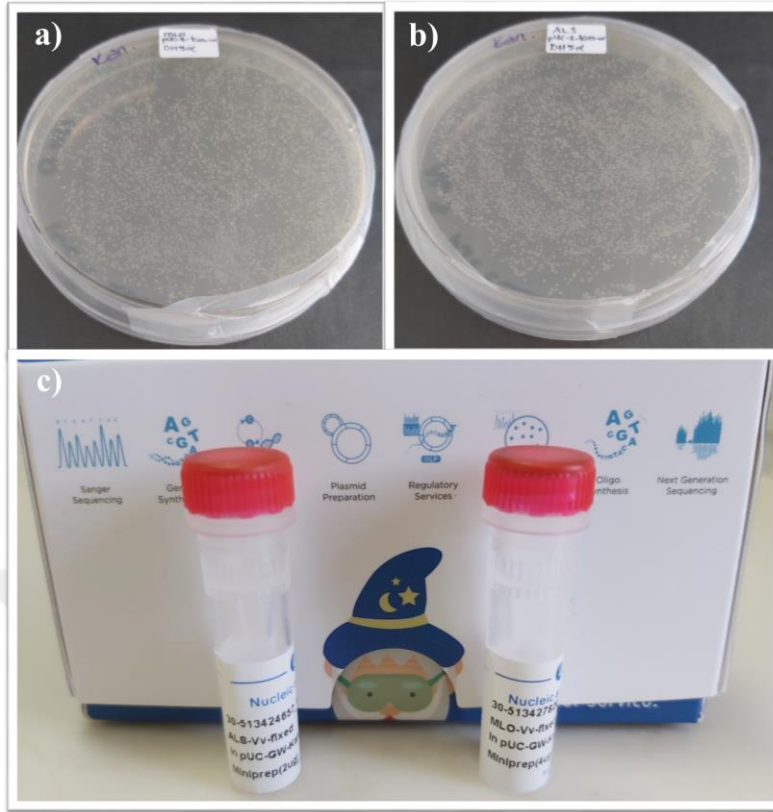


Şekil 4.6. ALS genlerine yönelik tasarlanan gRNA konstraklarının SnapGene yazılımında oluşturulmuş görselleri (Gri: AtU3 promotör, Mavi: pre-tRNA, Yeşil: gRNA, Turkuaz: gRNA iskeleti, Kırmızı: PolyA Tail sekanslarını göstermektedir)

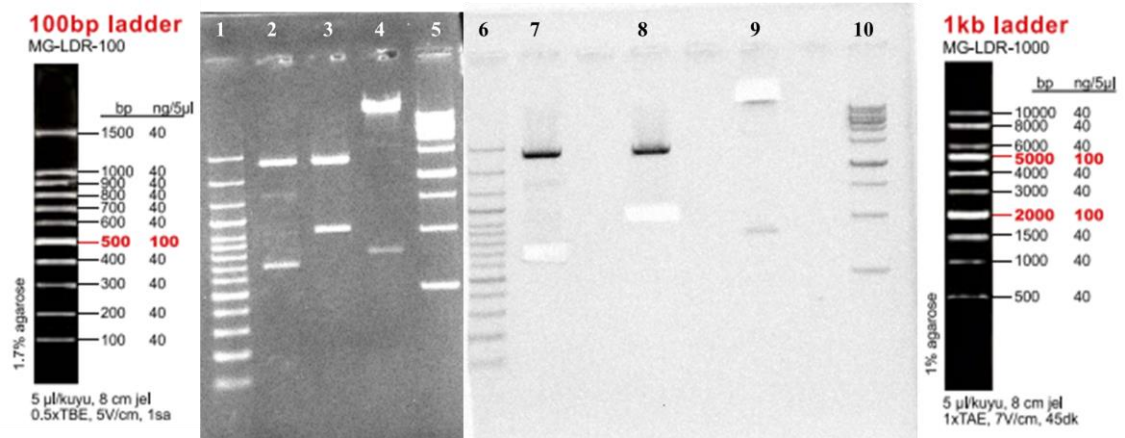
Tasarlanan gRNA konstrakları Genewiz (Çin) firmasına sentezlettilmiştir. Mayıs 2021’de, sentezlenen Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’daki tasarımlar, pUC-kan-wz isimli klonlama vektörüne klonlanmış halde liyofilize şekilde laboratuvarımıza ulaştırılmıştır (Bkz. Şekil 4.7c).

Vektörler ilk olarak 50 mg/L kanamisin içeren katı LB ortamlarında çoğaltılarak (*E.coli* DH5α, standart heat-shock metodu) ve uygun kit kullanılarak (NEB Plasmid Purification Kit, MiniPrep) saflaştırılmış ve gerekli stoklar elde edilmiştir (Şekil 4.7).

Saflaştırılan MLO genlerine ait gRNA tasarımlarını taşıyan pUC-kan-wz vektörü EcoRI ve XbaI, ALS genlerine ait tasarımlar ise AscI ve BamHI restriksiyon enzimleri kullanılarak klonlama vektöründen çıkartılmış ve uygun kit (Monarch® Gel Extraction Kit) yardımı ile saflaştırılmıştır (Şekil 4.8).



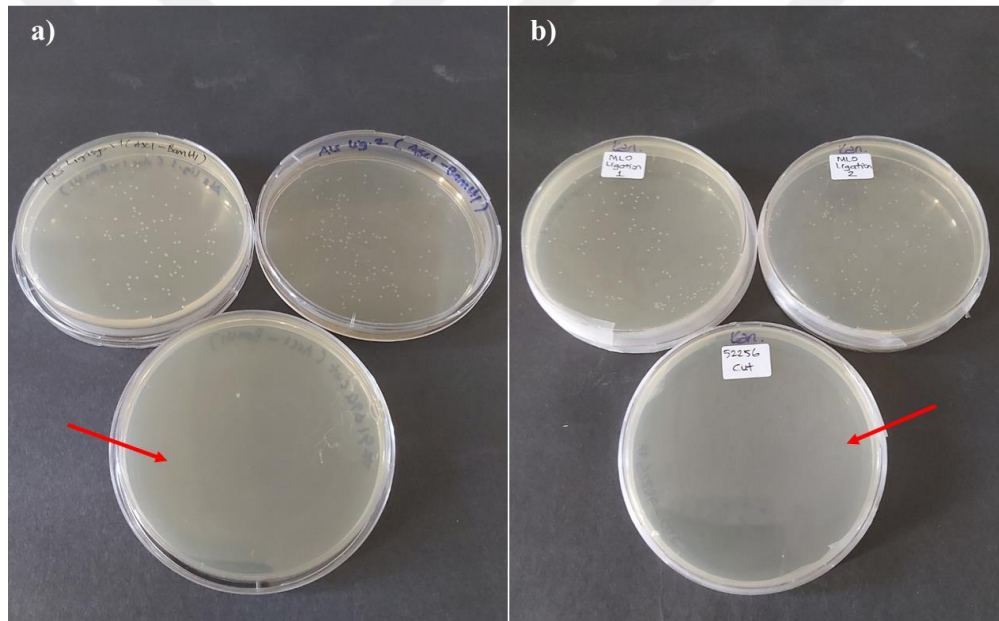
Şekil 4.7. a) MLO; b) ALS genlerine yönelik tasarlanan konstraktları taşıyan pUC-kan-wz vektörünün *E.coli* DH5α'ya transformasyonu sonrası (standart heat shock metodu) elde edilen bakteri kolonileri; c) Liyofilize şekilde laboratuvara gelen gRNA konstraklarını taşıyan tüpler



Şekil 4.8. MLO, ALS konstraktları ve klonlama vektörü 91694'ün restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra %0.8 (kütlece) agaroz ve %0.005 etidyum bromür içeren jelde 100V potansiyel farkla 1 saat yürütüldükten sonraki görüntüsü (solda) ve beklenen parçaların UV ışık altında jelden kesildikten sonraki jelin son görüntüsü (sağda). 1. ve 6. kuyucuklarda Hibrigen© 100bp, 5. ve 10. kuyucuklarda Hibrigen© 1kb referans markörü bulunmaktadır. 2. kuyucukta MLO konstrakına ait kesilen parçalar, 3. kuyucukta ALS

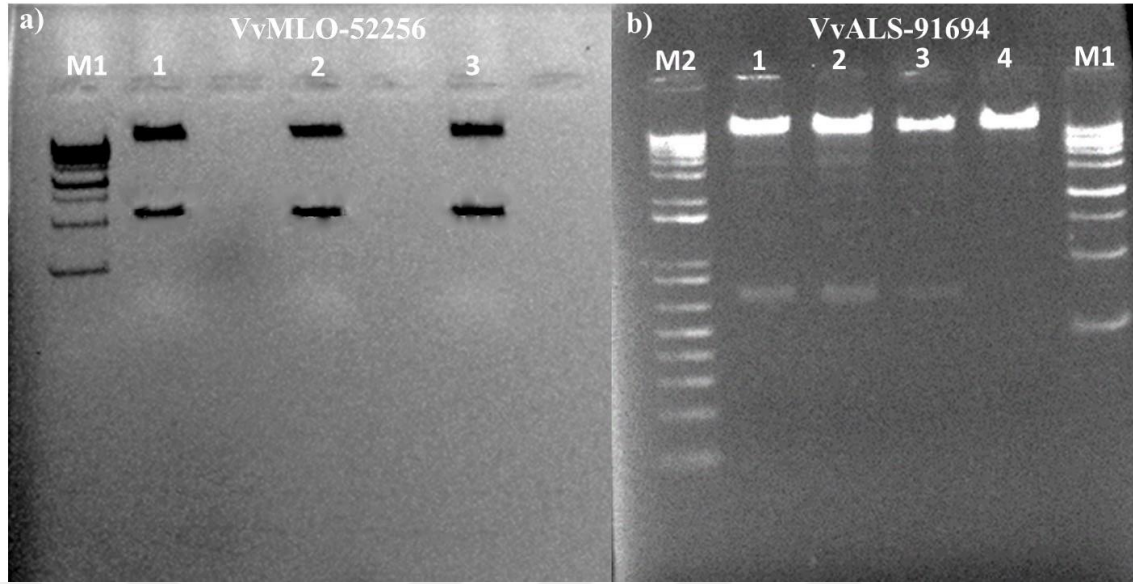
konsrakına ait kesilen parçalar, 4. kuyucukta pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della (Addgene #91694)'ya ait kesilen parçalardan görüntüler

Saf hale getirilen lineer gRNA'ler agaroz jel elektroforezi ile doğrulandıktan sonra, aynı enzim çiftlerinin kullanılarak açıldığı, VvMLO için pFGC-pcoCas9 (Addgene #52256); VvALS için pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della (Addgene #91694) transformasyon vektörlerine T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak klonlanmıştır. Ligasyon ürünlerinin *E.coli* DH5 α 'ya transformasyonu sonrası (standart heat shock metodu), ürünler VvMLO-52256 için 50 mg/L kanamisin; VvALS-91694 için 100 mg/L spektinomisin içeren agarlı LB besi ortamlarına inoküle edilmiştir. VvMLO-52256 ve VvALS-91694'den elde edilen koloniler Şekil 4.9'da sunulmuştur. Ayrıca kontrol amaçlı pFGC-pcoCas9 ve pDicAID_nCas9-PmCDA_NptII_Della'nın ilgili enzimlerle kesilmiş ürünlerinin de *E.coli* DH5 α 'ya transformasyonu (standart heat shock metodu) gerçekleştirilerek kesim etkinliği kontrol edilmiştir. Sonuç olarak, beklendiği gibi ısı-şok ile transformasyonu yapılan lineer formdaki vektör plazmidlerden koloni gelişmediği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.9a ve 4.9b'de yer alan kırmızı okla işaret edilen petriler).



Şekil 4.9. a) Ligasyon ürünlerinin ve lineer vektör plazmitlerin *E.coli* DH5 α 'ya transformasyonu sonrası (standart heat shock metodu) elde edilen VvMLO-52256; **b)** VvALS-91694'ye ait katı hücre kültürleri.

VvMLO-52256 ve VvALS-91694 transformasyon vektörlerini taşıdığı varsayılan kolonilerden 3'er adet seçilerek sıvı LB ortamlarında büyütülmüştür. Daha sonra gelişen sıvı kültürlerden transformasyon vektörleri uygun kit yardımıyla (NEB Plasmid Purification Kit, MiniPrep) izole edilmiş ve gerekli stoklar elde edilmiştir. VvMLO-52256 ve VvALS-91694 transformasyon vektörleri son bir teyit için RE kesimi ile yeniden doğrulanmıştır. VvMLO-52256 EcoRI ve XbaI; ve VvALS-91694 AscI ve BamHI restriksiyon enzimi çiftleriyle kesilmiştir. Beklenen parça büyüklükleri olan VvMLO-52256 için 1041 bp ürünler (Bkz. Şekil 4.10a), VvALS-91694 için 683 bp ürünler (Bkz. Şekil 4.10b), jel görüntüsünde izlenmiştir.



Şekil 4.10. a) VvMLO-52256; b) VvALS-91694 ligasyon ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra %0.8 (kütlece) agaroz ve %0.005 etidyum bromür içeren jelde 100V potansiyel farkla 1 saat yürütüldükten sonraki görüntüsü. M1 kuyucukları Hibrigen© 1kb, M2 kuyucuğu Hibrigen© 100bp referans markörü göstermektedir

Çalışmada yürütülen restriksiyon kesim reaksiyonları Thermo Fischer web sitesinde önerilen, “Double Digestion” protokollerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kesim reaksiyonlarına ait detaylı bilgiler Çizelge 3.4’te, ligasyon reaksiyonlarına ait detaylı bilgi ise Çizelge 3.5’te yer almaktadır.

Restriksiyon kesimi ile doğrulamanın ardından, transformasyon vektörleri VvMLO-52256 ve VvALS-91694, kompetent *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşuna elektroporasyon (2500V, 25 µF kapasitans ve 400 ohm) yöntemi ile aktarılmıştır.

4.3. Gen Transformasyonu ve Doku Kültürü Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular

4.3.1. Embriyojenik kallusların indüklenmesi ve sürdürülmesi ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular

2021 Nisan ve Mayıs aylarında Sultani Çekirdeksiz, Siyah Kışmış, Italia, Crimson Seedless, Michele Palieri ve Chardonnay çeşitlerinde yapılan anter, yaprak ayası ve yaprak sapı kültürlerinden elde edilen embriyojenik kallus oluşum tepkilerine ait bulgular Çizelge 4.5’te sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Anter, yaprak ayası ve yaprak sapı eksplantlarındaki embriyojenik kallus oluşum tepkileri

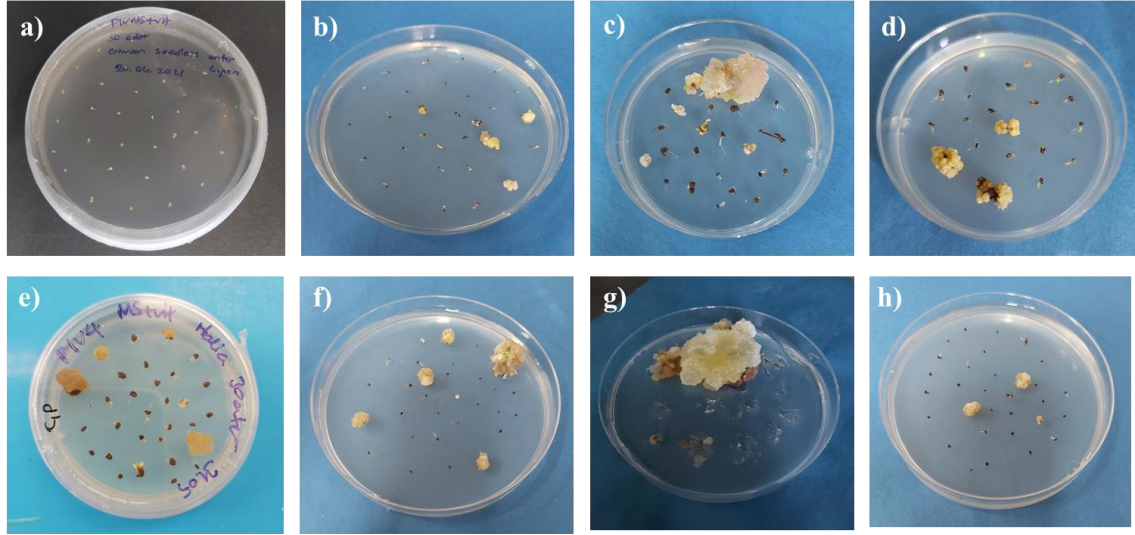
Çeşit	Embriyojenik Kallus Oluşum Tepkisi (%)								
	PIV			PIV1			PIV4		
	Anter	Yaprak Ayası	Yaprak Sapı	Anter	Yaprak Ayası	Yaprak Sapı	Anter	Yaprak Ayası	Yaprak Sapı
Sultani Çekirdeksiz	33,6	28,8	94,4	20,5	20	66,6	36,6	30,8	100
Siyah Kışmış	27,7	-	-	45,1	-	-	45,3	-	-
Italia	2,6	32	56,9	0,8	42,9	73,6	8,9	25	68
Crimson Seedless	0	45,8	98,6	0	62,5	70,8	0,7	77	100
Michele Palieri	33,3	45,8	91,6	56,1	62,5	93	33,3	75	100
Chardonnay	10,4	0	73,6	2,9	0	70,8	11,2	62,5	97,2

Kültür ortamı, eksplantların farklı gelişim aşamalarında büyüme için kritik olan besinleri sağlar ve kompozisyonu başarılı bitki rejenerasyonu olasılığını belirleyen önemli bir faktördür. Bugüne kadar asmada birçok farklı türde temel kültür ortamı, araştırmacılar tarafından kullanılmıştır; bunlar arasında MS ortamı (Murashige ve Skoog 1962), 1/2MS ortamı (yarı güçlü MS ortamı), LS ortamı (Linsmaier ve Skoog 1965), NN ortamı (Nitsch ve Nitsch 1969), WPM ortamı (Lloyd ve McCown 1980), C2D ortamı (Chee vd. 1984) ve DKW ortamı (Driver ve Kuniyuki 1984) bulunmaktadır. Bunların arasında MS ve NN ortamları, embriyojenik kallus ve adventif tomurcukların indüksiyonunda en yaygın olarak kullanılanlardır, somatik embriyo indüksiyonu, embriyo çimlenmesi ve bitki gelişimi için ise MS ve 1/2MS ortamları en çok kullanılanlar olmuştur (Zhang vd. 2021). Literatürdeki bu bilgiler ışığında çalışmada temel besin ortamı olarak MS kullanılmıştır.

Ayrıca, mevcut çalışmalar, asmada rejenerasyonun bitki hormonları ve hormon analogları olan 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), N-(2-kloro-4-piridil)-N'-fenilüre (4-CPPU), 6-benziladenin (6-BA, BA), 6-benzilaminopurin (6-BAP, BAP), gibberellik asit (GA3), indol-3-asetik asit (IAA), indol bütirik asit (IBA), naftalen asetik asit (NAA), 2-naftoksiasetik asit (NOA) ve thidiazuron (TDZ) gibi bitki hormonları ve büyüme düzenleyicileri tarafından etkilendiğini göstermektedir. Bir veya birkaç hormonun kültür ortamına eklenmesinin indüksiyon verimliliğini önemli derecede artırabileceği bildirilmiştir. Örneğin, temel besin ortamlarına 2,4-D (18 µmol L⁻¹) ve BAP (9 µmol L⁻¹)

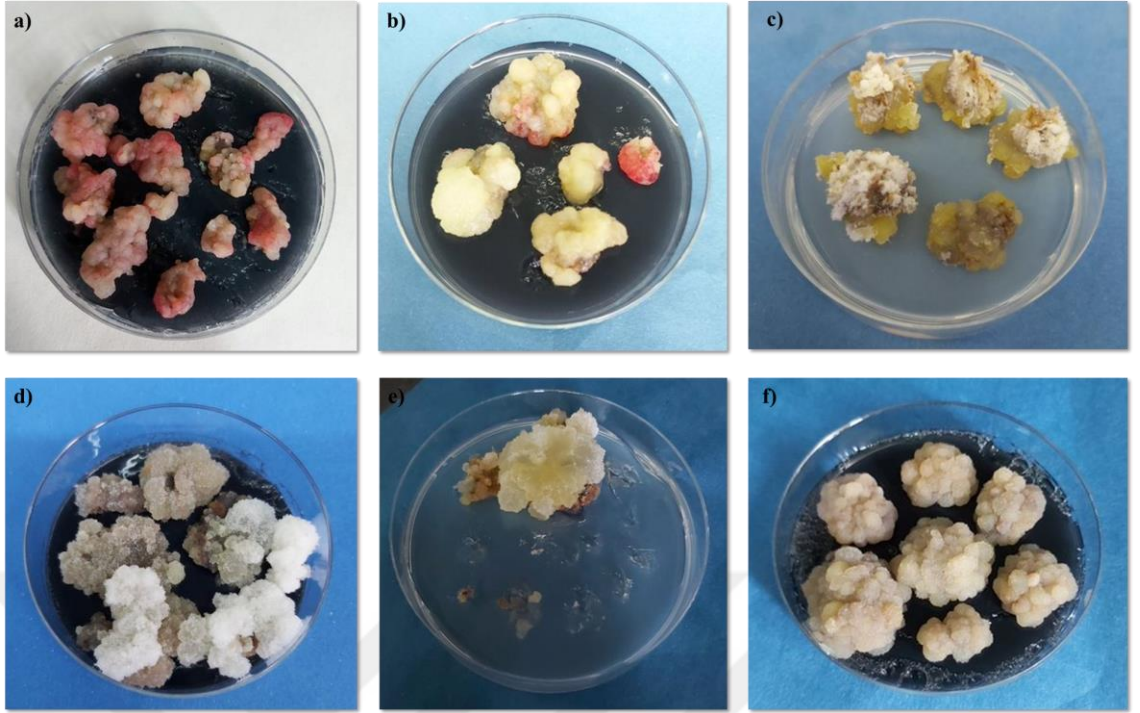
1) ilavesinin SE'yi indüklemekte oldukça etkili olduğu rapor edilmiştir (Maillot vd. 2016). Bir diğer hormon GA₃, genellikle SE çimlendirme ve bitki rejenerasyon aşamasında başarıyla kullanılırken (Prado vd. 2010; Peiró vd. 2015), bunun aksine, 2,4-D, embriyojenik kallus gelişim aşamasında sıklıkla tercih edilmektedir (Bertini vd. 2019; Cardoso vd. 2019; Nakajima vd. 2020). Çalışma kapsamında somatik embriyogenesis çalışmalarında embriyojenik kallus indüklenmesinde kullanılan ortamlardan PIV, 2,4-D ve BAP hormon kombinasyonu içermektedir. Ortamlardan PIV1, pCPA ve BAP, PIV4 ise NAA ve BAP hormon bileşenlerini içermektedir.

Çizelge 4.5 sonuçları incelendiğinde, genotipe bağlı olarak kallus oluşturmadaki farklı tepki yüzdeleri görülmektedir. Çalışmada kontrol çeşidi olarak kullanılan Chardonnay, beklenilenin aksine, kallus oluşturma tepkisi düşük olan çeşitlerden biri olarak değerlendirilmiştir. Öte yandan, pek çok *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonu çalışmasının materyali olan ve literatürde "Thompson Seedless" ve "Sultana" gibi isimlerle bilinen Sultani Çekirdeksiz çeşidi, PIV4 kodlu ortamda en yüksek embriyojenik kallus oluşturma tepkisi göstermiştir. Genel olarak, Michele Palieri dışında bütün çeşitler PIV4 ortamında en yüksek tepkide embriyojenik kallus oluşturunca, Michele Palieri'nin 1 mg/L pCPA ve 4 mg/L BAP hormon kombinasyonuna sahip PIV1 ortamında önemli derecede embriyojenik kallus oluşum tepkisi belirlenmiştir. Crimson Seedless çeşidi anterleri, 3 farklı indüksiyon ortamında da embriyojenik kallus gelişimi neredeyse göstermemiştir. Italia çeşidi PIV4 ortamında en yüksek kallus gelişim yüzdesi göstermiştir (Bkz. Şekil 4.11b). PIV4 ortamında en yüksek embriyojenik kallus oluşumu Siyah Kışmış çeşidinde saptanmıştır. İndüksiyon ortamlarının içerikleri kıyaslandığında, gen transformasyonu çalışmalarından temel alınan Bouquet vd. (2006)'nın embriyojenik kallus indüksiyon ortamı olarak kullandığı ve çalışmada PIV olarak kodlanan 1 mg/L 2,4 D ve 2 mg/L BAP içeren bu temel ortam dışında, PIV1 ve PIV4 kodlu farklı indüksiyon ortamlarının çalışmaya dahil edilmesinin çok yerinde olduğu görülmektedir. Öyle ki, çalışmanın tüm çıktıları 2 mg/L NAA ve 2mg/L BAP kombinasyonu içeriğine sahip PIV4 kodlu ortamlardan elde edilmiştir. Ayrıca çalışma materyali asma çeşitlerinin geniş yelpazede tutulması, çalışmanın sonuçlarına ve literatüre önemli katkılar sunmaktadır. Siyah Kışmış'ten elde edilen bulgular bu çeşit ile geliştirilmek istenen *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonu çalışmaları ve CRISPR teknolojisinin bu çeşitte uygulanması noktasında önemli olabilecek değerlendirmeleri sunmaktadır. Literatür incelendiğinde, şu ana kadar Siyah Kışmış asma çeşidinde CRISPR teknolojisinin kullanıldığı bir çalışmaya veya *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonu çalışmasına rastlanmamıştır. Şekil 4.11'de anterlerden gelişen kallus görüntüleri sunulmuştur.

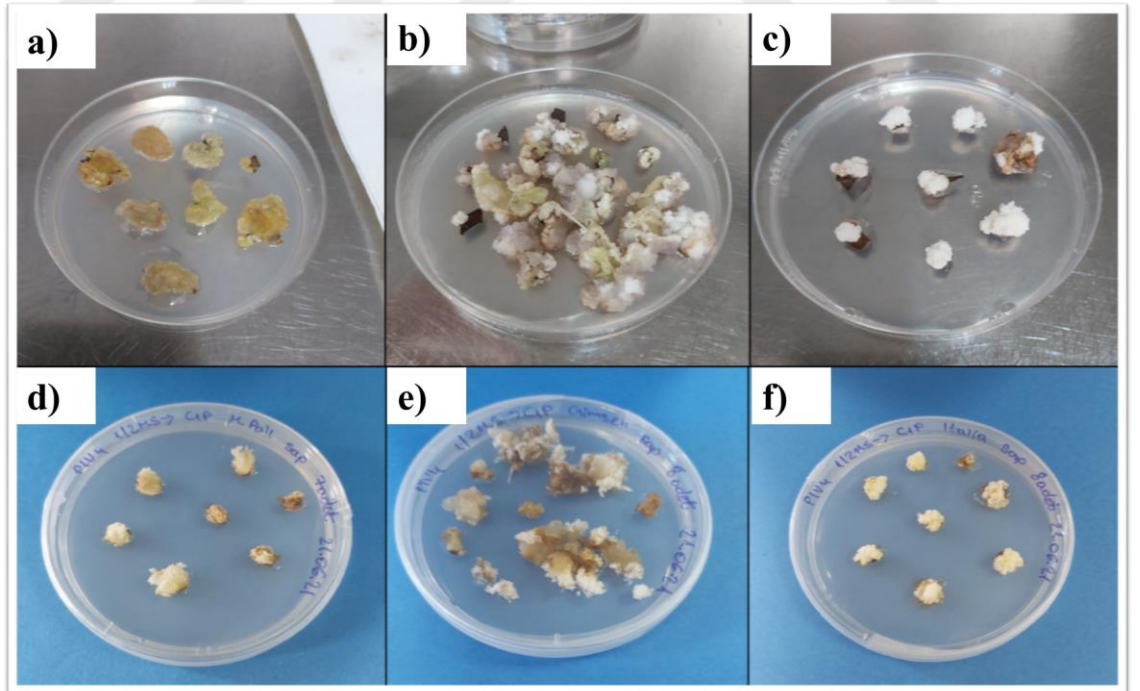


Şekil 4.11. a) Embriyogenik kallus indüklenme ortamlarına yerleştirilmiş anterler; **b)** 4-6 hafta sonunda Michele Palieri anterlerinden PIV1 ortamında gelişen sarı-krem renkteki embriyogenik kalluslar; **c)** Michele Palieri anterlerinden PIV4 ortamında gelişen kalluslar; **d)** Chardonnay anterlerinden PIV ortamında gelişen kallus yapıları; **e)** Italia çeşidi anterlerinden PIV4 ortamlarında gelişen kallus yapıları; **f)** Siyah Kışmış anterlerinden PIV4 ortamlarında gelişen kallus yapıları; **g)** Siyah Kışmış anterlerinden PIV1 ortamlarında gelişen kallus yapıları; **h)** Sultani Çekirdeksiz anterlerinden PIV4 ortamında gelişen kallus yapıları

Yaprak ayası ve yaprak sapı kültürlerinin sonuçları incelendiğinde genel olarak bu eksplantlardan gelişen kallus yapılarının kompakt (Bkz. Şekil 4.12a,b,f) veya yumuşak formda (Bkz. Şekil 4.12c,d) olduğu gözlemlenmiştir. Dağılan yapıda (friable) embriyogenik potansiyele sahip kallus oluşumları izlenmemiştir. Kompakt veya yumuşak formdaki kallusların da embriyo oluşturma potansiyeli bulundurduğu göz önünde bulundurularak, gelişen bu kalluslar transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır. İleriki dönemlerde bu kallus formlarından bitki rejenerasyonu elde edilememiştir. Şekil 4.12’de yaprak ayası eksplantlarından gelişen kallus görselleri sunulmuştur. Çeşitlere bağlı olarak kallus renklerinin farklılık gösterdiği dikkat çekmektedir. Özellikle Michele Palieri yaprak ayalarından gelişen kalluslarının pembe renkte gelişim gösterdiği kaydedilmiştir (Bkz. Şekil 4.12a,b). Öte yandan, Michele Palieri yaprak sapından türeyen kallusların üç farklı embriyogenik kallus indüklemeye ortamında da pembe renkli kalluslar oluşturmadığı gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.13d). Bu renk oluşumunun, asma yapraklarında oluşan fitoaleksine kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Asmada, stres koşullarında sentezlenen stilben grubu fitoaleksinlerin özellikle yaprak ve meyvelerde biriktiği bilinmektedir (Kesin ve Marasalı Kunter, 2009).



Şekil 4.12. a), b) PIV ortamında indüklenen Michele Palieri yapraklarına ait kalluslar; c) PIV4 ortamında gelişen Chardonnay yapraklarına ait kalluslar; d) PIV1 ortamında gelişen Sultani Çekirdeksiz yapraklarına ait kalluslar; e) PIV1 ortamında gelişen Siyah Kışmış anterlerine ait kalluslar; f) PIV ortamından gelişen Italia yapraklarına ait kalluslar

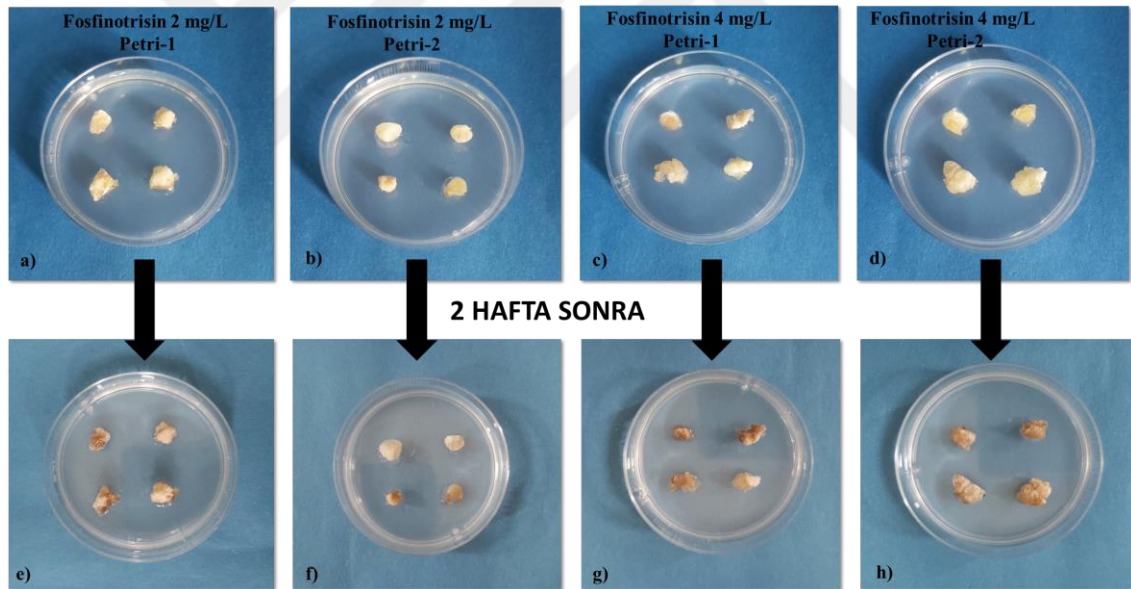


Şekil 4.13. Asma çeşitlerinin yaprak ayası ve yaprak saplarının embriyojenik kallus indüklemeye ortamlarındaki kallus gelişimleri a) Crimson Seedless yaprak ayalarının PIV1 ortamındaki gelişimleri; b) Michele Palieri yaprak ayalarının PIV4 ortamındaki

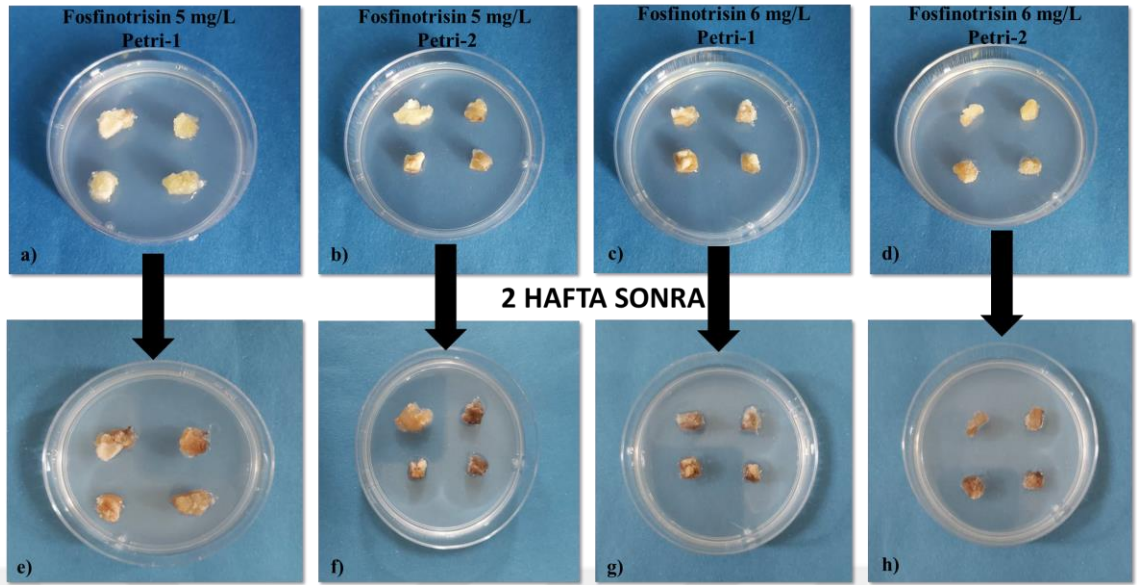
gelişimleri; **c)** Italia yaprak ayalarının PIV4 ortamındaki gelişimleri; **d)** Michele Palieri yaprak saplarının PIV4 ortamındaki gelişimleri; **e)** Crimson Seedless yaprak saplarının PIV4 ortamındaki gelişimleri; **f)** Italia yaprak saplarının PIV4 ortamındaki gelişimleri

4.3.2. Seleksiyon dozlarının belirlenmesi (Kill-curve testleri) ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular

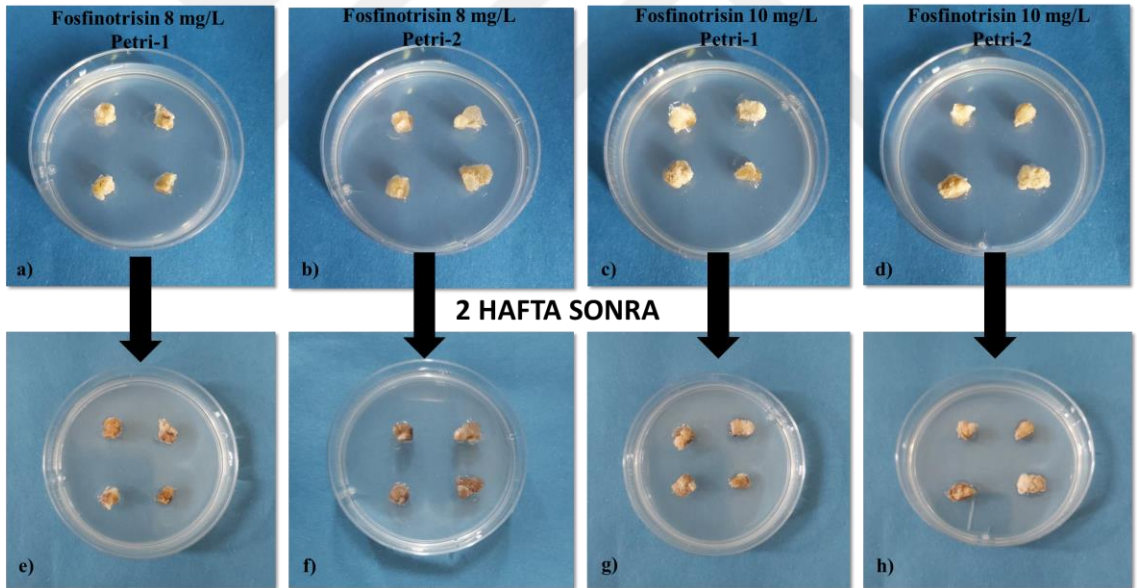
Fosfinotrisin ile yapılan seleksiyon doz denemesine ait sonuçlar Şekil 4.14, 4.15 ve 4.16'da sunulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde, Italia embriyojenik kalluslarının tamamının 4 mg/L dozda canlılıklarını yitirmeye başladıkları gözlemlenmiştir. Beklendiği gibi 4 mg/L üzerindeki bütün dozlarda kalluslar krem-beyaz olan renklerini kaybetmişlerdir. Öte yandan 2 mg/L dozda kalluslardan sadece bir kısmı yüzeysel ya da az miktarlarda kahverengileşmişlerdir. Bu da bize seleksiyon dozunun 2-4 mg/L oranlarda seçilmesi gerektiğini göstermektedir. Jardak Jamoussi vd. (2009), Arich dressé kùltivarında yaptıkları gen transformasyonu çalışmasında fosfinotrisin dozunu 2.5 mg/L dozunda uygulamışlardır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar literatürdeki bu çalışma ile uyumlu olsa da Dumin vd. (2018) Sauvignon blanc asma çeşidinde seleksiyon dozu olarak 10 mg/L'yi kullandıklarına rastlanmıştır. Literatür ve çalışmamız arasındaki bu tutarsızlığın, farklı asma çeşitlerinin farklı seleksiyon dozları istekleri olabileceğinden kaynaklandığını düşündürmektedir.



Şekil 4.14. a), b) Italia çeşidine ait embriyojenik kallusların sırasıyla 2 mg/L; c), d) 4 mg /L fosfinotrisin dozlarına maruz bırakılması; e), f), g), h) 2 hafta sonra petrilerin görüntüleri

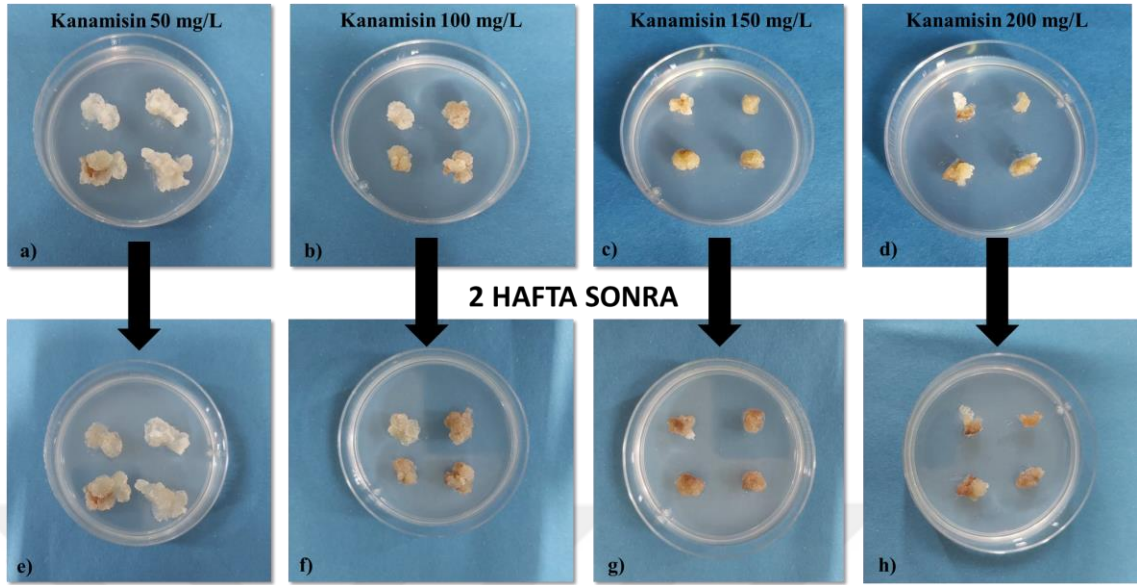


Şekil 4.15. a), b) Italia çeşidine ait embriyojenik kallusların sırasıyla 5 mg/L; c), d) 6 mg /L fosfinotrisin dozlarına maruz bırakılması; e), f), g), h) 2 hafta sonra petrilerin görüntüleri



Şekil 4.16. a), b) Italia çeşidine ait embriyojenik kallusların sırasıyla 8 mg/L; c), d) 10 mg /L fosfinotrisin dozlarına maruz bırakılması; e), f), g), h) 2 hafta sonra petrilerin görüntüleri

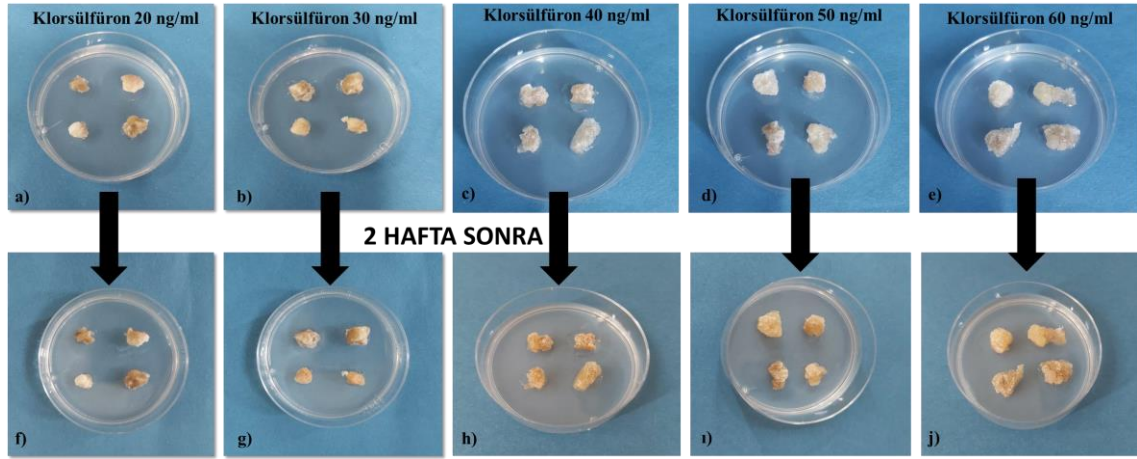
Kanamisin ile yapılan doz denemeleri sonuçları Şekil 4.17’de sunulmuştur.



Şekil 4.17. a) Sultani Çekirdeksiz çeşidine ait embriyojenik kallusların sırasıyla 50 mg/L; **b)** 100 mg /L; **c)** 150 mg/L; **d)** 200 mg/L kanamisin dozlarına maruz bırakılması; **e), f), g), h)** 2 hafta sonra petrilerin görüntüleri

Zhang vd. (2021) asma ile yapılan genetik transformasyonları derledikleri çalışmalarında, farklı asma çeşitlerinin embriyojenik kalluslarında kanamisin seleksiyon dozlarının 15-350 mg/L aralığında değiştiğini rapor etmişlerdir. Bu tez çalışması için yapılan doz deneme çalışmalarının sonuçları bu raporda bildirilen dozlarla tutarlılık göstermektedir. Sonuçlara göre Sultani Çekirdeksiz embriyojenik kallusları 50 mg/L dozuna dayanıklılık gösterirken, 100 mg/L ve üzeri dozlarda canlılıklarını yitirmeye başlamıştır. Literatürde fosfinotrisin ve kanamisin seleksiyonlarına sahip 2 ayrı transformasyon vektörünün bitkiye aynı anda aktarıldığı bir çalışmaya rastlanmadığından çalışmada belirlenen seleksiyon dozlarının aynı anda bitkiye verilmesinin bitki için fazla toksik olma ihtimali göz önünde bulundurulmuştur. Bunun için fosfinotrisin çalışmada belirlenen 4 mg/L dozdan 2 mg/L’ye ve kanamisin için belirlenen 100 mg/L doz oranından 50 mg/L’ye düşürülmüştür.

Sülfonilüre grubu herbisitlerden klorsülfüron ile gerçekleştirilen doz denemeleri sonuçları Şekil 4.18’de sunulmuştur.



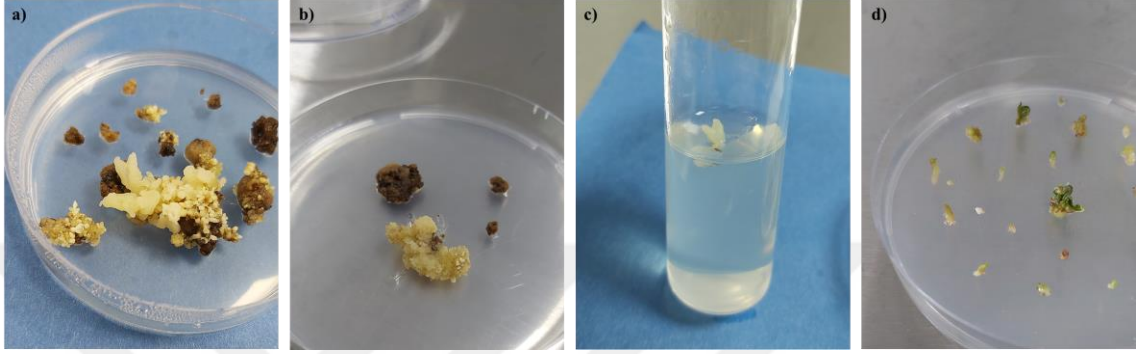
Şekil 4.18. a) Italia çeşidine ait embriyojenik kallusların sırasıyla 20 ng/mL; b) 30 ng/mL; c) 40 ng/mL; d) 50 ng/mL; e) 60 ng/mL klorosülfüron dozlarına maruz bırakılması; f), g), h), i), j) 2 hafta sonra petrilerin görüntüleri

Klorosülfüron doz uygulamaları incelendiğinde sonuçların literatür ile uyumlu olduğu değerlendirilmiştir. Kallusların 20 ng/ml doz uygulamalarında 2 hafta sonunda bir değişiklik gözlenmezken, 30 ng/ml doz uygulamasında (Bkz. Şekil 4.16b,g) kalluslar kahverengileşmeye başlamıştır. 40 ng/ml ve üzeri dozlarda ise kalluslarda kahverengileşme daha belirgin hale gelmiştir. Veillet vd. (2019, 2020), 30-40 ng/ml klorosülfüron doz uygulaması ile domateste %12; patateste %10 başarıyla transgen taşımayan bitkileri tespit edebilmişlerdir. Asmada klorosülfüron doz uygulamalarına literatürde rastlanmadığından, Veillet vd. (2019, 2020)'un çalışmalarında 30 ng/ml doz ile transgen taşımayan bitkileri seçebilmiş olmalarına dayanarak ve yürütülen doz denemelerinde benzer doz aralığında ölüm noktasının yakalanmış olması nedenlerinden ötürü, asma seleksiyon ortamlarında 30 ng/ml klorosülfüron dozu uygulanmıştır.

4.3.3. Embriyojenik kalluslara *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı çalışmalarından elde edilen bulgular

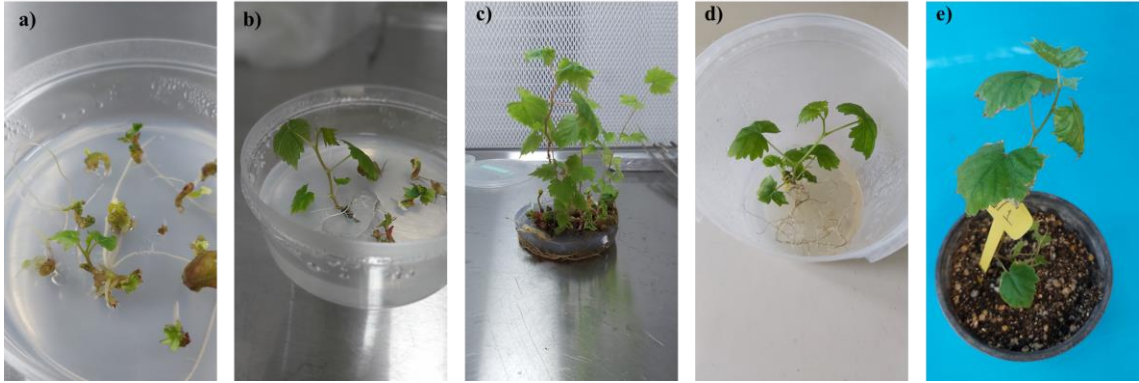
Transformasyon çalışmalarından 4 hafta önce GS1CA kodlu kültür ortamına aktarılan asma kallusları, *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonu uygulamalarının ardından, 10 gün süreyle fosfotrisin ve kanamasinin birlikte bulunduğu seleksiyon ortamına (Sel1) (Bkz. Çizelge 3.7) aktarılmıştır. Daha sonra kalluslar geçici entegrasyonun gerçekleştiği hücrelerin de seçilebilmesi için 30 ng/ml dozunda klorosülfüron içeren Sel2 (Bkz. Çizelge 3.7) ortamlarına aktarılmıştır. Sel 2 ortamlarında 4 haftada bir toplamda 3 kez alt kültüre alma işlemi sürdürülmüştür. Ardından kültürler embriyo çimlendirme ortamı olan ve hormon içermeyen MG1 ortamlarına aktarılmıştır. İlk kültüre alma işleminden MG1 ortamları dahil petriler 28°C karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Nisan 2021'de başlanan çalışmalarda ilk embriyolar 16 ay sonunda PIV4 ortamında embriyojenik kallus indüksiyonu gerçekleştirilen Siyah Kışmış anterlerinde ve PIV indüksiyon ortamında kültürleri başlatılmış Sultani Çekirdeksiz anterlerinde gözlenmiştir. Gelişen embriyolar Şekil 4.19'da sunulmuştur. Şeffaf yapıdaki bu embriyoların ileriki gelişimlerini tamamlamaları ve yeşil renge dönüşümlerinin sağlanması için MG2 (Bkz. Çizelge 3.7) ortamlarına aktarılmıştır. Bu aşamada kültürler 25°C sıcaklık ve 16 saat ışık(50 µmol/m².s), 8 saat karanlık koşullara 7-10 gün süreyle

maruz bırakılmıştır. Sultani Çekirdeksiz embriyolarından MG2 ortamlarında gelişim gözlenmemiştir. Sultani Çekirdeksiz ve Siyah Kışmış'ten gelişen embriyoların sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde 11 embriyo gözlenirken, embriyoların MG2 embriyo çimlendirme ortamlarında gelişimlerini sürdüremediği gözlenmiştir. Siyah Kışmış çeşidinde ise gelişen 352 embriyodan 143 tanesi bitki formuna dönüşmüş ve aklimatize edilmiştir. Bunlardan sera koşullarına adapte olan 132 bitkide mutasyon profilleri izlenmiştir. Bitkiler, 1'den 132'ye başlarında V harfi ile isimlendirilmiştir.



Şekil 4.19. a) Siyah Kışmış çeşidine ait anter kültüründe gelişen çeşitli aşamadaki embriyolar; b) Sultani Çekirdeksiz çeşidine ait anter kültürlerinden gelişen çeşitli aşamadaki embriyolar; c) Siyah Kışmış çeşidinde kotiledonlu aşamada bir embriyo; d) Gelişimlerini sürdürmeleri için MG2 ortamlarına aktarılmış somatik embriyolar

MG1 ortamlarında yeşil renge dönen embriyolar yeniden MG1 ortamlarına alınarak gelişimleri değerlendirilmiştir. Gelişimleri olumlu yönde seyreden ve bitki formuna dönüşen asmalar Bouquet vd. (2006)'da bildirilen köklendirme ortamlarının kullanılmasına ihtiyaç duyulmadan doğal olarak köklenmiş ve doğrudan aklimatize edilmişlerdir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. a), b) Siyah Kışmış çeşidinde bitkiye dönüşmüş embriyolar; c), d) Köklenmiş Siyah Kışmış çeşidine ait bitkiler; e) Aklimatize edilmiş bir bitki

Çizelge 4.6. Asma çeşitlerinde anter eksplantlarından gelişen embriyo sayıları ve bitkiye dönüşüm oranları

Çeşit	Embriyojenik Kallus İndüksiyon Ortamı	Gelişen Embriyo Sayısı	Bitkiye Dönüşen Embriyo Sayısı	Bitkiye Dönüşüm Oranı (%)
Sultani Çekirdeksiz	PIV	11	0	0
Siyah Kışmış	PIV4	352	132	37.5

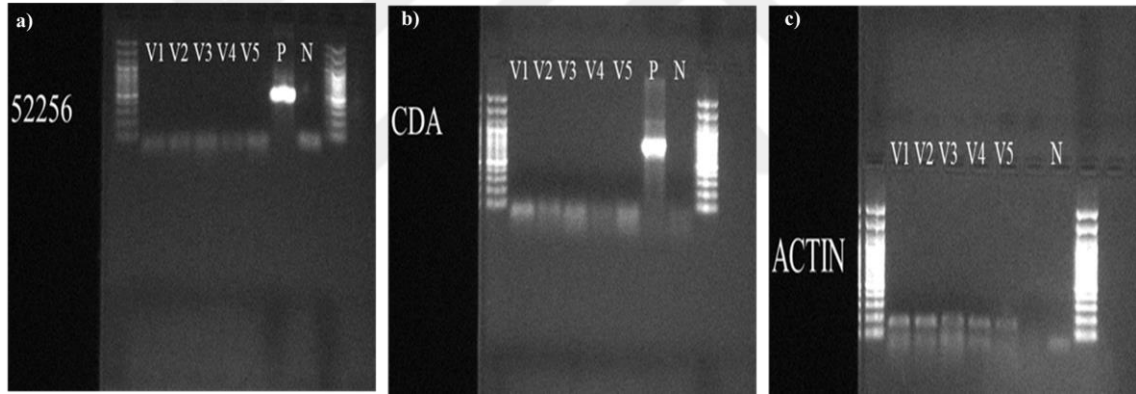
Asmada *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonu çalışmaları, olgunlaşmamış anterler, ovaryum, nüsellus, embriyolar, hipokotil veya *in vitro* fidelerden elde edilen genç yapraklar gibi diğer dokulardan elde edilen embriyojenik kültürlerle yapılabilmektedir. Bu çalışma kapsamında henüz olgunlaşmamış anterlerden ve *in vivo* yetişen asmaların yaprak ayası ve yaprak saplarından elde edilen embriyojenik kültürler transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Bu doku tipleri asmada somatik embriyo oluşturmak için yaygın ve başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Perl vd. 1996; Torregrosa 1998; Iocco vd. 2001; Nalwade ve Shitole 2004).

Agrobacterium suşu ve asma dokusu için ortak kültür koşullarını optimize etmek son derece önemlidir. Hücrelerin belirli bir *Agrobacterium* suşu ile enfekte olması ve başarılı T-DNA entegrasyonu, suş, bakteriyel kültür koşulları, bakteri yoğunluğu, ko-kültivasyon süresi ve kullanılan ortam gibi birçok faktörden etkilenir. Çalışmada kullanılan EHA105'in yüksek bir transformasyon oranına sahip olduğu pek çok çalışmada bildirilmiştir (Zhang vd. 2021). Kapsamlı bir çalışmada, López-Pérez vd. (2008), *Agrobacterium* suşu EHA105'in, Sugraone ve Crimson Seedless (*V. vinifera* L.) üzüm çeşitlerinde, C58 (pMP90) ile karşılaştırıldığında daha iyi bir transformasyon verimliliği sağladığını rapor etmiştir; bu sonuçlar, Torregrosa vd. (2002) tarafından elde edilen sonuçlarla uyumludur.

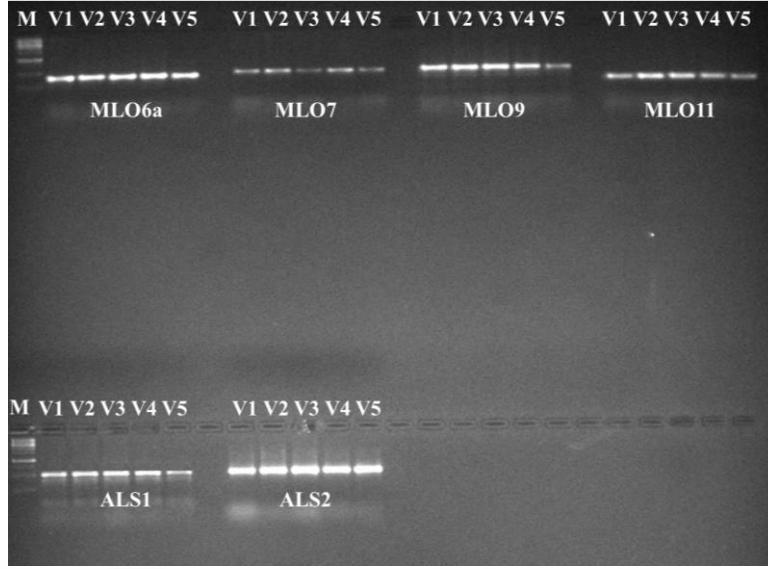
4.3.4. Geçici ve stabil entegrasyonun sağlandığı bitkilerin belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular

Çalışmada farklı zaman dilimlerinde bitki rejenerasyonları sağlanmıştır. Dış koşullara adapte edilen bitkilerin DNA'ları izole edilerek cas9, kanamisin ve/veya CDA transgen unsurlarını taşıyıp taşımadıkları Çizelge 3.2'de sekans bilgileri sunulan spesifik primerlerle kontrol edilmiştir. VvMLO-52256 vektörüne spesifik T-DNA bölgesi '52256-2', VvALS-91694 vektörü T-DNA'sı ise 'cas9-3', 'kanamisin' ve/veya 'CDA' olarak adlandırılan primer çiftleriyle kontrol edilmiştir. Ayrıca DNA kalitesinden emin olmak

için Actin genine spesifik primerlerle de kontroller gerçekleştirilmiştir. Embriyojenik kalluslar 10 gün süreyle fosfinotrisin, kanamycin ve ileriki gelişim dönemlerinde yalnızca klorsülfüron seleksiyonuna maruz bırakıldıklarından, bu aşamada elde edilen bitkilerin çeşitli formlarda düzenlenmiş olabileceği göz önünde bulundurularak bulgular değerlendirilmiştir. Bunlar ilk 10 günde seçilmiş; 1) stabil ve geçici entegrasyon yoluyla *MLO* genleri susturulmuş bitkiler, 2) stabil ve geçici entegrasyon yoluyla *ALS* genleri düzenlenmiş bitkiler ve 10 günden sonra yalnızca klorsülfüron seleksiyonu ile 3) stabil entegrasyon ile *ALS* genleri düzenlenmiş bitkiler, 4) geçici entegrasyon ile *ALS* genleri düzenlenmiş bitkilerdir. Bir başka deyişle çalışmadan elde edilen bitkilerin *ALS* ve *MLO* genleri geçici entegrasyon ile düzenlenmiş bitkiler, *ALS* genleri geçici ancak *MLO* genleri stabil entegrasyon ile düzenlenmiş bitkiler, *ALS* genleri stabil ancak *MLO* genleri geçici entegrasyon ile düzenlenmiş bitkiler, hem *ALS* hem *MLO* genleri stabil entegrasyon ile düzenlenmiş bitkiler ya da *MLO* veya *ALS* genlerinden yalnızca bir tanesi geçici ya da stabil entegrasyon ile düzenlenmiş bitkilerdir. Yukarıda sıralanan ihtimallerin değerlendirilmesi için transgen taşıyan veya taşımayan bütün bitkilerin gRNA bölgeleri incelenmiştir. Transformasyon vektörlerinin T-DNA bölgelerine spesifik tasarlanan primerler ile bitkilerin (V1, V2, V3, V4, V5) taranması neticesinde elde edilen PCR bant profilleri Şekil 4.21’de sunulmuştur. gRNA bölgelerine spesifik tasarlanmış primerler ile koşulan PCR ürünleri (Bkz Şekil 4.22) ve Sanger yöntemi ile sekanslatırılarak mutasyon profilleri değerlendirilmiştir.



Şekil 4.21. V1, V2, V3, V4, V5 bitkilerinin **a)** 52256-2; **b)** kanamisin; **c)** actin primer çiftleriyle koşulan PCR ürünlerinin %0.8 (kütlece) agaroz ve %0.005 etidyum bromür içeren jelde 100V potansiyel farkla 1 saat yürütüldükten sonraki görüntüsü (Agaroz jellerin ilk ve son kuyucukları 100 bp HibriGen© referans markörü içermektedir. Kuyucuklardaki ‘P’ pozitif kontrolleri temsil etmekte olup PCR reaksiyonlarında vektör plazmitler, ‘N’ negatif kontrolleri temsil etmekte olup PCR reaksiyonlarında su kullanılmıştır.)



Şekil 4.22. V1, V2, V3, V4, V5 bitkilerinin *MLO6a*, *MLO7*, *MLO9*, *MLO11*, *ALS1* ve *ALS2* gRNA primer çiftleriyle koşulan PCR ürünlerinin %0.8 (kütlece) agaroz ve %0.005 etidyum bromür içeren jelde 100V potansiyel farkla 1 saat yürütüldükten sonraki görüntüsü (M kodlu kuyucuklar 1 kb Himedia© referans markörü içermektedir)

Şekil 4.22’de gRNA bölgeleri çoğaltılan 5 bitkinin PCR ürünleri Sanger yöntemiyle sekanslatılmıştır. 6 bölge yönünden de bitkilerde mutasyon izlenmemiştir. Transgen taşıyan bitkilerin Vv*MLO*-52256 ve/veya Vv*ALS*-91694 vektörlerine ait transgenleri taşıma ve mutasyon bulundurma profilleri Çizelge 4.7’de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Transgen taşıyan asmaların gRNA bölgelerine göre sahip oldukları mutasyonlar

Bitki No	Transgen Taşıma Durumu		gRNA bölgelerinde mutasyon oluşumu					
	Vv <i>MLO</i> -52256	Vv <i>ALS</i> -91694	<i>MLO6a</i>	<i>MLO7</i>	<i>MLO9</i>	<i>MLO11</i>	<i>ALS1</i>	<i>ALS2</i>
V23	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V40	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V49	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V66	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V70	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Çizelge 4.7'nin devamı

Bitki No	Transgen Taşıma Durumu		gRNA bölgelerinde mutasyon oluşumu					
	VvMLO-52256	VvALS-91694	MLO6a	MLO7	MLO9	MLO11	ALS1	ALS2
V71	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V72	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V73	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V75	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V76	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	d
V77	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	d
V78	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V79	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V80	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V81	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V88	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V91	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V93	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V94	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V95	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V96	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V97	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V98	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V99	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd

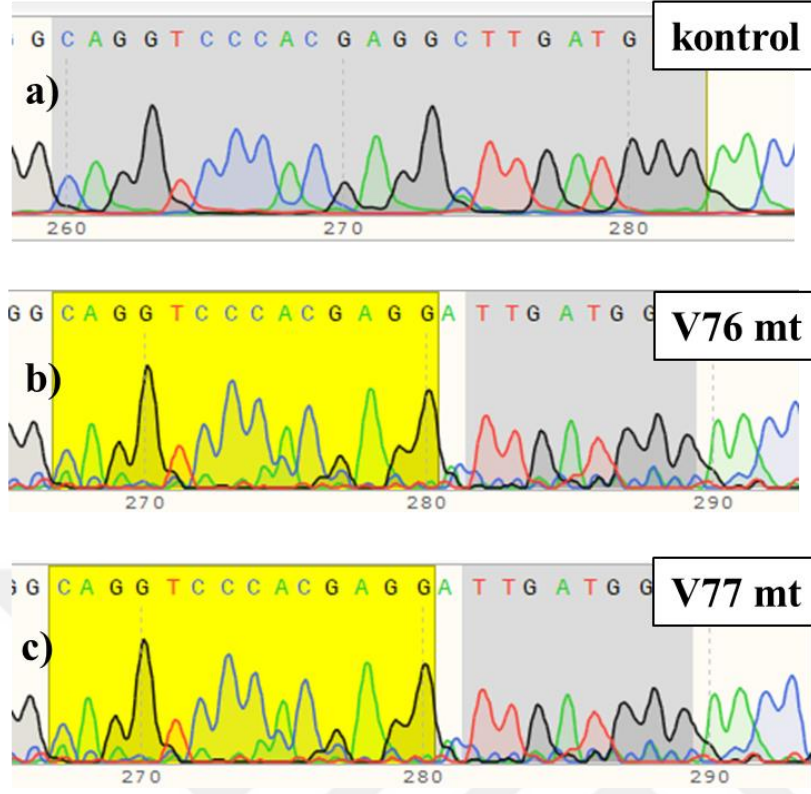
Çizelge 4.7'nin devamı

Bitki No	Transgen Taşıma Durumu		gRNA bölgelerinde mutasyon oluşumu					
	VvMLO-52256	VvALS-91694	MLO6a	MLO7	MLO9	MLO11	ALS1	ALS2
V100	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V101	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V104	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
V106	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Toplam Bitki Sayısı	16	24						

*nd mutasyon tespit edilmeyen

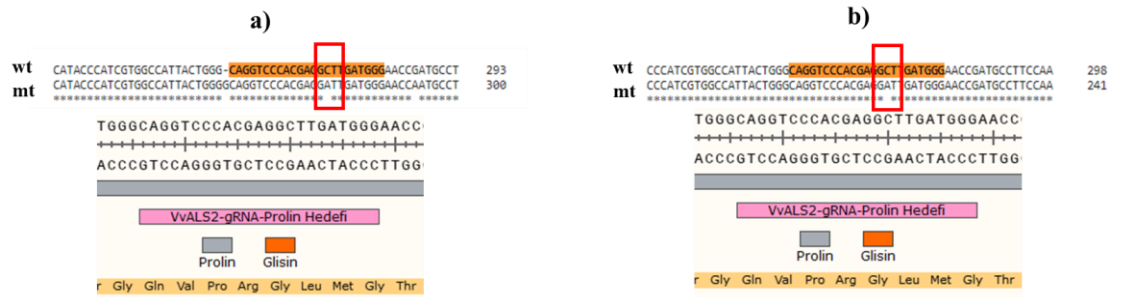
**d mutasyon tespit edilen

Çalışmada rejenere edilen 132 Siyah Kışmış çeşidine ait bitkiden 28'inde Agrobacterium aracılığıyla gerçekleştirilen transformasyonun kalıcı olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Kalıcı transformasyonun gerçekleştiği bitkilerin, %56.1'i VvMLO-52256'ya ait transgenleri, %85.7'si VvALS-91694'e ait transgenleri, % 39.2'si her iki vektöre ait transgenleri taşımaktadır. V76 ve V77 bitkilerinde VvALS2 gRNA bölgesinde tek baz mutasyonları izlenmiştir. Kontrol bitkisi, V76 ve V77'nin tek yönlü (forward) Sanger sekans kromotogramları Şekil 4.23'te sunulmuştur.



Şekil 4.23. a) Kontrol grubu Siyah Kışmış çeşidinde VvALS2 bölgesinin Sanger sekans kromotogramı; **b)** V76 bitkisinde VvALS2 bölgesinin Sanger sekans kromotogramı; **c)** V77 bitkisinde VvALS2 bölgesinin Sanger sekans kromotogramı

Transgen taşıyan bitkilerin mutasyon profilleri değerlendirildiğinde V76 ve V77 bitkisinde VvALS2 gRNA bölgesinde G177 rezidülerde 1 baz değişimi (C>A) izlenmiştir (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22) ancak mutasyonlar amino asit değişikliğine neden olmamıştır. Ayrıca izlenen mutasyon, hedeflenen P175 rezidülerde değil, PAM sekansı önünde 15. bazda sitidinin adenine dönüşümü şeklinde gerçekleşmiştir. Mutasyonların ClustalO ile yapılan profil değerlendirmesi Şekil 4.24’te sunulmuştur.



Şekil 4.24. a) V76 bitkisinde G177’de VvALS2 hedefinin, kontrol grubu VvALS2 hedefi ile ClustalO programı ile hizalanması sonucu elde edilen görsel; **b)** V77 bitkisinde G177’de VvALS2 hedefinin, kontrol grubu VvALS2 hedefi ile ClustalO programı ile hizalanması sonucu elde edilen görsel (kırmızı kareler C>A mutasyonunu göstermektedir)

DNA baz düzenleme sistemleri, temel araştırmalardan terapötik uygulamalara kadar çeşitli alanlarda güçlü araçlardır. Ancak, DNA baz düzenleyicilerin optimize edilmesinin, hücresel DNA ve RNA'da rehber RNA bağımsız baz değişikliklerinin sayısını azaltmak için gereklilik arz ettiği rapor edilmektedir (Park ve Beal 2019). Baz düzenleyici sistemlerde kullanılan deaminaz enzimlerinin rastgele düzenleme aktivitesi, hedef dışı baz düzenlemenin temel bir nedeni olarak değerlendirilmektedir. Bu da çalışmada elde edilen mutasyonların, sistemin hedef dışı etkisinden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir.



5. SONUÇLAR

Asma (*Vitis vinifera* L.), dünya genelinde önemli bir tarımsal ürün olarak yetiştirilen ve ekonomik değeri yüksek olan bir bitki türüdür. Ancak, asma üretimini ciddi şekilde tehdit eden önemli bir hastalık olan külleme, özellikle *Vitis vinifera* türü asmalar için yaygın bir sorundur. Külleme hastalığı, *Erysiphe necator* adlı mantarın neden olduğu, yapraklar, sürgünler ve üzüm salkımlarında beyaz tozlu lekelerin olduğu bir fungal enfeksiyondur. *E. necator* asmanın başta yeşil aksamalarına zarar vermekte, enfeksiyon sonrası meyvelerde çatlama görülmekte, tane verimi ve kalitesinde zararlara neden olmaktadır. Külleme sülfür içerikli ve sentetik fungisitlerle kontrol edilmektedir. Fungisit uygulamaları çevre ve insana sağlığına zararlı olmakla beraber, doğru zaman ve miktarda uygulanmadığında etkisiz kalabilmektedir. Külleme ile mücadelede tercih edilen bir diğer yöntem külleme dirençli çeşitlerin kullanılmasıdır; ancak bu çeşitler pazara hitap etme konusunda geri kalmaktadır. Bu iki yöntemin dışında, *REN* ve *RUN* gibi *R*-genleri ile asmada dirençli çeşitler geliştirilebilmektedir. Ancak *R* genleri sadece spesifik patojen efektörlerini tanıdığından dar spektrumlu olup, patojenin mutasyona uğraması durumunda işlevlerini yitirebilmektedir. Bu bağlamda, külleme hastalığına karşı dayanıklı asma çeşitlerinin geliştirilmesi, sürdürülebilir ve yüksek verimli bağcılık pratiğini desteklemek için önemli bir hedef haline gelmiştir. Son yıllarda *MLO* genlerinin bu hastalığa karşı duyarlılık üzerindeki etkileri, genetik çeşitlilik ve direnç geliştirmek adına önemli bir araştırma alanını oluşturmuştur. Yapılan çalışmalar, *MLO* genlerinin genellikle külleme hastalığına karşı duyarlı bitki çeşitlerinde daha yüksek ifade düzeylerine sahip olduğunu ve bu genlerin susturulmasının külleme direncini artırabileceğini göstermektedir. Bu noktada, CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisi, *MLO* genlerinin seçici olarak susturulması külleme dayanıklılığına sahip yeni asma çeşitleri geliştirmek için potansiyel bir araç olarak öne çıkmaktadır. Bu çalışmalar, asmada genetik direncin güçlendirilmesi ve külleme hastalığına karşı daha dayanıklı bitkilerin geliştirilmesine yönelik geniş kapsamlı bir anlayışın oluşturulmasına katkı sağlamaktadır.

Tez kapsamında, CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisinin kullanımıyla, asmada külleme hastalığına karşı dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi için çalışmalar yürütülmüştür. Bu hedef doğrultusunda, *MLO* genlerinin ve diğer potansiyel direnç faktörlerinin hedeflenerek, genetik dayanıklılığın nasıl artırılacağı ve asmada külleme ile mücadelede yeni yaklaşımların nasıl geliştirilebileceği araştırılmıştır. Çalışmanın temel amacı, Türkiye’de ve dünyada asma (*V. vinifera*) yetiştiriciliği kapsamında değerlendirildiğinde pazar değeri yüksek Sultani Çekirdeksiz, Italia, Crimson Seedless, Michele Palieri, Chardonnay ve Siyah Kışmış çeşitlerinde külleme hastalığına karşı dirençli ve transgen taşımayan (Cas9 ve kılavuz genler) genotiplerin geliştirilmesinin olanaklarını araştırmaktır. Bunun için, küllemeyle oldukça hassas Sultani Çekirdeksiz, Italia, Crimson Seedless, Michele Palieri ve Chardonnay çeşitlerinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla geçici ve stabil gen transferi araştırmaları yürütülmüştür. Geçici transformasyonda *ALS* genini hedef alan baz-düzenleyici nCas9 ve kılavuz RNA ile 4 *MLO-S* genini hedef alan Cas9 ve kılavuz RNA’ların aynı anda etki gösterdiği embriyogenik kalluslar sülfonil üre grubundan uygun bir herbisit aracılığıyla seçilmesi ve bitki rejenerasyonu; kalıcı transformasyonda ise *MLO* ve/veya *ALS* genleri düzenlenmiş bitkilerin geliştirilebilirlik olanakları değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir;

- Embriyojenik kallus oluşturmada, NAA ve BAP hormone içeriğine sahip PIV4 kodlu ortam en başarılı sonucu vermiştir.
- Embriyo gelişimi Siyah Kışmış ve Sultani Çekirdeksiz çeşitlerinde gözlenmiştir.
- Embriyoların bitkiye dönüşüm oranı, Siyah Kışmış çeşidinde daha verimli olarak değerlendirilmiştir.
- Çalışmada rejenere edilen 132 Siyah Kışmış çeşidine ait bitkiden 28'inde *Agrobacterium* aracılığıyla gerçekleştirilen transformasyonun kalıcı olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Kalıcı transformasyonun gerçekleştiği bitkilerin, %56.1'i VvMLO-52256'ya ait transgenleri, %85.7'si VvALS-91694'e ait transgenleri, % 39.2'si her iki vektöre ait transgenleri taşımaktadır.
- Transgen taşıyan bitkilerin mutasyon profilleri değerlendirildiğinde V76 ve V77 bitkisinde VvALS2 gRNA bölgesinde G177 rezidülerde 1 baz değişimi (C>A) izlenmiştir ancak mutasyonlar amino asit değişikliğine neden olmamıştır.
- Transgen taşıdığı halde sadece 2 bitkide mutasyon izlenmesinin nedenlerinden birinin bitkilerde multipleks genom düzenlemede polisistronik tRNA-gRNA sistemlerinin henüz yeni olması ve pratikte etkinliğinin henüz tam olarak ortaya konulamamış olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.
- Transgen taşımayan bitkilerde mutasyon izlenmemiştir, bu da çalışmada kullanılan klorsülfüron dozunun daha iyi bir optimizasyona ihtiyaç duyduğunu göstermektedir.
- Çalışmada izlenen *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonu çalışmalarının Siyah Kışmış çeşidinde yapılacak transformasyon çalışmalar için yol gösteri olacağı düşünülmektedir.

Gen düzenleme araştırmalarında, ilk jenerasyonda ve transgen taşımayan bitkilerin elde edilmesi, özellikle heterozigotluğu yüksek ve vejetatif yollarla çoğaltılan bitkiler için önemlidir. Son dönemde yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkan bir gen düzenleme sistemi, transgenik anaçlara aşıl原因an bitkiler kullanılarak kalıtsal ve transgen içermeyen genom düzenlemeleri oluşturmak için basit ve etkili bir yöntemi tanımlamıştır (Yang vd. 2023). Çalışma prensibi, Cas9 ve gRNA'nın TLS (kısaltma, TLS, İngilizce tRNA-like sequence kelimelerinin baş harflerini temsil etmektedir) motiflerine kaynaştırılmasıyla sağlanmaktadır. Bu yapılar, transgenik anaçlara aşıl原因mış yabancı tip sürgünlere taşınabilmekte ve böylece aşıl原因an donörde transgen taşımayan ve kalıtsal olarak düzenlenmiş genomlara sahip tohumlar üretilmektedir. Bu sistemin, bitkilerde gen transformasyonu çalışmalarında özellikle doku kültürü gibi zaman ve maliyet açısından yoğun bir aşamanın atlanabilmesine olanak sağlayarak, asmada ve diğer çok yıllık bitkilerde CRISPR/Cas9 ile gen düzenleme çalışmalarında uygulanabileceği düşünülmektedir. Çalışmada, Siyah Kışmış çeşidinde *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonunda izlenen yol haritasının, bu çeşidin transgenik anaç olarak kullanılması yoluyla ve özellikle transformasyona dirençli asma çeşitlerinin bu anaçlara aşıl原因ması ile transgen taşımayan ve istenen genetik düzenlemenin mümkün olabileceği bitkilerin geliştirilebileceği öngörülmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Abudayyeh, O. O., vd. 2017. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 550 (7675): 280-284.
- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Franklin, B., Koob, J., Kellner, M. J., Ladha, A., Joung, J., Kirchgatterer, P., Cox, D. B. ve Zhang, F. 2019. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science*, 365 (6451): 382-386.
- Acevedo-Garcia, J., Kusch, S., Panstruga, R. 2014. Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytologist*, 204 (2): 273-281.
- Agurto, M., Schlechter, R. O., Armijo, G., Solano, E., Serrano, C., Contreras, R. A., Zuniga, G. E. ve Arce-Johnson, P. (2017). RUN1 and REN1 pyramiding in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Crimson Seedless) displays an improved defense response leading to enhanced resistance to powdery mildew (*Erysiphe necator*). *Frontiers in plant science*, 8: 758.
- Akkurt, M., Şenses, İ. M. ve Erdoğan, Ü. 2018. Organic Viticulture Recent Status in Turkey and Development Opportunities. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6 (11): 1511-1516.
- Alleweldt, G. ve Possingham, J. V. 1988. Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 75 (5): 669-673.
- Alleweldt, G., Spiegel-Roy, P. ve Reisch, B. 1990. Grapes (*Vitis*). *Acta Horticulturae*, 290: 291-327.
- Altae-Tran, H., vd. 2021. The widespread IS200/IS605 transposon family encodes diverse programmable RNA-guided endonucleases. *Science*, 374 (6563): 57-65.
- Anonymous 1: State of the world vine and wine sector in 2022.
https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_Annual_Assessment-2023.pdf [Son erişim tarihi: 20.12.2023].
- Anonymous 2: Grapes Market Size & Share Analysis
<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/grapes-market> [Son erişim tarihi: 20.12.2023].
- Anzalone, A. V., Koblan, L. W. ve Liu, D. R. 2020. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature biotechnology*, 38 (7): 824-844.
- Anzalone, A. V., vd. 2019. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576 (7785): 149-157.
- Ata, H., vd. 2018. Robust activation of microhomology-mediated end joining for precision gene editing applications. *PLoS genetics*, 14 (9): e1007652.
- Atak, A. 2017. Determination of downy mildew and powdery mildew resistance of some grape cultivars. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 38 (1): 11-17.
- Bai, Y., vd. 2008. Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of Mlo function. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21 (1): 30-39.
- Barba, P., Cadle-Davidson, L., Harriman, J., Glaubitz, J. C., Brooks, S., Hyma, K. ve

- Reisch, B. 2014. Grapevine powdery mildew resistance and susceptibility loci identified on a high-resolution SNP map. *Theoretical and applied genetics*, 127: 73-84.
- Baron, C. ve Zambryski, P. C. 1996. Plant transformation: a pilus in *Agrobacterium* T-DNA transfer. *Current Biology*, 6 (12): 1567-1569.
- Bolukbasi, M. F., Liu, P., Luk, K., Kwok, S. F., Gupta, A., Amrani, N., Sontheimer, E. J., Zhu, L. J. ve Wolfe, S. A. 2018. Orthogonal Cas9–Cas9 chimeras provide a versatile platform for genome editing. *Nature communications*, 9 (1): 4856.
- Cadle-Davidson, L., Chicoine, D. R. ve Consolie, N. H. 2011. Variation within and among *Vitis* spp. for foliar resistance to the powdery mildew pathogen *Erysiphe necator*, *Plant Disease*, 95(2): 202-211.
- Caffier, V. ve Laurens, F. 2005. Breakdown of Pl-2, a major gene of resistance to apple powdery mildew, in a French experimental orchard. *Plant Pathol*, 54:116–124.
- Cardoso, H., Campos, C., Pais, S. ve Peixe, A. 2019. Somatic embryogenesis in Iberian grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars using carpels as initial explants: Protocol establishment and histological evaluation. *Journal of Agricultural Science and Technology*, B9: 15-30.
- Carra, A., Sajeve, M., Abbate, L., Siragusa, M., Pathirana, R. ve Carimi, F. 2016. Factors affecting somatic embryogenesis in eight Italian grapevine cultivars and the genetic stability of embryo-derived regenerants as assessed by molecular markers. *Scientia Horticulturae*, 204: 123-127.
- Carvalho, D. C. D., Silva, A. L. L. D., Schuck, M. R., Purcino, M., Tanno, G. N. ve Biasi, L. A. 2013. Fox grape cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) and grapevine cv. Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) cultivated in vitro under different carbohydrates, amino acids and 6-Benzylaminopurine levels. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56: 191-201.
- Chavez, A., vd. 2016. Comparison of Cas9 activators in multiple species. *Nature methods*, 13 (7): 563-567.
- Chee, R., Pool, R. ve Bucher, D. 1984. A method for large scale in vitro propagation of *Vitis*.
- Chowdhury, J., Henderson, M., Schweizer, P., Burton, R. A., Fincher, G. B. ve Little, A. 2014. Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *New Phytologist*, 204 (3): 650-660.
- Clemens, M., Faralli, M., Lagreze, J., Bontempo, L., Piazza, S., Varotto, C., Malnoy, M., Oechel W., Rizzoli, A. ve Dalla Costa, L. 2022. VvEPFL9-1 knock-out via CRISPR/Cas9 reduces stomatal density in grapevine. *Frontiers in Plant Science*, 13: 878001.
- Clog, E., Bass, P. ve Walter, B. 1990. Plant regeneration by organogenesis in *Vitis* rootstock species. *Plant cell reports*, 8: 726-728.
- Colby, S. M., Juncosa, A. M. ve Meredith, C. P. 1991. Cellular differences in *Agrobacterium* susceptibility and regenerative capacity restrict the development of transgenic grapevines. *Journal of the American Society for Horticultural*

- Science*, 116 (2): 356-361.
- Collias, D. ve Beisel, C. L. 2021. CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease. *Nature communications*, 12 (1): 555.
- Cong, L., vd. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339 (6121): 819-823.
- Conn, H. J. 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. *Journal of bacteriology*, 44 (3): 353-360.
- Consonni, C., vd. 2006. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature genetics*, 38 (6): 716-720.
- Cox, D. B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Franklin, B., Kellner, M. J., Joung, J. ve Zhang, F. 2017. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 358 (6366): 1019-1027.
- Çelik, H. 2006. Üzüm Çeşit Kataloğu. Sun Fidan AŞ Mesleki Kitaplar Serisi: 3, 165s.
- Çelik, H., Ağaoğlu, Y. S., Fidan, Y., Marasalı, B. ve Söylemezoğlu, G. 1998. Genel Bağcılık. Sun Fidan A.Ş. Mesleki Kitaplar Serisi: 1, 253s.
- Dai, L., Zhou, Q., Li, R., Du, Y., He, J., Wang, D., Cheng, S., Zhang, J. ve Wang, Y. 2015. Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121: 397-412.
- Doyle, JJ and Doyle, JL 1990. Isolation of DNA from fresh tissue. *Focus*, 12 (13): 13-15.
- Doyle, C., Higginbottom, K., Swift, T. A., Winfield, M., Bellas, C., Benito-Alifonso, D., Fletcher, T., Galan, M. C., Edwards, K. ve Whitney, H. M. 2019. A simple method for spray-on gene editing in planta. *BioRxiv*, 805036.
- Driver, J. A. ve Kuniyuki, A. H. 1984. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19 (4): 507-509.
- Dumin, W., Rostas, M. ve Winefield, C. 2018. Identification and functional characterisation of an allene oxide synthase from grapevine (*Vitis vinifera* L. Sauvignon blanc). *Molecular biology reports*, 45: 263-277.
- Dutt, M., Li, Z. T., Dhekney, S. A. ve Gray, D. J. 2007. Transgenic plants from shoot apical meristems of *Vitis vinifera* L. "Thompson Seedless" via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant cell reports*, 26: 2101-2110.
- Ergül, A., Çakır Aydemir, B. ve Yüksel Özmen, C. 2017. Asma biyoteknolojisi alanında gelişmeler. *TÜRKTOB Dergisi*, 24: 12-14.
- FABRE, J. 1977. Premiers résultats concernant l'obtention in vitro de néoformations caulinaires chez la Vigne.
- Feechan, A., Jermakow, A. M., Torregrosa, L., Panstruga, R. ve Dry, I. B. 2008. Identification of grapevine MLO gene candidates involved in susceptibility to powdery mildew. *Functional plant biology*, 35 (12): 1255-1266.
- Filiz, E. ve Vatansever, R. 2018. Genome-wide identification of mildew resistance locus

- O (MLO) genes in tree model poplar (*Populus trichocarpa*): powdery mildew management in woody plants. *European Journal of Plant Pathology*, 152: 95-109.
- Fuller, K. B., ALSton, J. M. ve Sambucci, O. S. 2014. The value of powdery mildew resistance in grapes: evidence from California. *Wine economics and policy*, 3(2): 90-107.
- Gadoury, D. M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F., Dry, I. B., Seem, R. C., Milgroom, M. G. 2012. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular plant pathology*, 13 (1): 1-16.
- Gambino, G., Ruffa, P., Vallania, R. ve Griboaud, I. 2007. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 90: 79-83.
- Gao, C. 2021. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*, 184 (6): 1621-1635.
- Gao, C., Long, D., Lenk, I. ve Nielsen, K. K. 2008. Comparative analysis of transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 27: 1601-1609.
- Garneau, J.E., Dupuis, M.E., Villion, M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadañ, A.H. ve Moineau, S. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468: 67–71.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. ve Siksnys, V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 109: E2579–E2586.
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I. ve Liu, D. R. 2017. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551 (7681): 464-471.
- Gelvin, S. B. 2017. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome. *Annual review of genetics*, 51: 195-217.
- Giacomelli, L., Zeilmaker, T., Malnoy, M., Rouppe van der Voort, J. ve Moser, C. 2018. Generation of mildew-resistant grapevine clones via genome editing. XII International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, ss. 195-200.
- Gilbert, L. A., vd. 2014. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 159 (3): 647-661.
- Gilbert, L. A., vd. 2013. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154 (2): 442-451.
- Gootenberg, J. S., vd. 2017. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356 (6336): 438-442.
- Guan, X., Zhao, H., Xu, Y. ve Wang, Y. 2013. Studies on gene transfer of shoot apical meristems by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in a progeny of Chinese wild. *Vitis*, 52 (4): 185-192.

- Guo, M., Ye, J., Gao, D., Xu, N. ve Yang, J. 2019. Agrobacterium-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. *Biotechnology advances*, 37 (1): 259-270.
- Güler, A. ve Candemir, A. 2013. Çekirdeksiz kuru üzüm üretiminde alternatif çeşitler ve kuru üzüm karakteristiklerinin belirlenmesi. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 27.
- Heindl, J. E., Wang, Y., Heckel, B. C., Mohari, B., Feirer, N. ve Fuqua, C. 2014. Mechanisms and regulation of surface interactions and biofilm formation in Agrobacterium. *Frontiers in Plant Science*, 5: 176.
- Hess, G. T., Frésard, L., Han, K., Lee, C. H., Li, A., Cimprich, K. A., Montgomery, S. M. ve Bassik, M. C. 2016. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. *Nature methods*, 13 (12): 1036-1042.
- Hiei, Y., Komari, T. ve Kubo, T. 1997. Transformation of rice mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Plant molecular biology*, 35: 205-218.
- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. ve Chilton, M. D. 1986. The hypervirulence of Agrobacterium tumefaciens A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of bacteriology*, 168 (3): 1291-1301.
- Hua, K., Tao, X., Yuan, F., Wang, D. ve Zhu, J. K. 2018. Precise A·T to G·C base editing in the rice genome. *Molecular plant*, 11 (4): 627-630.
- Hückelhoven, R. 2014. The effective papilla hypothesis, *New Phytologist*, 204 (3): 438-440.
- Hwang, H. H., Wang, M. H., Lee, Y. L., Tsai, Y. L., Li, Y. H., Yang, F. J., Liao, Y. H., Lin, S. K. ve Lai, E. M. 2010. Agrobacterium-produced and exogenous cytokinin-modulated Agrobacterium-mediated plant transformation. *Molecular plant pathology*, 11 (5): 677-690.
- Hwang, H. H., Wu, E. T., Liu, S. Y., Chang, S. C., Tzeng, K. C. ve Kado, C. I. 2013. Characterization and host range of five tumorigenic Agrobacterium tumefaciens strains and possible application in plant transient transformation assays. *Plant pathology*, 62 (6): 1384-1397.
- Hwang, H. H., Yu, M. ve Lai, E. M. 2017. Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15.
- Iovieno, P., Bracuto, V., Pavan, S., Lotti, C., Ricciardi, L. ve Andolfo, G. 2016. Identification and functional inference on the mlo family in viridiplantae, *Journal of Plant Pathology*, 587-594.
- Jaillon, O., vd. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449 (7161): 463.
- Jardak-Jamoussi, R., Bouamama, B., Mliki, A., Ghorbel, A. ve Reustle, G. M. 2008. The use of phosphinothricin resistance as selectable marker for genetic transformation of grapevine. *Vitis-Geilweilerhof*-, 47 (1): 35.
- Jardak-Jamoussi, R., Winterhagen, P., Bouamama, B., Dubois, C., Mliki, A., Wetzels, T., Ghorbel, A. ve Reustle, G. M. 2009. Development and evaluation of a GFLV inverted repeat construct for genetic transformation of grapevine. *Plant Cell*,

- Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 97: 187-196.
- Jiang, W. ve Marraffini, L. A. 2015. CRISPR-Cas: new tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems. *Annual review of microbiology*, 69: 209-228.
- Jiao, B., vd. 2022. Engineering CRISPR immune systems conferring GLRaV-3 resistance in grapevine. *Horticulture Research*, 9: uhab023.
- Jiao, W. U., ZHANG, Y. L., HE, R. R., Lei, Z. H. U., WANG, C. X., Xia, X. U. ve Jiang, L. U. 2012. Optimization of transformation efficiency of suspension cultured *Vitis vinifera* cv. Chardonnay embryogenic cells. *Journal of Integrative Agriculture*, 11 (3): 387-396.
- Jin, S., Fei, H., Zhu, Z., Luo, Y., Liu, J., Gao, S., Zhang, F., Chen, Y. H., Wang, Y. Ve Gao, C. 2020. Rationally designed APOBEC3B cytosine base editors with improved specificity. *Molecular cell*, 79 (5): 728-740.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. ve Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, 337 (6096): 816-821.
- Jittayasothorn, Y., Yang, Y., Chen, S., Wang, X. ve Zhong, G. Y. 2011. Influences of *Agrobacterium rhizogenes* strains, plant genotypes, and tissue types on the induction of transgenic hairy roots in *Vitis* species. *Vitis*, 50 (3): 107-114.
- Jørgensen, I. H. 1992. Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, 63 (1-2): 141-152.
- Kannan, S., Altae-Tran, H., Jin, X., Madigan, V. J., Oshiro, R., Makarova, K. S., Koonin, E. V. ve Zhang, F. 2022. Compact RNA editors with small Cas13 proteins. *Nature biotechnology*, 40 (2): 194-197.
- Karvelis, T., vd. 2020. PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage. *Nucleic acids research*, 48 (9): 5016-5023.
- Keskin, N. ve Kunter, B. 2005. Asma Fitoaleksinleri. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10 (1): 42-46.
- Kikkert, J. R., Striem, M. J., Vidal, J. R., Wallace, P. G., Barnard, J. ve Reisch, B. I. 2005. Long-term study of somatic embryogenesis from anthers and ovaries of 12 grapevine (*Vitis* sp.) genotypes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41: 232-239.
- Kim, M. C., Panstruga, R., Elliott, C., Müller, J., Devoto, A., Yoon, H. W., Park, H. C., Cho, M. J. ve Schulze-Lefert, P. 2002. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature*, 416 (6879): 447-451.
- Koblan, L. W., vd. 2021. Efficient C•G-to-G•C base editors developed using CRISPRi screens, target-library analysis, and machine learning. *Nature biotechnology*, 39 (11): 1414-1425.
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. ve Liu, D. R. 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533 (7603), 420-424.
- Koncz, C. vd Schell, J. 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific

- expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics MGG*, 204: 383-396.
- Koncz, C., De Greve, H., André, D., Deboeck, F., Van Montagu, M. ve Schell, J. 1983. The opine synthase genes carried by Ti plasmids contain all sign^{ALS} necessary for expression in plants. *The EMBO Journal*, 2 (9): 1597-1603.
- Konermann, S., Lotfy, P., Brideau, N. J., Oki, J., Shokhirev, M. N. ve Hsu, P. D. 2018. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*, 173 (3): 665-676.
- Kovács, L. G. ve Pueppke, S. G. 1994. Mapping and genetic organization of pTiChry5, a novel Ti plasmid from a highly virulent *Agrobacterium tumefaciens* strain. *Molecular and General Genetics MGG*, 242: 327-336.
- Lazo, G. R., Stein, P. A. ve Ludwig, R. A. 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Bio/technology*, 9 (10): 963-967.
- Li, M. Y., Jiao, Y. T., Wang, Y. T., Zhang, N., Wang, B. B., Liu, R. Q., Yin, X., Xu, Y. ve Liu, G. T. 2020. CRISPR/Cas9-mediated VvPR4b editing decreases downy mildew resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Horticulture research*, 7.
- Li, S., Yuan, B., Cao, J., Chen, J., Chen, J., Qiu, J., Zhao, X. M., Wang, X., Qui, Z. ve Cheng, T. L. 2020. Docking sites inside Cas9 for adenine base editing diversification and RNA off-target elimination. *Nature Communications*, 11 (1): 5827.
- Li, Y., Mansour, H., Wang, T., Poojari, S. ve Li, F. 2019. Naked-eye detection of grapevine red-blotch viral infection using a plasmonic CRISPR Cas12a assay. *Analytical Chemistry*, 91 (18): 11510-11513.
- Lin, B. C. ve Kado, C. I. 1977. Studies on *Agrobacterium tumefaciens*. VII. Avirulence induced by temperature and ethidium bromide. *Canadian Journal of Microbiology*, 23 (11): 1554-1561.
- Lin, Q., vd. 2021. Genome editing in plants with MAD7 nuclease. *Journal of Genetics and Genomics*. 48 (6): 444-451.
- Linsmaier, E. M. ve Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 18 (1): 100-127.
- Liu, G., Lin, Q., Jin, S. ve Gao, C. 2022. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Molecular cell*.
- Lloyd, G. ve McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture, 30: 421-427.
- López-Pérez, A. J., Velasco, L., Pazos-Navarro, M. ve Dabauza, M. 2008. Development of highly efficient genetic transformation protocols for table grape Sugraone and Crimson Seedless at low *Agrobacterium* density. *Plant cell, tissue and organ culture*, 94: 189-199.
- Lu, J., den Dulk-Ras, A., Hooykaas, P. J. ve Glover, J. M. 2009. *Agrobacterium tumefaciens* VirC2 enhances T-DNA transfer and virulence through its C-terminal

- ribbon–helix–helix DNA-binding fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (24): 9643-9648.
- Lv, Z., Jiang, R., Chen, J. ve Chen, W. 2020. Nanoparticle-mediated gene transformation strategies for plant genetic engineering. *The Plant Journal*, 104 (4): 880-891.
- Ma, Y., Zhang, J., Yin, W., Zhang, Z., Song, Y. ve Chang, X. 2016. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nature methods*, 13 (12): 1029-1035.
- Maeder, M. L. ve Gersbach, C. A. 2016. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Molecular Therapy*, 24 (3): 430-446.
- Maillot, P., Deglène-Benbrahim, L. ve Walter, B. 2016. Efficient somatic embryogenesis from meristematic explants in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Chardonnay: An improved protocol. *Trees*, 30: 1377-1387.
- Makarova, K. S., vd. 2020. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 18 (2): 67-83.
- Malnoy, M., Viola, R., Jung, M. H., Koo, O. J., Kim, S., Kim, J. S., Velasco, R. ve Nagamangala Kanchiswamy, C. 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Frontiers in plant science*, 7: 1904.
- Martinelli, L. Ve Mandolino, G. 1994. Genetic transformation and regeneration of transgenic plants in grapevine (*Vitis rupestris* S.). *Theoretical and applied genetics*, 88: 621-628.
- Mezzetti, B., Pandolfini, T., Navacchi, O. ve Landi, L. 2002. Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. *BMC biotechnology*, 2: 1-10.
- Miclot, A., Wiedemann-Merdinoglu, S., Duchêne, E., Merdinoglu, D. ve Mestre, P. 2012. A standardised method for the quantitative analysis of resistance to grapevine powdery mildew, *Eur J Plant Pathol*, 133: 483-495.
- Ming, M., vd. 2020. CRISPR–Cas12b enables efficient plant genome engineering. *Nature plants*, 6 (3): 202-208.
- Moon, S. B., Kim, D. Y., Ko, J. H. ve Kim, Y. S. 2019. Recent advances in the CRISPR genome editing tool set. *Experimental & molecular medicine*, 51 (11): 1-11.
- Mullins, M. G. ve Srinivasan, C. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-Sauvignon) by apomixis in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 27 (5): 1022-1030.
- Murashige, T. ve Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15 (3): 473-497.
- Najafi, S., Bertini, E., D’Inca, E., Fasoli, M. ve Zenoni, S. 2023. DNA-free genome editing in grapevine using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes followed by protoplast regeneration. *Horticulture Research*, 10 (1): uhac240.
- Nakajima, I., Ban, Y., Azuma, A., Onoue, N., Moriguchi, T., Yamamoto, T., Toki, S. ve Endo, M. 2017. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. *PLoS One*, 12 (5): e0177966.

- Nakajima, I., Endo, M., Haji, T., Moriguchi, T. ve Yamamoto, T. 2020. Embryogenic callus induction and Agrobacterium-mediated genetic transformation of ‘Shine Muscat’grape. *Plant Biotechnology*, 37 (2): 185-194.
- Nakamura, M., Gao, Y., Dominguez, A. A. ve Qi, L. S. 2021. CRISPR technologies for precise epigenome editing. *Nature Cell Biology*, 23 (1): 11-22.
- Nakano, M., Hoshino, Y. ve Mii, M. 1994. Regeneration of transgenic plants of grapevine (*Vitis vinifera* L.) via Agrobacterium rhizogenes mediated transformation of embryogenic calli. *Journal of Experimental Botany*, 45 (5): 649-656.
- Nguyen Tran, M. T., Mohd Khalid, M. K. N., Wang, Q., Walker, J. K., Lidgerwood, G. E., Dilworth, K. L., Lisowski, L., Pebay, A. W. ve Hewitt, A. W. 2020. Engineering domain-inlaid SaCas9 adenine base editors with reduced RNA off-targets and increased on-target DNA editing. *Nature Communications*, 11 (1): 4871.
- Nicholson, K. L., Tarlyn, N., Armour, T., Swanson, M. E. ve Dhingra, A. 2012. Effect of phyllotactic position and cultural treatments toward successful direct shoot organogenesis in dwarf ‘Pixie’grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 111: 123-129.
- Nishida, K., vd. 2016. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 353 (6305): aaf8729.
- Nitsch, J. P. ve Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163 (3862): 85-87.
- Núñez, J. K., vd. 2021. Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. *Cell*, 184 (9): 2503-2519.
- Ooms, G., Hooykaas, P. J., Van Veen, R. J., Van Beelen, P., Regensburg-Tuïnk, T. J. ve Schilperoort, R. A. 1982. Octopine Ti-plasmid deletion mutants of Agrobacterium tumefaciens with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, 7 (1): 15-29.
- Osakabe, Y., vd. 2018. CRISPR–Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine. *Nature Protocols*, 13 (12): 2844-2863.
- Özcan, A., Krajcski, R., Ioannidi, E., Lee, B., Gardner, A., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Abudayyeh, O. O. ve Gootenberg, J. S. 2021. Programmable RNA targeting with the single-protein CRISPR effector Cas7-11. *Nature*, 597 (7878): 720-725.
- Panstruga, R. 2005. Serpentine plant MLO proteins as entry portALS for powdery mildew fungi. *Biochemical Society Transactions*, 33 (2): 389-392.
- Park, S. ve Beal, P. A. 2019. Off-target editing by CRISPR-guided DNA base editors. *Biochemistry*, 58 (36): 3727-3734.
- Pearson, R.C. ve Gadoury, D.M. 1992. Powdery Mildew of Grape. Plant diseases of international importance. Vol III. Diseases of fruit crops, Englewood Cliffs, N.J, Prentice Hall.
- Peiró, R., Gammoudi, N., Yuste, A., Olmos, A. ve Gisbert, C. 2015. Mature seeds for in vitro sanitation of the Grapevine leafroll associated virus (GLRaV-1 and GLRaV-3) from grape (*Vitis vinifera* L.). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13

(2): e1005-e1005.

- Pessina, S. 2016. Role of MLO genes in susceptibility to powdery mildew in apple and grapevine. Doktora Tezi, Wageningen University, 222 s.
- Pessina, S., Lenzi, L., Perazzolli, M., Campa, M., Dalla Costa, L., Urso, S., Vale, G., Salamini, F., Velasco, R. ve Malnoy, M. 2016. Knockdown of MLO genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevine. *Horticulture research*, 3 (1): 1-9.
- Pickar-Oliver, A., vd. 2019. Targeted transcriptional modulation with type I CRISPR–Cas systems in human cells. *Nature biotechnology*, 37 (12): 1493-1501.
- Prado, M. J., Grueiro, M. P., González, M. V., Testillano, P. S., Domínguez, C., López, M. ve Rey, M. 2010. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from anthers and ovaries of six autochthonous grapevine cultivars from Galicia (Spain). *Scientia Horticulturae*, 125 (3): 342-352.
- Pratiwi, R. A. ve Surya, M. I. 2020. Agrobacterium-mediated transformation. Genetic Transformation in Crops. To, K., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2020
- Primrose, S. B. ve Twyman, R. 2006. Principles of gene manipulation and genomics. John Wiley & Sons.
- Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P. ve Lim, W.A. 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, 152 (5): 1173–1183.
- Qiu, W., Feechan, A. ve Dry, I. 2015. Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. *Horticulture research*, 2 (1): 1-9.
- Ren, C., Gathunga, E. K., Li, X., Li, H., Kong, J., Dai, Z. ve Liang, Z. 2023. Efficient genome editing in grapevine using CRISPR/LbCas12a system. *Molecular Horticulture*, 3 (1): 21.
- Ren, C., Guo, Y., Kong, J., Lecourieux, F., Dai, Z., Li, S. ve Liang, Z. 2020. Knockout of VvCCD8 gene in grapevine affects shoot branching. *BMC plant biology*, 20 (1): 1-8.
- Ren, C., Li, H., Liu, Y., Li, S. ve Liang, Z. 2022. Highly efficient activation of endogenous gene in grape using CRISPR/dCas9-based transcriptional activators. *Horticulture Research*, 9: uhab037.
- Ren, C., Liu, X., Zhang, Z., Wang, Y., Duan, W., Li, S. ve Liang, Z. 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Scientific reports*, 6 (1): 32289.
- Ren, C., Liu, Y., Guo, Y., Duan, W., Fan, P., Li, S. ve Liang, Z. 2021. Optimizing the CRISPR/Cas9 system for genome editing in grape by using grape promoters. *Horticulture research*, 8.
- Ren, F., Ren, C., Zhang, Z., Duan, W., Lecourieux, D., Li, S. ve Liang, Z. 2019. Efficiency optimization of CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. *Frontiers in plant science*, 10: 612.
- Sabbadini, S., Capriotti, L., Molesini, B., Pandolfini, T., Navacchi, O., Limera, C. ve Mezzetti, B. 2019. Comparison of regeneration capacity and Agrobacterium-

- mediated cell transformation efficiency of different cultivars and rootstocks of *Vitis* spp. via organogenesis. *Scientific reports*, 9 (1): 582.
- Sabir, F. K. ve Sabir, A. 2017. Extending postharvest quality attributes of grapes (*V. vinifera* L. cv. 'Thompson Seedless') by preharvest calcium pulverizations. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 16 (5): 29-38.
- Sabir, F. K. ve Sabir, A. 2019. Pre-harvest Micronized Calcium and Postharvest UV-C Treatments Extend the Quality of 'Crimson Seedless' (*Vitis vinifera* L.) Grapes. *Erwerbs-Obstbau*, 61.
- Sabir, F. K., Sabir, A. ve Unal, S. 2020. Chitosan coating and UV-C irradiation to maintain postharvest quality of minimally processed table grapes cv 'Michele Palieri'. *Erwerbs-Obstbau*, 62 (1): 35-42.
- Saleh, M. M. S., Ashour, N. E., El-Sheikh, M. H. ve El-Naggar, M. A. A. 2007. Foliar sprays of potassium dihydrogen phosphate and their impact on yield, fruit quality and controlling powdery mildew disease of Thompson Seedless grapevines. *Agr. Environ. Sci*, 2: 133-140.
- Saporta, R., San Pedro, T. ve Gisbert, C. 2016. Attempts at grapevine (*Vitis vinifera* L.) breeding through genetic transformation: the main limiting factors. *Vitis*, 55 (4): 173-186.
- Shen, M. W., Arbab, M., Hsu, J. Y., Worstell, D., Culbertson, S. J., Krabbe, O., Cassa, C. A., Liu, D. R., Gifford, D. K. ve Sherwood, R. I. 2018. Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. *Nature*, 563 (7733): 646-651.
- Shimatani, Z., vd. 2017. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature biotechnology*, 35 (5): 441-443.
- Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sakagami, Y. ve Machida, Y. 1990. Control of expression of *Agrobacterium* vir genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (17): 6684-6688.
- Smith, E. F. ve Townsend, C. O. 1907. A plant-tumor of bacterial origin. *Science*, 25 (643): 671-673.
- Stamp, J. A., Colby, S. M. ve Meredith, C. P. 1990. Improved shoot organogenesis from leaves of grape. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115 (6): 1038-1042.
- Strecker, J., Jones, S., Koopal, B., Schmid-Burgk, J., Zetsche, B., Gao, L., Makarova, K. S., Koonin, E. V. ve Zhang, F. 2019. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nature communications*, 10 (1): 212.
- Sunitha, S. ve Rock, C. D. 2020. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of TAS4 and MYBA7 loci in grapevine rootstock 101-14. *Transgenic research*, 29 (3): 355-367.
- Suzuki, K., Hattori, Y., Uraji, M., Ohta, N., Iwata, K., Murata, K., Kato, A. ve Yoshida, K. 2000. Complete nucleotide sequence of a plant tumor-inducing Ti plasmid. *Gene*, 242 (1-2): 331-336.

- Tian, S., vd. 2018. Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. *Plant cell reports*, 37 (9): 1353-1356.
- Torregrosa, L., Iocco, P. ve Thomas, M. R. 2002. Influence of Agrobacterium strain, culture medium, and cultivar on the transformation efficiency of *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53 (3): 183-190.
- Tu, M., Fang, J., Zhao, R., Liu, X., Yin, W., Wang, Y., Wang, X., Wang, X. ve Fang, Y. 2022. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of VvbZIP36 promotes anthocyanin accumulation in grapevine (*Vitis vinifera*). *Horticulture Research*, 9: uhac022
- Ünal, A. ve Soltekin, O. 2018. Dünya kurutmalık üzüm üretimi ve ticareti. *Bahçe*, 47: 1-9.
- van Beljouw, S. P., Haagsma, A. C., Rodríguez-Molina, A., van den Berg, D. F., Vink, J. N. ve Brouns, S. J. 2021. The gRAMP CRISPR-Cas effector is an RNA endonuclease complexed with a caspase-like peptidase. *Science*, 373 (6561): 1349-1353.
- van Schie, C. C. ve Takken, F. L. 2014. Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annual review of phytopathology*, 52: 551-581.
- Veillet, F., Perrot, L., Chauvin, L., Kermarrec, M. P., Guyon-Debast, A., Chauvin, J. E., Nogue, F. ve Mazier, M. 2019. Transgene-free genome editing in tomato and potato plants using agrobacterium-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (2): 402.
- Veillet, F., Kermarrec, M. P., Chauvin, L., Guyon-Debast, A., Chauvin, J. E., Gallois, J. L. ve Nogué, F. 2020. Prime editing is achievable in the tetraploid potato, but needs improvement. *BioRxiv*, 2020-06.
- Veluthambi, K., Jayaswal, R. K. ve Gelvin, S. B. 1987. Virulence genes A, G, and D mediate the double-stranded border cleavage of T-DNA from the Agrobacterium Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84 (7): 1881-1885.
- Vidal, J. R., Rama, J., Taboada, L., Martin, C., Ibanez, M., Segura, A. ve González-Benito, M. E. 2009. Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration. *Plant cell, tissue and organ culture*, 96: 85-94.
- Wan, D. Y., Guo, Y., Cheng, Y., Hu, Y., Xiao, S., Wang, Y. ve Wen, Y. Q. 2020. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of VvMLO3 results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*). *Horticulture research*, 7 (1): 1-14.
- Wang, H., La Russa, M. ve Qi, L. S. 2016. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annual review of biochemistry*, 85: 227-264.
- Wang, H., Wang, W., Zhan, J., Huang, W. ve Xu, H. 2015. An efficient PEG-mediated transient gene expression system in grape protoplasts and its application in subcellular localization studies of flavonoids biosynthesis enzymes. *Scientia Horticulturae*, 191: 82-89.
- Wang, S., Zong, Y., Lin, Q., Zhang, H., Chai, Z., Zhang, D., Chen, K., Qui, J. L. ve Gao, C. 2020. Precise, predictable multi-nucleotide deletions in rice and wheat using APOBEC-Cas9. *Nature biotechnology*, 38 (12): 1460-1465.

- Wang, X., Tu, M., Li, Z., Wang, Y. ve Wang, X. 2018. Current progress and future prospects for the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) genome editing technology in fruit tree breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 37 (4): 233-258.
- Wang, X., Tu, M., Wang, D., Liu, J., Li, Y., Li, Z., Wang, Y. ve Wang, X. 2018. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. *Plant biotechnology journal*, 16 (4): 844-855.
- Wang, X., Tu, M., Wang, Y., Yin, W., Zhang, Y., Wu, H., Gu, Y., Li, Z., Xi, Z. ve Wang, X. 2021. Whole-genome sequencing reveals rare off-target mutations in CRISPR/Cas9-edited grapevine. *Horticulture research*, 8.
- Wang, Y., Liu, X., Ren, C., Zhong, G. Y., Yang, L., Li, S. ve Liang, Z. 2016. Identification of genomic sites for CRISPR/Cas9-based genome editing in the *Vitis vinifera* genome. *BMC plant biology*, 16 (1): 1-7.
- Winterhagen, P., Howard, S. F., Qiu, W. ve Kovács, L. G. 2008. Transcriptional up-regulation of grapevine MLO genes in response to powdery mildew infection. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59 (2): 159-168.
- Wolfs, J. M., Hamilton, T. A., Lant, J. T., Laforet, M., Zhang, J., Salemi, L. M., Gloor G. B., Schild-Poulter, C. ve Edgell, D. R. 2016. Biasing genome-editing events toward precise length deletions with an RNA-guided TevCas9 dual nuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (52): 14988-14993.
- Xie, K., Minkenberg, B. ve Yang, Y. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (11): 3570-3575.
- Xie, X., Agüero, C. B., Wang, Y. ve Walker, M. A. 2016. Genetic transformation of grape varieties and rootstocks via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126: 541-552.
- Xie, X., Liu, W., Dong, G., Zhu, Q. ve Liu, Y. G. 2021. MMEJ-KO: a web tool for designing paired CRISPR guide RNAs for microhomology-mediated end joining fragment deletion. *Science China Life Sciences*, 64: 1021-1024.
- Xu, C., vd. 2021a. Programmable RNA editing with compact CRISPR–Cas13 systems from uncultivated microbes. *Nature methods*, 18 (5): 499-506.
- Xu, Z., Li, Y., Li, M., Xiang, H. ve Yan, A. 2021b. Harnessing the type I CRISPR-Cas systems for genome editing in prokaryotes. *Environmental Microbiology*, 23 (2): 542-558.
- Yang, L., Machin, F., Wang, S., Saplaoura, E. ve Kragler, F. 2023. Heritable transgene-free genome editing in plants by grafting of wild-type shoots to transgenic donor rootstocks. *Nature Biotechnology*, 1-10.
- Young, J. K., Gasior, S. L., Jones, S., Wang, L., Navarro, P., Vickroy, B. ve Barrangou, R. 2019. The repurposing of type I CRISPR-Cascade for gene activation in plants. *Communications biology*, 2 (1): 383.
- Zetsche, B., vd. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163 (3): 759-771.

- Zetsche, B., vd. 2017. Multiplex gene editing by CRISPR–Cpf1 using a single crRNA array. *Nature biotechnology*, 35 (1): 31-34.
- Zhang, P., Yu, Z. Y., Cheng, Z. M., Zhang, Z. ve Tao, J. M. 2011. In vitro explants regeneration of the grape ‘Wink’(*Vitis vinifera* L.‘Wink’). *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 3 (11): 276-282.
- Zhang, X. M., Wu, Y. F., Zhi, L. I., Song, C. B., & Wang, X. P. 2021. Advancements in plant regeneration and genetic transformation of grapevine (*Vitis* spp.). *Journal of Integrative Agriculture*, 20 (6): 1407-1434.
- Zhang, X., vd. 2020. Increasing the efficiency and targeting range of cytidine base editors through fusion of a single-stranded DNA-binding protein domain. *Nature cell biology*, 22 (6): 740-750.
- Zhao, D., Li, J., Li, S., Xin, X., Hu, M., Price, M. A., Rosser, S. J. ve Zhang, X. 2021. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nature biotechnology*, 39 (1): 35-40.
- Zheng, Z., Appiano, M., Pavan, S., Bracuto, V., Ricciardi, L., Visser, R. G., Wolters, A. M. ve Bai, Y. 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.
- Zheng, Z., Nonomura, T., Appiano, M., Pavan, S., Matsuda, Y., Toyoda, H., Wolters, A. M., Visser R. G. F. ve Bai, Y. 2013. Loss of function in Mlo orthologs reduces susceptibility of pepper and tomato to powdery mildew disease caused by *Leveillula taurica*. *PloS one*, 8(7): e70723.
- Zong, Y., Wang, Y., Li, C., Zhang, R., Chen, K., Ran, Y., Qui, J. L., Wanf, D. ve Gao, C. 2017. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nature biotechnology*, 35 (5): 438-440.

ÖZGEÇMİŞ

SELCEN DOĞAN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2018-2024	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2013-2016	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2003-2012	Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Doku Kültürü Sorumlusu 2022-Devam Ediyor	Areo Tohumculuk, Antalya
Dış Ticaret Sorumlusu 2014-2017	Merkez Anadolu Kimya, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Doğan, S. ve Arı, E. 2019. The effect of shaker use on embryo yield in shed-microspore cultures of ornamental peppers. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 5 (2): 299-307. Doi: 10.24180/ijaws.627679

2- Arı, E., Bedir, H., Yıldırım, S. ve Yıldırım T. 2016. Androgenic responses of 64 ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to shed-microspore culture in the autumn season. *Turkish Journal of Biology*, 40 (3): 706-717. Doi: 10.3906/biy-1505-41

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

1- Bülbül, C., Soylu, İ., Doğan, S., Girgin, S. M. ve Mutlu, N. 2023. The Basic Experimental Setup for the vacuum-assisted, Agrobacterium-mediated transient expression in tomato. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 10 (1): 97-106. Doi: 10.30910/turkjans.1112981

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Şimşek, D., Şimşek, C., Doğan, S. ve İkten, C. 2023. Development of yellow rust resistant wheat lines with the combination of RT-PCR, haploid and speed breeding technologies. *II. International Plant Protection Congress* (Basılı Sözlü Bildiri), 2023, Bursa

2- Doğan, S., Soylu, İ., Şimşek, C., Kaba, A., Akçakale, F., Karabeniz, A., Pakashtica, V., Bostan, A. B., Pınar, H. ve Mutlu, N. 2022. Sırik Domateste Crispr-Cas9 teknolojisi ile old-gold crimson mutasyonunun oluşturulması. *13. Sebzecilik Tarımı Sempozyumu* (Basılı Sözlü Bildiri), 2022, İzmir

3- Kaba, A., Doğan, S., Akçakale, F., Soylu, İ., Şimşek, C., Pınar, H. ve Mutlu, N. 2022 Domateste CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak canavar otu (*Orobancha spp.*, *Phelipanche spp.*)'na dayanıklı anaç Geliştirilmesi. *13. Sebzecilik Tarımı Sempozyumu* (Basılı Sözlü Bildiri), 2022, İzmir

4- Doğan, S., Olgun, B., Bingöl, F., Mısırlıoğlu, C., Erdem, A., Moral, Ç. ve Doğan G. 2019. Use of mosses as bio-tracers of air pollutants and cultivation of mosses in the laboratory. *I. Uluslararası Bilim ve İnovasyon Kongresi* (Basılı Tam Metin), 2019, Denizli