

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**CRISPR/Cas9 YOLUYLA *Lsi-1* GENİ (PUTATIVE) SUSTURULMUŞ
DOMATES (*Solanum lycopersicum* L.) BİTKİLERİNDE SİLİKON ALIMININ
BELİRLENMESİ**

Durmuş ÇETİN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

AĞUSTOS 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**CRISPR/Cas9 YOLUYLA *Lsi-1* GENİ (PUTATIVE) SUSTURULMUŞ
DOMATES (*Solanum lycopersicum* L.) BİTKİLERİNDE SİLİKON ALIMININ
BELİRLENMESİ**

Durmuş ÇETİN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

AĞUSTOS 2020

ANTALYA

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

**CRISPR/Cas9 YOLUYLA *Lsi-1* GENİ (PUTATIVE) SUSTURULMUŞ
DOMATES (*Solanum lycopersicum* L.) BİTKİLERİNDE SİLİKON ALIMININ
BELİRLENMESİ**

**Durmuş ÇETİN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu tez Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2019-4802 nolu proje ile desteklenmiştir.

AĞUSTOS 2020

ÖZET

CRISPR/Cas9 YOLUYLA *Lsi-1* GENİ (PUTATIVE) SUSTURULMUŞ DOMATES (*Solanum lycopersicum* L.) BİTKİLERİNDE SİLİKON ALIMININ BELİRLENMESİ

Durmuş ÇETİN

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. M. Aydın AKBUDAK

Ağustos 2020; 65 sayfa

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), patatesten sonra Dünya’da en çok tüketilen ve gıda sanayii için çok önemli bir sebzedir. Tuzluluk ve kuraklık gibi abiyotik stresler, domatesin yaşam döngüsünü olumsuz yönde etkilemek suretiyle verim düşüşüne sebep olmaktadır. Abiyotik streslerin yol açtığı olumsuzlukların giderilmesinde silisyumun faydaları ve silisyum alım mekanizmaları çeltik, arpa, mısır ve bazı diğer bitkilerde yapılan çalışmalar ile aydınlatılmıştır. Ancak, literatürde domateste silisyum alım mekanizması ile sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

Bu çalışmada, domateste silisyum alımından sorumlu genlerden biri olduğu *in silico* olarak gösterilmiş olan *SILsi1* geni CRISPR/Cas9 sistemi ile kesilmiştir. T₁ bitkileri üzerinde yapılan sekans analizleri, CRISPR/Cas9 ile yapılan genetik modifikasyonun kalıtsal olduğunu göstermiştir. *SILsi1* geninin domateste silisyum alımından sorumlu gen olduğunun fizyolojik ve transkriptomik analizlerle kanıtlanması planlanmış, ancak yüksek kimerizm oranına sahip, yetersiz sayıda T₁ bitkisi elde edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: CRISPR/Cas9, Domates, Gen susturma, *Lsi1*, Silisyum alımı

JÜRİ: Doç. Dr. M. Aydın AKBUDAK (Danışman)

Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Ali Tefik UNCU

ABSTRACT

DETERMINATION OF SILICON UPTAKE IN *LSI-1* (PUTATIVE) SILENCED TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) PLANTS USING CRISPR/Cas9

Durmuş ÇETİN

MSc Thesis in The Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. M. Aydın AKBUDAK

August 2019; 65 pages

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is the second most consumed vegetable worldwide after potato and very important input for the food industry. Abiotic stresses such as salinity and drought affect the life cycles of tomato, which results in yield losses. The beneficial effects of silicon to overcome these stresses and the silicon transport mechanisms in rice, barley, maize and some other crops have been illuminated. However, there is a limited number of reports in the literature about the silicon uptake mechanism in tomato.

In the present research, *SILsi1*, which was demonstrated *in silico* as one of the genes functioning in silicon uptake in tomato, was silenced using CRISPR/Cas9 system. The analyses on the T1 plants revealed that the CRISPR/Cas9-mediated genetic modifications were inherited to the progeny. The physiologic and transcriptomic analyses proved that *SILsi1* was responsible in silicon uptake in tomato, but insufficient number of T1 plants with high chimerism rate were obtained.

KEYWORDS: CRISPR/Cas9, Gene knock-out, *Lsi1*, Silicon uptake, Tomato

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. M. Aydın AKBUDAK

Assoc. Prof. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

Asst. Prof. Dr. Ali Tefvik UNCU

ÖNSÖZ

Lisans öğrenimimden bu yana bana rehberlik eden, yüksek lisans çalışmalarım süresince beni destekleyen, eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, değerli bilgilerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, danışman hocam Doç. Dr. Aydın AKBUDAK'a teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca aynı laboratuvarı paylaştığım, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Sadece eğitim hayatımda değil, tüm hayatım boyunca bana olan güvenlerini ve desteklerini bir an olsun esirgememiş, her zaman yanımda olduklarını bildiğim, babam Ahmet ÇETİN'e, annem Handan ÇETİN'e, kardeşlerim Emine ÇETİN, Esra ÇETİN ve Elif ÇETİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak iyi ki tanışmışım dediğim, her kötü anımda yanımda olan, desteklerini benden bir an olsun eksik etmeyen, müstakbel eşim Beyza BOZTOPRAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	2
2.1. Domates.....	2
2.2. Kuraklık ve Tuz Stresi	3
2.3. Silisyumun Bitkiler Üzerindeki Etkileri	4
2.4. Genom Araştırma Yöntemleri.....	5
2.5. Yeni Nesil Genom Düzenleme Araçları	5
2.5.1. ZFN'ler (Zinc finger nucleases).....	5
2.5.2. TALEN'ler (Transcription Activator Like Effector Nucleases)	6
2.5.3. CRISPR/Cas9 sistemi (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated)	7
2.6. Genom Düzenleme ve DNA Onarım Mekanizmaları.....	9
2.7. Çeltikte <i>Lsi1</i> Geni ve Diğer Bitkilerdeki Ortologları.....	10
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. gRNA Tasarımı ve Vektör Dizayını.....	13
3.1.1. <i>SpeI</i> kesimi	14
3.1.2. Pürifikasyon	14
3.1.3. <i>SwaI</i> kesimi	14
3.1.4. Ligasyon.....	15
3.1.5. Vektörün çoğaltılması	16
3.1.6. Koloni PCR ile doğrulama	17
3.1.7. Plazmid izolasyonu	18
3.1.8. Sanger sekanslama ile doğrulama	18
3.2. Elde Edilen Transformasyon Vektörünün (<i>SILsi1</i> -CRISPR) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e Aktarılması.....	18

3.3.	<i>Agrobacterium</i> Aracılığıyla Transformasyon	19
3.3.1.	Bitki yetiştirilmesi.....	19
3.3.2.	<i>Agrobacteriumun</i> hazırlanması	20
3.3.3.	Eksplantların hazırlanması	20
3.3.5.	Transformasyon.....	23
3.3.6.	Transformantların rejenere edilmesi	24
3.4.	Aklimatizasyon	25
3.5.	PCR ile Transformasyonun Doğrulanması	25
3.6.	Dizi Analizi ile Doğrulama	26
3.7.	RT-qPCR ile mRNA Analizi	27
3.8.	T ₁ Hattının Elde Edilmesi ve Yetiştirilmesi.....	28
3.9.	T ₁ Bitkilerinin PCR ile Kontrolü	28
3.10.	T ₁ Bitkilerinin Dizi Analizi ile Kontrolü	28
3.11.	T ₁ Bitkilerinin RT-qPCR ile mRNA Analizi	28
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	29
4.1.	Ligasyonun Koloni PCR ile Doğrulanması	30
4.2.	Sanger Sekanslama ile Doğrulama	31
4.3.	Transgenik Hatların Üretimi	31
4.4.	T ₁ Bitkilerinin Elde edilmesi.....	34
4.5.	T ₀ Bitkilerinin PCR ile Kontrolü	35
4.6.	T ₀ Bitkilerinin Dizi Analizi.....	35
4.7.	T ₁ Bitkilerinin PCR ile Kontrolü	39
4.8.	T ₁ Bitkilerinin Dizi Analizi.....	40
5.	SONUÇLAR.....	44
	ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “CRISPR/Cas9 Yoluyla *Lsi-1* Geni (Putative) Susturulmuş Domates (*Solanum Lycopersicum* L.) Bitkilerinde Silikon Alımının Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

29/07/2020

Durmuş ÇETİN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µL	: mikrolitre
bp	: baz çifti (base pair)
g	: gram
Mg	: megabaz
sn	: saniye
dk	: dakika
ml	: mililitre
ng	: nanogram
kb	: kilobaz
kv	: kilovolt
°C	: santigrat derece
V	: volt
M	: molar
l	: litre
mm	: milimetre
cm	: santimetre
ha	: hektar

Kısaltmalar

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
PCR	: Polymerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu

LB : Luria-Bertani

OD : Optik Dansite

Rpm : Bir dakikadaki devir sayısı

MS : Murashige & Skoog

CTAB : Setrimonyum bromür



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 2001-2019 yılları arasında Türkiye’de üretilen domates miktarı	2
Şekil 2.2. CRISPR/Cas9 sisteminin çalışma mekanizması.....	8
Şekil 2.3. CRISPR/Cas9 sisteminin DNA'yı kesmesi.....	9
Şekil 2.4. Ökaryot hücrenin endojen tamir yolları.....	10
Şekil 3.1. p201N Cas9 Vektörünün Haritası.....	13
Şekil 3.2. <i>SLSi1</i> -CRISPR vektörü	16
Şekil 3.3. Domates ekimi ve büyütülmesi.....	20
Şekil 3.4. Yaprığın kesim bölgeleri.....	21
Şekil 3.5. Ön kültür ortamındaki eksplantlar.....	22
Şekil 3.6. İnokülasyon ve eş kültür ortamı.....	23
Şekil 3.7. Yenileme ortamında bulunan eksplantlar.....	24
Şekil 4.1. Koloni PCR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü	30
Şekil 4.2. Sanger metoduyla sekanslanmış <i>Lsi1</i> plazmidi	31
Şekil 4.3. Transgenik hatların üretimi.....	32
Şekil 4.4. Poşet ile yapılan aklimatizasyon işlemi.....	33
Şekil 4.5. Kültür kabıyla oluşturulan aklimatizasyon ortamı	34
Şekil 4.6. T1 bitkilerinin eldesi.....	34
Şekil 4. 7. 1 ve 2 numaralı bitkilerin jel elektroforez görüntüsü	35
Şekil 4.8. 1 numaralı bitkinin forward primer ile yapılan Sanger okuması sonucu.....	36
Şekil 4.9. 1 numaralı bitkinin reverse primer ile yapılan Sanger okuması sonucu.....	37
Şekil 4.10. 2 numaralı bitkinin forward primer ile yapılan Sanger okuması sonucu.....	38
Şekil 4.11. 2 numaralı bitkinin reverse primer ile yapılan Sanger okuması sonucu.....	39
Şekil 4.12. T ₁ bitkilerinin jel elektroforez görüntüsü	40
Şekil 4.13. T ₁ bitkilerinin Sanger okuması sonucu.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 <i>SpeI</i> kesim reaksiyonu	14
Çizelge 3.2 <i>SwaI</i> kesim reaksiyonu	15
Çizelge 3.3 Ligasyon reaksiyonu	15
Çizelge 3.4. Koloni PCR reaksiyonu	17
Çizelge 3. 5. Koloni PCR koşulları tablosu	17
Çizelge 3.6 Çimlendirme ortamı	19
Çizelge 3.7. Ön kültür ortamı	21
Çizelge 3.8. Eş kültür ortamı	22
Çizelge 3.9. Yenileme ortamı	23
Çizelge 3.10. Köklendirme ortamı	24
Çizelge 3.11. PCR reaksiyonunda kullanılan primer setleri	26
Çizelge 3.12. PCR reaksiyonu	26
Çizelge 3.13. Sanger sekanslama için kullanılan primerler	27
Çizelge 3.14. RT-qPCR reaksiyonu	27
Çizelge 3.15. RT-qPCR reaksiyonunda kullanılan primerler	28

1. GİRİŞ

Domates, besin içeriği bakımından oldukça zengin olup, patatesten sonra Dünya’da en çok tüketilen ikinci sebzedir. Domatesin sahip olduğu birçok özellik, onun ekonomik önemini artırmaktadır. Dünyada çok büyük miktarlarda yetiştiriciliği yapılan domates üzerinde, daha verimli domates çeşitleri elde edebilmek için birçok çalışma yapılmaktadır.

Abiyotik stresler, diğer tarımsal ürünler gibi domatesin verimini de olumsuz yönde etkileyerek verim kaybına neden olmaktadır. Bu abiyotik streslerle başa çıkmak için bitkilere çeşitli bitki besin elementleri verilmekte olup, silisyum da bunlardan biridir.

Silisyum, dünyada oksijenden sonra bileşik halinde en çok bulunan element olup toprağın %60’ını oluşturmaktadır. Doğada bol miktarda bulunan silisyum, bitkilerde farklı oranlarda bulunmaktadır. Bitki köklerinin Si alma yeteneklerine bağlı olarak bu oran %10’lara kadar çıkmaktadır. Silisyumun bitkiye sağladığı faydalar, pek çok bilimsel çalışmayla gösterilmiştir. Bu faydalardan en önemlisi, silisyumun bitkilere kazandırdığı stres toleransıdır. Abiyotik streslerin bitki üzerindeki olumsuz etkilerini azaltması nedeniyle, silisyum son zamanlardaki stres çalışmalarının odak noktası haline gelmiştir.

Bitkiler, silisyum elementini topraktan alabilmek için çeşitli taşıyıcı sistemler geliştirmişlerdir. Bu sistemlerden en iyi bilineni 2006 yılında çeltik bitkisinde tanımlanmış olan *Lsi1* geninin kodladığı taşıyıcı kanal sistemidir (Jian Feng Ma vd. 2006). Silisyum biriktiren bitkiler sınıfına dahil olan çeltik bitkisi, *Lsi1* geninin kodladığı aquaporin familyasına ait taşıyıcı kanal vasıtasıyla, topraktaki silisyumu kök hücrelerine almaktadır. Arpa, mısır, balkabağı, buğday, atkuyruğu, soya, patates ve salatalık gibi bazı bitkilerde *Lsi1* geninin ortologları tanımlanmıştır. Domateste *Lsi1* geninin ortologunun bulunmasına yönelik çalışmaların, literatürde sınırlı olduğu görülmektedir. Yakın zamanda bu konuda iki çalışma (Deshmukh vd. 2015; Sun vd. 2020) yayınlanmış olup, bu araştırmaların sonuçları birbiri ile uyumsuzdur.

Genom düzenlemesine yönelik çalışmalarda son yıllarda büyük ilerlemeler kaydedilmiş olup, pek çok yeni sistem genomların düzenlenmesi için kullanıma sunulmuştur. Genom düzenleme tekniklerinden en yaygın bilineni ve kullanılanı CRISPR/Cas9 sistemidir. Uygulanabilirliğinin kolay ve maliyetinin düşük olması, CRISPR/Cas9’ ı diğer genom düzenleme tekniklerinin önüne geçirmiştir.

Gen fonksiyonlarının tespit edilmesine yönelik çalışmalarda, CRISPR/Cas9 sisteminden sıklıkla faydalanılmaktadır. Bu sistem bölgeye özgü mutasyon oluşturarak, hedef genin fonksiyonunu engellemekte ve organizmada meydana gelen değişiklikler sayesinde hedef genin fonksiyonu belirlenebilmektedir.

Yapılan bu çalışmayla, *in silico* olarak *Lsi1* ortoloğu olduğu biyoinformatik araçlar vasıtasıyla tahmin edilen domates *Lsi1* geni (*SILsi1*), CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak susturulmuştur. Elde edilen *SILsi1* mutant domates bitkileri, çeşitli fizyolojik ve ifade analizleriyle incelenmiştir. *SILsi1* geni susturulmuş bitkiler üzerinde yapılan bu çalışmayla, *in silico* olarak tahmin edilen *SILsi1* geninin konfirmasyonu, ve domateste silisyum alımındaki fonksiyonuna ışık tutulması amaçlanmıştır.

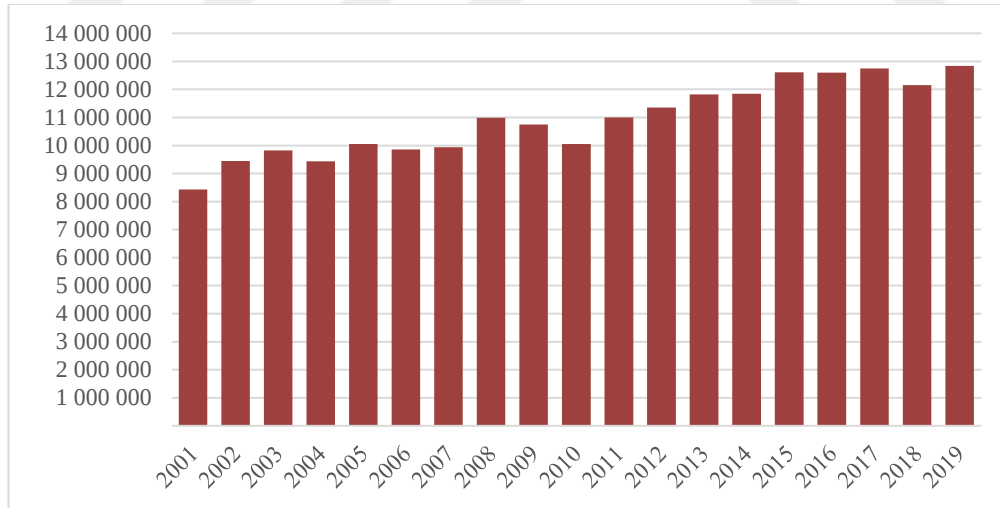
2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Domates

Patatesten sonra dünyada ham veya işlenmiş olarak en çok tüketilen sebze olan domates, 1.1 milyar ton olan toplam dünya yaş sebze üretimi içerisinde 182 milyon tonluk paya sahiptir (FAOSTAT 2018).

Taksonomide “*Solanum lycopersicum L.*” olarak adlandırılan domates, *Solanaceae* familyasına ait bir türdür (Peralta ve Spooner 2005). Anavatanı Güney Amerika’da And Dağları olan domatesin, ilk kez Peru’da yaşayan yerli kabileler tarafından kültüre alındığı ve tarımının yapıldığı tahmin edilmektedir (Gould 1974). Avrupa’ya ancak 16. yüzyılda getirilen domates gün geçtikçe daha çok üretilmeye ve tüketilmeye başlanmıştır. Zehirli olduğu düşüncesiyle önceleri sadece süs bitkisi olarak kullanılması nedeniyle, yaygınlaşması uzun zaman almıştır (Jones Jr 2007).

Dünya’da olduğu kadar Türkiye’de de büyük bir ekonomik öneme sahip olan domatesin, ülkemizde üretiminin 19. yüzyıl başlarında Adana’da başladığı tahmin edilmektedir (Şeniz 1992). Üretimine oldukça geç başladığı halde, Türkiye şu anda domates yetiştiriciliği konusunda lider ülkelerden biri olup ve üretim hacmi bakımından Çin, Hindistan ve ABD’den sonra Dünya’da 4. sırada yer almaktadır (FAOSTAT 2018). Domates üretimi ülkemizde yıldan yıla yükselen bir grafik çizmektedir (TUİK 2019) (Şekil 2.1). Domatesin bu kadar yaygın olmasında onun yaş sebze olarak tüketiminin yanı sıra gıda sanayinde ketçap, sos, salça, turşu ve dondurulmuş ürün gibi çeşitli gıdalar olarak kullanılmasının da etkisi büyüktür.



Şekil 2.1. 2001-2019 yılları arasında Türkiye’de üretilen domates miktarı (ton) (TUİK 2019)

Tarımsal ve ekonomik önemine binaen domates, pek çok bilimsel çalışmaya konu olmuştur. Genomunun sekanslanması müteakip, domatesi konu alan bilimsel

çalışmaların sayısı da gün geçtikçe artmaktadır (Tomato Genome Consortium 2012).

2.2. Kuraklık ve Tuz Stresi

Bitkiler yaşadıkları alanlarda yaşamlarını zorlayan, gelişimlerini kısıtlayan birtakım olumsuz koşullara maruz kalabilirler. Bitkilerin normal gelişimini etkileyen ve dolaylı da olsa onların verimliliklerini düşüren faktörlere stres denir (Gürel ve Avcıoğlu 2001). Stres faktörleri biyotik ve abiyotik stres faktörleri olmak üzere ikiye ayrılır (Larcher 1995).

Biyotik, yani canlı temelli stres faktörleri; bitkiler, mikroorganizmalar, hayvanlar ve antropojenik etkilerdir. Abiyotik, yani canlı temelli olmayan stres faktörleri ise sıcaklık, mineraller, radyasyon, su, gazlar vb. olarak sıralanabilir (Larcher 1995). %26'lık oranıyla kuraklık, Dünya'da tarımsal üretimi en fazla etkileyen strestir. Kuraklığı %20'lik oranıyla mineral stresi ve %15'lik oranıyla soğuk stresi takip etmektedir. Tüm tarım alanlarının sadece %10'luk bir kesimi stresten etkilenmemektedir. (Blum ve Jordan 1985).

Küresel ısınma sebebiyle yerkürenin sıcaklığının her geçen gün arttığı bilinen bir gerçektir. Bunun şüphesiz en büyük sonuçlarından biri de tuzlu olmayan su miktarının azalmasıdır. Bu azalma kuraklık ile sonuçlanmakta ve tüm canlıları etkilediği gibi bitkileri de olumsuz bir şekilde etkilemektedir. (Reddy vd. 2004).

Verimliliği düşüren abiyotik streslerden bir diğeri de mineral streslerinden kaynaklanan toprak tuzluluğudur. Dünya'da yüksek miktarda tuzlu olarak nitelendirilen toprak alanının 9 milyon ha'dan fazla olduğu düşünülmektedir (Tuteja 2007). Toprakta NaCl ve diğer çözülebilir tuzların miktarlarının artmasıyla birlikte bitkide meydana gelen tuz stresi, bitkide büyüme ve gelişim üzerinde birtakım olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Toprakta tuz konsantrasyonunun yükselmesi ve dolayısıyla su potansiyelinin azalması, bitki hücrelerinin ozmotik basıncını düşürmekte ve bitkilerde bir dizi tepkinin oluşmasına neden olmaktadır (Basra 1997).

Kuraklık ve tuzluluk stresinin mekanizmaları çok benzerdir. Topraktaki tuz miktarının artması da toprağın susuz kalması gibi su potansiyelini düşürüp, bitkinin su alımını etkiler. Bitkilerde oluşan su eksikliği singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit (O^{2-}), hidroksil radikalleri ($OH^{\cdot}$) gibi çeşitli reaktif oksijen türlerinin oluşumuna sebebiyet vermektedir (Parida ve Das 2005; Yılmaz vd. 2011). Reaktif oksijen türleri, eşleşmemiş elektron içeren moleküllerdir ve stres koşullarında mitokondri ve kloroplastlarda gerçekleşen metabolik reaksiyonlar sonucu oluşmaktadırlar. Reaktif oksijen türleri, normalde hücrenin doğal bir yan ürünü olsalar da aşırı birikimleri hücrenin ölümüne neden olur (Apse ve Blumwald 2002). Oluşan bu reaktif oksijen türleri ayrıca hücrelerde birçok yapıya zarar vermektedir. Nükleik asitler, membran lipidleri, proteinler, klorofiller bu durumdan en çok etkilenen yapılardır (Koca vd. 2007; Yılmaz vd. 2011). Lipit peroksidasyonunun en büyük etkisi hücre membranının tahribatıdır. Lipit peroksidasyonunun başlaması, çeşitli yollarla etkileyerek bir dizi tepkime sonucunda malondialdehit (MDA) oluşumuna sebep olmaktadır.

Bitkiler, stresler ile meydana gelen ve oldukça zararlı olan bu reaktif oksijen türleriyle başa çıkabilmek için çeşitli koruyucu antioksidan sistemleri geliştirmişlerdir.

Bu koruyucu sistemin bileşenlerinden bazıları karotenoidler, askorbat, α -tokoferol, glutatyon, gibi antioksidanlar ve glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX) gibi antioksidan enzimlerdir (Chinnusamy vd. 2005).

2.3. Silisyumun Bitkiler Üzerindeki Etkileri

Silisyum, periyodik tablonun 4A grubunda yer alan, atom sayısı 14 olan bir ametaldir. Bu element Silikon (Si) ismiyle de bilinmekte olup yeryüzünde en çok bulunan elementlerin başında gelmektedir. Silisyum, oksijenden sonra bileşik halinde en çok bulunan elementtir. Yerkabuğu ortalama olarak %25-28 silisyum içerir. Si bileşikleri (silikon dioksit veya silikatlar) toprağın %60'ından fazlasını oluşturur. Toprak çözeltilisinde Si konsantrasyonu silisik asit formunda olup 3.5 ila 40 mg Si L⁻¹ arasındadır (Marschner 1995).

Yer kabuğunda olduğu gibi silisyum bitkilerde de yüksek miktarlarda bulunur. Çeşitli bitki türleri farklı miktarlarda silisyum içeriğine sahiptir. Bitki çeşidine göre Si içeriği, bitkilerin kuru ağırlıklarında %0.1 ila %10 arasında değişmektedir (J. F. Ma vd. 2002). Bitki çeşitleri arasındaki bu büyük fark, bitki köklerinin farklı Si alma yeteneklerinden kaynaklanmaktadır (Takahashi vd. 1990).

Silisyum, bitkilerde bol miktarda bulunmasına ve bitki gelişimi için de yararlı olmasına rağmen mutlak elementler arasında yer almamaktadır (Epstein 1999). Silisyumun mutlak elementlerden biri olarak gösterilmemesinin sebebi; Arnon ve Stout tarafından oluşturulan, bir elementin mutlak element olması için gerekli olan 3 kriteri karşılayamamasındandır (Arnon ve Stout 1939). Bu kriterler:

- Elementin eksikliğinde, bitkinin gelişimini tamamlayamaması
- Elementin işlevinin başka bir mineral element tarafından karşılanamaması
- Elementin bitkinin metabolizmasında doğrudan yer alması

Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda silisyumun biyotik ve abiyotik streslere karşı faydalı rollerinin olduğu ve eksikliğinde olumsuz değişimlerin meydana geldiği pek çok çalışmayla gösterilmiştir (Miyake ve Takahashi 1978, 1983; Gong vd. 2005; Romero-Aranda vd. 2006).

Silisyum, bitkilerde çoklu stres koşullarıyla baş etmede faydalı olan nadir elementlerden biri olup fazla miktarda biriktiğinde bitkiye zararı olmayan tek elementtir (J. F. Ma vd. 2002). Bitki kökleri vasıtasıyla topraktan silisik asit [Si(OH)₄] veya mono silisik asit [H₄SiO₄] şeklinde alınan silisyum, daha sonra polimerleşerek yapraklarda, gövdede ve gövde yüzeyinde çift katmanlı bir yapı oluşturur (Yoshida vd. 1959). Silisyumun bitkiye sağladığı birçok yararın, epidermal dokularda oluşturduğu bu silika jel katmanı sayesinde olduğu düşünülmektedir. Oluşan bu silika yapı, bitkileri fungal ve haşere saldırılarına karşı daha dayanıklı hale getirmektedir. Ayrıca silisyum, bitkinin ışık alma yeteneğini artırabilmekte ve terleme kayıplarını en aza indirebilmektedir. Kısacası silisyumun bitkilere sağladığı faydalar, metabolik değil, daha çok onların fiziksel yapılarına sağladığı katkılar sayesinde olmaktadır (Yoshida vd. 1959; J. F. Ma vd. 2002). Yine bazı bitkilerde silisyum, bir veya daha fazla savunma mekanizmasını uyarmak suretiyle hastalıklara karşı konak direncini arttıran aktif bir fonksiyona sahiptir (Fauteux vd. 2005).

2.4. Genom Araştırma Yöntemleri

Sekanslama zamanının ve maliyetlerinin azalması ve genom düzenleme tekniklerinin keşfi sayesinde tıp, moleküler biyoloji, hayvancılık ve bitki ıslahı çalışmaları konusunda son yıllarda büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Yapılan bu çalışmalarla insan genomunda yer alan birçok genin işlevi aydınlatılmış, hastalıklarla olan ilişkileri incelenmiştir. Bu sayede bilinmeyen birçok hastalığın moleküler temeli ortaya çıkarılmış ve bazılarının tedavisi de mümkün olmuştur (Schadt vd. 2005; Tastan ve Sakartepe 2018).

Tıpta ve hayvancılıkta olduğu gibi, bitkiler üzerinde de genetik çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Yapılan çalışmalarla, biyotik ve abiyotik streslere toleranslı, verimli, besin içeriği yüksek ve kaliteli ürünler veren yeni ticari çeşitlerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu ürünlerin elde edilmesinde klasik ıslah yöntemlerinin yanı sıra biyoteknolojik yöntemlerden de faydalanılmaktadır. Geleneksel ıslah yöntemleri, yoğun iş gücü ve uzun zamanlara ihtiyaç duymakta iken biyoteknolojik yöntemlerle aynı amaca, daha az maliyetle, daha kısa zamanda ve daha az iş gücüyle ulaşılabilmektedir.

Sekanslama maliyetlerinin düşmesi ve hızının artması, 15 yıllık kısa bir süre içerisinde mısır, çeltik, tütün, domates gibi önemli bitkilerin genomlarının sekanslanmasıyla sonuçlanmıştır. Bununla birlikte halen bu sekansların gen anotasyonu ve fonksiyonel analizlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu genlerin işlevini aydınlatmak, ardından yapılacak çalışmaların da önünü açmaktadır.

Bir genin işlevini aydınlatmak için yapılan genetik çalışmaların temelini, o genin DNA dizisinden yola çıkılarak yapılan çalışmalar ve o geni barındırmayan mutant organizmaların fenotipleriyle yapılan çalışmalar oluşturmaktadır. Son yıllarda TALEN ve CRISPR gibi genom düzenleme araçlarının keşfiyle birlikte, RNAi ve aşırı ifadeleme (over-expression) teknikleri yoluyla yürütülen anotasyon çalışmaları da hız kazanmıştır.

2.5. Yeni Nesil Genom Düzenleme Araçları

Yeni nesil genom düzenleme araçları; moleküler biyoloji, tıp, bitki ıslahı gibi çeşitli alanlarda kullanılan, genomda düzenleme yapılmasına olanak tanıyan, son yıllarda büyük ilerlemeler kaydetmiş sistemlerdir. Bu sistemler, gen tedavisi (hatalı genlerin düzeltilmesi), delesyon ve insersiyon (nükleotid ekleme-çıkarma) yoluyla mutasyon oluşturma, yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesi gibi biyoteknolojik çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Cai ve Yang 2014). Son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlayan en önemli genom düzenleme araçları dizi spesifik nükleazlardır (ZFN, TALEN, CRISPR) (Gaj vd. 2013; Akbudak ve Kontbay 2017).

2.5.1. ZFN'ler (Zinc finger nucleases)

Genomda modifiye edilmek istenen sekansa göre dizayn edilen ve genomun istenilen noktasından kesim yapabilen ilk genom düzenleme aracı ZFN'ler (Zinc Finger Nucleases)'dir. ZFN'ler, iki parçadan oluşmaktadır. Birinci parça DNA'ya bağlanan Zinc Finger (ZF) proteinleridir. İkinci parça ise DNA'yı kesen, *Flavobacterium okeanoites* bakterisinden izole edilen *FokI* nükleazdır (Samanta vd. 2016). İki yapının yapay olarak

birleştirilmesiyle oluşan bu özelleştirilmiş nükleaz, genomu modifiye etmek için kullanılmaktadır.

FokI nükleazının kesim yapabilmesi için başka bir *FokI* nükleazıyla dimerize olması gerekmektedir (Kim vd. 1996). Bu sebeple, bir genomda modifikasyon oluşturmak için, iki adet ZFN tasarlanması gerekmektedir. İki ZFN monomerinden oluşan ZFN sisteminde, her bir ZFN monomeri en az 3 adet ZF içermektedir. ZF motiflerinden her biri 3 bp'lik spesifik bir DNA sekansını tanımaktadır. Bu da ona en az 18 bp uzunluğunda bir tanıma bölgesi özgüllüğü kazandırmaktadır (Kim vd. 1996; Voytas 2013). Bu iki ZFN'den bir tanesi çift iplikli DNA'nın üst zincirine bağlanırken, diğer ZFN alt zincire bağlanmaktadır. Ayrıca ZFN'nin çift iplik kırığı oluşturabilmesi için, ZFN monomerlerinin bağlanma sekanslarının arasında 5-7 bp'lik aralık dizi (spacer) olması gerekmektedir. Kesim işlemi bu spacer bölgeden yapıldığı için, kesim yapılmak istenen hedef bölge bu aralıkta olmalıdır (Osakabe ve Osakabe 2015).

ZFN sisteminde, iki ZFN monomerine ve spacer bölgeye ihtiyaç duyulması, sistemin kullanılması için kısıtlama getirse de sisteme ekstra özgüllük sağlamaktadır. Bu sayede çok büyük genomda bile herhangi bir yanlış bağlanma olmadan hedef bölgeden kesim yapılabilmektedir (Gaj vd. 2013; Akbudak ve Kontbay 2017).

ZFN teknolojisi birçok çalışmada genom düzenleme aracı olarak kullanılmıştır. Zebra balığı (Foley vd. 2009), sıçan (Mashimo vd. 2010), tütün (Townsend vd. 2009), mısır (Shukla vd. 2009), *Drosophila melanogaster* (Carroll 2011) gibi çeşitli organizmalarda ZFN teknolojisi başarıyla uygulanmıştır.

ZFN sistemi diğer sistemlere göre daha özgüldür. Ancak ZFN sistemi, uygulanmasının diğer genom düzenleme araçlarına göre daha fazla zaman alıcı, zahmetli ve maliyetli olması, her organizma için tasarlanamaması gibi dezavantajlara sahip olduğundan, diğer sistemlerin gerisinde kalmıştır (Urnov vd. 2010).

2.5.2. TALEN'ler (Transcription Activator Like Effector Nucleases)

İkinci nesil genom düzenleme araçlarından olan TALEN sistemi, ZFN sistemine alternatif olarak 2011 yılında kullanılmaya başlanmıştır (Bogdanove ve Voytas 2011). TALEN sistemi de tıpkı ZFN sistemi gibi bir nükleaz ve bu nükleaza hedefe bağlanması için rehberlik eden bağlanma domaininden oluşmaktadır. TALEN sisteminde bulunan bağlanma domaini, TAL (Transcription Activator-Like) efektörleridir.

TALE proteinleri, her biri tek nükleotidi tanıyan ve bu nükleotidlere bağlanan 10-30 tekrarlı ardışık dizilerden meydana gelmektedir. Bu tekrarların her biri 33-35 (genellikle 34) amino asitten oluşmaktadır. Her tekrarın 12. ve 13. pozisyonunda bulunan ikili amino asit, RVD (repeat variable diresidue) olarak adlandırılmıştır. Dört RVD'den (NI, NG, NN ve HD) her biri farklı nükleotidi (A, T, G, C) tanımaktadır. Kısacası TALEN sisteminde hedef bölgeye bağlanma özgüllüğünü RVD'ler sağlamaktadır (Bogdanove ve Voytas 2011).

Hedeflenen DNA dizisine göre yeniden tasarlanmış, uygun RVD'ler barındıran TAL efektör proteinler sayesinde, genomun istenilen bölgesinde çift iplik kırığı oluşturulabilmektedir. TALEN sisteminin genomda çift iplik kırığı oluşturabilmesi için,

bir çift TALEN gereklidir. Bu TALEN'lerden biri üst iplikçiğe bağlanırken diğeri alt iplikçiğe bağlanmaktadır. Bu sayede, *FokI* nükleazlarının kesim yapabilmesi için gerekli olan dimerizasyon meydana gelmekte ve kesim gerçekleşmektedir. Ayrıca ZFN sisteminde olduğu gibi TALEN sisteminde de iki bağlanma domaini arasında spacer (aralık) bölgenin olması gerekmektedir. TALEN sisteminde spacer bölge genelde 14-18 bp uzunluktadır (Chen ve Gao 2013; Voytas 2013).

Günümüzde TALEN'ler, ligasyon temelli metotlarla kolay bi şekilde elde edilebilir hale gelmiştir. Bu metotlardan en yaygın olanı Golden Gate Assembly metodudur. Bu metot sayesinde 5 günde, hedef bölgeyi kesmek üzere bir TALEN sistemi inşa edilebilmektedir (Cermak vd. 2011).

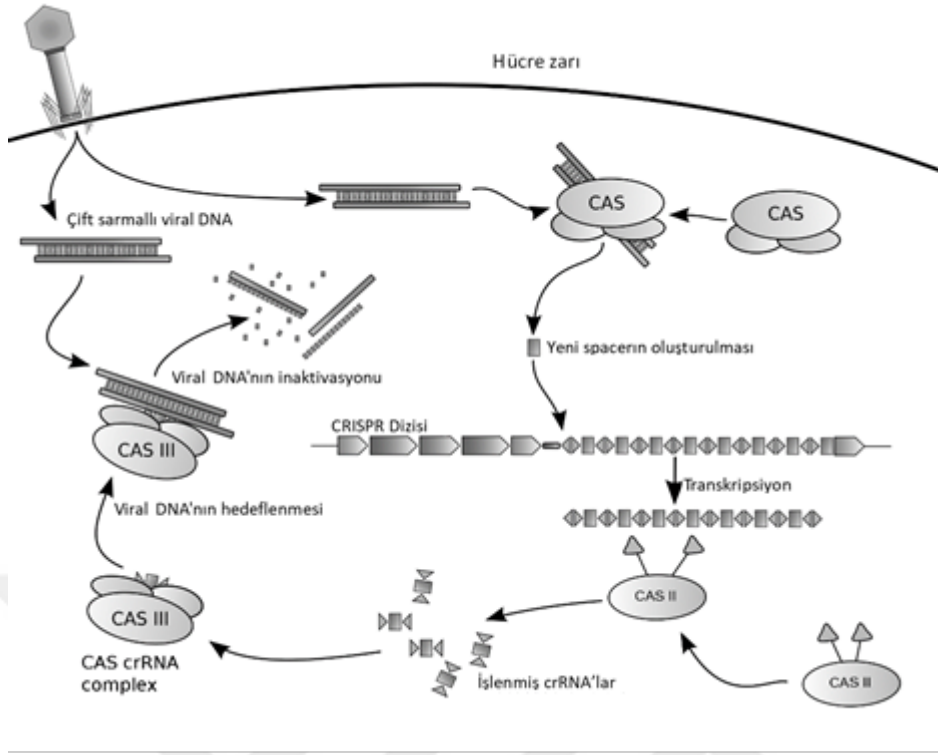
TALEN sistemi yalnızca çift iplik kırığı oluşturmak için değil, gen ifadesinin düzenlenmesi içinde kullanılmaktadır. Örneğin kesim domaini yerine transkripsiyonel aktivatörler ya da baskılayıcılar kullanılarak hedef genin ekspresyon düzeyi kontrol altına alınabilmektedir (Baltes ve Voytas 2015). TALEN sistemi, *Arabidopsis thaliana*, tütün, arpa, buğday, çeltik, *Brachypodium*, mısır ve patates gibi bitkilerde başarıyla uygulanmıştır (Cermak vd. 2011; Li vd. 2012; Christian vd. 2013; Shan vd. 2013; Wendt vd. 2013; Zhang vd. 2013; Char vd. 2015; Clasen vd. 2016).

2.5.3. CRISPR/Cas9 sistemi (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated)

Dizi spesifik nükleazların her birinin avantajları ve dezavantajları vardır. Ancak CRISPR, ZFN ve TALEN'e göre çok daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun birçok sebebi olsa da temel sebebi CRISPR'ın diğer araçlara göre daha ucuz ve hazırlanmasının kolay olmasıdır (X. Ma vd. 2016).

CRISPR/Cas9 sistemi (kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar), bakteri ve arkeaların büyük bir kısmında bulunan, bulunduğu hücrenin genomunu yabancı DNA'ya (virüs DNA'sı ve plazmid gibi) karşı koruyan bir bağışıklık sistemidir. Bu sistem sayesinde prokaryot hücre, yabancı DNA sekansını tanıyıp keserek, kendi genomunu yabancı DNA'nın zararından korumaktadır (Bolotin vd. 2005; Mojica vd. 2005; Pourcel vd. 2005).

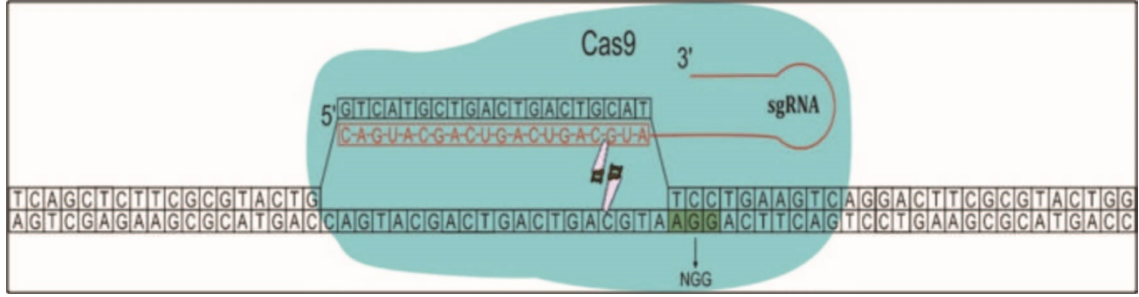
Prokaryot organizmalarda, sınıflandırılmış üç tip CRISPR sistemi bulunmaktadır. Bunlardan mekanizması en iyi bilinen ve en çok çalışılan sistem Tip II CRISPR sistemidir. Bu sistemde Cas9 adı verilen endonükleaza rehberlik eden, tracrRNA (trans-aktif edici CRISPR RNA) ve crRNA (CRISPR-RNA) adında iki RNA bulunur. Prokaryotik hücre, yabancı DNA saldırısına maruz kaldığı zaman, yabancı DNA'nın dizisini, genetik hafıza gibi çalışan CRISPR sistemine kaydetmektedir. Bu kaydetme işi, yabancı DNA'nın belirli bir kısmını (spacer), CRISPR sisteminin özdeş tekrar dizileri (identical direct repeats) arasına kopyalamak suretiyle yapılmaktadır. Yabancı DNA hücreyi tekrar enfekte ettiği zaman, CRISPR dizilerinin transkripsiyonuyla oluşan, protein kodlamayan, tracrRNA ve crRNA, Cas9 nükleazıyla birleşerek ribonükleoprotein kompleksi oluşturur ve yabancı DNA'yı tanıyarak keser (Doudna ve Charpentier 2014). CRISPR sisteminin çalışma mekanizması Şekil 2.2'de gösterilmiştir (Atmos 2009).



Şekil 2.2. CRISPR/Cas9 sisteminin çalışma mekanizması

Cong ve ark. 2013 yılında bakterilerin doğal savunma mekanizması olan CRISPR/Cas9 sisteminin bileşenlerini modifiye edip insan genomuna uygun hale getirmişlerdir (Cong vd. 2013). Genom düzenlemek için yeniden programlanmış CRISPR sisteminde crRNA ve tracrRNA birleştirilerek kimerik bir RNA olan guide RNA (gRNA-rehber RNA) üretilmiştir. Tasarlanan CRISPR vektörleri sayesinde gRNA ve Cas9 aynı anda sentezlenebilmektedir. Hedef bölgeye komplementer bir gRNA tasarlanmasıyla genomun istenen yerinde çift iplik kesiği oluşturulabilmektedir. gRNA'nın ortalama olarak 20 bp uzunlukta olması gerekmektedir. CRISPR sisteminin hedef bölgede çift iplik kırığı oluşturabilmesi için hedef bölgenin aşağı kısmında (downstream) 5'-NGG-3' sekansının bulunması gerekmektedir. Bu korunmuş üçlü sekansa PAM (protospacer adjacent motif) adı verilmiştir. PAM sekansı CRISPR sisteminin hedef bölgede çift iplik kırığı oluşturması için mutlaka gereklidir (Jinek vd. 2012; Cho vd. 2013; Mali vd. 2013). Sıklıkla NGG olarak bulunan PAM sekansı nadiren de olsa NAG şeklinde bulunabilir (Hsu vd. 2013).

Hedef bölgeye komplementer olan gRNA'nın, hedef bölgeyi bulup, RNA-DNA hibrit yapısını oluşturmasıyla, gRNA'nın rehberlik ettiği Cas9 nükleaz, PAM sekansının 3-4 nükleotid gerisinden (upstream) DNA'nın alt ve üst iplikçisini keser (Şekil 4.4).



Şekil 2.3. CRISPR/Cas9 sisteminin DNA'yı kesmesi (Akbulak ve Kontbay 2017)

CRISPR/Cas9 sistemi, domates (Brooks vd. 2014; Ito vd. 2015; Pan vd. 2016), patates (Butler vd. 2015), çeltik (Shen vd. 2017), tütün (Gao vd. 2015) ve *Arabidopsis* (Feng vd. 2013) gibi birçok bitki türünde genom düzenleme aracı olarak başarıyla kullanılmış ve kullanılmaya devam edilmektedir.

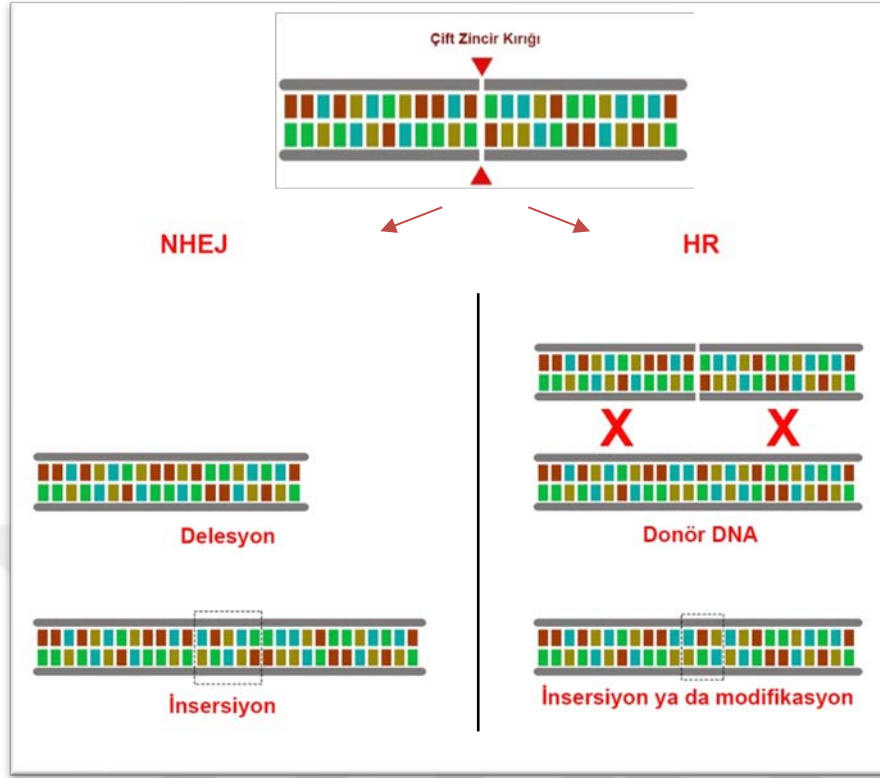
2.6. Genom Düzenleme ve DNA Onarım Mekanizmaları

DNA kırığının meydana gelmesini takiben hücre, genom bütünlüğünü korumak için meydana gelen kırığı hemen tamir eder. Bu tamir aşağıda açıklandığı üzere iki şekilde gerçekleşir (Şekil 5.5).

- 1- HR- Homologous Recombination (Homolog Rekombinasyon)
- 2- NHEJ- Non-Homologous End Joining (Homolog Olmayan Uçların Birleşmesi)

Homolog rekombinasyon mekanizmasında; hücre, diğer iplikçığı kalıp DNA olarak kullanarak, çift zincir kırığı olan DNA bölgesini tamir etmektedir. Bu mekanizmadan yararlanılarak, çift zincir kırığı oluşturulan bölgenin her iki ucuna homoloji gösteren bir donör DNA kullanımıyla, genomda istenilen değişiklik yapılabilmektedir (Smith 2001).

Homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ) mekanizmasında ise; hücre, kalıp DNA kullanmayarak çift iplik kırığını rastgele ve kusurlu olarak tamamlamaktadır. Rastgele yapılan bu tamir işlemi çoğunlukla DNA diziliminde insersiyon ve delesyonlara sebep olmaktadır. Oluşan insersiyon ve delesyonlar ise çerçeve kayması veya oluşan stop kodonu nedeniyle mutasyon meydana getirmektedir. Bu tamir mekanizmalarından NHEJ, HR'ye göre oldukça baskındır. Genellikle bir hücrede tamir mekanizması olarak %99,9 oranında NHEJ mekanizması kullanılırken, sadece %0,1 oranında HR mekanizması kullanılır (Shuman ve Glickman 2007; Akbulak ve Kontbay 2017).



Şekil 2.4. Ökaryot hücrenin endojen tamir yolları

Sonuç olarak hedef DNA bölgesinde çift iplik kırığı oluşturduktan sonra, hücrenin doğal DNA onarım mekanizmalarından yararlanılarak, genomda istenilen değişiklik yapılabilmektedir.

2.7. Çeltikte *Lsi1* Geni ve Diğer Bitkilerdeki Ortologları

Bitkilerdeki silisyum alım metabolizmasının anlaşılması noktasında son yıllarda büyük mesafeler kat edilmiştir. Jian Feng Ma vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmayla topraktan köke silisyum alımını sağlayan gen olan *Lsi1* ilk defa çeltikte tanımlanmıştır. Bu genin moleküler işaretleyiciler (marker) sayesinde haritalaması yapılmış ve çeltiğin ikinci kromozomunun uzun kolundaki bir gen bölgesinin silisyum alımından sorumlu olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar bu gene Low Silicon Rice (*Lsi1*) adını vermişlerdir. Beş ekzon, dört introndan oluşan bu genin kodladığı protein, aquaporin familyasında Nod26 benzeri majör intrinsik protein (NIP) alt familyasına aittir. Bu protein hem ekzodermis hem de endodermis hücrelerinin distal yani merkezden uzak tarafındaki plazma membranı üzerinde lokalize olmuştur. Bu çalışmadan bir yıl sonra yine benzer yöntemlerle *Lsi2* geni tanımlanmıştır. Bu genin kodladığı protein ise yine kökün hem ekzodermis hem de endodermis hücrelerinde bulunmaktadır. Ancak bu gen, *Lsi1* gibi distal tarafta değil hücrenin proksimal (merkeze yakın) tarafındadır. Yapılan çalışmalar *Lsi2* geninin, *Lsi1* gibi topraktan köke silisyum taşıması yapmadığını göstermektedir.

Lsi2, köke *Lsi1* tarafından alınan silisyumu kök hücrelerinden iletim borularına taşıyan bir taşıyıcı olarak görev yapmaktadır (Ma ve ark., 2007).

Lsi1 geni tarafından üretilen taşıma kanalının sadece silisyum akışında görev almadığı, başka elementlerin de akışına aracılık ettiği gösterilmiştir. Zhao vd. (2010) yaptıkları çalışmayla *Lsi1* geninin *Xenopus laevis* oositlerinde ifade edilmesini sağlamış ve bu oositleri arsenit (As (III))'e maruz bırakmışlardır. *Lsi1* genini ifade eden oositlerin, yabani tip oositlere nazaran arsenit (As (III))'i daha az barındırdığını göstermişlerdir. Elde ettikleri verilerle *Lsi1* geninin, arsenitin hücre dışına akımını sağladığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca *Lsi1* geninden yoksun çeltik mutantları üzerinde yaptıkları çalışmayla, *Lsi1* geninin, çeltik bitkisinin kökünde arsenit akışında rol oynadığını göstermişlerdir (Zhao vd. 2010).

Lsi1 geninin Ma ve ark.(2006) tarafından çeltikte tanımlanmasından sonra, diğer bitkilerdeki *Lsi1* ortologlarını bulma çalışmaları hız kazanmıştır. Chiba vd. (2009) yaptıkları çalışmayla *Lsi1* geninin, arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisindeki ortologu olan *HvLsi1* genini tanımlamışlardır. *HvLsi1* geninin kodladığı taşıyıcı, çeltikten farklı olarak, arpada seminal köklerdeki epidermal ve kortikal hücrelerde ve lateral köklerdeki hipodermal hücrelerde bulunmaktadır (Chiba vd. 2009). Mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde silisyum alımından sorumlu olan *Lsi1* homoloğu *ZmLsi1*, 2009 yılında belirlenmiştir. Mısır bitkisinde ise silisyum taşıyıcıları, seminal ve taç köklerdeki epidermal ve hipodermal hücreler ile lateral köklerdeki kortikal hücrelerde bulunmaktadır. Bu iki bitkinin kök yapılarından dolayı, silisyum taşıyıcıları çeltikten farklı lokalizasyon gösterse de taşıyıcıların polar lokalizasyonu çeltikle benzerdir. Bu bitkilerin, yüksek silisyum alım güçleri, polar lokalizasyonlu silisyum alım kanallarına sahip köklerine atfedilmiştir (Mitani vd. 2008). 2015 yılında yapılan matematiksel bir modelleme, pirinçte etkili silisyum alımı için, silisyum taşıma kanallarının polar lokalizasyonunun en uygun kombinasyon olduğunu doğrulamıştır (Sakurai vd. 2015).

Mitani vd. (2011)'in yaptıklarıyla çalışmayla balkabağında (*Cucurbita moschata*) *Lsi1* homoloğu olan *CmLsi1* geni tanımlanmıştır. Balkabağındaki *CmLsi1* geni, pirinç, mısır ve arpadaki gibi polar lokalizasyon göstermemiş ve tüm kök hücrelerinde ifade edilmiştir (Mitani vd. 2011).

Farklı bitkilerde silisyum alımından sorumlu olan, *Lsi1* geninin homoloğunu bulma çalışmaları devam etmiş ve buğdayda *TaLsi1* (Montpetit vd. 2012), atkuyruğunda (*Equisetum arvense*) (Grégoire vd. 2012) *EaNIP3;1*, soyada *GmNIP2*, patateste *StLsi1*(Vulavala vd. 2016) ve salatalıkta *CsLsi1* (Sun vd. 2017) tanımlanmıştır.

Domateste *Lsi1* geninin homoloğunu bulmak için ilk çalışma 2015 yılında yapılmıştır (Deshmukh vd. 2015). Çalışmada elde edilen *SLsi1*, *Xenopus laevis* oositlerinde silisyum için taşıma aktivitesi göstermemiştir.

Lsi1 geni Vatansever ve ark., (2017) tarafından domateste *in silico* olarak tanımlanmıştır. Sun vd. (2020) yakın zamanda yaptıkları bir çalışmayla *Lsi1* homoloğu *SLsi1* geninin, domateste silisyum alımından sorumlu gen olduğunu göstermişlerdir (Sun vd. 2020). Araştırmacılar, biyoinformatik yollarla, pirinçteki *Lsi1* genine homoloji gösterdiğini tespit ettikleri *SLsi1/SINIP2-1* genini, domatesten izole edip *Xenopus laevis* oositlerine aktarmışlardır. *SLsi1* geni taşıyan *Xenopus laevis* oositleri, silisyum taşıma

aktivitesi göstermiştir. İkinci kontrol olarak *SILsi1* genini, *Lsi1* genini taşımayan mutant çeltik bitkilerine aktarmışlardır. Normalde silisyum alamayan mutant çeltik bitkilerinin *SILsi1* geni sayesinde silisyum aldığını göstermişlerdir. Ayrıca üçüncü kontrol olarak, domateste *SILsi1* geninin aşırı ifadeleneşini sağlamışlardır. Toprağı, silisyum analoğı element olan germanyum (Ge) ilave etmişler ve *SILsi1* genini aşırı ifade eden domates köklerinde, Ge konsantrasyonunun arttığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar, *SILsi1*'in domateste silisyum alımından sorumlu gen olduğunu göstermektedir.

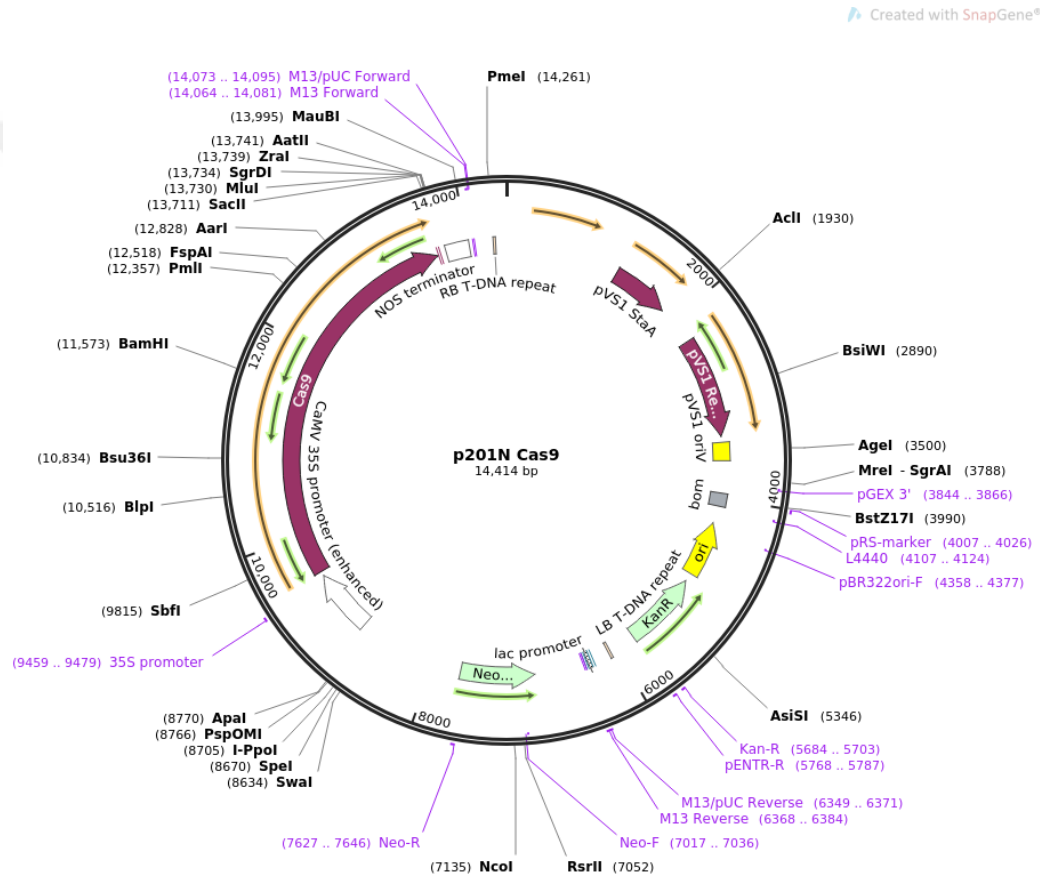
Üç çalışmada da biyoinformatik yollarla domateste silisyum alımından sorumlu olduğu düşünölen gen aynı gendir (*SINIP2-1*). Bununla birlikte, Deshmukh ve ark. ile Sun ve ark.'ın sonuçları birbiri ile örtüşmemektedir. Deshmukh ve ark., *SINIP2-1* geninin *Xenopus laevis* oositlerinde silisyum için taşıma aktivitesi göstermemiş olmasından dolayı, *SILsi1* geni olmadığını söylemişlerdir. Ancak Sun ve ark. üç ayrı kontrol yöntemiyle yaptıkları çalışmayla *SINIP2-1* geninin *SILsi1* geni olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca *Xenopus laevis* çalışmasını bağımsız iki farklı laboratuvarıa ayrı ekipler tarafından yaptıklarını belirterek doğruluğunu savunmuşlardır (Deshmukh vd. 2015; Sun vd. 2020).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. gRNA Tasarımı ve Vektör Dizaynı

SILs1 geni beş ekzona sahiptir ve domatesin üçüncü kromozomunda bulunmaktadır. CRISPR-P programı kullanılarak bu genin ikinci ekzonunda bulunan GCTTGAGCGTCCGTAGCTGG (altı çizgili olan üçlü baz PAM sekansdır) bölgesi gRNA bağlanma bölgesi olarak seçilmiştir.

Çalışmada, CRISPR/Cas9 vektörünün dizayn edilebilmesi için Jacobs ve Martin (2016)'nın önerdiği protokolden yararlanılmıştır. Protokole göre hazırlanan gRNA p201N Cas9 plazmidine (AddGene Plasmid #59175) klonlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. p201N Cas9 Vektörünün Haritası

gRNA'yı, p201N:Cas9 vektörü içerisine klonlamak için vektör, *SpeI* ve *SwaI* (New England Biolabs) kesim enzimleri ile kesilip lineer hale getirilmiştir.

3.1.1. *SpeI* kesimi

Çizelge 3.1’de verilen *SpeI* kesim reaksiyonu 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.1 *SpeI* kesim reaksiyonu

p201N:Cas9	8 µL
<i>SpeI</i>	1 µL
Buffer (CutSmart)	2 µL
Nükleaz içermeyen H ₂ O	9 µL
Toplam	20 µL

3.1.2. Pürifikasyon

Kesim ürününün pürifikasyonu, QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) ile aşağıda açıklandığı şekilde yapılmıştır;

- Pürifikasyonu yapılacak her 1 hacim örnek başına 5 hacim PB Buffer eklendi ve karıştırıldı.
- Pürifikasyon kolonları 2 ml’lik santrifüj tüpüne konuldu.
- DNA’yı bağlamak için örnekler kolona yüklendi. 60 sn. santrifüj yapıldı. Tüpte toplanan sıvı kısım döküldü ve kolon aynı tüpe tekrar yerleştirildi.
- Yıkama için kolona 750 µl PE Buffer eklendi. 60 sn. santrifüj yapıldı. Tüpte toplanan sıvı tekrar döküldü. Kolon aynı tüpe yerleştirildi.
- Kalan yıkama tamponunu uzaklaştırmak için kolon aynı tüpün içindeyken 1 dk. daha santrifüj yapıldı.
- Kolon, temiz bir 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
- DNA’yı kolondan uzaklaştırıp tüpe aktarmak için 50 µl EB Buffer eklendi. 1 dk. santrifüj yapıldı. (Verimi artırmak için EB Buffer miktarı 30 µl’ye düşürülebilir. Ayrıca santrifüjden önce 1 dk. beklemek de verimi artırabilir.)

3.1.3. *SwaI* kesimi

SpeI ile kesilen ve pürifikasyon işlemi uygulanan vektörü, *SwaI* restriksiyon enzimi ile kesmek için aşağıdaki reaksiyon hazırlanarak 25°C’de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.2 *SwaI* kesim reaksiyonu

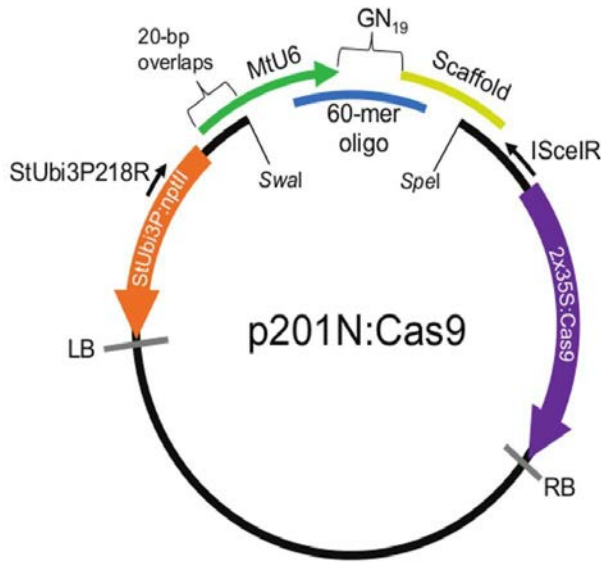
p201N:Cas9 (SpeI ile lineer hale getirilmiş halde)	17 µL
<i>SwaI</i>	1 µL
Buffer (3.1)	2 µL
Toplam hacim	20 L

3.1.4. Ligasyon

Lineer hale getirilmiş p201N:Cas9 vektörü, MtU6 promotoru, scaffold ve gRNA, ligasyon yoluyla birleştirilerek *SILsi1*-CRISPR vektörü (Şekil 3.2) oluşturulmuştur. Ligasyon reaksiyonu aşağıdaki çizelgede gösterildiği gibi hazırlanarak, 50°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Ligasyon reaksiyonu

p201N:Cas9 (100 ng)	4 µL
MtU6 promotor (50 ng)	1 µL
Scaffold (12 ng)	1 µL
<i>SILsi1</i> gRNA	1 µL
NEBuilder (HiFi DNA assembly mix)	5 µL
Nükleaz içermeyen H ₂ O	8 µL
Toplam	20 µL



Şekil 3.2. *SILsi1*-CRISPR vektörü

3.1.5. Vektörün çoğaltılması

Ligasyon sonrası gRNA'nın entegre olduğu vektörün çoğaltılabilmesi ve seçilebilmesi için ligasyon reaksiyonu *E. Coli* bakterilerine transformasyon yoluyla aktarılmıştır. Transformasyon işlemi şu basamaklardan oluşmaktadır;

- -80°C'de muhafaza edilen, gliserol stok halde bulunan kompetent *E.coli* (DH5α) bakterileri buz üzerine yerleştirildi.
- Vorteks yapılmadan, buz kristal görünümünün kaybolması beklendi.
- Buz üzerinde temiz bir mikrosantrifüj tüpüne 60 µL *E.coli* hücresi alındı.
- Kompetent hücreler hassas yapılar olduğu için pipetle alınırken pipetaj yapmamaya, tek seferde alınıp bırakılmaya özen gösterildi.
- *E.coli* (DH5α) hücrelerine 10 µL (100 pg-1 µg) çoğaltmak istenilen vektör eklendi.
- Pipetaj yapılmadı, karışması için 4-5 kez tüpe parmakla nazıkçe vuruldu.
- Karışım 30 dk. buz üzerinde inkübe edildi.
- Önceden ayarlanmış ve 42°C'ye ulaşmış su banyosu ile 30 sn. ısı şokuna maruz bırakıldı.
- Tekrar buz üzerine alınarak 5 dk. daha inkübe edildi.
- Tüpün üzerine 950 µl antibiyotik içermeyen Luria-Bertani (LB) ortamı eklendi.

- 1 saat boyunca 37°C sıcaklıkta 250 rpm hızla çalkalanmaya bırakıldı.
- Önceden hazırlanmış, 50 mg/L kanamycin (p201N:Cas9 için seçici antibiyotik) içeren LB agar üzerine ekim yapıldı.
- Petriler ters çevrilerek 37°C sıcaklıkta gece boyunca beklemeye bırakıldı.

3.1.6. Koloni PCR ile doğrulama

Antibiyotiğe dayanıklı kolonilerde ligasyon işlemini doğrulamak için koloni PCR yöntemi kullanılmıştır. PCR öncesinde, kolonilerden steril pipet ucu veya kürdan yardımıyla bir miktar hücre alınıp 1 ml sıvı besi yerinde 3-4 saat 37° C’de inkubasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.4. Koloni PCR reaksiyonu

DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)	12 µl
Forward primer (StUbi3P218R)	1 µl
Reverse primer (IsceIR)	1 µl
Koloni kültürü	3 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	8 µl
Toplam	25 µl

Çizelge 3. 5. Koloni PCR koşulları tablosu

Sıcaklık	Süre	Tekrar Sayısı
95 °C	3 dk.	1
95 °C	30 sn.	31
58 °C	30 sn.	
72 °C	30 sn.	
72 °C	5 dk.	1

Koloni PCR sonucunda oluşan ürünler %1'lik agaroz jelde yürütülüp, ligasyonun başarılı olduğu plazmitleri içeren koloniler tespit edilmiştir.

3.1.7. Plazmid izolasyonu

Ligasyonun başarılı olduğu üç koloni seçilerek plazmit izolasyonu amacıyla çoğaltılmıştır. Bu işlem için 50 ml'lik falcon tüpe 20 ml LB Broth, 20 µl kanamycin (50 mg/l) ve 20 µl kültür eklenmiştir. Karışım 37°C sıcaklıkta gece boyunca 200 rpm hızda çalkalanmıştır. Ardından GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) kitiyle üreticinin talimatlarına göre plazmid izolasyonu yapılmıştır.

3.1.8. Sanger sekanslama ile doğrulama

İzole edilen plazmitlerde, MtU6 promotor, *SILsi1* gRNA, ve scaffoldun hatasız bir şekilde entegre olduğunu tespit etmek için plazmitler Sanger metoduyla sekanslanmıştır. Sekanslamada StUbi3P218R primeri (5' ACATGCACCTAATTTCAGTAGATGT 3') kullanılmıştır.

3.2. Elde Edilen Transformasyon Vektörünün (*SILsi1*-CRISPR) *Agrobacterium tumefaciens*'e Aktarılması

SILsi1-CRISPR vektörünün domatese transformasyonu için *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) kullanılmıştır.

Vektör *Agrobacterium*'a aşağıda detayları verilen elektroporasyon yöntemiyle aktarılmıştır.

- Kompetent halde bulunan *A. Tumefaciens* LBA4404 hücreleri -80°C'lik dolaptan çıkarılıp buz üzerine alındı.
- 0,2 cm boşluğa sahip elektroporasyon küveti (Gene Pulser/MicroPulser, BIO-RAD) buz üzerinde soğutuldu.
- Buz üzerinde soğutulmuş, steril bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 50 µl *A. Tumefaciens* LBA4404 hücresi koyuldu. Üzerine 1 µl vektör ilave edildi.
- Tüp 1-2 dk. buz üzerinde tutuldu.
- Karışım buz üzerinde soğutulmuş küvet içerisine aktarıldı. Küvete bir iki kez parmakla vurularak karışımın tabana indiğinden emin olundu ve küvetin kapağı kapatıldı.
- Vakit kaybetmeden küvetin dış çeperi kurularak elektroporasyon cihazına (Eppendorf Eporator) yerleştirildi.
- 5 milisaniye, 2.5 kv gücünde ayarlanan cihaz ile küvete akım verildi.
- Cihaz içerisinden çıkarılan küvet tekrar buza yerleştirildi ve içerisine 1 ml LB Broth eklendi.
- Buzdan çıkarılarak 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 1 saat sonunda dilüsyonlar halinde Kanamycin (50 mg/l) içeren LB agar petrilere ekildi. 28°C'de inkübasyona bırakıldı.
- 2-3 gün inkübasyon süresi sonunda oluşan kolonilerden gliserol stok hazırlanarak -80°C dolaba kaldırıldı.

3.3. *Agrobacterium* Aracılığıyla Transformasyon

Domates eksplantlarına *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyon, Cortina ve Culiáñez-Macià (2004) tarafından oluşturulan protokole göre yapılmıştır.

3.3.1. Bitki yetiştirilmesi

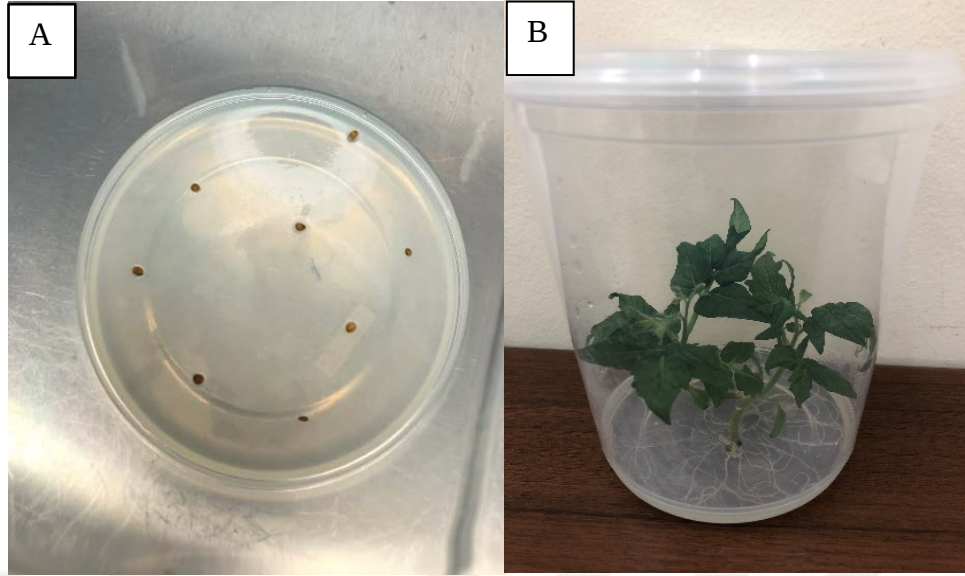
Bu çalışmada ticari domates (Micro-Tom çeşidi) tohumları kullanılmıştır. Tohumlar 3 dk. %70'lik etanol ardından 7 dk. %30'luk ticari çamaşır suyu (%4,5 sodyum hipoklorit) içerisinde tutulup yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Üç kez distile su ile durulama yapılarak, etanol ve çamaşır suyu kalıntısı kalmaması sağlanmıştır.

Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, içerisinde 60-70 ml çimlendirme ortamı bulunan kültür kaplarına (OS 140BOX/Green Filter, 140x90 mm, Duchefa) ekilmiştir. Çimlendirme ortamı içeriği şu şekildedir;

Çizelge 3.6 Çimlendirme ortamı

ÇİMLENDİRME ORTAMI	
Murashige & Skoog medium including vitamins (Duchefa)	4405,19 mg/l
Sükroz (CAISSON)	30 g/l
Agar, Bacteriological (HIMEDIA)	8 gr/l
pH: 5.8'e ayarlandı. Ardından 121°C'de 15 dk. otoklavlandı.	

Kültür kaplarına ekimi yapılan bitkiler, 25°C sıcaklığa sahip, %60 bağıl nem bulunan bitki büyütme kabininde, uzun gün şartlarında (16 saat gündüz, 8 saat gece) büyümeye bırakılmıştır.



Şekil 3.3. Domates ekimi ve büyütülmesi A) Kültür kaplarına ekilmiş domates tohumları. B) Kültür kabında büyümüş domates bitkileri

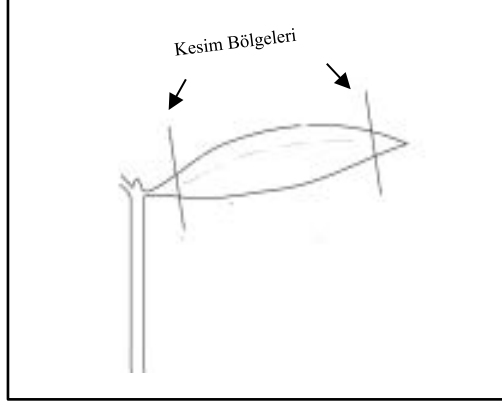
3.3.2. *Agrobacterium*un hazırlanması

SILsi1-CRISPR vektörünü barındıran *Agrobacterium* hücreleri, gliserol stoktan öze yardımıyla alınıp, Kanamycin (50 mg/l), Rifampicin (50 mg/l) ve Streptomycin (100 mg/l) antibiyotiklerini içeren LB agar petrilere ekilmiştir. Rifampicin ışığa duyarlı bir kimyasal olduğu için petriler aliminyum folyo ile kaplanarak ışık alması engellenmiştir. Daha sonra petriler 28°C’de inkübe edilmiştir.

Üç gün sonunda oluşan kolonilerden öze yardımıyla tek koloni seçilerek, 50 mg/l Kanamycin içeren 30 ml LB Broth içerisine aktarılmıştır. Ardından kültür, 28°C sıcaklıkta 230 rpm hızda çalkalanmaya bırakılmıştır. Düzenli olarak absorbansı ölçülen bakteriler, $OD_{600} = 0.5-0.6$ değerine ulaşıncaya kadar büyütülmüştür. İstenen OD’ye ulaşılmadan yaklaşık 4 saat önce kültür ortamına 200 μ M acetosyringone (Sigma-Aldrich) eklenmiştir. Kültürler istenen OD’ye ulaştıktan sonra, oda sıcaklığında 5000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Bakterilerin bulunduğu pellet kısmı korunarak, sıvı besi ortamı ve antibiyotiklerin bulunduğu süpernatant kısmı ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Ardından pellet, 1x MS ve 30 g/l sükrözden oluşan besi ortamında tekrar çözölmüştür. Bu şekilde bakteriler, eksplantlara bulaştırmaya hazır hale getirilmiştir.

3.3.3. Eksplantların hazırlanması

Yeterli büyüklüğe ulaşan (yaklaşık 4 haftalık) domates bitkilerinin yaprakları eksplant olarak kullanılmıştır. Yapraklar, steril kabin içerisinde, steril bistüri yardımıyla gövdeden ve dallardan kesilerek ayrılmıştır. Yaprakların uç kısımları ile sap kısımları da kesilerek uzaklaştırılmıştır.

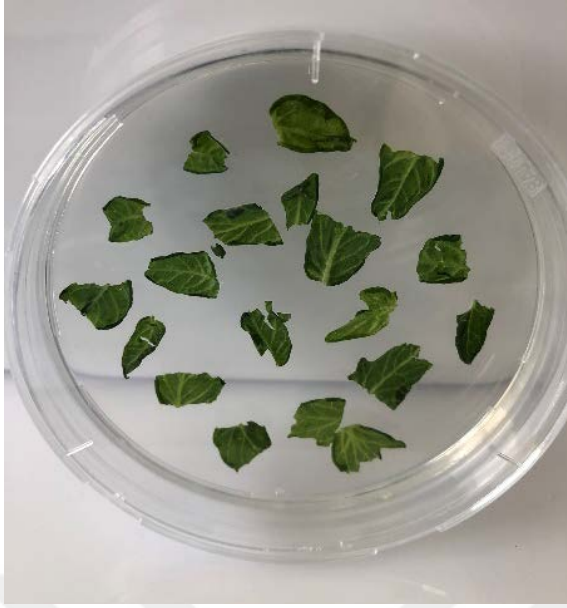


Şekil 3.4. Yaprığın kesim bölgeleri

Kesilen yapraklar ortalama olarak 6-8 mm² boyutunda parçalara ayrılmıştır. Bu işlem, yapraklar 30 g/l süktroz içeren 1x MS ortamının içinde tutularak yapılmıştır. Bu sayede yaprakların kurumaması sağlanmıştır. Eksplant, üst kısmı (adaksiyal) besi ortamına değecek şekilde ön kültür ortamı petrilere yerleştirilmiş ve oda sıcaklığındaki karanlık ortamda iki gün inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.7. Ön kültür ortamı

ÖN KÜLTÜR ORTAMI	
Murashige & Skoog medium including vitamins (Duchefa)	4405,19 mg/l
Süktroz (Caisson)	30 g/l
Agar, Bacteriological (Himedia)	8 gr/l
1-Naphthaleneacetic acid, NAA (Duchefa)	1 mg/l
6-Benzylaminopurine solution, BAP (Sigma-Aldrich)	1 mg/l
pH: 5.8. 121°C’de 15 dk. otoklavlandı. Hormonlar otoklav sonrası karışımın sıcaklığı 55°C’ye düştükten sonra eklenmiştir.	



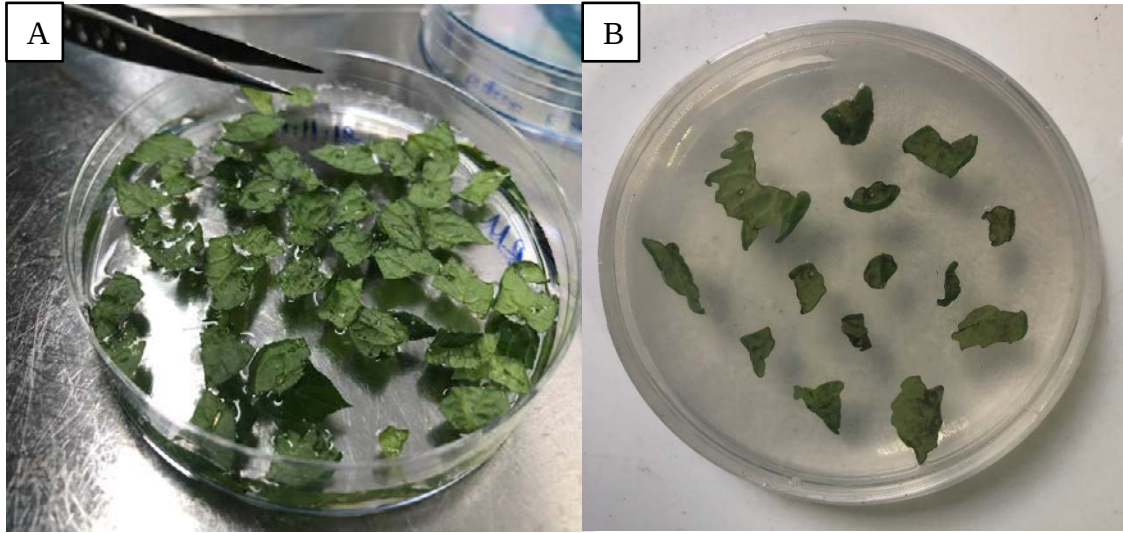
Şekil 3.5. Ön kültür ortamındaki eksplantlar

3.3.4. *Agrobacterium*’ların eksplantlara inoküle edilmesi

İki gün boyunca ön kültür ortamında beklemiş olan eksplantlar boş bir petri kabı içerisine steril pens yardımıyla aktarılmıştır. Önceden hazırlanmış olan inokülasyona hazır bakteri süspansiyonu, eksplantların üzerine eksplantların tamamını kaplayacak şekilde dökülmüştür. Otuz dakika boyunca eksplantlar süspansiyon içerisinde hareket ettirilerek tutulmuştur. Negatif kontrol eksplantları ise *Agrobacterium* içermeyen 1x MS + Sükroz (30g/l) karışımında bekletilmiştir. Otuz dakika sonunda bakteri süspansiyonun içinden çıkarılan eksplantlar, yaprağın alt kısmı (abaksiyal) ortama değecek şekilde eş kültür ortamı (Co-Culture Medium) içeren petri üzerine alınmıştır.

Çizelge 3.8. Eş kültür ortamı

EŞ KÜLTÜR ORTAMI	
Murashige & Skoog medium including vitamins (Duchefa)	4405,19 mg/l
Sükroz (Caisson)	30 g/l
Agar, Bacteriological (Himedia)	8 gr/l
1-Naphthaleneacetic acid, NAA (Duchefa)	1 mg/l
6-Benzylaminopurine solution, BAP (Sigma-Aldrich)	1 mg/l
Acetosyringone (Sigma-Aldrich)	200 µM
pH: 5,8, 121°C’de 15 dk. otoklavlandı. Hormonlar otoklav sonrası karışımın sıcaklığı 55°C’ye düşükten sonra eklenmiştir.	



Şekil 3.6. İnokülasyon ve eş kültür ortamı A) *Agrobacterium* ile inoküle edilmiş eksplantlar B) Eş kültür ortamındaki eksplantlar

3.3.5. Transformasyon

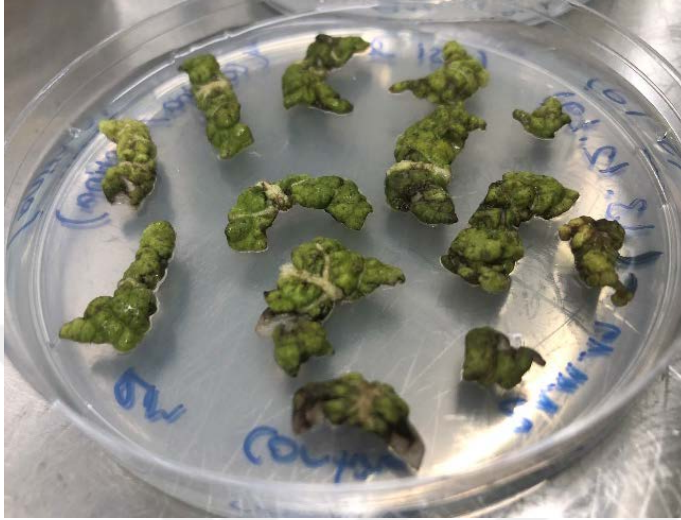
Eksplantlar, 2 gün oda sıcaklığında karanlık bir ortamda, eş kültür ortamında tutulmuştur. *Agrobacterium*'ları uzaklaştırmak için, steril pens yardımıyla alınan eksplantlar, antibiyotik içeren sıvı besi ortamına (1x MS + 30 g/l sükroz + 200 mg/l Timentin) daldırılmıştır. Daha sonra steril kurutma kâğıdı ile kurulanıp yenileme ortamı (regeneration medium) petrilere alınmıştır.

Yenileme ortamı; eksplantlardan kallus oluşumu için gereken hormonları, transformasyon sonrasında eksplantlar üzerinde kalan *Agrobacterium*'u öldürmek için kullanılan Timentin'i ve transforme olmuş kallusların seçilimi için gerekli antibiyotik olan Kanamycin'i barındırmaktadır. Pozitif kontrol olarak kullanılan besin ortamında, eksplantlardan seçilimsiz kallus oluşumu beklendiği için, Kanamycin bulunmamaktadır.

Çizelge 3.9. Yenileme ortamı

YENİLEME (Rejenerasyon) ORTAMI	
Murashige & Skoog medium including vitamins (Duchefa)	4405,19 mg/l
Sükroz (CAISSON)	30 g/l
Agar, Bacteriological (HIMEDIA)	8 gr/l
Zeatin (CAISSON LAB)	0,5 mg/l
3-Indoleacetic acid- IAA (Duchefa)	0,5 mg/l
Timentin (GoldBio)	200 mg/l
Kanamycin (Sigma-Aldrich)	100 mg/l
pH: 5.8'e ayarlandı. Ardından 121°C'de 15 dk. otoklavlandı. Hormonlar ve antibiyotikler otoklav sonrası karışımın sıcaklığı 55°C'ye düştükten sonra eklendi.	

Eksplantların bulunduğu yenileme ortamı petrileri 24°C sıcaklığa sahip, %60 bağıl nem içeren bitki büyütme kabininde 16 saat ışık 8 saat karanlık altında inkübasyona bırakılmıştır. İki haftada bir eksplantlar yeni yenileme ortamı petrilerine aktarılarak besiyerleri tazelenmiştir.



Şekil 3.7. Yenileme ortamında bulunan eksplantlar

3.3.6. Transformantların rejenere edilmesi

Kalluslardan oluşan filizler, 2-3 cm boya ulaştıktan sonra steril bistüri ile kallustan ayrılmış ve yenileme ortamından alınıp, kültür kabında bulunan köklendirme ortamına konulmuştur. Besin ortamının hacminin ve yüksekliğinin artmasıyla, filizlerin daha rahat büyümesi ve köklenmesi amaçlanmıştır.

Çizelge 3.10. Köklendirme ortamı

KÖKLENDİRME ORTAMI	
Murashige & Skoog medium including vitamins (Duchefa)	4405,19 mg/l
Sükroz (Caisson)	30 g/l
Agar, Bacteriological (HiMedia)	8 gr/l
Timentin (GoldBio)	100 mg/l
Kanamycin (Sigma-Aldrich)	100 mg/l
pH: 5.8'e ayarlandı. Ardından 121°C'de 15 dk. otoklavlanır. Antibiyotikler otoklav sonrası karışımın sıcaklığı 55°C'ye düştükten sonra eklenir.	

3.4. Aklimatizasyon

Kültür kabı içerisinde köklenen bitkilerin dış ortama alıştırılmaları gerekmektedir. Bu amaçla bitkiler, köklerine zarar vermeden besin ortamından dikkatlice çıkarılmış, %75 torf ve %25 perlit içeren plastik saksılara (8x8x9 cm) ekilmiştir. Yapraklarına distile su ile spreyleme yapılarak ortamdaki nem miktarı artırılmıştır. Akabinde, saksılar ışık geçirebilen, hava almayan poşetler ile kapatılmıştır. Böylelikle, bitkilerin direk havayla teması kesilmiş ve yüksek nemli ortamda kalmaları sağlanmıştır. Yaklaşık üç gün sonunda poşette delikler açılmaya başlanmış olup delik sayısı kademeli olarak artırılmış ve 10 gün sonunda poşetler tamamen çıkarılmıştır. Bitkiler bu süre zarfında 25°C sıcaklığa, %70 bağıl neme sahip bitki büyütme kabininde, uzun gün ışık koşullarında (16 saat gündüz, 8 saat gece) tutulmuşlardır. Bitkiler üç günde bir sulanmıştır. Bitkilerin sulanmasında Hoagland's No.2 Basal Salt Mixture (Caisson) besin çözeltisi kullanılmıştır.

Dış ortama alıştırılmış olan T₀ bitkileri küçük saksılardan çıkartılıp daha büyük saksılara alınmıştır. Büyüme sıcaklıkları 25°C gündüz sıcaklığı, 23°C gece sıcaklığı olacak şekilde değiştirilmiştir.

3.5. PCR ile Transformasyonun Doğrulanması

Bitkiler yeterli büyüklüğe ulaşınca, CTAB metoduyla DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon aşamaları aşağıda verilmiştir.

- Bitkiden alınan örnek 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne koyulmuş ve üzerine 150 µl CTAB+ β-merkaptotanol eklenmiştir.
- Ezme çubuğu vasıtasıyla yapraklar iyice ezilmiştir.
- Üzerine 300 µl CTAB+ β-merkaptotanol daha eklenmiş ve tüpün kapağı sıkıca kapatılarak 65°C'lik su banyosunda 2 saat inkübe edilmiştir.
- Su banyosundan alınan tüpe 450 µl Kloroform izoamil alkol solüsyonu (24:1) eklenmiştir.
- 13 000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj sonucu oluşan süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
- Alınan süpernatant hacmi kadar kloroform izoamil alkol solüsyonu (24:1) eklenmiştir.
- 13 000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Üst faz alınmış ve aynı hacim kadar soğuk izopropil alkol eklenmiştir. Tüp hafifçe 4-6 kez yukarı aşağı çevrilerek karışması sağlanmıştır.
- Tüp -20°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- Tekrar 13 000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Tüp dibinde oluşan pellete zarar vermeden, süpernatant kısmı pipet yardımıyla alınmıştır.
- Pelet üzerine -20°C'lik dolaptan çıkarılan %70'lik etil alkolden 300 µl eklenmiştir. Tekrar 13 000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapılmıştır.

- Tekrar süpernatantı uzaklaştırıp, etanol ekleyerek son basamak tekrarlanmıştır.
- Süpernant pellete zarar vermeden dökülmüş ve kalan etil alkolün buharlaşması için pellet oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
- Etil alkol buharlaştıktan sonra (pelletin tamamen kurumamasına dikkat edilerek) pellet 100 µl nükleaz içermeyen suyla çözülmüştür.

Transformasyonu doğrulamak için elde edilen DNA'lar üzerinde, çizelgede sekansları verilen iki ayrı primer seti kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.11. PCR reaksiyonunda kullanılan primer setleri

Primer İsmi	Primer Sekansı
<i>SLPrimer1_i_F</i>	CTTCAAGCGAACCAGTAGGC
<i>SLPrimer1_i_R</i>	GCTCCACCATGTTCACATCA
<i>SLPrimer2_B_F</i>	GCTCCTGGCTTGGGAATGAT
<i>SLPrimer2_B_R</i>	CCGTGCTGTTCTTTTGAGCC

Çizelge 3.12. PCR reaksiyonu

DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	12 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
DNA	3 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	8 µl
Toplam Hacim	25 µl

3.6. Dizi Analizi ile Doğrulama

PCR reaksiyonları beklenen bant uzunluklarına sahip bitkilerin DNA'ları Sanger sekanslama yöntemi ile sekanslanmıştır. Sekanslama işlemi, hizmet alımı yoluyla Sentebiolab (ANKARA) firmasına yaptırılmıştır. Sanger okuması, aşağıdaki çizelgede verilen primerler ile çift yönlü olarak yapılmıştır.

Çizelge 3.13. Sanger sekanslama için kullanılan primerler

Primer İsmi	Primer Sekansı
<i>SLLsi1</i> -F	GGAGAGTGAAGGAGGGAAGT
<i>SLLsi1</i> -R	CGAGCACGAAATTTGATGCG

3.7. RT-qPCR ile mRNA Analizi

RNA izolasyonu bitkinin yaprağından RNA Plant Mini Kit (Qiagen) yardımıyla üreticinin protokolü takip edilerek yapılmıştır.

İzole edilen RNA'da DNA bulaşıklığının devam edip etmediğini görmek üzere 500 ng RNA %0,8'lik agaroz jel üzerinde elektroforez yöntemiyle yürütülmüştür.

Bilindiği üzere Real Time-quantitative PCR (RT-qPCR) analizleri çok hassas analizlerdir. Reaksiyon kurulurken kalıp RNA'nın her örnekte aynı miktarda olması, deney doğruluğu için büyük önem teşkil etmektedir. Bu yüzden RT-qPCR analizinden önce örneklerin tam miktarının belirlenmesi için Qubit Fluorometric Quantification cihazı kullanılmıştır. Örneklerdeki RNA miktarı, Qubit RNA BR Assay Kit kullanılarak ölçülmüştür.

RT-qPCR analizleri Light Cycler 96 (Roche) cihazı ile yapılmıştır. *SLLsi1* geninin ifadesi, DNase muamelesi görmüş 10 ng RNA ile Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit (NEB) kullanılarak hesaplanmıştır. Reaksiyon Çizelge 3.14'te verilen şekilde kurulmuştur.

Çizelge 3.14. RT-qPCR reaksiyonu

Luna Universal One-Step Reaction Mix (2X)	2,5 µl
Luna WarmStart® RT Enzyme Mix (20X)	0,25 µl
Forward primer (10 µM)	0,4 µl
Reverse primer (10 µM)	0,4 µl
Template RNA (5 ng/µl)	2 µl
Nükleaz içermeyen su	1,45 µl
Toplam Hacim	7 µl

Çizelge 3.15. RT-qPCR reaksiyonunda kullanılan primerler

Primer İsmi	Primer Sekansı
<i>Sl_Lsi1_F</i>	CCGTAGCTGGTGGACTCATT
<i>Sl_Lsi1_R</i>	CTGTGTCCATGGGAAATGTCT

RT-qPCR analizlerinde kullanılan primerler Primer 3 Input programı (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) yardımıyla tasarlanmış ve Macrogen (Hollanda) tarafından sentezlenmiştir. (Çizelge 3.15).

3.8. T₁ Hattının Elde Edilmesi ve Yetiştirilmesi

T₀ bitkilerinin olgunlaşmış meyvelerinden tohumlar elde edilmiştir. Oda sıcaklığında kurutulan tohumlar, %75 torf ve %25 perlit içeren plastik saksılara (8x8x9 cm) ekilmiştir. Ekimi yapılan tohumlar, 25°C sıcaklıkta, %60 bağıl nem içeren bitki büyütme kabininde, uzun gün koşullarında büyümeye bırakılmıştır. Bitkiler üç günde bir 1/4 Hoagland's No.2 Basal Salt Mixture (Caisson) besin çözeltisi ile sulamıştır.

3.9. T₁ Bitkilerinin PCR ile Kontrolü

Yeterli büyüklüğe ulaşan T₁ bitkilerinden yaprak örneği alınmış ve CTAB yöntemiyle DNA'sı elde edilmiştir. Elde edilen DNA'lar, Çizelge 3.11'de sekansı gösterilen *SLPrimer1_i* primer seti ile PCR işlemine tabi tutulmuştur.

3.10. T₁ Bitkilerinin Dizi Analizi ile Kontrolü

PCR reaksiyonları beklenen bant uzunluklarına sahip T₁ bitkilerinin DNA'ları Sanger yöntemi ile sekanslanmıştır. Sekanslama işlemi, hizmet alımı yoluyla BM Lab (Ankara) firmasına yaptırılmıştır. Sanger okuması, Çizelge 3.15'te sekansı gösterilmiş olan *Sl_Lsi1_F* primeri ile tek yönlü olarak yapılmıştır.

3.11. T₁ Bitkilerinin RT-qPCR ile mRNA Analizi

T₁ bitkilerinde *SLsi1* geninin ifadelenip ifadelenmediğini kontrol etmek için RT-qPCR yöntemi ile mRNA analizi yapılmıştır. RT-qPCR işlemi Başlık 3.7'de bahsedilen şekilde yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Domates çekici rengi, tadı ve mükemmel beslenme özellikleri nedeniyle Dünya’da en çok tüketilen sebzelerden birisidir (Wang vd. 2010). Domates ve domatesten elde edilen ürünler, A ve C vitaminleri başta olmak üzere, β -karoten, flavonoidler, likopen ve organik asitler gibi birçok yararlı bileşik barındırmaktadır. Çalışmalar, yüksek domates tüketiminin, bazı kanser türlerine ve kardiyovasküler hastalıklara yakalanma riskini azalttığını göstermiştir (Sahlin vd. 2004).

Çoğu bitkisel üründe olduğu gibi domates yetiştiriciliğinde de üreticiler birçok sorunla baş etmektedir. Bakteriyel hastalıklar, kuraklık, tuz ve soğuk gibi stresler bu sorunların başında gelmektedir. Bu sorunlar, bitkilerin erken ölümüne, fotosentetik alan kayıplarına ve pazarlanamaz meyve üretimine sebep olarak, üreticileri büyük zararlara uğratmaktadır. Bu sorunlarla başa çıkmak için dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, biyolojik kontrol ve kimyasal tarım ilaçlarının kullanılması gibi bazı çözümler denenmektedir. İnsanlarda çevre duyarlılığının arttığı günümüzde, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler çevre dostu, sürdürülebilir tarımsal mücadele yöntemleri geliştirmeye çalışmaktadır (el-gamal vd. 2007).

Silisyum, gübre olarak uygulanmasıyla bitkilerde biyotik ve abiyotik streslere karşı daha fazla tolerans sağlayan bir elementtir. Doğada en çok bulunan elementlerden biri olması ve kimyasal tarım ilaçları gibi çevreye zarar vermemesiyle ön plana çıkmaktadır. Çevre dostu ve sürdürülebilir tarımsal mücadele için silisyum bazlı çalışmalar büyük önem arz etmektedir. Silisyumun, bitkilerde streslere karşı direnci artırmasının mekanizması henüz çözülememiştir. Bu konuda fiziksel bariyer oluşumu hipotezi vardır. Hipoteze göre polimerleşen silisyum, hücre duvarında birikmekte ve bitkiye fiziksel direnç kazandırmaktadır (Yoshida vd. 1959; Samuels vd. 1991; J. F. Ma vd. 2002).

Çeltik ve sucul çayırlar gibi bazı bitki türleri dokularında %1-10 gibi yüksek miktarlarda silisyum biriktirmektedir. Bu bitkiler akümülatör bitki olarak sınıflandırılmıştır ve topraktaki silisyumu aktif olarak dokularına almaktadır. Salatalık gibi bitkiler ise silisyumu pasif olarak alabilmekte ve ortalama düzeyde silisyum birikimi göstermektedir. Ancak domates gibi akümülatör olmayan bitkiler topraktaki silisyumu çok az almakta ve dokularındaki silisyum birikimi az olmaktadır (Takahashi vd. 1990). Bu varyasyonların moleküler mekanizması henüz aydınlatılamamıştır.

Birçok bitkide topraktan bitki köküne silisyum alımının genetik altyapısı araştırılmış ve ilk defa çeltik bitkisinde silisyum alımından sorumlu kanal proteinini kodlayan gen tanımlanmıştır. Low silicon rice (*Lsi1*) adı verilen bu genin kodladığı protein, çeltik kökünün distal yani merkezden uzak tarafındaki plazma membranı üzerinde lokalize olmaktadır.

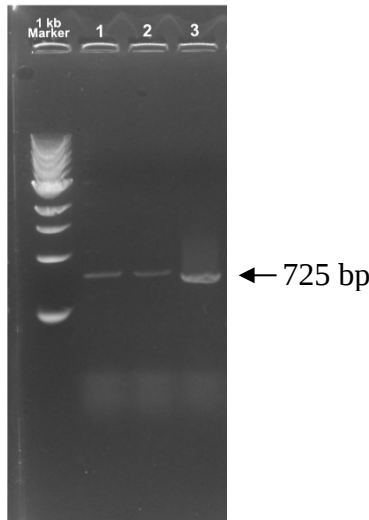
Domates bitkisindeki silisyum alım mekanizmasını aydınlatmak için Deshmukh vd. (2015) yaptıkları çalışmayla, biyoinformatik yollarla buldukları *SILsi1* genini domatesten izole edip, *Xenopus laevis* oositlerine aktarmışlardır. Ancak bu genin herhangi bir silisyum taşıma aktivitesi göstermediğini ifade etmişlerdir

Sun vd. (2020) domateste silisyum alım mekanizmasını keşfetmek için *in silico* olarak, çeltikteki *Lsi1* geninin heterologu olduğunu tahmin ettikleri *SILsi1/SINIP2-1* genini *Xenopus laevis* oositlerine aktarmışlar ve silisyum taşıma aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Sun vd, Deshmukh vd. den farklı olarak, *Lsi1* genini barındırmayan *Lsi1* mutant çeltik hatlarının taşıma aktivitesi gösterdiğini bulmuşlardır. Bu sonuç *Lsi1* geninin domateste silisyum alım aktivitesiyle görevli olduğunu göstermektedir. Hem Deshmukh vd. hem de Sun vd. üzerinde çalıştıkları aynı gen olmasına rağmen farklı sonuçlara ulaşmaları, *Lsi1* geninin işlevi hakkında yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Yapılan bu çalışmalarda domates genomuna, genom düzenleme araçlarıyla bir modifiye yapılmamış, genler oositte ifadeleme, mutant çeltik bitkisine klonlama gibi yöntemlerle incelenmiştir.

4.1. Ligasyonun Koloni PCR ile Doğrulanması

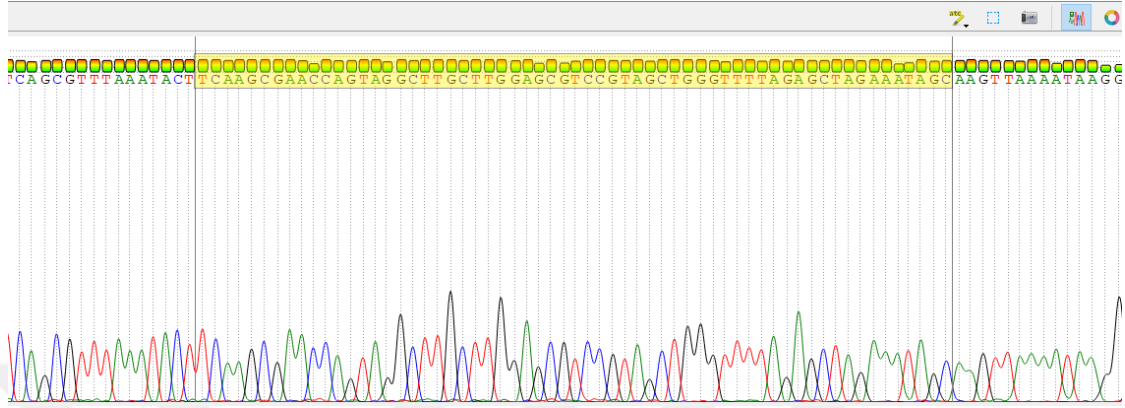
Ligasyon sonrası, doğru *SILsi1*-CRISPR vektörünün aktarıldığı *E. coli* bakterilerini seçmek ve doğrulamak için, petri üzerindeki tek kolonilerden rastgele 3 tanesi seçilerek, koloni PCR kurulmuştur. Koloni PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmesiyle, seçilen kolonilerin tamamının doğru insersiyonu barındıran koloniler olduğu doğrulanmıştır. Doğru insersiyonu içeren kolonilerin bant boyutunun 725 bp, insersiyon olmayan kolonilerde ise bant boyutunun 310 bp olması beklenmektedir.



Şekil 4.1. Koloni PCR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü

4.2. Sanger Sekanslama ile Doğrulama

Seçilen üç adet koloniden izole edilen plazmitlerin sekans sonucu aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 4.2. Sanger metoduyla sekanslanmış *Lsi1* plazmidi

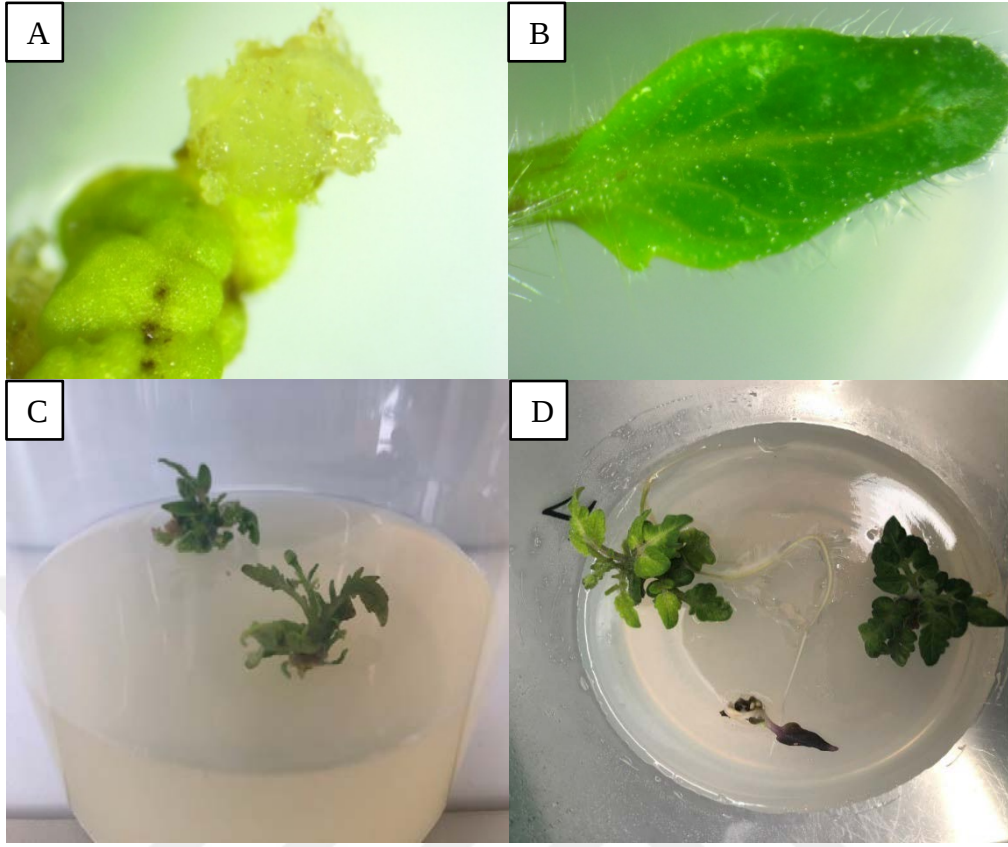
Sanger sekanslaması sonucu *Lsi1* plazmidinin promotor-gRNA-scaffold sekanslarını hatasız bir şekilde taşıdığı görülmüş ve *SILsi1* geninin susturulmasında bu plazmid kullanılmıştır.

4.3. Transgenik Hatların Üretimi

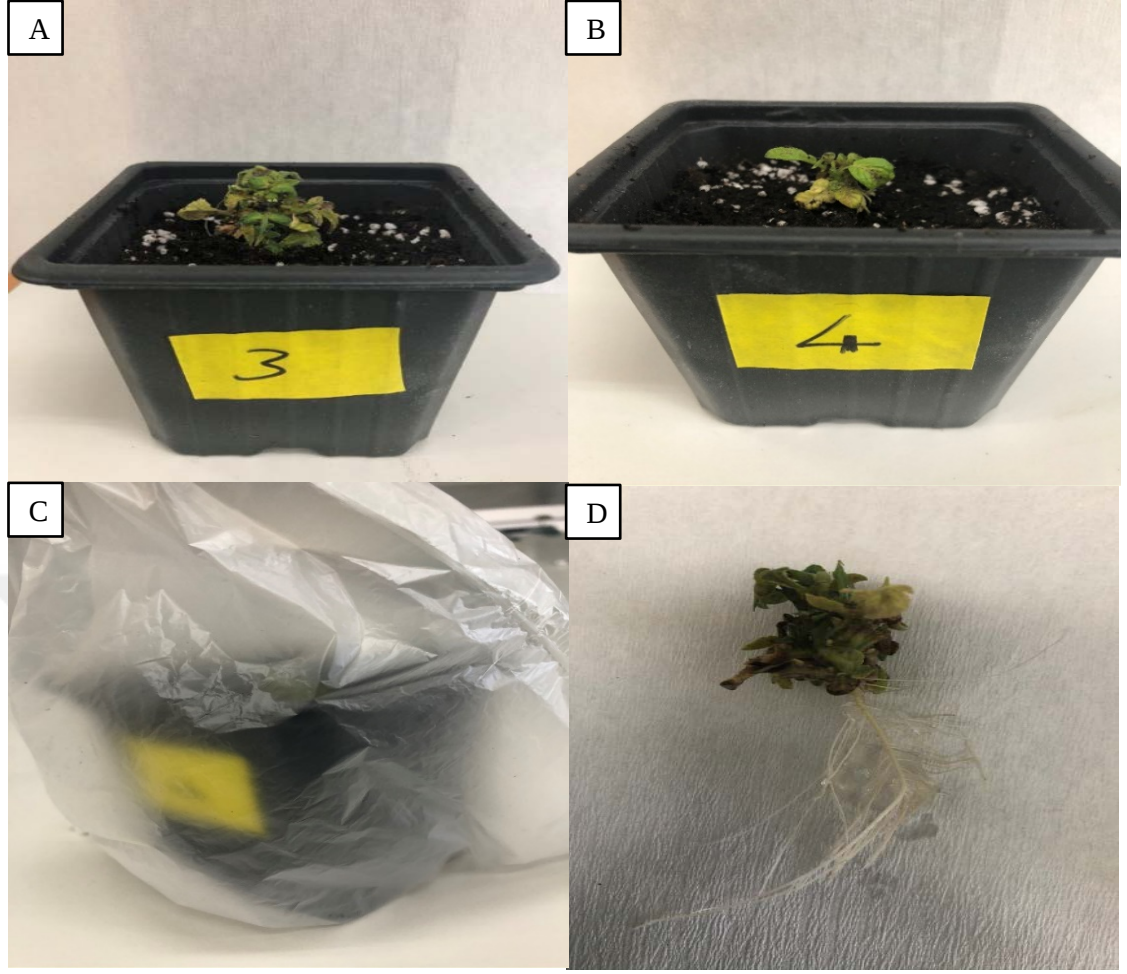
Dört farklı domates bitkisinden 80 adet eksplant oluşturulmuştur. Rejenerasyon ortamına aktarılan eksplantlardan dört- beş hafta içinde 60 adet kallus oluşmuş, kallus oluşumundan üç- dört hafta sonra ise kalluslardan 6 adet sağlıklı sürgün elde edilmiştir (Şekil 4.3).

Sağlıklı bir şekilde köklendirilen altı sürgünden bir tanesi, gelişmeden ölmüştür. Bir diğeri ise kontaminasyon sebebiyle kaybedilmiştir. Sonuç olarak köklendirilen altı bitkiden dört tanesi saksıya aktarılabilmektedir.

Besi ortamından küçük saksılara aktarılan iki bitki, hiçbir gelişme göstermemiş ve ölmüştür (Şekil 4.4). İki bitkinin ölümüne, aklimatizasyon aşamasındaki (muhtemelen aşırı ventilasyon nedeniyle nem kaybı sebebiyle) başarısızlığın sebep olduğu düşünülmüş ve bunun üzerine uygulama şekli değiştirilmiştir.

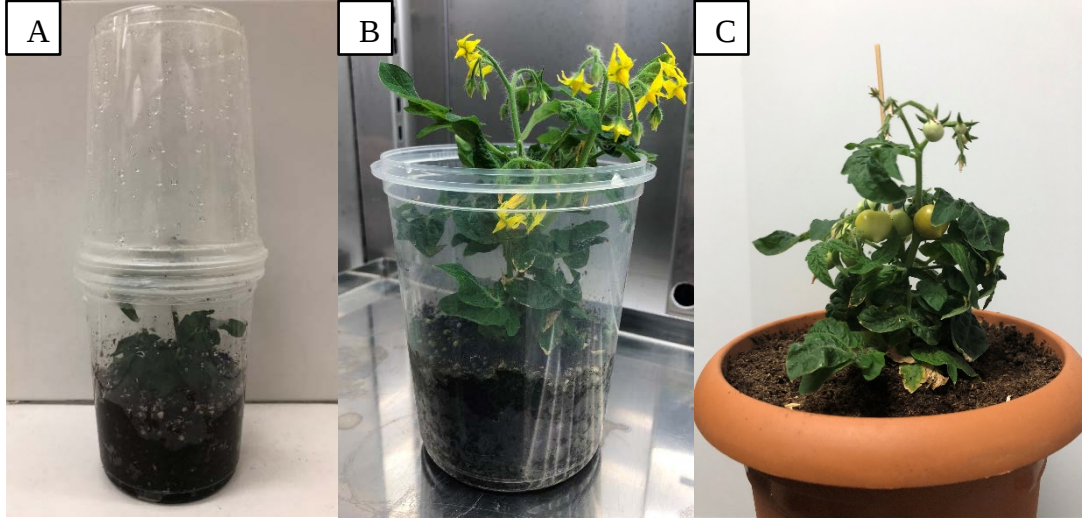


Şekil 4.3. Transgenik hatların üretimi A) Eksplanttan oluşan kallusun stereo mikroskop altındaki görüntüsü; B) Kallustan oluşan sürgünün stereo mikroskop altındaki görüntüsü; C) Kültür kabındaki köklendirme ortamında gelişmiş bitkiler; D) Köklendirme ortamında köklenmiş bitkiler



Şekil 4.4. Poşet ile yapılan aklimatizasyon işlemi A-B) Kültür kabından saksıya aktarılan ve daha sonra ölen bitkiler; C) Aklimatizasyon için poşet geçirilmiş saksı; D) Bitkilerin kültür ortamından çıkarıldığı andaki kök yapısı

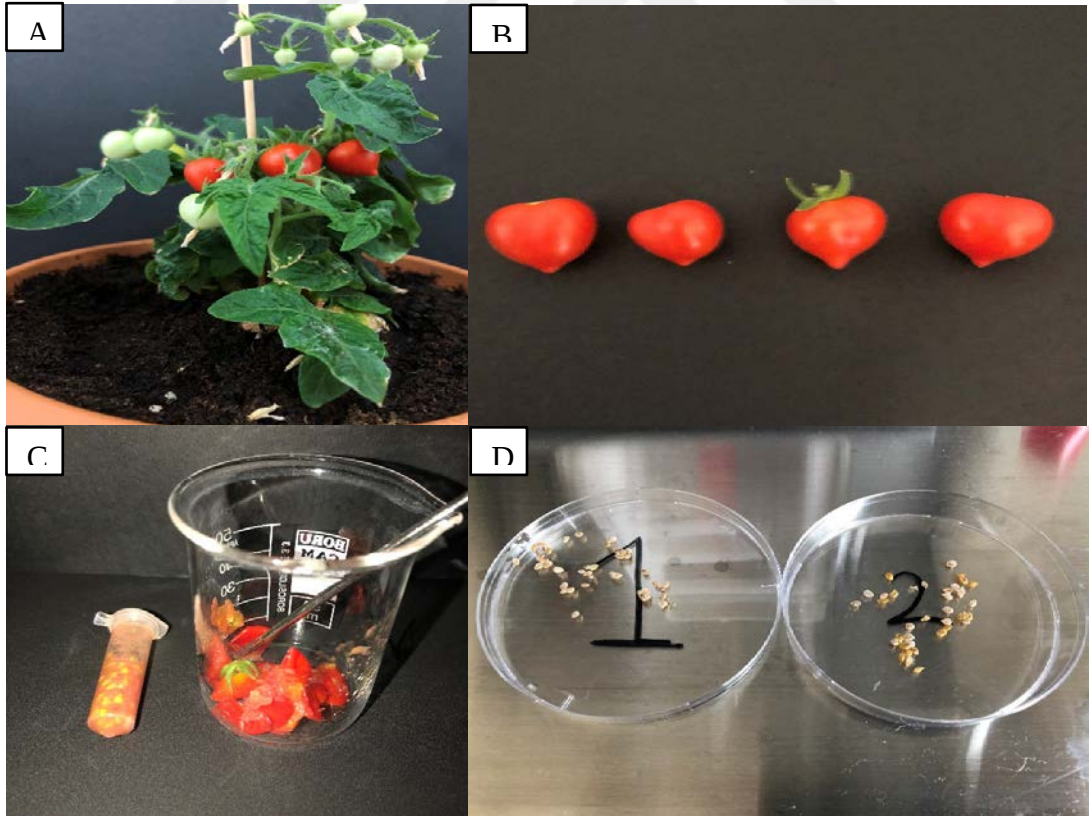
Diğer iki bitki küçük saksı yerine kültür kabı içerisindeki %75 torf, %25 perlit karışımına ekilmiş ve diğer bir kültür kabı üzerine geçirilmiştir. Kültür kapları birbirlerine bantlanarak dış ortam ve bitki arasındaki hava akışı kesilmiştir. Önceki aklimatizasyon sisteminde olduğu gibi saksılar üzerine geçirilen poşeti delmek yerine, üstte bulunan kültür kabı 4 farklı yerinden delinmiş ve bitkiler bu şekilde aklimatize edilmiştir (Şekil 4.5). Bu şekilde uygulanan aklimatizasyon işleminin saksıya poşet geçirme uygulamasına göre daha faydalı olduğu görülmüştür. Geriye kalan ve sağlıklı bir şekilde aklimatize edilen 2 bitki büyük saksılara aktarılmıştır.



Şekil 4.5. A) Kültür kabıyla oluşturulan aklimatizasyon ortamı; B) Kültür kabında aklimatize edilen ve büyüyen T₀ bitkisi; C) Saksıya aktarılan T₀ bitkisi

4.4. T₁ Bitkilerinin Elde edilmesi

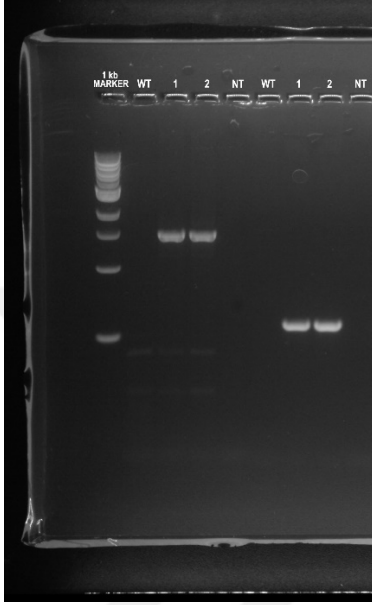
T₀ bitkilerinin olgunlaşmış meyveleri toplanıp fermantasyon yöntemiyle tohumları elde edilmiştir.



Şekil 4.6. T₁ bitkilerinin eldesi A) T₀ bitkisinin olgunlaşmış domatesleri; B) Tohumları elde edilmek üzere toplanmış domatesler; C) Domateslerin tohumlarının alınması; D) Elde edilmiş T₁ tohumları

4.5. T₀ Bitkilerinin PCR ile Kontrolü

Bir ve iki numaralı bitkilerden elde edilen DNA'lar, *SLPrimer1_i* ve *SLPrimer2_B* primer setleri ile PCR reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Elde edilen PCR ürünlerinin jel elektroforezinde yürütülmesi sonucu, her iki bitkinin de pozitif oldukları, yani *SLsi1*-CRISPR vektöründeki t-DNA bölgesinin bir kısmını taşıdıkları görülmüştür (Şekil 4. 7).



Şekil 4. 7. 1 ve 2 numaralı bitkilerin jel elektroforez görüntüsü

4.6. T₀ Bitkilerinin Dizi Analizi

SLsi1-F (5'GGAGAGTGAAGGAGGGAAGT'3) ve *SLsi1*-R (5'CGAGCACGAAATTTGATGCG'3) primerleri ile 1 ve 2 numaralı bitkilerin DNA'ları çift yönlü olarak Sanger yöntemiyle sekanslanmıştır. Hedef lokusta CRISPR/Cas9 yoluyla gerçekleşen kesim CRISP-ID (<http://crispid.gbiomed.kuleuven.be/>) programı ile analiz edilmiştir (Dehairs vd. 2016).



Şekil 4.8. 1 numaralı bitkinin forward primer ile yapılan Sanger okuması sonucu



Şekil 4.9. 1 numaralı bitkinin reverse primer ile yapılan Sanger okuması sonucu



Şekil 4.10. 2 numaralı bitkinin forward primer ile yapılan Sanger okuması sonucu

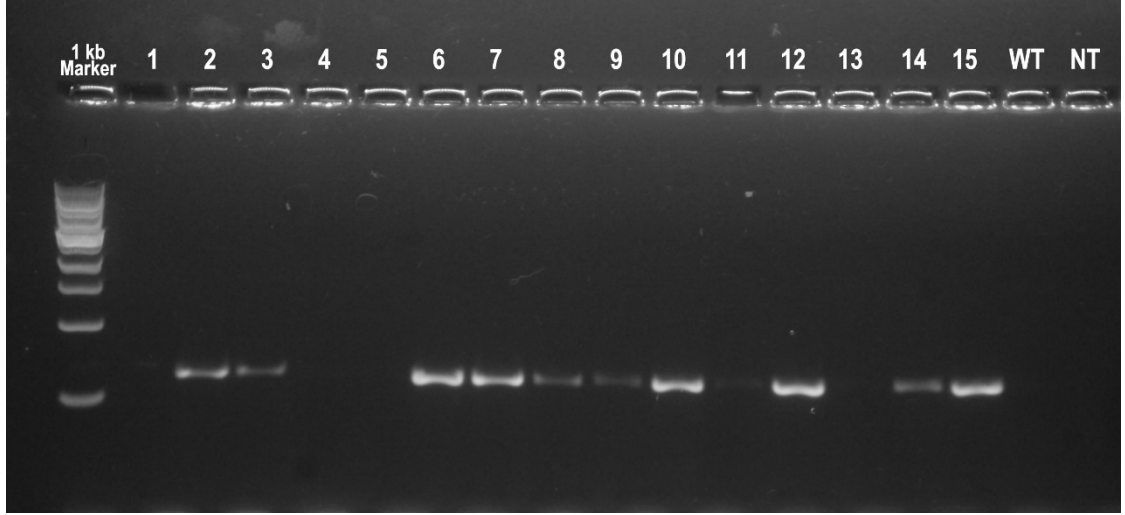


Şekil 4.11. 2 numaralı bitkinin reverse primer ile yapılan Sanger okuması sonucu

Yapılan kesim analizi sonrasında; 1 ve 2 numaralı T_0 bitkilerinde, *SILsi1* geninin kesilmek istenen bölgesinde başarılı bir şekilde çift zincir kırığı oluşturulduğu görülmüştür. Yapılan bu genomik modifikasyon sonucu 1 numaralı bitkide monoallelik 4 bp (TAGC) delesyon ve 2 numaralı bitkide ise monoallelik 1 bp (C) insersiyon oluşmuştur.

4.7. T_1 Bitkilerinin PCR ile Kontrolü

Toprağa ekilmiş ve sağlıklı bir şekilde büyümüş olan T_1 bitkilerinden rastgele seçilmiş olan 15 tanesinin (8 adet 1 numaralı bitkiden elde edilmiş, 7 adet 2 numaralı bitkiden elde edilmiş) CTAB yöntemiyle DNA'ları elde edilmiş ve bu DNA'lara *SLPrimer1_i* primeri ile PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforez yöntemiyle yürütülmüştür. 16 bitkiden 11 tanesinin pozitif sonuç verdikleri yani *SILsi1*-CRISPR vektöründeki t-DNA'yı taşıdıkları görülmüştür.

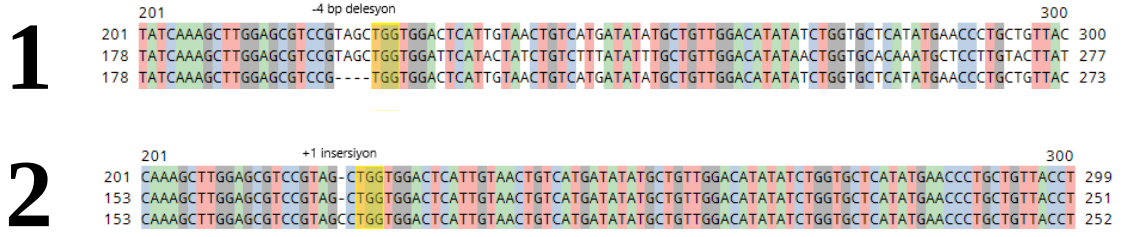


Şekil 4. 12 T₁ bitkilerinin jel elektroforez görüntüsü

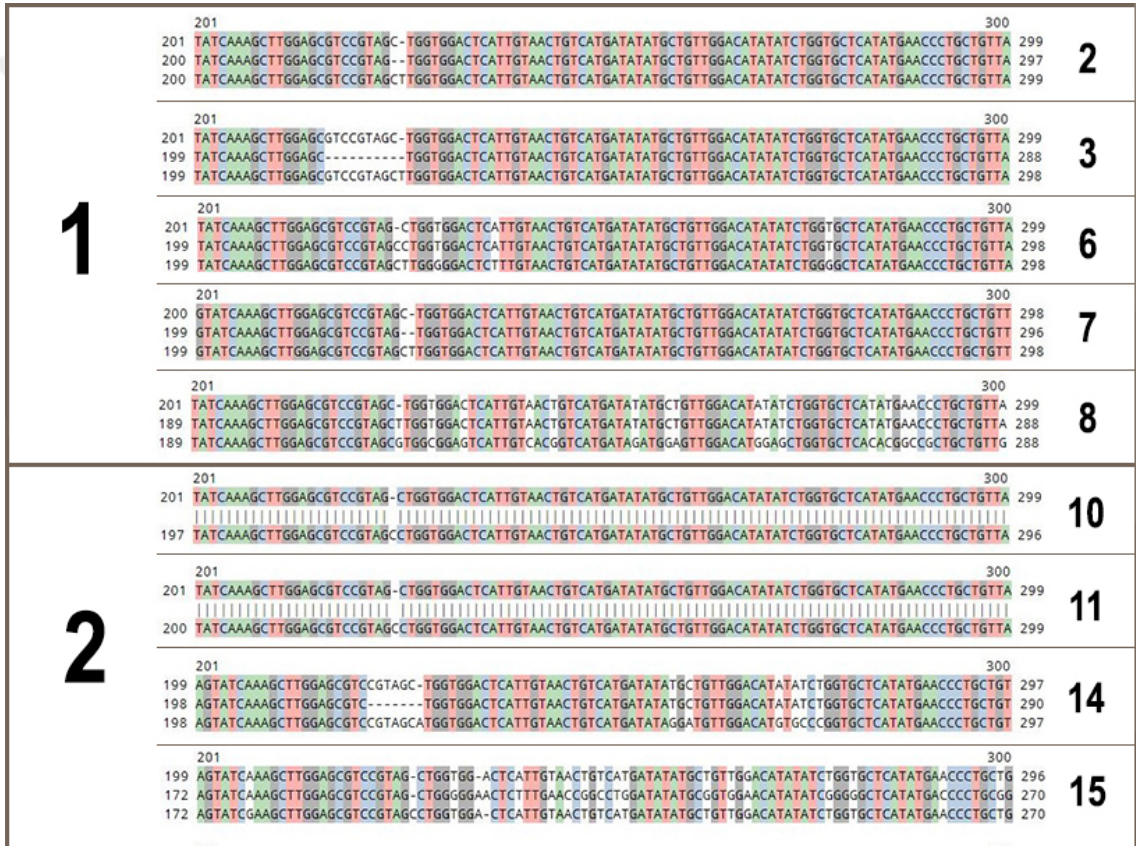
4.8. T₁ Bitkilerinin Dizi Analizi

PCR kontrolü sonrası pozitif sonuç veren beş adet (2-3-5-6-7-8) 1 numaralı T₀ bitkisinden elde edilmiş ve dört adet (10-11-14-15) 2 numaralı T₀ bitkisinden elde edilmiş toplam dokuz adet T₁ bitkisinin DNA'sı *SILsi1-F* (5'GGAGAGTGAAGGAGGGAAGTGA'3) primeri ile Sanger yöntemiyle sekanslanmıştır. Hedef lokusta CRISPR/Cas9 yoluyla gerçekleşen kesim CRISP-ID (<http://crispid.gbiomed.kuleuven.be/>) programı ile analiz edilmiştir (Dehairs vd. 2016).

T₀ Bitkileri



T₀ T₁ Bitkileri T₁



Şekil 4. 13 T₁ bitkilerinin Sanger okuması sonucu (ilk satırlar referans sekanslardır.)

Yapılan Sanger sekanslaması sonucunda, seçilen T₁ bitkilerinin tamamında, *SILs1* geninin kesilmek istenen bölgesinde genetik modifikasyon gerçekleştiği görülmüştür. Bu sonuçlara bakıldığında, *Agrobacterium* aracılığıyla CRISPR/Cas9 yöntemi kullanılarak yapılan genetik modifikasyonun, kalıtsal olarak yavru bitkilere aktarıldığı görülmüştür.

Sekanslar incelendiğinde, T₀ bitkilerinin ikisinde de CRISPR sonucu meydana gelen modifikasyonun monoallelilik olduğu görülmektedir. Bir numaralı T₀ bitkisinde

birinci allelde TAGC bazlarının delesyona uğradığı görülmektedir. Diğer allelde ise herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir. 2 numaralı bitkide ise yine sadece bir allelde mutasyon oluşmuş ve C nükleotidi eklenmiştir. Diğer allelde değişiklik meydana gelmemiştir.

T₁ bitkilerinin sekansları incelendiğinde, 1 numaralı T₀ bitkisinden elde edilen 5 bitkiden hepsinin biallelik heterozigot mutasyona sahip olduğu görülmektedir. 2 numaralı T₁ bitkisinin bir alleline T bazı eklenmiş, diğer allelinde ise C bazı delesyona uğramıştır. 3 numaralı T₁ bitkisinde delesyona uğramış nükleotid sayısının daha fazla olduğu görülmektedir. Allenin birinde GTCCGTAGC bazları silinmiş, diğer allele yalnızca T bazı eklenmiştir. 6 numaralı T₁ bitkisinin bir alleline C, diğer alleline T bazları eklenmiştir. 7 numaralı T₁ bitkisinin bir allelinde C bazı silinmiş, diğer alleline T bazı eklenmiştir. Son olarak 8 numaralı T₁ bitkisinin bir alleline T, diğer alleline ise G bazı eklenmiştir.

2 numaralı T₀ bitkisinden elde edilen 4 bitkiden 3 tanesi biallelik, 1 tanesi monoalleliktir. Biallelik olan 10 ve 11 numaralı T₁ bitkilerinde C bazı, kesim bölgesine eklenmiştir. 14 numaralı T₁ bitkisinde allelin birinden CGTAGC bazları silinmiş diğer allele A bazı eklenmiştir. Monoallelik 15 numaralı T₁ bitkisinde ise allelin birine C bazı eklenmiş diğer allelde herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir.

T₀'dan T₁ nesline kalıtsal iletim, genel olarak Mendel kurallarına göre olmaktadır. T₀ ve T₁ bitkilerinin sekansları karşılaştırıldığında, yavru bitki olan T₁ bitkilerinin sekanslarının birçoğunun T₀ bitkilerine benzemediği görülmüştür. Örneğin; 1 numaralı T₀ bitkisi monoallelik mutasyona uğramış ve allelinin birinde 4 bazlık delesyon meydana gelmiştir. Diğer allelinde ise herhangi bir değişiklik olmamıştır. Mendel kalıtım yasalarına göre bu bitkiden oluşacak yavru bitkilerin %25'i homozigot mutant sekansa sahip, %50'si heterozigot sekansa sahip (hem mutant hem yabani tip sekansı barındıran) ve %25'inin homozigot yabani tip sekansa sahip olması beklenmektedir. Ancak 1 numaralı T₀ bitkisinden oluşan yavru bitkilere bakıldığında hiçbirinin beklenen sekansları barındırmadıkları görülmüştür. Bu beklenmedik bir sonuçtur. Buna, bitkilerde oluşan kimerizmin neden olduğu düşünülmektedir.

Bir bitki organizmasındaki hücrelerin tamamı, normalde aynı genomik yapıya sahiptir. Ancak bazı sebeplerden ötürü, bitki hücreleri birbirinden farklı genotipik yapılara sahip olabilirler. Genetik olarak birbirinden farklı, iki ya da daha fazla türde dokudan oluşan bitkiler kimerik bitkilerdir. Yani bir bitkinin dokusunda birden fazla genotipe sahip hücre varsa o bitkilere kimerik bitkiler denir (George vd. 2008).

Bazı araştırmacılar CRISPR/Cas9 sisteminin, domates genomunda Arabidopsis ve çeltik bitkilerine nazaran daha aktif çalıştığını düşündüklerini bildirmişlerdir. Bu aktivitenin, yabani tip allellerin sürekli modifikasyonuna sebep olabileceğini, özellikle erken büyüme aşamalarında heterozigot olan bitkilerin kimerik bitkilere dönüşmesini kolaylaştırabileceğini savunmuşlardır (Pan vd. 2016).

Gen fonksiyonunu bulma çalışmalarında mutant bitkiler, özellikle homozigot mutant bitkiler kesinlikle gereklidir (van de Wiel vd. 2017). Ancak çalışmamızda yeteri kadar homozigot mutant T_1 bitkisi elde edilememiştir. Silisyum alımının incelenmesi için gerekli deneylerin, *Lsi1* geninin ifadenlenmediği, homozigot mutant bitkilerde yapılması gerektiğinden, bu deneyler yapılamamıştır. Bu aşamada, T_2 bitkilerinin yetiştirilip, yeterli sayıda homozigot mutant bitki elde edilmesi gerekliliği doğmuştur. Geni doğrulamak için yapılacak transkriptomik ve fizyolojik çalışmalar ancak bu bitkiler üzerinde yapılabilecektir.

Bu konuda yapılan birçok araştırmada, çalışmamıza benzer şekilde çok sayıda kimerizmlı bitki elde edilmiştir (Jang vd. 2016; Pan vd. 2016). Araştırmacılar bu kimerik bitkilerin CRISPR deneylerinde büyük bir kısıtlama olduğunu savunmuşlardır. Jang vd. (2016) çeltikte farklı gelişim aşamalarında çalışmalar yapmış ve Cas9'ın çalıştığı doku parçasına göre değişik etkileri olabildiğini, bundan dolayı bitkilerdeki kimerik genotipin, hücre tiplerinin heterojenliğinden kaynaklandığını bulmuştur. Daha erken aşamalarda T_0 bitkilerinin seçiliminin, kimerizm ihtimalini düşürebileceğini bildirmiştir.

Yabani tür Micro-Tom ile kıyaslandığında hem T_0 hem de T_1 bitkilerinde gözle görülür herhangi bir fiziksel farklılık meydana gelmemiştir.

Bu tezde, klasik yöntemler yerine, genom düzenleme araçlarının son üyesi olan CRISPR/Cas9 sistemi ile *SILsi1* geninin susturulduğu düşünülen domates bitkileri elde edilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarda yapılmamış olan, *SILsi1* geni susturulmuş T_1 hatlarının incelenmesiyle genin fonksiyonu daha iyi anlaşılabilecektir. İncelenmiş olan domates bitkilerinin, toprağa tohum olarak ekilmesinden itibaren *SILsi1* genini hiç taşımamış olması, *SILsi1* genini araştırmak için bir avantaj sağlamaktadır.

Tez çalışmamızda yabani tür domates ile *SILsi1* geni susturulmuş mutant domateslerin silisyum alım miktarının kıyaslanması da planlanmış ancak tez süresinin yetersizliği nedeniyle bu kıyaslama yapılamamıştır. Bu kıyaslama neticesinde *SILsi1* geninin fonksiyonu net olarak anlaşılabilecektir. Çalışmamızda elde ettiğimiz mutant domates hattı sayesinde, domates bitkisindeki silisyum alım mekanizması hakkında literatürde yer almayan birçok çalışma yapılabilecektir. Örneğin; *SILsi1* geninin fonksiyonu doğrulandıktan sonra bu genin yine CRISPR/Cas9 yöntemiyle aşırı ifadenlenmesi sağlanabilecek ve sonuçları incelenebilecektir. Bu çalışmaların hepsi topraktan daha fazla silisyum alabilen dolayısıyla biyotik ve abiyotik streslere karşı daha dayanıklı domates hatlarının geliştirilmesi için literatüre katkı sağlayacaktır. Tüm bu çalışmalar, “sürdürülebilir ve çevre dostu tarımsal mücadele” amacına hizmet etmek üzere, literatüre büyük katkılar sağlayacaktır.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *SILsi1* geninin ikinci ekzonunun, CRISPR/Cas9 sistemi ile mutasyona uğratarak susturulması amaçlanmıştır. İki adet transgenik T₀ ve 11 adet T₁ bitkisi elde edilmiştir. T₁ bitkilerinde yapılan analizler, *Lsi1* geninde yapılan genetik modifikasyonun %69 oranında kalıtsal olarak aktarıldığını göstermiştir. Bu sayede toprağa ekiminden itibaren *SILsi1* geninin ifadenmediği düşünülen domates bitkileri elde edilmiştir. Oluşan bitkilerin yüksek kimerizm oranından dolayı yeterli sayıda homozigot biallelik mutant bitki elde edilememiştir. Bu sonuçlar, benzer çalışmalardaki sonuçlar ile örtüşmektedir. Tez süresi içerisinde yeterli sayıda homozigot mutant bitki elde edilemediğinden birçok transkriptomik ve fizyolojik analiz yapılamamıştır. Fazla sayıda homozigot mutant bitki elde edebilmek için T₂ bitkilerinin üretilmesine ve gerekli testlerin onlar üzerinde yapılmasına karar verilmiştir. T₂ bitkilerinde yapılacak silisyum alım analizleri, genin anotasyonuna katkı sağlayacaktır.

Literatürde bulunan, domateste *Lsi1* genini bulmak için yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde, herhangi bir gen susturma işlemi yapılmadığı görülmüştür. Diğer çalışmalardaki araştırmacılar, *SILsi1* geninin fonksiyonunu incelemek için geni domatesten izole edip, *Lsi1* geni barındırmayan mutant çeltik veya oosit gibi farklı organizmalarda ifadenmesini sağlamışlardır.

Genom düzenleme araçlarıyla yapılan gen susturma ve fonksiyon bulma çalışmalarının diğer yöntemlere göre daha kesin sonuçlar verdiğini düşünmekteyiz. Yabani tür domatesin ve transgenik domatesin toprağa ekilmesinden itibaren aynı şartlarda gelişmesini sağlamak, genin fonksiyonunun daha iyi anlaşılmasına sebep olmaktadır.

Bitkilerde streslere karşı dayanıklılık sağlayarak bitki verimini artıran silisyum elementinin önemi her geçen gün daha da iyi anlaşılmaktadır. Çalışmamız, domateste silisyum alım mekanizmasının keşfedilmesi için yapılan çalışmalara katkı sağlayacak ve gelecekteki çalışmalar için temel oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Akbudak, M. A., and Kontbay, K. 2017. Yeni nesil genom düzenleme teknikleri: Zfn, talen, crispr'lar ve bitkilerde kullanımı. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi. 26 (1): 111-126.
- Apse, M. P., and Blumwald, E. 2002. Engineering salt tolerance in plants. Current Opinion in Biotechnology. 13 (2): 146-150.
- Arnon, D. I., and Stout, P. R. 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. Plant Physiol. 14 (2): 371-375.
- Atmos, J. 2009.
- Baltes, N. J., and Voytas, D. F. 2015. Enabling plant synthetic biology through genome engineering. Trends in biotechnology. 33 (2): 120-131.
- Basra, A. Mechanisms of environmental stress resistance in plants: CRC Press; 1997, p: Blum, A., and Jordan, W. R. 1985. Breeding crop varieties for stress environments. Critical Reviews in Plant Sciences. 2 (3): 199-238.
- Bogdanove, A. J., and Voytas, D. F. 2011. Tal effectors: Customizable proteins for DNA targeting. 333 (6051): 1843-1846.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokine, A., and Ehrlich, S. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (crisprs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology (Reading, England). 151: 2551-2561.
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., and Van Eck, J. 2014. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/crispr-associated9 system. 166 (3): 1292-1297.
- Butler, N. M., Atkins, P. A., Voytas, D. F., and Douches, D. S. 2015. Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*solanum tuberosum* l.) using the crispr/cas system. PLOS ONE. 10 (12): e0144591.
- Cai, M., and Yang, Y. 2014. Targeted genome editing tools for disease modeling and gene therapy. Curr Gene Ther. 14 (1): 2-9.
- Carroll, D. 2011. Genome engineering with zinc-finger nucleases. Genetics. 188 (4): 773-782.
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Voytas, D. F. 2011. Efficient design and assembly of custom talen and other tal effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res. 39 (12): e82.
- Char, S. N., Unger-Wallace, E., Frame, B., Briggs, S. A., Main, M., Spalding, M. H., Yang, B. 2015. Heritable site-specific mutagenesis using talen s in maize. Plant Biotechnol J. 13 (7): 1002-1010.
- Chen, K., and Gao, C. 2013. Talens: Customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. J Genet Genomics. 40 (6): 271-279.
- Chiba, Y., Mitani, N., Yamaji, N., and Ma, J. F. 2009. Hvlsi1 is a silicon influx transporter in barley. The Plant Journal. 57 (5): 810-818.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., and Zhu, J.-K. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science. 45 (2): 437-448.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M., and Kim, J.-S. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the cas9 rna-guided endonuclease. Nature biotechnology. 31 (3): 230.
- Christian, M., Qi, Y., Zhang, Y., and Voytas, D. F. 2013. Targeted mutagenesis of arabidopsis thaliana using engineered tal effector nucleases. G3: Genes, Genomes, Genetics. 3 (10): 1697-1705.

- Clasen, B. M., Stoddard, T. J., Luo, S., Demorest, Z. L., Li, J., Cedrone, F., Zhang, F. 2016. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J.* 14 (1): 169-176.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Zhang, F. 2013. Multiplex genome engineering using crispr/cas systems. *339 (6121):* 819-823.
- Dehairs, J., Talebi, A., Cherifi, Y., and Swinnen, J. V. 2016. Crisp-id: Decoding crispr mediated indels by sanger sequencing. *Scientific Reports.* 6 (1): 28973.
- Deshmukh, R. K., Vivancos, J., Ramakrishnan, G., Guérin, V., Carpentier, G., Sonah, H., . . . Bélanger, R. R. 2015. A precise spacing between the npa domains of aquaporins is essential for silicon permeability in plants. *Plant J.* 83 (3): 489-500.
- Doudna, J. A., and Charpentier, E. 2014. The new frontier of genome engineering with crispr-cas9. *Science.* 346 (6213): 1258096.
- el-gamal, d. n., Abd-El-Kareem, F., Fotouh, Y., and el-mougy, N. 2007. Induction of systemic resistance in potato plants against late and early blight diseases using chemical inducers under greenhouse and field conditions. 3.
- Epstein, E. 1999. Silicon. *Annual review of plant biology.* 50 (1): 641-664.
- FAOSTAT. (2018). Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Fauteux, F., Rémus-Borel, W., Menzies, J. G., and Bélanger, R. R. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology letters.* 249 (1): 1-6.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D.-L., Wei, P., Mao, Y. 2013. Efficient genome editing in plants using a crispr/cas system. *Cell research.* 23 (10): 1229-1232.
- Foley, J. E., Yeh, J.-R. J., Maeder, M. L., Reyon, D., Sander, J. D., Peterson, R. T., and Joung, J. K. 2009. Rapid mutation of endogenous zebrafish genes using zinc finger nucleases made by oligomerized pool engineering (open). *PLOS ONE.* 4 (2): e4348.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., and Barbas III, C. F. 2013. Zfn, talen, and crispr/cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology.* 31 (7): 397-405.
- Gao, J., Wang, G., Ma, S., Xie, X., Wu, X., Zhang, X., Xia, Q. 2015. Crispr/cas9-mediated targeted mutagenesis in *nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol.* 87 (1-2): 99-110.
- George, E., Hall, M., and De Klerk, G.-J. (2008). Plant propagation by tissue culture. In (pp. 283-333).
- Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S., and Zhang, C. 2005. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science.* 169 (2): 313-321.
- Gould, W. A. *Tomato production, processing and quality evaluation*: Avi Pub. Co.; 1974, p:
- Grégoire, C., Rémus-Borel, W., Vivancos, J., Labbé, C., Belzile, F., and Bélanger, R. R. 2012. Discovery of a multigene family of aquaporin silicon transporters in the primitive plant *equisetum arvense*. 72 (2): 320-330.
- Gürel, A., and Avcıoğlu, R. 2001. Bitkilerde strese dayanıklılık fizyolojisi. *Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*. S. Özcan, E. Gürel, M. Babaoğlu (Eds.). Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, Turkey. pp. 308-313.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Shalem, O. 2013. DNA targeting specificity of rna-guided cas9 nucleases. *Nature biotechnology.* 31 (9): 827.

- Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Mikami, M., and Toki, S. 2015. Crispr/cas9-mediated mutagenesis of the rin locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochemical biophysical research communications*. 467 (1): 76-82.
- Jacobs, T., and Martin, G. 2016. High-throughput crispr vector construction and characterization of DNA modifications by generation of tomato hairy roots. *Journal of Visualized Experiments*.
- Jang, G., Lee, S., Um, T. Y., Chang, S. H., Lee, H. Y., Chung, P. J., Do Choi, Y. 2016. Genetic chimerism of crispr/cas9-mediated rice mutants. *Plant Biotechnology Reports*. 10 (6): 425-435.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. 2012. A programmable dual-rna-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337 (6096): 816-821.
- Jones Jr, J. B. *Tomato plant culture: In the field, greenhouse, and home garden*: CRC press; 2007, p:
- Kim, Y.-G., Cha, J., and Chandrasegaran, S. 1996. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to fok i cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93 (3): 1156-1160.
- Koca, H., Bor, M., Özdemir, F., and Türkan, I. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and experimental botany*. 60 (3): 344-351.
- Larcher, W. 1995. *Plant physiological ecology*.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P., and Yang, B. 2012. High-efficiency talen-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature biotechnology*. 30 (5): 390.
- Ma, J. F., Tamai, K., Ichii, M., and Wu, G. F. 2002. A rice mutant defective in si uptake. *Plant Physiol*. 130 (4): 2111-2117.
- Ma, J. F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Yano, M. 2006. A silicon transporter in rice. *Nature*. 440 (7084): 688-691.
- Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y., and Liu, Y.-G. 2016. Crispr/cas9 platforms for genome editing in plants: Developments and applications. *Molecular plant*. 9 (7): 961-974.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Church, G. M. 2013. Rna-guided human genome engineering via cas9. *Science*. 339 (6121): 823-826.
- Marschner, H. 1995. Beneficial mineral elements. *Mineral nutrition of higher plants*. 2: 405-434.
- Mashimo, T., Takizawa, A., Voigt, B., Yoshimi, K., Hiai, H., Kuramoto, T., and Serikawa, T. 2010. Generation of knockout rats with x-linked severe combined immunodeficiency (x-scid) using zinc-finger nucleases. *PLOS ONE*. 5 (1): e8870.
- Mitani, N., Yamaji, N., Ago, Y., Iwasaki, K., and Ma, J. F. 2011. Isolation and functional characterization of an influx silicon transporter in two pumpkin cultivars contrasting in silicon accumulation. 66 (2): 231-240.
- Mitani, N., Yamaji, N., and Ma, J. F. 2008. Identification of maize silicon influx transporters. *Plant and Cell Physiology*. 50 (1): 5-12.
- Miyake, Y., and Takahashi, E. 1978. Silicon deficiency of tomato plant. *Soil Science and Plant Nutrition*. 24 (2): 175-189.
- Miyake, Y., and Takahashi, E. 1983. Effect of silicon on the growth of solution-cultured cucumber plant. *Soil Science and Plant Nutrition*. 29 (1): 71-83.

- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C. s., García-Martínez, J., and Soria, E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*. 60 (2): 174-182.
- Montpetit, J., Vivancos, J., Mitani-Ueno, N., Yamaji, N., Rémus-Borel, W., Belzile, F., Bélanger, R. R. 2012. Cloning, functional characterization and heterologous expression of *talsi1*, a wheat silicon transporter gene. *Plant Mol Biol*. 79 (1): 35-46.
- Osakabe, Y., and Osakabe, K. 2015. Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant Cell Physiology*. 56 (3): 389-400.
- Pan, C., Ye, L., Qin, L., Liu, X., He, Y., Wang, J., Lu, G. 2016. Crispr/cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Scientific Reports*. 6: 24765.
- Parida, A. K., and Das, A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and environmental safety*. 60 (3): 324-349.
- Peralta, I. E., and Spooner, D. M. Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*solanum l. Section lycopersicon*) (Vol. 104); 2005, p:
- Pourcel, C., Salvignol, G., and Vergnaud, G. 2005. Crispr elements in *yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. 151 (3): 653-663.
- Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., and Vivekanandan, M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of plant physiology*. 161 (11): 1189-1202.
- Romero-Aranda, M. R., Jurado, O., and Cuartero, J. 2006. Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. *Journal of plant physiology*. 163 (8): 847-855.
- Sahlin, E., Savage, G. P., and Lister, C. E. 2004. Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*. 17 (5): 635-647.
- Sakurai, G., Satake, A., Yamaji, N., Mitani-Ueno, N., Yokozawa, M., Feugier, F. G., and Ma, J. F. 2015. In silico simulation modeling reveals the importance of the casparian strip for efficient silicon uptake in rice roots. *Plant and Cell Physiology*. 56 (4): 631-639.
- Samanta, M. K., Dey, A., and Gayen, S. 2016. Crispr/cas9: An advanced tool for editing plant genomes. *Transgenic research*. 25 (5): 561-573.
- Samuels, A. L., Glass, A. D. M., Ehret, D. L., and Menzies, J. G. 1991. Mobility and deposition of silicon in cucumber plants. *Plant, Cell & Environment*. 14 (5): 485-492.
- Schadt, E. E., Lamb, J., Yang, X., Zhu, J., Edwards, S., GuhaThakurta, D., Zhang, C. 2005. An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nature genetics*. 37 (7): 710-717.
- Shan, Q., Wang, Y., Chen, K., Liang, Z., Li, J., Zhang, Y., Zheng, X. 2013. Rapid and efficient gene modification in rice and brachypodium using talens. *Molecular plant*. 6 (4): 1365-1368.
- Shen, C., Que, Z., Xia, Y., Tang, N., Li, D., He, R., and Cao, M. 2017. Knock out of the annexin gene *osann3* via crispr/cas9-mediated genome editing decreased cold tolerance in rice. *Journal of Plant Biology*. 60 (6): 539-547.

- Shukla, V. K., Doyon, Y., Miller, J. C., DeKever, R. C., Moehle, E. A., Worden, S. E., . . . Meng, X. 2009. Precise genome modification in the crop species *zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*. 459 (7245): 437-441.
- Shuman, S., and Glickman, M. S. 2007. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nature Reviews Microbiology*. 5 (11): 852-861.
- Smith, G. R. 2001. Homologous recombination near and far from DNA breaks: Alternative roles and contrasting views. 35 (1): 243-274.
- Sun, H., Duan, Y., Mitani-Ueno, N., Che, J., Jia, J., Liu, J., Gong, H. 2020. Tomato roots have a functional silicon influx transporter but not a functional silicon efflux transporter. 43 (3): 732-744.
- Sun, H., Guo, J., Duan, Y., Zhang, T., Huo, H., and Gong, H. 2017. Isolation and functional characterization of *cslsi1*, a silicon transporter gene in *cucumis sativus*. 159 (2): 201-214.
- Şeniz, V. Domates, biber ve patlıcan yetiştiriciliği: Tarımsal Araştırmaları Destekl. ve Gel. Vakfı; 1992, p:
- Takahashi, E., Ma, J., and Miyake, Y. 1990. The possibility of silicon as an essential element for higher plants. *Comments on Agricultural and Food Chemistry*. 2 (2): 99-102.
- Tastan, C., and Sakartepe, E. Crispr genom modifikasyonları t101; 2018, p:
- Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*. 485 (7400): 635.
- Townsend, J. A., Wright, D. A., Winfrey, R. J., Fu, F., Maeder, M. L., Joung, J. K., and Voytas, D. F. 2009. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*. 459 (7245): 442-445.
- TÜİK. (2019). Bitkisel üretim İstatistikleri. *Türkiye İstatistik Kurumu*. Retrieved from <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>
- Tuteja, N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol*. 428: 419-438.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., and Gregory, P. D. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*. 11 (9): 636-646.
- van de Wiel, C. C. M., Schaart, J. G., Lotz, L. A. P., and Smulders, M. J. M. 2017. New traits in crops produced by genome editing techniques based on deletions. *Plant Biotechnology Reports*. 11 (1): 1-8.
- Voytas, D. F. 2013. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual review of plant biology*. 64.
- Vulavala, V. K. R., Elbaum, R., Yermiyahu, U., Fogelman, E., Kumar, A., and Ginzberg, I. 2016. Silicon fertilization of potato: Expression of putative transporters and tuber skin quality. *Planta*. 243 (1): 217-229.
- Wang, M., Cao, J., Lin, L., Sun, J., and Jiang, W. 2010. Effect of 1-methylcyclopropene on nutritional quality and antioxidant activity of tomato fruit (*solanum lycopersicon* l.) during storage. 33 (2): 150-164.
- Wendt, T., Holm, P. B., Starker, C. G., Christian, M., Voytas, D. F., Brinch-Pedersen, H., and Holme, I. B. 2013. Tal effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Mol Biol*. 83 (3): 279-285.

- Yılmaz, E., Tuna, A. L., and Bürün, B. 2011. Bitkilerin tuz stresine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri-tolerance strategies developed by plants to the effects of salt stress. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi. 7 (1): 47-66.
- Yoshida, S., Onishi, Y., and Kitagishi, K. 1959. The chemical nature of silicon in rice plant. Soil Science and Plant Nutrition. 5 (1): 23-27.
- Zhang, Y., Zhang, F., Li, X., Baller, J. A., Qi, Y., Starker, C. G., Voytas, D. F. 2013. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. Plant Physiol. 161 (1): 20-27.
- Zhao, F.-J., Ago, Y., Mitani, N., Li, R.-Y., Su, Y.-H., Yamaji, N., Ma, J. F. 2010. The role of the rice aquaporin lsi1 in arsenite efflux from roots. 186 (2): 392-399.



ÖZGEÇMİŞ

Durmuş ÇETİN

durmuscetin@akdeniz.edu.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2017 – Devam ediyor	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2013 – 2017	Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Konya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2018 – Devam ediyor	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
--	---

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Filiz E., Çetin D., Akbudak M.A. (2019). Aromatic amino acids biosynthesis genes identification and expression analysis under salt and drought stresses in *Solanum lycopersicum* L. *Scientia Horticulturae* 250, 127-137.