



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

**ERKEK KISIR DOMATES BİTKİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ
İÇİN *SLPHD_MS1* GENİNİN CRISPR-CAS9 ARACILIĞI İLE
SUSTURULMASI**

Doktora Tezi

Gökhan GÖKDEMİR

Danışman
Doç. Dr. Musa KAVAS

SAMSUN
2023

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



**ERKEK KISIR DOMATES BİTKİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ
İÇİN *SLPHD_MS1* GENİNİN CRISPR-CAS9 ARACILIĞI İLE
SUSTURULMASI**

Doktora Tezi

Gökhan GÖKDEMİR

Danışman

Doç. Dr. Musa KAVAS

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Gökhan GÖKDEMİR tarafından, Doç. Dr. Musa KAVAS danışmanlığında hazırlanan “ERKEK KISIR DOMATES BİTKİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ İÇİN *SLPHD_MS1* GENİNİN CRISPR-CAS9 ARACILIĞI İLE SUSTURULMASI” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 7.7.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Musa KAVAS Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Ceyhun KAYIHAN Başkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

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

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

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

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

19 /05 / 2023
Gökhan GÖKDEMİR

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : ERKEK KISIR DOMATES BİTKİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ
İÇİN *SLPHD_MS1* GENİNİN CRISPR-CAS9 ARACILIĞI İLE SUSTURULMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 19/05/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 12

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

19 /05 / 2023
Doç. Dr. Musa KAVAS

ÖZET

ERKEK KISIR DOMATES BİTKİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ İÇİN SLPHD_MS1 GENİNİN CRISPR-CAS9 ARACILIĞI İLE SUSTURULMASI

Gökhan GÖKDEMİR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

Doktora, Temmuz/2023

Danışman: Doç. Dr. Musa KAVAS

Türkiye uygun iklim koşullarına sahip olmasından dolayı dünyadaki domates üretiminde önemli ülkelerden birisidir. 2020 yılı verilerine göre, Dünya domates üretim sıralamasında Çin birinci sırada yer alırken Türkiye, Hindistan'dan sonra 3. sırada yer almakta olup, bu veri ülkemizin önemli bir üretici olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte domates ülkemizde üretim, tüketim ve ekonomideki değeri bakımından sebzeler arasında ilk sırada yer almaktadır. Ülkemiz açısından önemli bir bitki olmasının yanı sıra model bir bitki olan domatesta bitki gen fonksiyonu ve düzenlemesini anlamak ve yararlı tarımsal özellikte bitkileri geliştirmek için uygun bir organizmadır. Hem dünyada hem de ülkemizde domates tarımında hibrit çeşitler yoğunlukla kullanılmaktadır. Hibrit çeşitler; verim, kalite, dayanıklılık ve adaptasyon yeteneği gibi faktörler açısından iyileştirilmiş olmakla birlikte, F1 hibrit tohumluğu tek kullanımlık olması nedeniyle de ticari bir önem taşımaktadır. CRISPR/Cas teknolojisi bitkilerin de dahil olduğu farklı organizmalarda genom düzenlemesi çalışmalarında çığır açmıştır. Son yıllarda oldukça yaygın olarak kullanılan CRISPR/Cas9 aracılıklı genom düzenlemesi, sekansa spesifik gen manipülasyonu için en uygun ve çok yönlü araçlardan birisidir. İlk defa *Arabidopsis thaliana* bitkisinde karakterize edilen *SLPHD_MS1* geni polen oluşumu ve tapetum gelişiminden sorumlu genlerden birisidir. Bu çalışmada, *PhD_tipi MS1* genini hedefleyen CRISPR/Cas9 sistemi *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla domates kotiledonlarına transfer edilmiştir. Hedef genin susturulması sonucunda polen oluşumunun engellenmesi ile erkek kısır domates bitkisi ve hatları elde edilmiştir. Bu hatlarda polenlerin canlılığı incelendiğinde gen aktarımı yapılmamış domatese göre genomu düzenlenmiş hatların polen canlılığının son derece azaldığı tespit edilmiştir. Meyvelerdeki tohum oluşumu incelendiğinde ise hiçbir hatta tohum oluşumu gözlenmemiştir.

Anahtar Sözcükler: Domates, CRISPR/Cas9, Erkek kısır hat, Genom düzenlenmesi, *MS1* geni

ABSTRACT

CRISPR/CAS9 SILENCING OF THE SLPHD_MS1 GENE FOR DEVELOPMENT OF MALE STERILE TOMATO PLANTS

Gökhan GÖKDEMİR

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Agricultural Biotechnology

Ph.D., July/2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Musa KAVAS

Turkey is one of the important countries in tomato production in the world due to its favorable climatic conditions. According to 2020 data, while China ranks first in the world tomato production ranking, Turkey ranks third after India, and this data shows that our country is an important producer. However, tomatoes are in the first place among vegetables in terms of production, consumption and economic value in our country. In addition to being an important plant for our country, tomato, which is a model plant, is a suitable organism to understand plant gene function and regulation and to develop plants with beneficial agricultural properties. Hybrid varieties are extensively used in tomato farming both in the world and in our country. Hybrid varieties; Although it has been improved in terms of factors such as yield, quality, durability and adaptability, F1 hybrid seed is also of commercial importance because it is disposable. CRISPR/Cas technology has revolutionized genome editing studies in different organisms, including plants. CRISPR/Cas9 mediated genome editing, which has been widely used in recent years, is one of the most suitable and versatile tools for sequence-specific gene manipulation. The *SLPHD_MS1* gene, which was characterized for the first time in *Arabidopsis thaliana*, is one of the genes responsible for pollen formation and tapetum development. In this study, the CRISPR/Cas9 system targeting the *PhD_type MS1* gene was transferred to tomato cotyledons by *Agrobacterium tumefaciens*. Male sterile tomato plants and lines were obtained by inhibiting pollen formation as a result of silencing the target gene. When the viability of the pollen in these lines was examined, it was determined that the pollen viability of the lines whose genome was edited was extremely reduced compared to the tomato without gene transfer. When the seed formation in the fruits was examined, no seed formation was observed in any line.

Keywords: Tomatoes, CRISPR/Cas9, Male sterile line, Genome editing, *MS1* gene

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarım boyunca bilimsel düşünce, bilgi birikimi ve tecrübelerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Musa KAVAS başta olmak üzere öğrenimim boyunca emeği geçen bütün hocalarıma sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız ve her daim paylaşacağımıza inandığım, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum çalışma arkadaşım Zafer Seçgin'e teşekkürü bir borç bilirim.

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

Gökhan GÖKDEMİR

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENOM DÜZENLEME	4
2.1. DNA Kırıkları Tamir Mekanizması	5
2.1.1. Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ)	6
2.1.2. Homoloji ile Yönlendirilen Rekombinasyon (HDR).....	6
2.2. Genom Düzenleme Araçları	7
2.2.1. Meganükleazlar (MNs).....	7
2.2.2. ZFN (Çinko Parmak Nükleazlar).....	9
2.2.3. TALEN	11
2.2.4. CRISPR/Cas9	13
3.1. CRISPR/Cas9 ve İşleyişi	14
3.2. CRISPR/Cas Sisteminin Sınıflandırması	18
3.3. CRISPR/Cas9 Sisteminin Fonksiyonları	21
3.3.1. Gen Nakavtı	21
3.3.2. Gen Nükleotid Dizisi Yerleştirme	22
3.3.3. Baz Düzenleme	23
3.3.4. Ekspresyonun Düzenlenmesi	24
3.3.5. Genom Düzenlenmiş Bitkilerde Mutant Tarama Stratejileri.....	25
3.4. Domates Islahında CRISPR/Cas Uygulamaları	27
3.4.1. CRISPR/Cas9 Kullanılarak Biyotik Stres Faktörlerine Dirençli Domates Geliştirilmesi.....	28
3.4.2. CRISPR/Cas9 Kullanılarak Abiyotik Stres Faktörlerine Dirençli Domates Geliştirilmesi.....	31
3.4.3. CRISPR/Cas Kullanılarak Domateste Verim, Kalite, Büyüme ve Gelişiminin Artırılması	31
3.4.4. CRISPR/Cas9 Aracılı Erkek Kısır Domates Bitkilerin Üretimi.....	34
4. <i>SLPHD_MS1</i>	36
5. MATERYAL VE METHOD	38
5.1. Bitki Materyali ve Doku Kültür Ortamı	38

5.2. Kullanılan Bakteri Suşları ve Besi Ortamları	38
5.3. Besi Ortamları	39
5.4. Tamponlar ve Solüsyonlar	39
5.5. Kimyasal ve Enzimler	39
5.6. Method.....	39
5.6.1. gRNA'nın dizayn edilmesi	39
5.6.2. Doku kültürü aracılı gen aktarımında kullanılacak bitki ifade vektörünün (pHSE401) oluşturulması	39
5.6.3. Plazmitlerin Kompetan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 bakterisine aktarılması.....	41
5.6.4. Bitki Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu ve Tohumların Çimlendirilmesi	42
5.6.5. Domates Bitkisine Gen Aktarımı.....	42
5.6.5.1. Kotiledon Eksplantlarının Ön-kültür Ortamına Alınması.....	43
5.6.5.2. <i>Agrobacterium</i> Hücre Kültürünün Hazırlanması	43
5.6.5.3. Kotiledon Eksplantlarının <i>Agrobacterium</i> ile İnokülasyonu ve Ko-Kültürasyon Besi Ortamına Alınması	44
5.6.5.4. Eksplantların Selektif Besi Ortamına Aktarılması.....	44
5.6.5.5. Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Aklimatizasyonu	44
5.6.6. T0 Aday Bitkilerin Moleküler Olarak Belirlenmesi	45
5.6.7. Genom Düzenlenmiş Bitkilerde Mutasyon Analizleri	45
5.6.8. Genomu Düzenlenmiş Bitkilerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	46
5.6.9. Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Polen Canlılıklarının Belirlenmesi	47
5.6.10. Eş-İfade Analizi	47
5.6.11. T0 Genom Düzenlenmiş Bitkilerden RNA İzolasyonu ve Kantitatif RT-qPCR.....	48
6. BULGULAR.....	50
6.1. gRNA dizayn edilmesi	50
6.2. CRISPR/Cas9 vektörü pHSE401'in oluşturulması	50
6.2.1. DT1T2 PCR Reaksiyonunu gerçekleştirilmesi.....	50
6.2.2. DT1 PCR ürünlerinin jelden izolasyonu.....	52
6.2.3. Golden Gate Reaksiyonu ve Ligasyon Ürünlerinin <i>E. coli</i> bakterisine Transferi.....	52
6.2.4. pHSE401+ 2 gRNA plazmitlerinin Kompetan <i>Agrobacterium</i> Gv3101 suşuna transferi	54
6.2.5. <i>Agrobacterium</i> Aracılı Gen Aktarımı ve Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Elde Edilmesi.....	54
6.2.6. T0 Transgenik Mutant Aday Bitkilerin Moleküler Olarak Tanımlanması.....	55

6.2.7. Genomu Düzenlenmiş Bitkilerin Morfolojik Tanımlanması.....	56
6.2.8. Genomu Düzenlenmiş Bitkilerde Mutasyon Analizi.....	56
6.2.9. <i>SIPHD_MS1</i> Mutant Hatlarda Polen Canlılığını Kontrolü ve Tohum Oluşumunun Belirlenmesi	59
6.2.10. Eş-İfade Analizi	61
6.2.11. Genomu Düzenlenmiş Mutant Bitkilerde <i>SIPHD_MS1</i> geninin RT-qPCR ile Belirlenmesi	63
7. SONUÇ	68
KAYNAKLAR	69
ÖZ GEÇMİŞ.....	93



SİMGELER VE KISALTMALAR

AT-rich	: Adenin Timin Bakımından Zengin
g	: Bağlı merkezkaç kuvveti
UTR	: Çevrilmemiş Bölge
bp	: Çift Bazlı
ddH ₂ O	: Çift Damıtılmış Su
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
dATP	: Deoksiadenozin Trifosfat
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DEPC	: Dietil Pirokarbonat
dNTPs	: Dinükleotid Trifosfat
EtBr	: Etidyum Bromür
EDTA	: Etilen Diamin Triasetik Asit
Na ₂ EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit Disodyum Tuzu Dihidrat
U	: Enzim Ünitesi
FAOSTAT	: Gıda ve Tarım Örgütü İstatistik Veritabanları
gr	: Gram
2n=2x=24	: Haploid numara (n) ve monoploid numara (x)
pH	: Hidrojen Potansiyeli
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
kb	: Kilo Baz Çifti
kDa	: Kilodalton
CDS	: Kodlayan Dizi
cDNA	: Komplementer
cv.	: Kültivar
L	: Litre
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
m	: Metre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Mili-molar
mm	: Milimetre
µg	: Mikrogram

μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
μm	: Mikrometre
M	: Molar
MS	: Murashige ve Skoog Medium
ng	: Nanogram
nptII	: Neomisin Fosfotransferaz
1 X	: Normal Solüsyon
nt	: Nükleotid
OD	: Optik Yoğunluk
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVP	: Polivinilpirolidon
KCl	: Potasyum Klorür
Tm	: Primer Bağlanma Sıcaklığı
RNA	: Ribonükleik Asit
sn	: Saniye
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
CTAB	: Setil Trimetil Amonyum Borat
BSA	: Sığır Serum Albumin
NaH_2PO_4	: Sodyum Dihidrojen Fosfar
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NaCl	: Sodyum Klorür
SOC medium	: Süper Optimal Sıvı Besiyeri
H_2O	: Su
BLAST	: Temel Yerel Hizalama Arama Aracı
TAE	: Tris Asetat EDTA
TBE	: Tris Borat EDTA
TE	: Tris Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Ti Plasmid	: Tümör İndükleyici Plasmid
spp.	: Türler
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
GFP	: Yeşil Floresan Proteini
GUS	: β -glukuronidaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Genom düzenlenmesinde DNA tamir mekanizmalar	5
Şekil 2.2. Meganükleazların yapısal gösterimi. Meganükleazlar çift sarmal hedef DNA'ya bağlanma ve çift zincir kırıkları oluşturma yeteneğine sahiptirler. Meganükleazlar 14-40 bp'lik hedef ara sekansa bağlanmaktadır	8
Şekil 2.3. Çinko parmak nükleazların yapısal gösterimi	10
Şekil 2.4. Genom düzenleme için kullanılan TALEN yapısı. FokI DNA kesim domaini TALE'ler ile birleştirilir ve çift olarak kullanılır çünkü FokI enzimi DNA kesme aktivitesi için dimerizasyon gerektirmektedir. TALEN'lerin DNA bağlanma domaini, 13–28 Transkripsiyonel Aktivatör Benzeri Efektör Tekrarlarından (TALE Tekrarları) oluşur	13
Şekil 3.1. CRISPR genom düzenleme sisteminin temel işleyişi	17
Şekil 3.2. Bilinen CRISPR-Cas sistemlerine genel bakış. (Makarova vd, 2017a) 'den uyarlanmıştır. Tipik operon organizasyonunu gösteren, şu anda tanımlanmış tüm CRISPR-Cas sistemlerinin genomik lokusların şematik gösterimi	21
Şekil 4.1. <i>MS1</i> geninin dokulara göre ekspresyonu.....	37
Şekil 5.2. <i>A. tumefaciens</i> GV3101 bakterisi ile gen aktarım yönteminin özeti	43
Şekil 6.1. <i>SIPHD_MS1</i> gRNA19 ve gRNA25'in scaffold ile oluşturduğu sekonder yapıları RNAfold webserver görüntüsü	50
Şekil 6.2. DT1T2 PCR1 sonucunda oluşan gen kasetinin şematik gösterimi.....	51
Şekil 6.3. DT1T2 PCR ürünlerinin jel görüntüsü Lane 1: 100 bp markör (Biomol). Lane 2-4 DT1PCR1 PCR ürünü. Lane 6 Primer içermeyen kontrol.....	51
Şekil 6.4. U6-26p-F ve U6-29p-R primerleri ile yapılan koloni PCR jel görüntüsü	53
Şekil 6.5. pHSE401+ 2 gRNA plazmitinin % 0.4'lük agaroz jel görüntüsü	53
Şekil 6.6. <i>Agrobacterium</i> Gv3101 <i>hptII</i> primerleri ile koloni PCR yapılması. 1 ve 10: GeneRuler 1kb DNA markör (SM0311). 2-9: <i>SIPHD_MS1</i> hatları.....	54
Şekil 6.7. <i>Agrobacterium</i> aracılı gen aktarım sonrasında genom düzenlenmiş bitkilerin yetiştirilmesi. (a): Trasforme edilen eksplantların seleksiyon besi ortamına alınması. (b): Rejenere olan transgenik bitkicikler. (c): 2-3 cm boyutlarında bitkiciklerin köklendirme besi ortamına alınarak köklendirilmesi. (d-e): Köklenen transgenik bitkilerin saksıya alınarak akklimizasyonu ve nem kaybının önlenmesi. (f): Bitkilerin 30 Lt'lik saksılara transferi. (g): Bitkilerin iklim odasında büyütülmesi.....	55
Şekil 6.8. Aday transgenik ve gen aktarımı yapılmamış crocker bitkilerinde <i>HptII</i> geni ile yapılan PCR sonucu. 1 ve 13: GeneRuler 1kb DNA markör (SM0311). 2-11 Aday transgenik hatlar. 12: kontrol wt.....	56
Şekil 6.9. Bitkilerin hasat dönemine kadar iklim odasında büyütülmesi. (a) <i>SIPHD_MS1</i> mutant hatlar. (b) Gen aktarımı yapılmamış crocker bitkileri.....	56
Şekil 6.10. CRISPR/Cas9 ile elde edilen mutant hatlarda ve wt bitkilerde <i>SIPHD_MS1</i> genlerinin amplifikasyonu. a) <i>SIPHD_MS1</i> geninde gRNA 19 ile oluşturulan mutasyonlu bölgenin PCR ile	

taranması b) <i>SIPHD_MS1</i> geninde gRNA 25 ile oluşturulan mutasyonlu bölgenin PCR ile taranması.....	57
Şekil 6.11. <i>SIPHD_MS1</i> geninde gRNA 25 ile oluşturulan mutasyonlar.....	58
Şekil 6.12. <i>SIPHD_MS1</i> geninde gRNA 19 ile oluşturulan mutasyonlar.....	58
Şekil 6.13. Wt ve <i>SIPHD_MS1</i> mutant bitkilerin: a) İklim odasında büyütülmesi. b) <i>TTC</i> testi ile polen canlılığın ışık mikroskop görüntüsü. c) Wt ve <i>SIPHD_MS1</i> mutant bitkilerin çiçek yapılarının görüntüsü	59
Şekil 6.14. WT ve <i>SIPHD_MS1</i> mutant bitkilerin olgunlaşma sonrasında hasat edilen meyvelerin ve meyvede oluşan tohumların görüntüsü	60
Şekil 6.15. Wt ve <i>SIPHD_MS1</i> mutant bitkilerden elde edilen meyve başına tohum sayısı	61
Şekil 6.16. Genevestigator ile yapılan co-expression analizi	61
Şekil 6.17. <i>MS1</i> geni ile farklı anatomik dokularda ifade olan 10 gen.....	62
Şekil 6.18. <i>MS1</i> geni ile farklı anatomik dokularda ifade olan genler ve ekspresyon yüzdeleri	62
Şekil 6.19. Hiyerarşik kümeleme	63
Şekil 6.20. WT ve mutant bitkilerin yapraklarında <i>SIPHD_MS1</i> genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi.....	65
Şekil 6.21. WT ve mutant bitkilerin çiçeklerinde <i>SIPHD_MS1</i> genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi.....	65
Şekil 6.22. WT ve <i>SIPHD_MS1</i> mutant bitkilerin yapraklarında <i>Solyc04g007380 (PR5K)</i> genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi	65
Şekil 6.23. WT ve <i>SIPHD_MS1</i> mutant bitkilerin çiçeklerinde <i>Solyc04g007380 (PR5K)</i> genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi	66
Şekil 6.24. WT ve <i>SIPHD_MS1</i> mutant bitkilerin yapraklarında <i>Solyc01g095080 (ACS1)</i> genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi	66
Şekil 6.25. WT ve <i>SIPHD_MS1</i> mutant bitkilerin çiçeklerinde <i>Solyc01g095080 (ACS1)</i> genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi	66
Şekil 6.26. WT ve <i>SIPHD_MS1</i> mutant bitkilerin yapraklarında <i>Solyc02g079120</i> genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi	67
Şekil 6.27. WT ve <i>SIPHD_MS1</i> mutant bitkilerin çiçeklerinde <i>Solyc02g079120</i> genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi	67

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 5.1. Kullanılan bakteri suşları ve besi ortamları.....	39
Tablo 5.2. Golden gate cloning PCR reaksiyonu	40
Tablo 5.3. Golden gate reaksiyonunun oluşturulması	40
Tablo 5.4. Koloni PCR Bileşenleri ve koşulları	41
Tablo 5.5. Koloni PCR Bileşenleri ve koşulları	42
Tablo 5.6. Aday genom düzenlenmiş T0 bitkilerin belirlenmesinde kullanılan PCR bileşenleri	45
Tablo 5.7. Aday genom düzenlenmiş T0 bitkilerin belirlenmesinde kullanılan PCR protokolü.....	45
Tablo 5.8. T0 bitkilerinde Phusion High-Fidelity DNA polimeraz PCR bileşenleri	46
Tablo 5.9. T0 bitkilerinde Phusion High-Fidelity DNA polimeraz PCR koşulları	46
Tablo 5.10. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri	48
Tablo 5.11. cDNA sentezi PCR koşulları.....	48
Tablo. 5.12. RT-qPCR sentezi reaksiyon bileşenleri.....	49
Tablo 5.13. RT-qPCR koşulları.....	49
Tablo 6.1. PCR ürünleri Jelden ekstraksiyon Nanodrop sonuçları.....	52
Tablo 6.2. Transformasyon sonucunda elde edilen transgenik ve genom düzenlenmiş hatların miktarı	54
Tablo 6.3. Wt ve mutant bitkilerde polen canlılıklarının kontrolü	59
Tablo 6.4. <i>Arabidopsis thaliana</i> 'daki genlerin <i>Solanum lycopersicum</i> 'daki ortologları	63

1. GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum L.*), patlıcangiller familyasından olup anavatanı Güney ve Orta Amerika olan tek yıllık bir bitkidir. Amerika'dan Avrupa'ya, buradan da tüm dünyaya yayılmıştır (Mamay ve Yanık 2012). Domates $2n=2x=24$ kromozom sayısına ve 950 Mb genom büyüklüğüne sahiptir (Brake, 2022).

Domates (*Solanum lycopersicum L.*), her yıl 5.051 milyon hektar alanda üretilen ve yaklaşık 186.821 milyon ton domates ile patatesten sonra en önemli ikinci sebze ürünüdür (FAOSTAT, 2020). Asya, küresel domates üretiminin %61,1'ini oluştururken, Avrupa, Amerika ve Afrika toplam domates veriminin sırasıyla %13,5, %13,4 ve %11,8'ini üretmektedir. Hollanda'da hektar başına 508 tondan fazla olan domates verimi elde ederken, Somali'de bu oran hektar başına 1,45 tona tekabül etmektedir (FAOSTAT, 2020). Dünya'da ortalama verim hektar başına 376 tondur. Kişi başına düşen domates tüketimi 61,9 ile 198,9 kg arasında değişmekle birlikte, domates tüketimi Çin, Hindistan, Kuzey Afrika, Orta Doğu, ABD ve Brezilya'da yoğunlaşmaktadır (FAOSTAT, 2020). Domates, patates, biber (*Capsicum annuum L.*) ve patlıcan (*Solanum melongena L.*) gibi ekonomik açıdan önemli diğer birçok ürünü içeren *Solanaceae* familyasının bir üyesi olup, sebze ve meyve bitkileri için en değerli bitki ailelerinden birini temsil etmektedir.

Domates insan sağlığı açısından önemli birçok bileşik içerir ve dengeli bir diyetin besleyici bir parçası olarak kolayca entegre edilebilir (Martí vd, 2016). Tüketiciler taze meyveleri tüketmenin yanı sıra çorbalar, meyve suları ve soslar gibi işlenmiş ürünlerde de domates kullanmaktadır (Krauss, 2006; Li, 2018b). Son yıllarda tüketiciler, sağlık açısından yararlı gıdaların, çeşitli kronik hastalıkların ve işlev bozukluklarının önlenmesindeki rollerinin daha fazla farkına varmışlardır (Pem ve Jeewon, 2015). Bu gereksinimleri karşılamak için çok sayıda fonksiyonel gıda maddesi oluşturulmuş olsa da meyve ve sebze gibi “geleneksel gıdaların” tüketiminin bu amaç için daha etkili olduğunu belirtmek önemlidir (Viuda-Martos, 2014).

Domatesin besinsel önemi büyük ölçüde vitaminler, karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi sağlık açısından çok önemli bileşiklerle açıklanmaktadır (Raiola, 2014; Liu, 2016; Martí, 2016; Li, 2018b). Bu biyoaktif bileşikler, anti-inflamatuar, anti-alerjik, antimikrobiyal, antitrombotik, kardiyο-koruyucu ve antioksidan etkiler olmak üzere çok çeşitli fizyolojik özelliklere sahiptir (Raiola, 2014). Domates, likopen

kaynağını temsil eden karotenoidler açısından zengindir (Viuda-Martos, 2014). Karotenoidler ve polifenolik bileşikler, domateslerin besin değerine katkıda bulunarak tat, aroma ve doku olmak üzere fonksiyonel özelliklerini ve duyuşsal niteliklerini geliştirir (Raiola, 2014; Tohge ve Fernie, 2015; Martí, 2016). Domatesler ayrıca doğal olarak oluşan antioksidanlar Vitamin C ve E'nin (Martí, 2016) yanı sıra sakaroz, heksozlar, sitrat, malat ve askorbik asit gibi büyük miktarlarda metabolitlere sahiptir (Li, 2018b).

Domates meyve kalitesi ve metabolit biyosentezi, bitki yetiştirme koşullarından etkilenir (Diouf, 2018). Domates üretimi, su kaynaklarının kıtlığı, toprak tuzluluğu ve diğer abiyotik stresler de dahil olmak üzere dünya çapında çeşitli sorunlarla karşı karşıyadır (Fahad, 2017; Gharbi, 2017; Zhou, 2019). Özellikle, Güney Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika'daki bazı bölgeler ve Akdeniz iklimine sahip ülkelerde, domates yetiştiriciliğinde giderek artan bir şekilde kuraklık ve tuzluluk gibi sınırlayıcı koşullarla karşı karşıya kalmaktadır. Bu koşullar da domates çiftçilerinin rekabet gücünü azaltmaktadır. Bu da ekosistemin bütünlüğünü etkileyerek kırsal sektörlerin terk edilmesine sebep olmaktadır.

Ekonomik ve besinsel önemine ek olarak, domates, etli meyve gelişimi çalışması için model haline gelmiştir (Karlova, 2014; Kim, 2018; Li, 2018b). Zengin bir genomik kaynak olarak hizmet veren domates genomunun tamamı dizilenmiştir ve bu tür için hem genetik hem de fiziksel haritalar ve moleküler belirteçler mevcuttur (Suresh, 2014; Zhao, 2019). Ayrıca, bir dizi iyi karakterize edilmiş monogenik mutantlar, TILLING popülasyonları, yabani domates türleri, kendi içinde rekombinant olarak yetiştirilmiş hatlar ve genom düzenleme araçları mevcuttur (Pérez-Martín, 2017; Li, 2018b; Martín-Pizarro ve Posé, 2018; Rothan, 2019).

Günümüzde yetiştirilen domates çeşitleri, doğada bulunan yabani türlerden bugüne kadar uzun yıllar süren ıslah çalışmaları sonucunda elde edilmiştir. Islah stratejileri, arzu edilen ürünlerin ve özelliklerinin insan tüketimine uygun hale getirilmesinde kilit rol oynamaktadır. Bununla birlikte, domatesin raf ömrü kısadır, bu da ürünün neredeyse %50-60'ına ulaşabilen kayıplara sebep olmaktadır. Bu kayıplar, gelişmiş ve altyapısı iyi olan ülkelere gelişmekte olan ülkelere göre daha azdır. 2050 yılına kadar beklenen nüfus artışı, daha fazla ve daha besleyici gıda üretimi gerektireceği göz önüne alındığında, gıda güvenliği endişeleri ortaya çıkmaktadır. Yakın zamana kadar tarımsal bitkilerden, besin açısından zenginleştirilmiş ürünler

retmek için birçok iyileştirmeler yapılsa da yetersiz kalmıştır. Ayrıca, ekstrem doğa koşulları bitki stresini artırıp ürünün verimini ve besin kalitesini etkilemektedir. Bu yüzden geleneksel ıslah yöntemlerinin dışında modern yöntemlerin kullanım ihtiyaı da doğmuştur. Bitki genetiğinin anlaşılmasındaki son gelişmeler ve genom düzenleme teknolojilerinin kullanımı da dahil olmak üzere genetik mühendisliği teknolojilerinin geliştirilmesinde kaydedilen ilerlemeler, daha iyi özelliklere sahip bir domatesin gerçek olacağı umutlarını artırmıştır.

Melezleme, mutasyon ıslahı ve gen aktarım yöntemleri modern tarımda ürün iyileştirmek için ana yöntemlerdir. İstenilen karakterlerin melezleme yolu ile yani klasik ıslah yöntemleri kullanılarak aktarılması uzun yıllar almaktadır. Uzun yıllardır yapılan ıslah çalışmaları sonucunda, bitki genomlarındaki homozigotluk artmıştır. Bu yüzden genetik değişkenlik büyük ölçüde azalmış ve birçok özelliğin geliştirilme potansiyeli ya kaybolmuş ya da sınırlandırılmıştır. Mutasyon ıslahı, kimyasal mutajenler veya fiziksel ışınlar kullanarak oluşturulan mutasyonlar genetik çeşitliliği genişletmiştir (Pacher ve Puchta 2017). Mutasyon ıslahında çok sayıda mutantın üretilmesi ve taranması zor olduğu için yapılması zaman alıcı maliyetli ve karışıklıklara sebep olmaktadır. Bu tür zaman alıcı, zahmetli, maliyetli ve rastgele ıslah programları yerine günümüzde modern genom düzenleme teknolojileri kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknolojilerden günümüzde en çok kullanılanları çinko parmak nükleazlar (ZFN'ler), Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) ve Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR)'dir.

2. GENOM DÜZENLEME

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

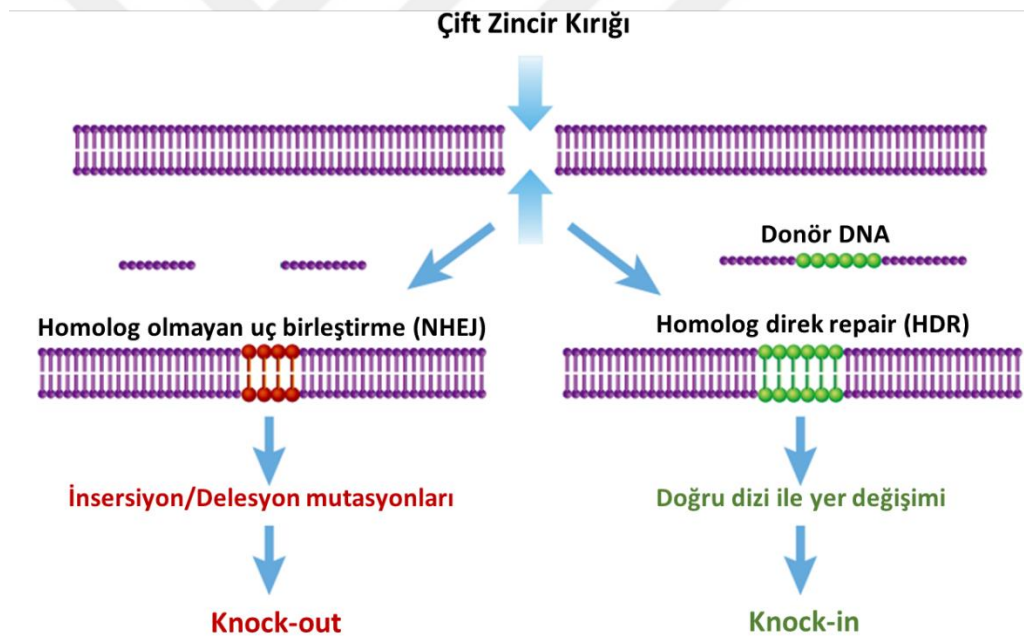
Genom düzenleme araçları, protein ile yönlendirilebilen birinci nesil nükleazlar (MN (Meganükleazlar), ZFN (Çinko Parmak Nükleazlar) ve TALEN (Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar)) ve RNA ile yönlendirilen ikinci nesil nükleazlar (CRISPR / Cas9 ve CRISPR / Cpf1 için) olmak üzere sınıflandırılabilir.

TALEN'ler, ZFN'ler ve MN'ler, genom manipülasyonunda kullanılan birinci nesil düzenleme araçlarıdır. Birinci nesil genom düzenleme araçları ile karşılaştırıldığında, CRISPR/Cas9 tekniği gibi ikinci nesil genom düzenleme araçları daha kolay ve etkindir (Wang, 2013). CRISPR/Cas9 sistemi, TALEN'lerin ve ZFN'lerin aksine yalnızca tek kılavuzlu RNA (sgRNA) ve Cas9 proteinini içerdiğinden dolayı tasarımı kolaydır. ZFN'ler herhangi bir bölgeden DNA dizisini kesmek için kullanılan hedeflenebilir DNA kırıkları oluşturabilen proteinlerdir. TALEN'ler DNA hasarında tamir yolağını tetikleyerek, genomun modifikasyonuna yol açan hedef dizide çift zincir kırıkları (ÇZK) oluşturabilmektedir (Gersbach, 2013). ZFN ve TALEN'lerin etkin kullanılmalarını engelleyen bazı kısıtlayıcı faktörler olmasına rağmen insan, hayvan ve bitki çalışmalarında kullanılmaktadırlar. ZFN'nin özgüllüğü sınırlıdır ve çoğunlukla hedef dışı mutasyonlar meydana getirebilmektedir (Puchta, 2017). ZFN ve TALEN'lerde vektör oluşturmak zaman alıcıdır, protein mühendisliği gerektirir ve bununla birlikte laboratuvar çalışmalarında da iş yükü fazladır. Bu kısıtlamalardan dolayı, TALEN'lerin ve ZFN'lerin bitkilerdeki uygulamaları sınırlandırılmıştır (Chylinski, 2012). Etkin bir genom düzenleme aracı geliştirmek için bitkilerde CRISPR/Cas9 sisteminin uygulamaları genişletmiş ve umut vadeden genom

düzenleme aracı haline gelmiştir (Zhang, 2013).

2.1. DNA Kırıkları Tamir Mekanizması

Bitki hücrelerinin genomu hem hücre içinde hem de hücre dışında üretilen maddeler tarafından zarar görebilmektedir. Reaktif oksijen türleri olarak hücrenin kendi metabolizmasının yan ürünleri, çevresel radyasyona, kimyasal maddeler veya ultraviyole ışığa (UV) maruz kalma DNA'ya zarar verebilir. Genoma yapılan bu saldırılar sonucunda, her hücrede günde birden fazla DNA'da mutasyon oluşmasına neden olur ve bunlar içerisinde en zararlı olan çift zincir DNA kırıklarıdır (ÇZK). Tamir edilemeyen ya da kısmi tamir edilen ÇZK'ları indüklenmiş apoptoz veya kromozomal anormallikler (translokasyonlar veya delesyonlar) ile sonuçlanabilir. Genomun bütünlüğünün korunması açısından bu kırıkların tamir edilmesi oldukça önemli ve hayatidir (Kotmakçi, 2017).



Şekil 2.1. Genom düzenlenmesinde DNA tamir mekanizmaları

Daha önce açıklandığı gibi, CRISPR/Cas9 sistemi DNA'da ÇZK'na neden olur ve daha sonra bu kırıklar hücrelerin endojen onarım mekanizmalarından yararlanarak tamir edilebilmektedir. NHEJ ile tamir hataya meyilli olduğundan çerçeve kayması mutasyonları (Frameshift mutations) ve InDel mutasyonu adı verilen insersiyon/delesyon mutasyonlarına neden olabilmektedir. Bu mutasyonların kazanılması ile gen ürünü bozulduğundan, homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ), gen çıkarma (knock-out, KO) uygulamaları için oldukça uygundur. CRISPR/Cas9

teknolojisinin kullanıldığı uygulamalarda Cas9 ve gRNA'nın transfeksiyonu sırasında hedef DNA dizisiyle homoloji gösteren donör DNA dizisinin de hücreye verilmesiyle homolog rekombinasyon yoluyla genom içine bu DNA dizisinin eklenmesi (knock-in) sağlanabilmektedir. Farklı çalışma grupları tarafından yapılan uygulamalarda homolog rekombinasyon yoluyla insersiyon, delesyon ya da dizi değişikliği yapabilmek mümkün olmuştur (Sander ve Joung, 2014)

2.1.1. Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ)

Modifiye edilmiş diziye özgü nükleazlar, belirli gen lokuslarında DNA çift zincir kırıkları (DSB) oluşturmak üzere tasarlanır ve iki DNA onarım yolağından biri aracılığıyla istenen genomik modifikasyonları kolaylaştırır (Bortesi, 2016; Abdelrahman, 2018). Bu genomik yollar homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve homolojiye yönelik onarımdır (HDR). NHEJ, homolog bir şablon dizisi gerektirmeksizin (Ron, 2014), sıklıkla indeller oluşturduğundan ve dolayısıyla fonksiyonel gen nakavtları oluşturabildiğinden dolayı, ÇZK'larına yanıt olarak hataya açık ana onarım yoludur (Lawrenson, 2019). Aynı zamanda, bir donörden alınan DNA dizileri homolojiden bağımsız bir şekilde başka bir genoma yerleştirilebilir ve bu nedenle, ürünün iyileştirilmesi için önceden belirlenmiş bir lokusa gen entegrasyonu için etkin bir strateji olabilir. NHEJ, hücre döngüsü sırasında evrimsel olarak korunmuş ve aktiftir, ancak en önemlisi, rekombinasyon için hiçbir homolog şablonun bulunmadığı G1 hücre fazı sırasında çok önemlidir. NHEJ, HDR'den daha hızlıdır ve çoğu DNA kırıklarını çok kısa sürede onarır (Liu, 2019b). Bu nedenle NHEJ, genom düzenleme metodları aracılığıyla üretilen DNA kırılmalarını düzelten başlıca onarım yoludur. NHEJ, aynı zamanda, homolojiden bağımsız bir şekilde donör DNA dizi insersiyonları üretmek için kullanılabilir ve bu nedenle, birden fazla gen aktarmak için etkili bir yöntem olabilir (Chen,2019). NHEJ kullanılarak bitki genomlarında nükleotid dizisi üzerinde değişiklikler elde edilebilir.

2.1.2. Homoloji ile Yönlendirilen Rekombinasyon (HDR)

NHEJ, büyük ölçekli gen nakavt deneyleri için oldukça etkin ve verimli olsa da HDR'ye bağlı hedefli gen düzenleme, doğru genomik modifikasyon için hala en önemli araçlardan birisidir. HDR, gen düzenlenmesini kolaylaştırarak dizi üzerinde değişiklikleri hatasız bir şekilde yapar. HDR ile kırık DNA uçları, genomdan gelen dizi homolojisi temelinde onarılır (Manova, 2015; Nambiar, 2019). HDR, prensip olarak, genetik çalışmalarda çok önemli rol oynayan ve genlerin fonksiyonlarının geri

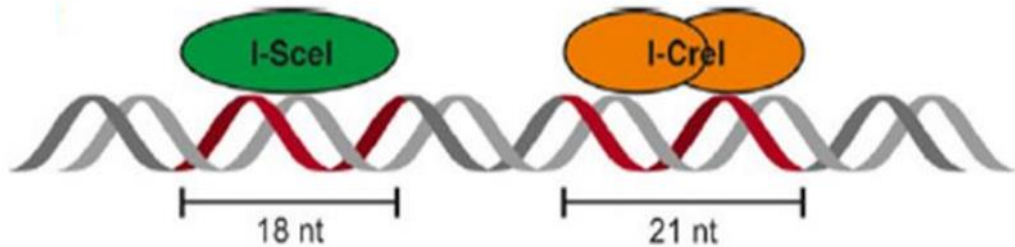
kazanımları için kullanılan bir araçtır. HDR, hücre döngüsünün S ve G2 fazları sırasında işlev gören somatik hücrelerde küçük bir DSB onarım yoludur (Lawrenson, 2019; Puchta, 2005). Çeltik ve mısırdaki HDR aracılı CRISPR-Cas9 düzenlemesi başarılı olmasına rağmen hedef kırık ve bir onarım şablonunun bir arada bulunması gerektiğinden yüksek bitkilerde uygulanması daha zor olup bu gereksinim HDR'nin yaygın uygulanmasını engellemektedir. Bitkilerde HDR destekli gen hedeflemenin verimliliğini artırmak için farklı stratejiler kullanılmaktadır. Yakın tarihli çeşitli yayınlar, Arabidopsis (Mao, 2019; Wolter, 2018), tütün (Baltes, 2014; Miki, 2018), domates (Puchta, 2005), çeltik (Begemann, 2017; Wang, 2017; Li, 2018), mısır (Svitashev, 2016), soya fasulyesi (Li, 2015), buğday (Gil-Humanes, 2017), patates (Butler, 2016), arpa (Gasparis, 2018), pamuk (Li, 2013; Li, 2017) ve ketende (Sauer, 2016) diziye özgü nükleazların kullanıldığı HDR aracılı gen düzenlemesini bildirmektedir. Bu gen hedefleme olaylarının çoğu, hedefleme verimliliğini artırmak için hedeflenen bölgelerdeki herbisit veya antibiyotığe dirençli genler gibi seleksiyon markörlerine dayanıyordu. Bununla birlikte, gen hedefleme olayları seleksiyon markörlerine bağlı değildi ve düşük frekanslar gösteriyordu (Zhao, 2016). Dolayısıyla bu yöntemlerin önemini sınırlamıştır. Hataya meyilli HDR elde etmek için, bir kardeş kromatidin aynı lokusuyla sınırlandırılmalı ve bir DNA onarım şablonunun bir bitki hücresine aktarılması gerekir. Ayrıca, HDR verimliliği, bir hücreye aktarılan DNA miktarından etkilenebildiği de görülmüştür (Chu, 2015).

2.2. Genom Düzenleme Araçları

2.2.1. Meganükleazlar (MNs)

Meganükleazlar, diziye özgü bir şekilde daha büyük DNA dizilerini (>12 bp) tanıyabilen ve kesebilen endonükleazlardır (Chapdelaine, 2010; Suzuki, 2020). Arkebakteriler, bakteriler, algler, mantarlar, mayalar ve bazı bitki türleri gibi bir dizi organizmada bulundukları bildirilmektedir. İlk olarak 1980'lerde keşfedilmişler ve daha sonra 1990'ların başında memeli hücrelerinde kapsamlı bir şekilde karakterize edilmişlerdir (Arnould, 2011). Uzun tanıma bölgelerinin varlığından dolayı, hedef bölgelerin büyük bir genomda yalnızca bir yerde olması beklenir. Bunlar aynı zamanda güdümlü endonükleazlar olarak da bilinirler ve konakçı genomun parazitik elementleri olarak hareket ettikleri varsayılır. Meganükleazlar, belirli bir konumda konakçı genomunda çift zincir DNA kırıkları oluşturur ve daha sonra, konakçının homolog onarım sistemini kullanarak kendilerini aktarılan genomda çoğaltır (Silva, 2011).

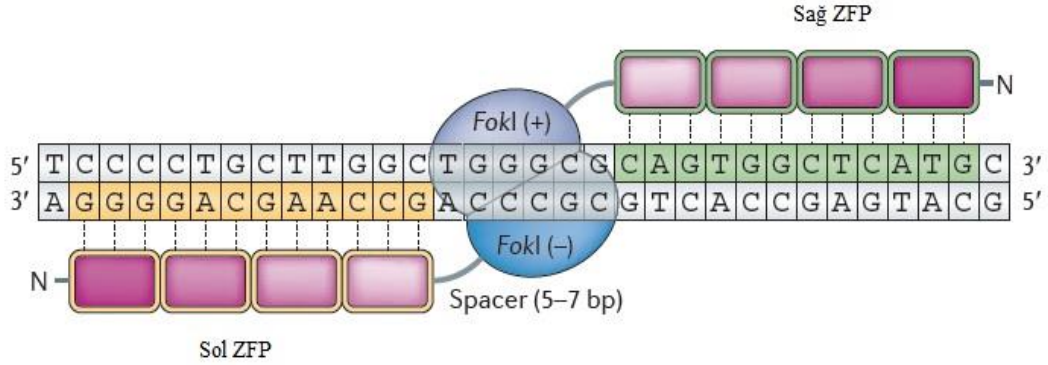
Meganükleazlar, yapılarında bulunan dizi ve motiflerine göre beş aileye sınıflandırılmıştır. Bunlar LAGLIDADG, PD-(D/E) XK, His-Cys kutusu, GIY-YIG ve HNH'yi içerir (Danilo, 2022). Bunlar arasında, LAGLIDADG meganükleaz (LMN) ailesi, genom düzenleme için yaygın olarak kullanılmıştır. Adı, bu protein ailesinin yapısında bulunan ana motif dizisinden türetilmiştir (Suzuki, 2020; Silva, 2011). LMN'ler genellikle tek hücreli ökaryotların kloroplast ve mitokondrilerinde ifade edilir. Bu endonükleazların çoğu, dimerik proteinler olarak bulunur ve kendi intron birleşmesinden sorumlu RNA maturaz aktivitesi ve ekson dizisinin kesimiyle sonuçlanan spesifik bir endonükleaz aktivitesi olmak üzere iki rol oynar (Arnould, 2011). Meganükleazlar, NHEJ sistemi kullanılarak onarılan ve hedef bölgede hataya açık delesyonlara veya mikro insersiyonlara neden olan çift zincir kırıklarını üretir (Arnould, 2011; Liang, 1998). Bu ailenin çeşitli üyeleri arasında genom düzenleme için en yaygın olarak kullanılanlar *I-SceI* ve *I-CreI*'dir. *I-SceI* geni, *Saccharomyces cerevisiae*'nin mitokondriyal DNA'sının 21S rRNA kodlayan geninde lokalizedir. 18 bç uzunluğundaki 5'-TAGGGATAACAGGGTAAT-3' dizisini tanımlar ve özgünlüğü ve aktivitesi nedeniyle genom düzenleme alanında "altın standart" olarak bilinir. *I-CreI*, tek hücreli alg *Chlamydomonas reinhardtii*'nin kloroplastında tanımlanmış ve 23S rRNA geninde lokalize olduğu görülmüştür. Bir homodimer olarak bulunur ve 22 bç uzunluğundaki 5'-CAAAACGTCGTGAGACAGTTTG-3' hedef dizisini tanır. *I-CreI*'nin katalitik bölgesi, DNA'nın kesimine katılan ikili aspartik asit rezidüsünden oluşur (Arnould, 2011; Prieto, 2018). Bununla birlikte, yeni DNA dizilerini hedeflemek için meganükleazların yeniden yapılandırılması sürecinde yer alan zorluklar nedeniyle, genom düzenlemede kullanımı sınırlı olmuştur (Maeder, 2016; Zess, 2021).



Şekil 2.2. Meganükleazların yapısal gösterimi. Meganükleazlar çift sarmal hedef DNA'ya bağlanma ve çift zincir kırıkları oluşturma yeteneğine sahiptirler. Meganükleazlar 14-40 bp'lik hedef ara sekansa bağlanmaktadır

2.2.2. ZFN (Çinko Parmak Nükleazlar)

Çinko parmak nükleazları (ZFN'ler), spesifik bölgelerden DNA dizilerini kesmek için özel olarak tasarlanmış, hedeflenebilir DNA kesim proteinleridir (Carroll, 2011). ZFN'ler, homolog rekombinasyon ile geni değiştirmek için DNA'da çift zincir kırıklarının oluşturulması yoluyla hedeflenen gen düzenlemesini gerçekleştirir (Şekil 2.3). Her ZFN, DNA dizisinde benzersiz bir 6 bç heksameri tanıyan iki parmaklı modül zincirine sahip bir DNA bağlama domaini ve bir *FokI* nükleaz domaininden oluşur (Şekil 2.3) (Carlson, 2012; Gupta, 2012). Bu domainler bir çinko parmak proteini (ZFP) oluşturmak üzere birleştirilir. DNA bağlama ve DNA kesim domaini birlikte kaynaştığında, oldukça spesifik bir genomik makas oluştururlar (Carlson, 2012; Gupta, 2012). ZFN aracılı gen düzenlenmesi ile, DNA dizisinde bölgeye özgü çift sarmallı kırıklar oluşturur ve DSB'lerin ligasyonu yoluyla genomu kalıcı olarak düzenlenir (Carlson, 2012; Gupta, 2012). ZFN aracılı gen hedeflemesi ile, bölgeye özgü çift zincir DNA kırıkları oluşturulur ve zincir kırıklarının ligasyonu yoluyla genom kalıcı olarak düzenlenir (Carlson, 2012; Gupta, 2012). ZFN tabanlı genom düzenlemenin uygulanması için en önemli faktör, bu tekniğin genomdaki belirli bir DNA dizisini kesin olarak hedefleyebilen ZFN'lerin üretilmesine bağlı olmasıdır. Cys2His2 ZFP, gerekli dizi spesifikliği ile uygun ZFN'ler geliştirmek için mümkün olan en iyi yapıyı sağlar (Pabo, 2001). Bu ZFN yaklaşık 30 amino asitten oluşur ve çinko iyonlarının korunmuş Cys2His2 amino asitlerine bağlanmasıyla stabilize edilen bir $\beta\beta\alpha$ yapısına sahiptir (Thakore, 2015; Pavletich, 1991). ZF motifi, α sarmalını DNA çift sarmalının ana oluğuna dahil ederek genomdaki DNA dizisine bağlanır (Pavletich, 1991). Çinko parmağın α sarmalının -1, +1, +2, +3, +4, +5 ve +6 pozisyonlarındaki amino asitler, ZFN'nin DNA dizisi ile diziye özgü etkileşimlerinden sorumludur (Pavletich, 1991; Elrod-Erickson, 1999; Shi, 1995). Parmakların her biri DNA'nın üçlü dizisini bağlar. Daha uzun bir DNA zincirine bağlanma, birden fazla çinko parmak motifinin ZFP'ler oluşturmak üzere bağlanmasıyla mümkün olur (Liu, 1997; Beerli, 1998; Kim, 1998). Metilaz domaini (M), *FokI*-kesim domaini (N), transkripsiyon aktivatör domaini (A) ve transkripsiyon baskılayıcı domaini (R), bir ZFN oluşturmak için ZFP ile birleştirilir (Kim, 1996; Smith, 2000; Mani, 2005a; Alwin, 2005).



Şekil 2.3. Çinko parmak nükleazların yapısal gösterimi

Belirli hedef dizileri tanıyan ve kesen ZFN'lerin mühendisliği, büyük ölçüde ilgili hedefi tanıyabilen ZFP'lerin güvenilirliğine bağlıdır. ZFN'ler özellikle üç nükleotitlik dizilere bağlandığından, genomdaki 64 üçlü varyantın varlığı, her bir üçlü varyantı bağlayan ZFN'lerin tasarlanmasını zorlaştırmaktadır. Ancak, 5'-GNN-3', 5'-ANN-3', 5'-CNN-3' ve 5'-TNN-3' dizilerine bağlanan ZFN'ler deneysel olarak doğrulanmıştır (Liu, 2002; Dreier, 2001; Jamieson, 2003). Önceki ZF motifinde α sarmalının 2. konumunda bir Asp rezidüsünün varlığı, üçlü kodon dışında çapraz zincir temasını uyarır, bu da hedef bölgelerin eşleşmesine neden olur (Pavletich, 1993). Bu nedenle, Asp rezidüsü, ZFP'nin α sarmalının ikinci konumunda mevcut olduğunda, üçlü kodon yerine dört baz çiftli DNA hedef dizisine bağlanır ve bu yüzden tasarım stratejisini karmaşıktırır. Bununla birlikte, birçok durumda, ZFP'lerin ZF motifleri, üç nükleotitlik DNA dizisinin sadece iki nükleotidi ile diziye özgü temaslar kurar ve 2. pozisyonda bir Asp rezidüsünün varlığı, üçlü alt bölge için ZF motifinin afinitesini ve özgüllüğünü artırır (Greisman, 1997). 2. pozisyonda bir Asp rezidüsünün yokluğunda, üç nükleotitlik DNA'nın sadece iki bazı tanınır, bu da dejenere bölgelerin tanınmasının artırılmasını sağlar (Durai, 2005). Üç ZFP'den oluşan bir set, 18 bp'lik bir hedef diziyi tanır; her ZF'nin karşılık gelen üçlüsünün özgüllüğüne bağlı olarak, gerçek tanıma bölgesi 12 ile 18 bp arasında değişebilir (Durai, 2005).

Belirli bir ZFP, belirli bir nükleotid bölgesini tanıdığında, *FokI* restriksiyon endonükleazı devreye girer. *FokI*, çift sarmallı DNA'daki palindromik olmayan pentadeoksiribonükleotit dizisini 5'-GGATG-3':5'-CATCC-3' tanıyan ve tanıma

bölgesinin downstream'deki DNA'nın 9/13 nükleotitlerini ayıran bir tip II restriksiyon enzimidir. *FokI*'nin DNA bağlama bölgesinin tanıma bölgesine bağlanması üzerine, endonükleaz domainine bir sinyal iletilir ve kesim meydana gelir. ZFN'ler, DNA'nın çift sarmallı kesimini gerçekleştirmek için nükleaz domainini dimerize eder (Mani, 2005b). Üç ZFN, bir çift zincir kırığının üretilmesine yol açan nükleaz domainini dimerize etmek için altı baz çifti tanıma bölgesi gerektirir. Etkili olarak ZFN'ler, benzersiz bir DNA dizisinin tanınması için yeterli olan 18 baz çifti tanıma bölgesine sahiptir (Durai, 2005). Karşılıklı dizi özgüllüğü ve tanıma bölgelerine sahip iki ZFN, ÇZK'ı oluşturmak için bir heterodimer olarak çalışabilir.

Bir gende ÇZK 'nın üretilmesinden sonra, onarım mekanizması ile gen düzenleme gerçekleştirilmiş olur. 5'-GNNGNNGNN-3' konsensüs dizisine sahip bir gen, basit bir birleştirme yaklaşımıyla hedeflenebilir (Porteus, 2006). ANN, GNN ve CNN üçlülerinin karışımları ile dizileri hedeflemek de mümkündür (Dreier, 2000; Dreier, 2005). Gen parçası ya genomun homolog bir bölümüne transfer edilebilir ya da rastgele hedeflenebilir. Rastgele entegrasyon durumlarında, DSB homolog olmayan uç birleştirme ya da homolog rekombinasyon yoluyla ligasyonu gerçekleştirilir. ZFN'leri kullanarak, genomdaki herhangi bir genomik lokusu hızla ve rastgele bozabilir veya entegre edebiliriz. ZFN'ler aracılığıyla yapılan mutasyonlar kalıcıdır.

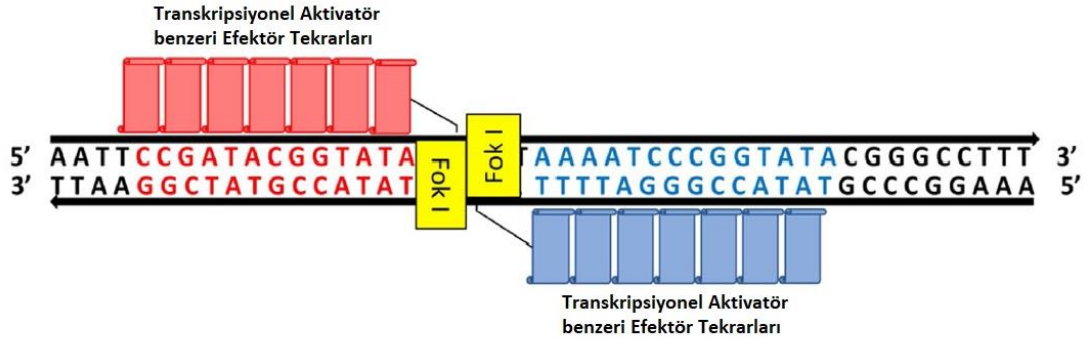
2.2.3. TALEN

Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler), bitkilerde etkili genom düzenleme araçları olarak ZFN'lere bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 2.4) (Joung, 2013). Prensipde TALEN'ler, ÇZK'larını oluşturmak için ZFN'lere benzer bir mekanizmayı kullanır (Şekil 2.4). TALEN'ler, spesifik olmayan *FokI* endonükleazları içeren ZFN'lere benzer. Bununla birlikte, ZFN'lerin *FokI* domainleri, transkripsiyon aktivatörü benzeri efektörlerden (TALE'ler) türetilen yüksek oranda korunmuş tekrarların spesifik DNA bağlama domainleri ile birleşir (Joung, 2013). TALE proteinleri, konukçu bitkilerde gen transkripsiyonunu değiştirmek için TALE'leri salgılayan *Xanthomonas* bakterilerinde bulunur (Bonas, 1989; Boch, 2010). TALE'lerin DNA-bağlama domainleri, 12. ve 13. pozisyonlar dışında 30 kopyaya kadar yüksek oranda korunmuş 33-34 amino asit dizisi içerir. 12. ve 13. konumlar, tekrar değişken direzidü (RVD) olarak adlandırılır ve spesifik nükleotid tanıma ile önemli bir korelasyon sergiler. Her tekrar, tek bir bazı tanıyabilir ve bu nedenle, herhangi bir DNA dizisi için yeni bağlama bölgeleri birleştirilebilir. *FokI* domaini,

spesifik olmayan DNA kesim enzimi olarak işlev görür (Bitinaite, 1998; Wah, 1998). DNA bağlama domaini ile *FokI* kesim domaini arasındaki amino asit rezidülerin sayısı ve iki ayrı TALEN bağlama bölgesi arasındaki bazların sayısı, TALEN'lerin aktivitelerini etkileyen önemli parametrelerdir. Amino asitlerin ve DNA bağlayıcı TALE domainlerinin tanınması, proteinlerin etkin mühendisliğini gerektirir. TALEN tanıma dizileri oluşturulduktan sonra, bunlar plazmitlere aktarılır ve hedef hücrelere transformasyonları gerçekleştirilir. Daha sonra, gen ürünü eksprese edilir ve genomun gerekli düzenlemesini gerçekleştirdiği çekirdeğe girer. Alternatif olarak, TALEN yapısı, TALEN'in genomik entegrasyon olasılığını ortadan kaldıran mRNA olarak hücrelere transformasyonu gerçekleştirilebilir. mRNA tabanlı yaklaşım, homoloji tabanlı onarım (HDR) olanaklarını artırır ve başarılı gen düzenlemesine yol açar. TALEN teknolojisi *Oryza sativa*'da başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Li, 2012). Bakteriyel yanıklığa hassasiyeti artıran *Os11N3* geninin promotör bölgesi TALEN teknolojisi kullanılarak hedeflenmiş ve sonuç olarak hastalığa dirençli çeltik geliştirilmiştir (Li, 2012). Belirli genleri hedeflemek için ZFN'ler ve TALEN'ler arasında yapılan karşılaştırmalı bir çalışma, TALEN'ler için en yüksek kesim oranlarını göstermiştir. Bu sonuç, TALEN'lerin tasarım kolaylığı ve yüksek kesim aktiviteleri ve TALEN'ler tarafından uygulanabilecek sınırsız hedef yelpazesinden kaynaklanmaktadır (Joung, 2013). TALEN teknolojisi, *Arabidopsis thaliana*'nın nakavt mutantlarını oluşturmak için verimli bir şekilde kullanılmıştır (Cermak, 2011). TALEN teknolojisi çok verimli olmasına ve ZFN'lerden üstün olmasına rağmen, tasarlanmış TALE tekrarlarının inşası zordur çünkü birden fazla aynı tekrar dizisi gerektirir (Joung, 2013).

ZFN'ler gibi TALEN'ler de *FokI* nükleaz enzimi ile TALE tekrarlarının birleştirilmesi ile oluşur. Fakat her bir TALE tekrarı tek bir nükleotidi hedefler, daha esnek hedef tasarımına izin verir ve ZFN'ler tarafından hedeflenebilecek olanlara göre potansiyel hedef alanların sayısını artırır. TALEN aracılığı ile genetiği değiştirilmiş arpa, patates, şeker kamışı, soya, çeltik, mısır ve buğday dahil olmak üzere birçok bitkide gösterilmiştir (Phillips, 2017). Ürün geliştirmede TALEN-aracılı genom düzenlemenin ilk uygulaması çeltik bitkisinde yapılmış olup, bakteriyel yanıklık hastalığına duyarlılık sağlayan *OsSWEET14* geninin bütünlüğünün bozulması sonucunda elde edilen mutant hatların bakteriyel yanıklık hastalığına dirençli olduğu bulunmuştur (Zhang vd 2020). Benzer şekilde, TALEN'ler buğdayda, küllenmeye

karşı dayanıklı buğday oluşturmak için üç *TaMLO* homolog genini susturmak için kullanılmıştır (Cheng, 2014). Sonuç olarak, TALEN'ler bitkilerde besin içeriklerinin artırılması, hastalıklara dirençliliğin artırılması gibi farklı özelliklere sahip bitkilerin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmıştır.



Şekil 2.4. Genom düzenleme için kullanılan TALEN yapısı. FokI DNA kesim domaini TALE'ler ile birleştirilir ve çift olarak kullanılır çünkü FokI enzimi DNA kesme aktivitesi için dimerizasyon gerektirmektedir. TALEN'lerin DNA bağlanma domaini, 13–28 Transkripsiyonel Aktivatör Benzeri Eftör Tekrarlarından (TALE Tekrarları) oluşur

2.2.4. CRISPR/Cas9

Son yıllarda, hedeflenen gen manipölasyonları ve çok sayıda organizmada istenen genleri düzenlemek için etkileyici bir genom düzenleme aracı olarak CRISPR/Cas9 tanımlanmıştır. CRISPR/Cas9 sistemi, bitkiler dahil birçok organizmada en etkili ve kullanışlı genom düzenleme aracı olarak kullanılmaktadır. CRISPR/Cas9 genom düzenleme aracı bu çalışma ve tezde ayrı bir ana başlık olarak ele alınacaktır.

3. CRISPR/CAS9

3.1. CRISPR/Cas9 ve İşleyişi

Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR)/Cas, bakterilerde yaygın olarak bulunan bir DNA dizi ailesidir. Bakteriye saldıran virüslerden DNA parçaları içerir. Bu DNA fragmentleri, bakteri tarafından DNA'yı daha sonraki saldırılardan korumak ve bu saldırıları bertaraf etmek için kullanılır. CRISPR/Cas, bakterilere yabancı genetik materyale karşı direnç sağlayan tipik bir bakteriyel bağışıklık sistemi görevi görür. CRISPR sistemi, CRISPR RNA (crRNA), trans-aktive edici CRISPR RNA (tracrRNA), Cas9 nükleaz ve protospacer bitişik motifi (PAM) içerir (Şekil 3.1). Doğal olarak oluşan CRISPR sistemleri, yabancı DNA dizisini CRISPR kümesine entegre eder (Sander, 2014). Ardından, yabancı DNA'yı barındıran CRISPR kümesi, yabancı DNA bölgesine tamamlayıcı olan PAM bölgesini içeren crRNA (yaklaşık 40 nt uzunluğunda) üretir. crRNA, bir kılavuz RNA (gRNA) oluşturmak için tracrRNA ile hibritleşir (Şekil 3.1). gRNA, Cas9 sistemini aktive eder ve Cas9'a bağlanır. gRNA'nın 5' ucundaki yirmi nükleotid, Cas9 nükleazını hedeflenen DNA ile tamamlayıcı baz çiftine yönlendirerek RNA-DNA tamamlayıcı baz eşleşmesine yol açar (Sander, 2014). Kesim için ön koşul, hedef DNA'nın downstream bölgesinde bir PAM motifinin varlığıdır; PAM motifi genellikle 5'-NGG-3' veya 5'-NAG-3' (Gasiunas, 2012; Hsu, 2013) içerir. Özgüllük, upstream bölgesinde bulunan yaklaşık 12 nükleotid "tohum dizisi" ile sağlanır. Bu prosedürü kullanarak Cas9 nükleaz aktivitesi herhangi bir DNA dizisine yönlendirilebilir (Sander, 2014). Cas9 sistemi, daha sonra NHEJ veya HDR tarafından tamiri gerçekleştirilen ÇZK'larını indükler (Sander, 2014). Bazı Cas9 varyantları, hedef DNA'nın tamamlayıcı veya tamamlayıcı olmayan zincirlerinin yalnızca bir bölgesinde (nickase) çentik ya da kesik oluşturur. Cas9 kesiği, azaltılmış NHEJ indel seviyeleri ile HDR'yi indükler (Cong, 2013; Mali, 2013). Bir Cas9 nükleazı çoklu gRNA kullanılarak, aynı anda birden fazla bölge hedefleyebilir ve değiştirebilir (Liu, 2014). Bu süreç, bir gRNA'nın hedeflenen bir genin bütünlüğünü bozmada yetersiz olduğu veya aynı anda birden fazla geni değiştirdiği durumlarda çok faydalıdır.

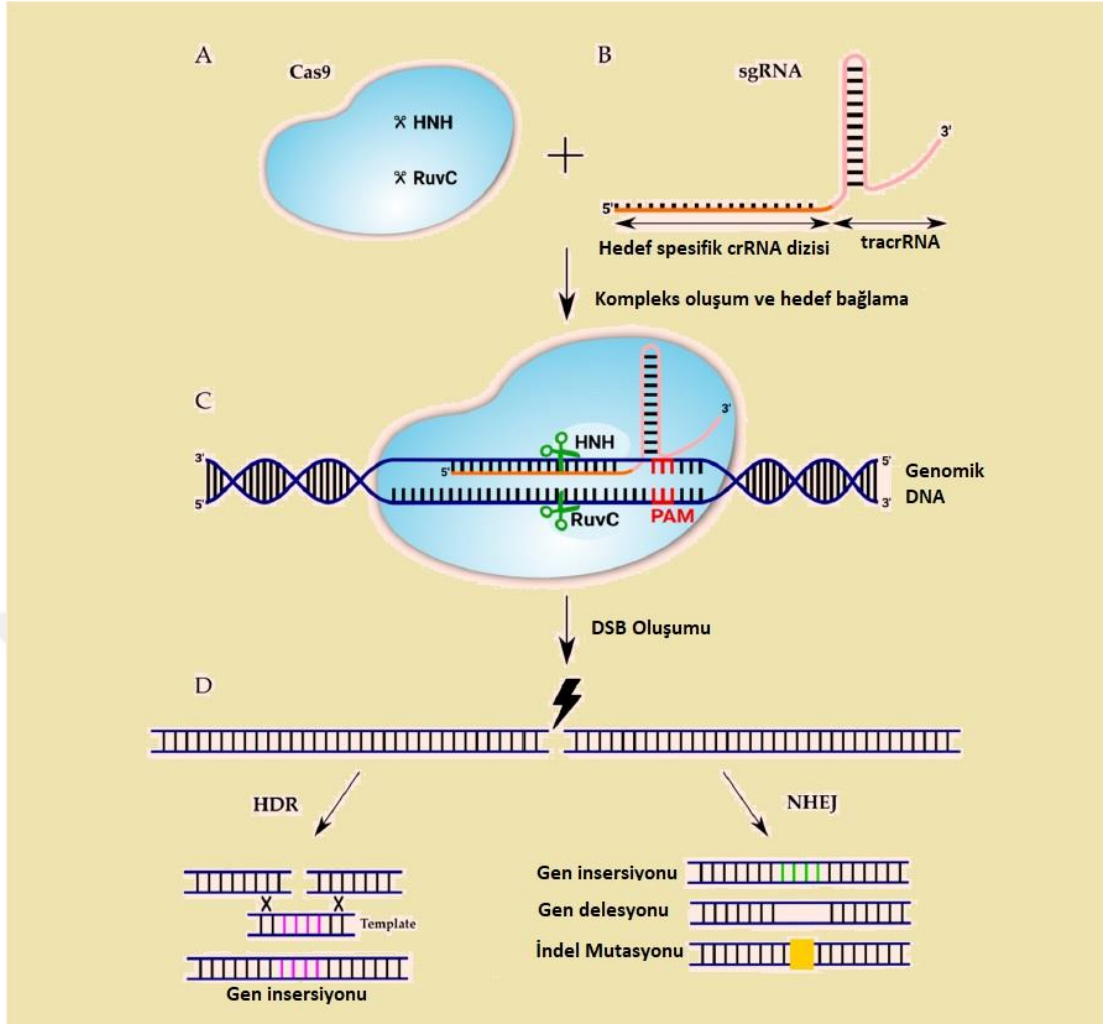
CRISPR/Cas9 teknolojisinin kullanışlılığı ve spesifikliğı ile ilgili en büyük eleştirilerden biri hedef dışı mutasyonlara neden olabilmesidir (Hsu, 2013; Bortesi, 2015). Bununla birlikte, bitkilerde hedef dışı mutasyonlar nadirdir. Çeltikte sadece %

1.6 hedef dışı etkiler tahmin edilmiştir (Xie, 2013). Yanlış eşleşme, PAM motifinin upstream bölgesinde mevcut olan konum 11 ile sınırlandırılmıştır. Ancak, *A. thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Triticum aestivum* ve *O. sativa*'da hedef dışı mutasyonlar gözlenmemiştir (Feng, 2014; Zhou, 2014).

Crispr/Cas9 sisteminin çalışmasını, 20 nt gRNA dizisinin özgülüğü belirlediği düşünülüyordu; fakat daha sonra hedef bölgelerin tanınması için gRNA'nın 3' ucunda sadece 8–12 nükleotidin gerekli olduğu (Jiang, 2013; Jinek, 2012) ve PAM motifinin düzenlenmesine bağlı olarak PAM motifine yönelik çoklu uyumsuzlukların tolere edilebileceği bulundu (Pattanayak, 2013; Fu, 2013). Karşılık gelen gRNA dizilerindeki çeşitli pozisyonlarda eksik bir baz (gRNA çıkıntısı) veya fazladan bir baz (DNA çıkıntısı) içeren DNA dizileri, hedef dışı kesimi uyarabilir (Lin, 2014). crRNA'daki tohum bölgesinin dışındaki bölgede CRISPR/Cas9'un özgülüğü, nokta mutasyonlarının olasılıklarını azaltan içsel özelliğe sahiptir (Semenova, 2011). Uygun gRNA tasarımı, genomun hedef dışı düzenlenmesinin azaltılmasını büyük ölçüde kolaylaştırabilir. CRISPR/Cas9'un hedef dizisiyle Watson-Crick baz eşleşmesi nedeniyle, dizi analizi kullanılarak hedef dışı bölgeler kolayca tahmin edilebilir (Cho, 2014). CRISPR/Cas9 sistemi, hedef dışı etkileri hızlı ve uygun maliyetli bir şekilde test etmek için yeniden programlanabilir. Hedef dışı kesim ile ilgili olarak, uyumsuzluklar (mismatch) tercihen 3' ucuna kıyasla gRNA'nın 5' ucunda tolere edilir (Sander, 2014). Bununla birlikte, 5' ucundaki bazı uyumsuzluklar (mismatch) önemli bir etkiye sahip olabilirken, 3' uçlar Cas9 aktivitesini etkilemez (Fu, 2013). gRNA'nın daha yüksek GC içeriği, DNA hibriti, gRNA'nın DNA'ya bağlanmasını stabilize eder ve bu nedenle hedef dışı mutasyon olasılığı çok düşüktür. %30'un altındaki GC içeriği, yüksek hedef dışı mutajenez oranlarına yol açabilir (Pattanayak, 2013; Fu, 2013). gRNA ve Cas9 konsantrasyonunun azaltılması, hedef dışı mutasyonları azaltabilir (Sander, 2014). Bununla birlikte birkaç çalışmada hedef bölgenin mutasyonunda azalma da gözlenmiştir (Fu, 2013). 3' uçları kesilmiş (tracr türevli diziler içinde) veya 5' ucuna (tamamlayıcı bölgeden önce) eklenmiş iki guanin nükleotidi olan modifiye edilmiş gRNA, azaltılmış genom düzenleme verimlilikleri ile daha iyi hedef ve hedef dışı mutasyon oranlarına yol açar (Sander, 2014). Eşleştirilmiş bir çentik stratejisi kullanılarak, off-target bölgelerde oluşturulan çentikleri gRNA ve Cas9 kullanılarak hedef bölgede oluşturulabilir. Cas9 tarafından oluşturulan çentik kesimi, DNA'nın karşı zincirinde 4 ila 100 bp ile ayrılmış bölgeleri hedefler ve tek zincirli DNA

oligonükleotid donörleri ile indel mutasyonlarını ve HDR'yi uyarabilir (Sander, 2014). İkinci bir gRNA'nın eklenmesi ve Cas9 nükleazının Cas9 nickase ile değiştirilmesi hedef dışı mutasyonların daha düşük seviye de gerçekleşmesine neden olur (Sander, 2014). Tek bir monomerik Cas9 nickase, genomik lokuslarda indel mutasyonlarını indükleyebilir (Ran, 2013; Fu, 2014; Mali, 2013). Fakat kullanılan gRNA türü, genom düzenlemede yüksek verimlilik elde etmek için en önemli faktörlerden biridir. 3' ucuna doğru değişken uzunluklarda tracrRNA dizileri barındıran daha uzun tek gRNA, daha kısa gRNA'ya göre daha yüksek düzenleme frekansları sergiler (Hsu, 2013). Yapılan bir çalışmada hedef dışı etkilerin, 5' uçlarından kesilen kısa gRNA dizilerinin kullanılmasıyla büyük ölçüde azaltılabileceğini bildirmiştir (Fu, 2014). Bununla birlikte, 3' uçlarına doğru daha fazla tracrRNA'ya sahip daha uzun gRNA, daha kısa gRNA dizileri ile karşılaştırıldığında daha yüksek düzenleme frekansları sağlar (Hsu, 2013). En sık kullanılan ve 3' uçlarında tracrRNA sekansı içeren gRNA tasarımı, yaklaşık 100 nükleotide sahiptir (Sander, 2014). Hedef bölgelerin seçeneklerini sınırlayabileceğinden dolayı, gRNA'yı ifade etmek için kullanılan promotörlerin rolü çok önemlidir. Ubiquitin (UBI), U3 ve U6 promotörleri, diğer promotörlere kıyasla yüksek mutasyon frekansları gösterir (Miao, 2013; Gao, 2015).

Belirli bir gen ve türde CRISPR/Cas9 genom düzenleme sisteminin başarısını arttırmak için, hesaplama modelleri genom düzenleme için uygun gRNA hassas bir şekilde tasarlanabilir ve hedef dışı bölgeler tahmin edilebilir. Hedef dışı bölgelerin genom çapında in-siliko tahmini için nötral bir yöntem kullanılır (Lindsay, 2014). spCas9 PAM varyantı D1135E, 5'-NGG PAM için özgüllüğü artıran tek nokta mutasyonu içerir (Kleinstiver, 2015.) Bu varyant, 5' -NAG ve 5' -NGA PAM dizilerinde düzenlemeyi önemli ölçüde azaltmış ve genom çapında özgüllüğü iyileştirmiştir (Kleinstiver, 2015). Benzer şekilde, dört mutasyonlu spCas9-HF, Cas9'un hedef DNA'ya bağlanmasını zayıflatır ve Cas9 aktivasyonu için gRNA: DNA komplementerliğinin sıklığını artırır. Bu varyasyon kullanılarak hedef dışı düzenleme neredeyse tamamen önlenmiştir (Kleinstiver, 2016).



Şekil 3.1. CRISPR genom düzenleme sisteminin temel işleyişi

Genom düzenlemeye ek olarak, CRISPR/Cas9 sistemi, gen ifadesinin ektopik düzenlenmesi için de kullanılabilir. Gen ifadesinin düzenlenmesi yoluyla, bir genin işlevi öğrenilebilir ve ayrıca sentetik biyoloji için yeni genetik düzenleyici devreler tasarlanabilir (Bortesi, 2015). Gen ifadesinin düzenlenmesine, uyarılabilir veya baskılanabilir promotörler aracılık eder ve işlevsizleştirilmiş nükleazlar, gen ekspresyonunu düzenlemek için kullanılabilir (Bortesi, 2015). Katalitik olarak aktif olmayan/ölü Cas9 (dCas9) DNA'yı kesemez ancak gRNA yoluyla hedef bölgelere bağlanabilir. dCas9'un transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon veya baskılama domainleri ile bir füzyon proteini olarak ekspresyonu, hedef genlerin tersine çevrilebilir transkripsiyonel kontrolüne yol açabilmektedir (Gilbert, 2013). dCas9'un, TAL aktivasyon domainini içeren *PDS*'in C-terminal EDLL domaini ile füzyonu, transkripsiyonel aktivatörlerin oluşturulmasını sağlamaktadır (Maeder, 2013). Benzer şekilde, dCas9'un *ERF* transkripsiyon faktörünün SRDX domaini ile füzyonu bir

baskılayıcı sistem oluşturur (Bortesi, 2015). Transkripsiyonel aktiviteler, transkripsiyon başlangıç bölgesine göre gRNA'nın pozisyonundan etkilenir (Bortesi, 2015). Efektör domaini olmayan dCas9, transkripsiyonun başlama ve uzamasını inhibe ederek sentetik ve endojen genleri baskılar. dCas9 sistemi, kontrol edilebilir bir ekspresyon sistemi olmayan türlere uygulanabilir. Gen ekspresyonunun transkripsiyonel kontrolüne sahip olmak için aynı veya farklı promotörler çoklu gRNA'lar tarafından hedeflenebilir (Bikard, 2013; Piatek, 2015- Qi, 2013). Ortogonal Cas9 proteinleri, aynı hücrede eşzamanlı ve bağımsız olarak hedeflenen genlerin düzenlenmesine aracılık eder (Esvelt, 2013). dCas9, hedeflenen genomik bölgeye belirli materyalleri aktarmak için kullanılabilir (Bortesi, 2015). Floresan proteinlerle kaynaşmış dCas9, kromozom yapısı ve dinamikleri hakkında bilgi edinebileceğimiz canlı hücrelerin spesifik genomik lokuslarını görselleştirmede kullanılabilir (Anton, 2014). Benzer bir yaklaşım, histon modifikasyonlarını ve DNA metilasyonunu hedeflemek ve epigenomların düzenlenmesinde kullanılabilir (Maeder, 2013).

3.2. CRISPR/Cas Sisteminin Sınıflandırması

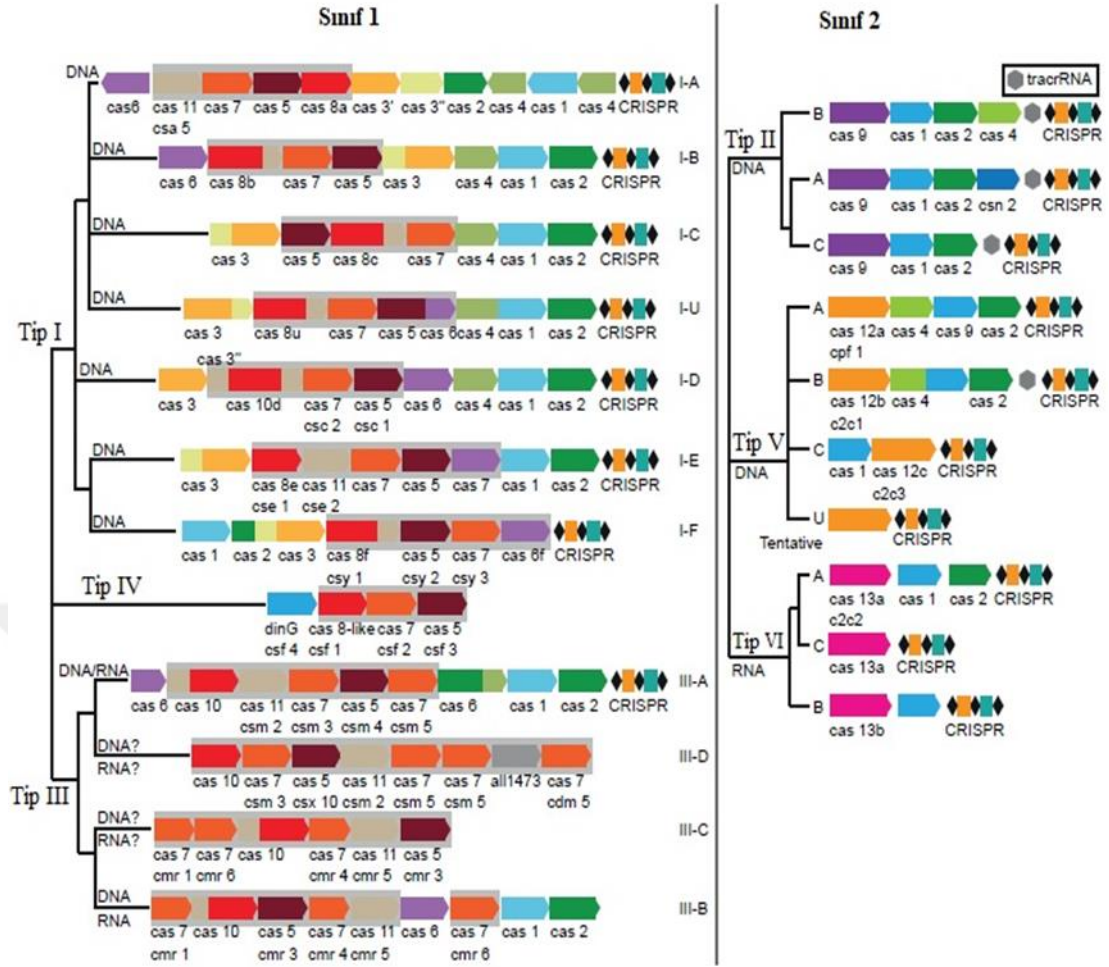
CRISPR Cas sistemleri, altı tip ve 33 alt tip olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. Genel sınıflandırmalar ve özellikler Şekil 3.2'de özetlenmiştir. CRISPR Cas sistem sınıfı 1, multiprotein efektör kompleksleri içerir. Sınıf 2 ise çok domainli ve çok işlevli bir efektör protein ailesini içerir (Jinek, 2013). Bu sınıfların her biri üç türe ayrılmıştır. 1. Sınıfta I, III ve IV tipleri, 2. Sınıfta ise II, V ve VI tipleri bulunmaktadır.

Tüm tipler, benzersiz proteinleri içeren efektör modüllerinin farklı mimarileriyle ayırt edilirler. Her tip ayrıca lokus organizasyonundaki ince farklılıklar ile karakterize edilen ve alt tipe özgü Cas proteinlerini kodlayan çok sayıda alt tipte sınıflandırılır (Haft, 2005; Shmakov, 2017). CRISPR/Cas sistemlerinin tipini ve alt tipini tanımlayan birincil özellikler, genetik ve fonksiyonel olarak çeşitli olan cas genleri ve kodladıkları proteinlerdir. Bu, CRISPR aracılı bağışıklığın çeşitli adımlarında gerçekleştirdikleri biyokimyasal işlevlerin sayısını gösterir. RNA tanıma motifi (RRM), çok sayıda Cas proteininde yaygındır ve Cas protein ailelerinin çoğu, nükleik asitler, helikaz ve nükleaz motifleri ile etkileşime giren fonksiyonel domainler içerir (Makarova, 2013; Makarova, 2011). Genetik olarak, cas1 ve cas2 yaygın olarak farklı tip ve alt tiplerde bulunurken, cas3, cas9 ve cas10 sırasıyla tip I, II ve III grubunda yer almıştır (Barrangou, 2013).

CRISPR Cas bağışıklık tepkisi adaptasyon, ifade ve müdahale olmak üzere üç

adımdan oluşur. Adaptasyon adımı, bir Cas protein kompleksi kısa bir protospacer bitişik motif (PAM) ile karşılaşır, istilacı bir DNA molekülüne bağlanır ve içinde iki çift zincirin kopmasına neden olur. İstilacı fajların veya plazmitlerin (protospacer olarak adlandırılır) salınan kısa DNA fragmanı, CRISPR dizisinin iki tekrarı arasında yerleşir ve bir aralayıcı olur. Ekspresyon aşamasında, cas genlerinin ekspresyonu ve CRISPR'nin uzun bir prekürsör CRISPR RNA'ya (pre-crRNA) transkripsiyonu gerçekleşir. Cas proteinleri ve aksesuar faktörleri, pre-crRNA'yı kısa olgun crRNA'ya işler. İnterferans adımı, crRNA ve Cas proteinlerinin birleşik etkisi, yabancı nükleik asidin kesilmesine aracılık eder ve sonuç olarak konakçı hücreleri enfeksiyondan korur (Barrangou, 2007; Makarova, 2006). CRISPR sistemlerinin her birinde ifade ve müdahale aşamaları farklıdır. Tip I'de Cas6e/Cas6f, çift sarmallı RNA (dsRNA) ile saç tokası halkaları tarafından oluşturulmuş tek sarmallı RNA'nın (ssRNA) birleşim yerinden kesilmesini sağlar. Tip II sistemde, işlem yapan crRNA'lar (tracrRNA'lar), Cas9 ve RNase III tarafından kesilen dsRNA'yı oluşturmak için yer alır. Tip III'te, kesim için doğrudan bir Cas6 homologu kullanılır ve saç tokası ilmekleri gerekli değildir (Jinek, 2012; Makarova, 2015). CRISPR hem plazmid hem de kromozomal DNA üzerinde bulunabilir. Aralayıcıların uzunlukları ve tekrarların uzunlukları ve dizileri bir CRISPR lokusu içinde iyi korunur. Ancak aynı veya diğer genomlardaki CRISPR'ler arasında farklılık gösterebilirler. CRISPR tekrarları farklılık gösterebilir (23-55 nt), ancak tekrarlar tipik olarak 28-37 nt uzunluklara sahiptir ve her biri saç tokası yapıları oluşturabilen palindromik bir dizi içerir. Benzer şekilde, aralayıcılar büyük ölçüde değişebilir (21-72 nt), ancak tipik uzunlukları 32-38 nt'dir (Grissa, 2007). Yukarıda bahsedildiği gibi, çok sayıda Cas proteini nükleik asitlere bağlanarak CRISPR sistemini genom mühendisliği için bir araç haline getirir. Cas proteinleri arasında, Cas 9, genomik düzenleme için en yaygın olarak kullanılandır (Mir, 2018). Cas9 iki nükleaz domaininden oluşur. Bunlar DNA'nın hedef zincirini parçalayan bir *HNH* nükleazı ve *RuvC-I*, *RuvC-II* ve *RuvC-III* alt domainlere ayrılan ve hedef olmayan zinciri ayıran *RuvC* benzeri nükleazlardır. Cas9, iki RNA ile bir ribonükleoprotein kompleksi oluşturur. Yabancı DNA'yı tanıyan crRNA ve tracrRNA ile hibridize olan ve tip II için ayırt edici olan tracrRNA'dır. Etkili genomik düzenleme için, crRNA ve tracrRNA, kimerik bir tek kılavuzlu RNA'ya (sgRNA) kaynaştırılmaktadır (Jinek, 2012; Gasiunas, 2012). sgRNA iki kısımdan oluşur. Bunlar Cas9 bağlanması ve 5'-ucu için bir omurga sistemi oluşturan sabit bir kısım ve hedef DNA dizisine tamamlayıcı olan 20 nt kısımlardır.

DNA'daki hedef bölge ayrıca iki parça içerir. Bunlar sgRNA'daki 5'-ucu ve 20 nt dizisini tamamlayan protospacer ve protospacer'a doğrudan bitişik olan Cas9 tarafından bağlanan kısa bir PAM dizisidir. sgRNA, genomdaki belirli bir diziyi tanır ve Cas9, DNA dizisini kesmek için bir çift makas görevi görür. Cas9, bir PAM olmadığında diziyi kesemeyecektir. Farklı bakteri tip II CRISPR sistemleri, farklı Cas9 proteinlerine sahiptir. En yaygın olarak kullanılan Cas9, *Streptococcus pyogenes*'ten (SpCas9) uyarlanmıştır ve hedef olmayan DNA zincirindeki 5' -NGG-3' dizisini PAM olarak tanımlar (Cong, 2015; Hirano, 2016). Protospacer'ı 5'-uç 20 nt dizisi ile eşleştirmenin ve Cas9'u PAM'a bağlanmasının sonucu olarak, DNA onarımını tetikleyen bir ÇZK oluşur (Song, 2017). Ökaryotlarda iki ana endojen onarım mekanizması vardır. NHEJ mekanizmasında, protein faktörleri DNA zincirlerine nükleotid delesyonları veya insersiyonları dahil ederek yeniden birleşir. Bununla birlikte bu onarım mekanizması hataya açık bir süreçtir. Dahası, NHEJ hedeflenen gende çerçeve kayması mutasyonları oluşturabilir ve onu bozabilir (Lino, 2018; Musunuru, 2017; Román-Rodríguez, 2019). NHEJ, hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında ortaya çıkabilir. Aksine, HDR oluşumu, kardeş kromatidlerin mevcut olduğu ve onarım şablonu olarak hizmet edebileceği geç S veya G2 fazı ile sınırlıdır. HDR mekanizması, iki DSB veya DSB bölgesi arasında eklemeler ve baz ikameleri ile sonuçlanır. Fakat bu kardeş kromatitlerden veya yabancı DNA'dan gelen homolog donör DNA dizilerinin varlığını gerektirir (Lin, 2014; Brnzei, 2008).



Şekil 3.2. Bilinen CRISPR-Cas sistemlerine genel bakış. (Makarova vd, 2017a) 'den uyarlanmıştır. Tipik operon organizasyonunu gösteren, şu anda tanımlanmış tüm CRISPR-Cas sistemlerinin genomik lokusların şematik gösterimi

3.3. CRISPR/Cas9 Sisteminin Fonksiyonları

Günümüzde, bitki genom düzenleme aracı olan CRISPR/Cas9 sisteminin uygulamaları, esas olarak gen fonksiyon araştırmalarına ve tarım ürünlerinin genetik olarak iyileştirilmesine odaklanmaktadır. CRISPR/Cas9, gen nakavtı, knock-in veya baz değiştirme, baz düzenleme, birincil düzenleme ve ekspresyonu düzenleme gibi çeşitli yeteneklere sahiptir.

3.3.1. Gen Nakavtı

Gen nakavtı, CRISPR/Cas9 sisteminin bitki fonksiyonel genom araştırmalarında tek ve multipleks gen nakavtı olmak üzere iki en kapsamlı uygulamasıdır. sgRNA'nın rehberliğinde Cas9 nükleazı, çift zincir kırıklarını (DSB) oluşturmak için genin ekson

bölgesindeki hedef DNA segmentini keser. Tercih edilen NHEJ onarım yolağı, kesim bölgesinin yakınında bir veya birkaç bazın eklenmesi veya silinmesini üretmeye eğilimlidir (Feng, 2014; Ma, 2015). İnsersiyonlar ya da delesyonlar sonucunda çerçeve kayması mutasyonu meydana gelir ve hedef protein doğru şekilde kodlanamaz. Düzenlenmiş hücre dizilerindeki küçük insersiyon veya delesyonların, anormal transkriptler veya proteinler üretebileceğini ve fonksiyonel analizi karmaşıklaştıran beklenmedik etkilere neden olabileceği görülebilmektedir (Tuladhar, 2019).

CRISPR/Cas9 aracılı gen nakavtının yüksek verimliliğine dayanan multipleks gen nakavt teknolojisi, gen ailelerinin fonksiyonel olarak analiz edilmesi, karmaşık agronomik özellikler için çoklu genlerin düzenlenmesinin aydınlatılması ve bitkilerde sinyal yollarının analiz edilmesi için büyük kolaylık sağlamıştır. Farklı genler için farklı hedeflere sahip çoklu sgRNA'lar, transformasyon için bir ekspresyon kasetine yerleştirilip birleştirilebilir. Örneğin, bir grup araştırmacı tarafından sekiz agronomik geni aynı anda hedeflemek için bir CRISPR/Cas9 vektörü oluşturulmuştur. Tüm düzenlenen genler, T0 neslinde yüksek mutasyon verimliliğine sahip olmuş ve sekiz gende hem heterozigot hem de homozigot genotipler elde edilmiştir (Wang, 2015; Shen, 2017). Buğdayda, polisistronik tRNA stratejisini kullanan Luo'nun grubu, multipleks genleri aynı anda düzenleyebilen verimli bir CRISPR-Cas9 multiplex sistemi kurmuştur. 1 yıl içinde 15 genomik lokusa kadar mutajenezi hedeflemeyi, transgenik olmayan bitkileri restore etmeyi ve elit bir buğday çeşidinde uygun alelleri toplamayı başarmışlardır (Luo, 2021). Homolog genler veya gen ailelerinde, korunan diziyi hedefleyen bir sgRNA da iyi sonuçlar elde edebilmektedir (Li, 2018b; Sánchez-León, 2018).

3.3.2. Gen Nükleotid Dizisi Yerleştirme

Önemli olarak, bazı yerel germplazmlarda veya ilgili türlerde hala birçok faydalı allel vardır. HDR yolağı ile endojen genlerin veya DNA parçalarının değiştirilmesi, bitki ıslahında ve özelliklerinin iyileştirmesinde faydalı bir rol oynamaktadır. HDR aracılı düzenleme, hedeflenen gen değiştirmeyi ve yerel ya da ilgili türlerden elit alellerin herhangi bir bağlantı sürüklenmesi olmadan birkaç nesil içinde ticari çeşitlere doğrudan aktarılmasını sağlayan güçlü bir genom düzenleme aracıdır. Günümüzde, birçok bitkide gen parçalarının yerleştirilmesi veya değiştirilmesi sağlanmıştır (Luo, 2016; Begemann, 2017; Shi, 2017; Li, 2019). Ancak, düzenleme verimliliği çok düşüktür. Bitkilerde HDR aracılı genom düzenlemeyi gerçekleştirmenin dört ana

zorluğu vardır. Bunlardan ilki HDR, DSB'lerin onarımı için NHEJ ile sürekli rekabet halindedir, ancak NHEJ, DSB onarımının ana yoludur (Shi, 2017). İkincisi, HDR yalnızca geç S ve G2 evrelerinde etkinken, NHEJ mitoz dışında tüm hücre döngüsü boyunca etkindir (Truong, 2013; Orthwein, 2014). Üçüncüsü, HDR için donör onarım şablonunu, çekirdeğe veya hücrelere iletmek zor ve sınırlıdır. Sonuncusu ise hedef genlerde DSB'lerin indüksiyonu ve donör onarım şablonu iletiminin zamanlamasını koordine etmek zordur (Wang, 2017; Li ve Xia, 2020).

Genom düzenlemeyi daha verimli hale getirmek için bitkilerde çeşitli stratejiler denenmiştir. Bunlardan ilki, bombardıman aktarım yöntemi veya geminivirüs replikonlarını (GVR) kullanarak donör onarım şablonu (DRT) miktarını artırmak olmuştur (Sun, 2016; Dong, 2020). Başka bir stratejide yumurta hücresi veya erken embriyoya özgü gen promotörü gibi spesifik promotörler kullanılarak Cas9 frekansının iyileştirilmesi sağlanmıştır. Son olarak ise tüm bileşenleri içeren hepsi bir arada vektörü kullanarak Cas proteini, iki tek kılavuzlu RNA (sgRNA'lar) ve DRT'nin iletimi koordine edilmiştir (Peng, 2019). Bu çabalara rağmen, HDR frekansını daha da iyileştirmek ve bitki hücrelerine yeterli DRT sağlamak hala zor olmaya devam etmektedir.

3.3.3. Baz Düzenleme

Tek nükleotid nokta (SNP) mutasyonları, bireyler arasındaki fenotipik çeşitliliği artırmanın genetik temelidir. Baz düzenleme, tek bir bazın hedef DNA fragmanında belirli bir pozisyonda değiştirilmesini ifade eder. Bu teknoloji hem NHEJ'in rastgeleliğinden hem de HDR'nin düşük verimliliğinden kaçınmak için DNA çift zincir kırıklarının oluşturulmasına bağlı değildir. Baz düzenleyiciler, deaminaz gibi tasarlanmış bir baz modifikasyon enziminin *Streptococcus pyogenes* Cas9'un (dCas9) katalitik olarak ölü versiyonuyla veya Cas9'un (nCAs9) (D10A) çentik oluşturan versiyonunun birleştirilmesiyle oluşturulur ve güncel olarak sitozin baz düzenleyicilerini (CBEs) ve adenin baz düzenleyicilerini (ABEs) içermektedir. CBE'ler, hedef sitozini urasile dönüştürmek için doğal olarak oluşan bir sitidin deaminaz kullanır, bu da C•G'den T•A'ya dönüşümü katalize eder (Komor, 2016). ABE'ler ise teorik olarak A•T'den G•C mutasyonunu düzeltecektir (Gaudelli, 2017). CBE ve ABE sistemleri, dört tip baz dönüşümünü gerçekleştirmek için tek baz düzenlemesine olanak tanır ve tarımsal bitkilerde başarıyla kullanılmıştır (Bharat, 2020). Son zamanlarda, baz düzenleme teknolojisi kullanılarak bitki genine yönelik

evrim çalışmasında bazı ilerlemeler kaydedilmiştir. Neredeyse PAM kısıtlaması olmadan C'den T'ye mutasyonu elde etmek için bir dizi yüksek verimli baz düzenleme araçları geliştirilmiştir. Böylece A'dan G'ye mutasyon kapsamı çeltikte büyük ölçüde genişletilmiştir (Zhang, 2021).

3.3.4. Ekspresyonun Düzenlenmesi

CRISPR/Cas9'un en sık uygulaması, kodlama dizilerini hedefleyerek boş aleller oluşturmak olsa da kodlama bölgelerindeki fonksiyon kaybı mutasyonları, pleiotropik veya zararlı etkilere neden olabilmektedir (Hendelman, 2021). Hem hayvanlarda hem de bitkilerde yapılan çok sayıda araştırma, evrimi, kültüre almayı ve üremeyi yönlendiren birçok genetik değişikliğin, genlerin upstream, intron ve downstream bölgelerinde meydana geldiğini ortaya çıkarmıştır (Wang, 2014; Ding, 2021). Kodlama bölgesinde oluşturulan mutasyonlar ile karşılaştırıldığında, cis bölgelerde genom düzenlemenin gen ekspresyonunun seviyesini ve zamanlamasını değiştirerek küçük fenotipik değişiklikleri indüklemeye olasılığı daha yüksek olduğu görülmüştür (Ding, 2021).

Bugüne kadar, bitkilerin genom düzenlemesinde gen ekspresyonunun değiştirilmesi, esas olarak hedef genlerin promotör bölgesindeki cis regülatör elementleri (CRE) düzenlemeye veya doğrudan silmeye odaklanmıştır. Örneğin, yapılan bir çalışmada multipleks bir CRISPR/Cas9 promotör hedefleme yaklaşımı kullanarak meyve boyutunu, çiçek dallanmasını ve bitki mimarisini kontrol eden genlerin promotörlerini düzenlemiştir (Rodríguez-Leal, 2017). Bu yaklaşımla, domateslerde yapay QTL varyasyonu, meyve boyutunun artışı ve diğer önemli tarımsal özellikler elde edilmiştir. Başka bir çalışmada, embriyo ve çiçeklenme gelişiminde türe özgü bir rol oynayan domates *WUSCHEL HOMEODOMAIN 9* (*WOX9*) geninde kapsamlı bir allelik seri oluşturmak için bir cis düzenleme sistemi kullanmıştır (Hendelman, 2021). Bu araştırma, domates *WOX9* geninin promotör bölgesinin farklı yerlerinde cis-dizi elementleri tarafından düzenlenen bir pleiotropik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir.

Çoğu durumda, önemli özellikleri düzenleyen birçok gen, üründe iyileşme sağlamak için fonksiyon kaybı veya azalmasından ziyade yüksek oranda translasyon gerektirir (Xu, 2017; Reis, 2020). Upstream açık okuma çerçeveleri (uORF'ler), ökaryotik mRNA'ların 5' önde gelen dizisindeki önemli cis düzenleyici unsurlardır ve genellikle downstream ORF'lerin ribozom durması yoluyla translasyon başlangıcını

inhibe etmektedir (Zhang, 2020; Kurihara, 2020). Upstream açık okuma çerçevelerini düzenleyerek çeviriye ince ayar yapmak, bitkilerin özelliklerinin iyileştirilmesi için hedef genlerin translasyon verimliliğini etkili bir şekilde artırmıştır. Örneğin, *LsGGP2*'nin upstream açık okuma çerçevesinin düzenlenmesi, oksidatif stres toleransını ve marulun askorbat içeriğini ~ %150 artırmıştır (Zhang, 2018). *Arabidopsis thaliana*'da, *PHO1* geninin upstream açık okuma çerçevesinin silinmesi sürgünün İnorganik ortofosfat içeriğini artırmış ve düşük harici İnorganik ortofosfat kaynağı altında sürgün büyümesini iyileştirmiştir (Reis, 2020).

3.3.5. Genom Düzenlenmiş Bitkilerde Mutant Tarama Stratejileri

Bilinen bir genomu düzenlenmiş DNA dizisini analiz etmek için uygulanan en yaygın yöntem PCR'dir. Düzenleme yapılmış lokusun hedef DNA dizisinin bilgisini gerektirir. Transgenik yapıların ve klasik GDO'ların saptanması için çok sayıda standartlaştırılmış referans PCR yöntemi mevcuttur ve genomu düzenlenmiş bitkilere uyarlanabilmektedir. (Broccanello, 2018; Du, 2017).

Geçmişte, PCR yöntemleri geleneksel olarak, istenen sonucun basit bir varlık/yokluk ve sonuçların rutin olarak jel elektroforezi ile görselleştirilmesi şeklindeydi (Lipp, 2005). PCR, çok çeşitli insersiyon ve delesyon boyutları ile düşük maliyet ve kullanım kolaylığı için uygun bir seçimdir. Son nokta floresan reaksiyonu (örneğin T7E1, Surveyor, RFLP, CAPS) veya amplifikasyon eğrisinin izlendiği kantitatif bir yaklaşım olarak uygulanabilir. Bunlar, mutanti wild type hücrelerden ayırt ederek kılavuz RNA etkinliğini aydınlatma yeteneği sunar (Zischewski, 2017; Lomov, 2019). Kapiler PCR fragment boyutu analizi, birkaç baz çifti kadar küçük farklılıkları tespit etmek için de kullanılabilir. Düzenlemenin boyutuna bağlı olarak, PCR'ı poliakrilamid veya agaroz jel bazlı görselleştirme takip edebilir. Bant yoğunlukları, mutasyona uğramış hücrelerin mutasyona uğramamış hücrelere oranı hakkında bilgi sağlayabilir (Lomov, 2019).

PCR yöntemlerinin geliştirilmesi, amplifiye edilecek bölge etrafındaki nükleotid dizisi hakkında önceden bilgi sahibi olmayı gerektirir. Düzenlenen bölgedeki dizi, düzenleme sürecinde kullanılan kılavuz RNA'ların tasarımı için gerekli olduğundan zaten bilinmektedir. Bununla birlikte genom düzenlemede PCR en ince ayrıntıya kadar bir bilgi sunmamaktadır. Bir popülasyonda amaçlanan düzenleme oluşturulduktan sonra, yüksek verimli ve daha hassas PCR yöntemlerine ya da dizilemeye geçiş

yapılabilir.

Günümüzde mutasyonların tespitinde en çok kullanılan diğer teknik dizilemedir. Yeni ve üçüncü nesil dizileme teknolojilerindeki hızlı gelişmeler, dizilemenin DNA değişikliklerinin tespiti için güçlü bir araç olarak ortaya çıkmasına yol açmıştır. Hedef zenginleştirme, kütüphane hazırlama ve biyoinformatik analiz araçlarına yönelik yöntemlerdeki en son gelişmeler, değişken saptama doğruluğunun artması, daha yüksek verim ve daha hızlı geri dönüş süreleri ile sonuçlanmıştır (Salk, 2018).

Dizi varyantlarını tespit etmek için yeni nesil dizileme uygulamaları, tam genom dizileme, tam ekzom dizileme ve hedefli dizilemeyi kapsar. Hedef bazlı dizileme, azaltılmış maliyet ve veri kümesi boyutu ile daha yüksek okuma kapsamına izin veren ilgili genler veya hedefler kümesine odaklanır. Ayrıca, kapsama derinliğini etkilemeden tek bir dizileme çalışmasında daha fazla sayıda bitki bir araya getirilebilir.

Hedef bazlı dizileme, PCR tabanlı hedef amplifikasyonu veya biyotinlenmiş hibridizasyon problemleri kullanılarak hedef yakalama olmak üzere iki ana yaklaşımdan oluşur (Bewicke-Copley, 2019). Amplikon tabanlı dizileme, genellikle daha küçük hedef bölgeler ve daha yüksek hedef okuma yüzdesi ile iki yöntemin en verimlisidir. Hibrit yakalama dizilemesi ise tipik olarak daha büyük hedef bölgelerin daha tekdüze kapsamı ile sonuçlanmaktadır. Her ikisi de genom düzenlemelerinin doğru tespiti için güçlü yaklaşımlardır. Birçok örnekte paralel olarak birden fazla hedef bölge değerlendirilebilir.

Genel olarak, genom düzenlemelerinin tespiti için bir dizileme yaklaşımının kullanılması, PCR tabanlı yaklaşımlara kıyasla daha yüksek maliyete sahiptir. Bu nedenle, teknik sınırlamalar nedeniyle PCR yoluyla algılama geliştirilemediğinde veya yüksek verimli analiz durumlarında, tipik olarak dizileme yaklaşımı kullanılır. İki lokusa özgü primer kullanan geleneksel amplikon bazlı sekanslama, tek baz çifti varyantlarının veya daha küçük indellerin karakterizasyonu için uygundur. Bununla birlikte, daha büyük indeller ve translokasyonlar durumunda uygulanması kısıtlıdır. Ligasyon aracılı PCR'ye dayanan daha yeni tek primer teknolojileri bu sınırlamaları azaltmıştır (Zheng, 2014). Kısa okuma teknolojisi kullanılarak amplikon tabanlı dizileme için yaklaşık 600 bp'ne kadar olan amplikonlar hedeflenmektedir. Hibrit yakalama durumunda daha da büyük alanlar hedeflenebildiğinden, PCR veya dijital PCR (dPCR) yöntemleri için primer tasarımı karmaşık olduğunda hedef zenginleştirme yaklaşımları uygulanabilmektedir. PCR veya dPCR'ye göre karmaşık

primer tasarımının nedenleri, amplikon boyutunun üst sınırı ve düzenlemeyi çevreleyen diziler ile ilgilidir. Elverişsiz G-C içeriği, tekrarlayan dizi veya belirli haplotiplerdeki özellikle ilgili olmayan polimorfizmlerin varlığı, PCR tabanlı saptama yöntemlerinin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Yüksek oranda tekrarlanan bölgelerde hedeflenen genom düzenlemeleri için, gerekli özgüllük düzeyine izin veren uzun okuma dizileme platformları kullanılarak uzun parçalar yakalanıp dizilenebilmektedir.

3.4. Domates Islahında CRISPR/Cas Uygulamaları

Domates ve 12 yabani akrabası, batı ve orta Güney Amerika'ya özgüdür ve çeşitli habitatlarda yaygındır. Ayrıca yüksek genetik değişkenliğe katkıda bulunur. Domateslerin kültüre alınma sırasında, fizyolojik ve genetik olarak dünya çapında yoğun geliştirmeye tabi tutulmuştur. Sonuç olarak, *Solanum lycopersicum*'un tek türünden morfolojik olarak farklı birçok çeşit geliştirilmiştir. Ne yazık ki, yabani domateslerde bulunan biyotik ve abiyotik faktörlere direnç gibi bazı önemli özellikler kültüre alınma sırasında kaybedilmiştir. Sonuç olarak, geleneksel ıslah, sağlık ve genetik çeşitlilik kaybının eşlik ettiği gelişmiş özelliklerle sonuçlanmıştır. Ancak kaybolan bu özelliklerin kazanımı için kullanılan geri çaprazlamalar oldukça zaman alıcı ve zahmetli bir iştir (Meyer, 2013). Genomikteki teknolojik ilerlemeler, son yirmi yılda tarım ürünlerinde uygulanan genetik mühendisliği uygulamalarını geliştirmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi olarak da adlandırılan genetik mühendisliği, istenen genin bir türden diğerine transferini içerir, böylece tarım ürünlerinin iyileştirilmesi şansını arttırır (Parmar, 2017). Bu teknoloji kullanılarak geliştirilen transgenik bitkiler, genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO'lar) olarak adlandırılır. Bununla birlikte, GDO'ların düzenleyici onayı, maliyetli ve genellikle geciktiği için büyük bir dezavantajdır (Bawa, 2013).

Son zamanlardaki çabalar, direnç özelliklerinin yeniden ortaya çıkmasına izin veren yerel türlerin ve yabani türlerin korunmasını sağlamıştır (Gascuel, 2017). Ayrıca, yapay mutajenez, ıslahçılara, daraltılmış genetik tabanın genişletilmesine yardımcı olan yeni genetik ve fenotipik çeşitlilik içeren genotipler sunmaktadır (Just, 2013; Menda, 2004). Ayrıca mutant koleksiyonları, domatestede özelliklerin keşfi için tamamlayıcı bir alternatif sağlar (Rothan, 2019). Son on yılda, mutant koleksiyonları oluşturmak için çeşitli domates çeşitleri kullanılmıştır (Meissner, 2000; Ariizumi, 2014).

Modern genetik ve ıslah yöntemleri, domates genomlarının yapısal ve fonksiyonel yönlerinin anlaşılmasına ve geliştirilmesine katkıda bulunmuştur (Rothan, 2019). Domateste, nicel özellik lokusları (QTL) haritalaması, ısı ve tuz toleransı (Bai, 2018; Wen, 2019) ve meyve (Causse, 2004; Stevens, 2008) ile ilişkili genlerin haritalanmasına yardımcı olmuştur. Ayrıca, genom çapında ilişkilendirme çalışması (GWAS), bitki mimarisi, meyve şekli ve domateste meyve ağırlığı (Bauchet, 2017; Tieman, 2017) ve meyve metabolitleri (Sauvage, 2014; Zhao, 2019) gibi özelliklerle ilgili bölgeleri haritalamak için kullanılmıştır. GWAS ayrıca domateste kuraklık ve tuz toleransı ile ilgili bölgelerin belirlenmesine yardımcı olmuştur (Sun, 2012).

Yüksek verimli dizileme teknolojilerindeki ilerlemeyle birlikte, çeşitli yabani ve yerel domates türlerinin (Fernandez-Pozo, 2015; Zhu, 2018) genomları tamamen dizilenmiştir (Bolger, 2014; Gao, 2019). Yabani ve diğer domates çeşitlerinin genomik dizileri hakkındaki bilgiler Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>) ve *Solanum pennellii* genom projesinde (https://www.plabipd.de/project_spenn/start.ep) paylaşılmıştır. Yüksek kaliteli bir genom dizisinin mevcudiyeti, moleküler biyoloji ve genomik tekniklerdeki hızlı gelişmeler, araştırmacıların istenen herhangi bir genomik lokusunu eklemeler/silmeler veya baz ikamesi şeklinde hassas bir şekilde düzenlemesini sağlamıştır. Bir dal içindeki tüm suşlardan ya da çeşitlerden gelen genlerin tamamının (Pan-genomun) mevcudiyeti, domates ıslahı ve gelişiminde hedef gen modifikasyonlarının etkisini test etmek için gen düzenleme araçlarını kolaylaştırabilir.

CRISPR / Cas sistemi, genom düzenleme araçları içerisinde en etkili ve en yaygın olarak kullanılan araçtır. Bu yüzden teknoloji olarak, tarım ürünlerinin kalitesinin artırılması için hem araştırmacılar hem de endüstriler tarafından ilgi görmektedir. Günümüzde, CRISPR / Cas genom düzenlemesi, biyotik ve abiyotik strese dirençli bitkilerin geliştirilmesinde anahtar rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra bitkilerin gelişim ve verim özelliklerinin iyileştirilmesi, sekonder metabolitlerin içeriğinin değiştirilmesi gibi uygulamalarıyla modern ıslahta ana uygulamalardan biri haline gelmiştir.

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

Biyotik faktörler, dünya çapında ürün verimini %20-40 oranında azaltan patojenlerin saldırısının neden olduğu hastalıkları içermektedir. Hastalıkları kontrol

etmek için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Pestisitler patojenleri durdurmak için kullanılır, ancak pestisitler hem insanlara hem de çevreye zararlıdır (Damalas, 2011). Kimyasalların uygulanması bazı yararlı organizmaları da yok ederek ekolojik dengeyi bozmaktadır. Hastalıkların üstesinden gelmek için, daha fazla pestisit geliştirilmesi ve kullanılması genellikle bir önlem mekanizması olarak kullanılır. Bununla birlikte, pestisitlerin uygulanması patojenlere bir dereceye kadar etki etmektedir. Bu nedenle, ürün verimliliğinin kimyasallara ve pestisitlere bağımlılığı, uzun süreli kullanımda ekolojik dengesizliğe yol açabilecek zararlı yan etkileri nedeniyle en iyi bir çözüm değildir (Tilman, 2002).

Hastalığa dirençli bitkilerin genetik olarak ıslahı, hastalıklara karşı verimli ve çevre dostu bir strateji sağlar. Başlangıçta, geleneksel ıslah yöntemleri, hastalığa dirençli genetik kaynaklar oluşturmada başarılıydı. Bununla birlikte, geleneksel ıslahın çeşitli dezavantajları vardır. İlk olarak, birbirleriyle polen alışverişinde bulunabilen bitkiler için kullanılabilir. İkincisi, bitki popülasyonu, özellikle hastalık direncinde yeterli genetik çeşitliliğe sahip olmalıdır. Üçüncüsü, gereken süre ve bağlantı sürüklenmesi, genellikle verimin azalması gibi birçok istenmeyen özelliği beraberinde getirir. Geleneksel yetiştirme teknikleri ile hızlı gelişen patojenlere ayak uydurmak zordur (Yin, 2019).

Hedeflenen gen düzenleme ile üretilen bitkiler, funguslar, bakteriler ve virüsler gibi biyolojik tehditlerin üstesinden gelmek için kullanılabilir. Hastalık direncini negatif olarak düzenleyen genler, genom düzenleme için umut verici hedefleri temsil etmektedir.

Domateste en yaygın mantar enfeksiyonlarından bazıları kurşuni küf (*Botrytis cinerea*), erken yanıklık (*Alternaria solani*), geç yanıklık (*Phytophthora infestans*) ve *Fusarium* solgunluğudur (*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*).

B. cinerea, domates dahil birçok bitkide kurşuni küf oluşumuna neden olan en kozmopolit ve yıkıcı mantar enfeksiyonudur. Buxdorf ve arkadaşları (Buxdorf, 2014), *SISHN3* transkripsiyon faktör genlerinin RNAi aracılığıyla susturulmasından sonra Micro-Tom domatesinde nekrotrofik yaprak patojeni *B. cinerea*'ya karşı azaltılmış duyarlılıkla sonuçlandığı bildirmiştir. Buna karşılık, *SISHN3*'ün aşırı ekspresyonu, *B. cinerea* enfeksiyonuna karşı dirence neden olmuştur. Bir başka benzer çalışma, domates pektat liyazının (*SIPL*) RNAi aracılığıyla susturulmasıyla *B. cinerea*'ya karşı toleransın azaldığını bildirmiştir (Yang, 2017). *SINL33*, bir NL tipi NBS LRR direnç

proteinlerini kodlayan bir gendir. *SINL33*'ün susturulması sadece *B. cinerea*'nın kurşuni küf hastalığına karşı toleransını arttırmakla kalmamış, aynı zamanda oksidatif strese karşı toleransı da arttırmıştır (Ye, 2019).

F. oxysporium mantarı, hifal dallanma yoluyla köklerin vasküler dokularına nüfuz eden ve ksilemi istila ederek karakteristik bir solma fenotipine neden olan toprak kaynaklı bir parazittir. Bu mantar, ekonomik açıdan önemli birçok ürünü yok eder. *Fusarium* mitojenle aktive olan protein kinaz (*MAPK*) sinyal genleri (*FMK1*, *HOG1*) ve *PBS2*), bitki yüzeyi algılama ve patogenezinde rol oynar (Di Pietro, 2001). *F. oxysporium*'da bu üç genin susturulması, domates meyvelerinde misel gelişiminin azalmasını sağlayarak, gen susturulmamış mantara kıyasla patojenitenin azalmasına yol açmıştır (Pareek, 2007). Zhang ve arkadaşları, *SIMAPK3*'ün nakavt mutantlarının kurşuni küf hastalığına duyarlı olduğunu bildirmiştir (Zhang, 2018).

Nekrasov ve arkadaşları MoneyMaker'da Küf direnç lokusunun (*Mlo*) bir CRISPR/Cas9 mutantını üretmiştir (Nekrasov, 2017). *Mlo*'nun yabani tip alleli küllemeye karşı hassasken, *mlo*'nun nakavt mutantları külleme enfeksiyonuna neden olan mantara karşı dirençli olduğu görülmüştür. Benzer bir çalışmada, *Külleme Direnci 4*'ün (*PMR4*) CRISPR/Cas9 mutantları, külleme enfeksiyonuna karşı dirençliliği teyit edilmiştir (Koseoglou, 2017). *SIPMR4*'ün RNA silencing yöntemiyle küllemeye karşı direnci geliştirilmiştir (Huibers, 2013).

Gemini virüsleri gibi çeşitli virüsler, ürün verimliliğini etkileyen tarımsal bitkilerinin çoğu için bir tehdittir. Tashkandi ve arkadaşları, MoneyMaker domates çeşidinde CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak Domates Sarı Yaprak Kıvrıkcık Virüsünün (*TYLCV*) kaplama proteinini (CP) ve RNA replikasını (Rep) hedeflemiştir (Tashkandi, 2018). CRISPR ile düzenlenen bitkilerde *TYLCV* genomunun düşük seviyeleri ile belirgin olan *TYLCV* enfeksiyonuna karşı dirençli olduğu görülmüştür. Genomun kaplama protein bölgesi, replikazdan daha verimli bir şekilde hedeflenmiştir.

Pseudomonas syringae, en önemli kültür bitkilerini etkileyen bakteriyel bir patojendir. Enfeksiyon üzerine, *P. syringae* pv. *Tomato* (*Pto*) DC3000, bakteri istilası için stoma açıklığını indükleyen koronatin (COR) salgılar. COR'un stoma yanıtı için bir koreseptör *JAZ2*'ye ihtiyacı vardır. CRISPR/Cas9 tarafından düzenlenen *SlJAZ2* ile, bakteriyel benek hastalığına dirençli hale gelmiştir (Ortigosa, 2019).

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

Domates en çok yetiştirilen sebze türlerinden biridir, ancak verim çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. (Gerszberg ve Hnatuszko-Konka, 2017). Aşırı sıcaklıklar, tuzluluk veya kuraklık gibi olumsuz çevresel faktörlerin varlığı, meyve sayısı ve meyve boyutunun azalması sonucu domates verimini azaltmakla birlikte meyve kalitesini de etkilemektedir (Moretti, 2010). Günümüzde bu sorunla başa çıkmak için çeşitli modern ıslah teknolojileri uygulanmaktadır. Bunlardan birisi de CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemidir. CRISPR/Cas9, domateste daha önce bilinmeyen abiyotik stres düzenleyicileri tanımlamak için değerli bir araç olduğunu kanıtlamıştır. Brassinosteroid bitki hormonunun hücre bölünmesi, hücre uzaması, üreme ve tohum çimlenmesi gibi çeşitli gelişimsel ve fizyolojik süreçlerle ilişkili olduğu bilinmektedir (Divi ve Krishna, 2009). Yin ve meslektaşları, *BRASSINAZOLE-RESISTANT 1*'in (*BZR1*) domateste brassinosteroid sinyalleme sisteminin kritik bir bileşeni olduğunu ve *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG1*'i (*RBOH1*) düzenlediğini ve bunun da apoplastik hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimini ve ısı stresi toleransını kontrol ettiğini göstermiştir (Yin, 2018). *BZR1* geninin CRISPR/Cas9 aracılı nakavt edilmesiyle, bozulmuş *RBOH1* indüksiyonu, büyümede azalma ve ısı toleransı olan mutant hatlar ortaya çıkmıştır. Başka bir çalışmada, araştırmacılar, domatesin *NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENE 1*(*SINPR1*)'in kuraklık stresindeki potansiyel rolünü belirlemeyi başarmışlardır (Li, 2019b). CRISPR-npr1 mutantları, yabani tip bitkilere kıyasla artmış bir stoma açıklığı, daha yüksek elektrolitik geçirgenlik ve kuraklık toleransında bir azalma göstermiştir. Yu ve ekibi, domateste *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES* (*SIMAPK3*) geni üzerinde CRISPR/Cas9 ile mutasyon oluşturmuştur. WT bitkileri ile karşılaştırıldığında, *SIMAPK3* mutantları daha az solma ve daha az membran hasarı ve düşük reaktif oksijen türleri (ROS) içeriği görülmüştür (Yu, 2019). *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN* (*SILBD40*) geninde CRISPR/Cas9 aracılığıyla mutasyon oluşturulmuştur. Bu mutasyon sonucunda domateste kuraklığa toleransı ile sonuçlanmıştır (Liu, 2020).

3.4.3. CRISPR/Cas Kullanılarak Domateste Verim, Kalite, Büyüme ve Gelişiminin Artırılması

Meyve kalitesi ve miktarı, kültür bitkilerinin iyileştirilmesi için gerekli olan belli

başlı özelliklerden bir tanesidir. Erken çiçeklenme, çok sayıda çiçek, belirli büyüme alışkanlığı, meyve büyüklüğü ve lokül sayısı verimi belirleyen başlıca özellikler iken, meyve kalitesi ve besin değeri, meyve olgunlaşması, meyve pigmentasyonu ve meyve metabolitlerine göre derecelendirilir.

Birçok genom düzenleme deneyi, çiçek morfolojisinde ve çiçeklenme zamanında değişikliklerle sonuçlanmıştır. Xu ve arkadaşları, fab (fasiyasyon ve dallanma) için bir EMS mutan ve fin (fasiyasyon çiçeklenme) için üç hızlı nötron (FN) mutan tanımlanmıştır (Xu, 2015). Bu mutantlar, daha yüksek sayıda loküle sahip meyvelere yol açan dallı çiçeklenme ve fasiyasyon çiçeklerle sonuçlanan genişlemiş meristemlerle karakterize edilmiştir. Harita tabanlı klonlamayla, FAB için *CLAVATA1*'deki (*CLV1*) ve FIN için bir arabinosiltransferaz genindeki mutasyonlarla tanımlanmıştır. Cis düzenleyici elementleri (CRE) düzenleyerek nicel değişkenler oluşturmak için, Rodríguez-Leal ve arkadaşları *S. pimpinellifolium*'da CRISPR/Cas9 mutantları üretmişlerdir (Rodríguez-Leal, 2017). *CLV3* geninin promotöründeki mutasyonlar, çiçek organları ve lokül sayısı için bir dizi varyantla sonuçlanmıştır. Ayrıca *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN9*, *WOX9* (S) ve *SELF PRUNING* (SP) için promotör mutantlar üreterek bitki mimarisinde ve çiçeklenme modifikasyonlarında birçok kantitatif varyasyona neden olmuşlardır. Bu varyantlar, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde spesifik Cis düzenleyici elementlerin (CRE'ler) çalışmasına izin vermektedir. Ayrıca, bölgesel olarak ekilen tarım ürünlerinin kültüre alınması için genlerin baskın ve yarı baskın etkilerini araştırmada umut verici kaynaklar olmuşlardır. CRISPR/Cas9 aracılığıyla çiçeklenme baskılayıcı *SELF-PRUNING5G* (*SP5G*) geninin düzenlenmesiyle, erken hasadı kolaylaştıran gün uzunluğundan bağımsız erken çiçeklenme ile kompakt belirli büyüme gösteren mutantlar elde edilmiştir (Soyk, 2017).

Meyve olgunlaşması, CRISPR/Cas9 aracılı gen düzenleme kullanılarak hedeflenen bir diğer önemli meyve özelliğidir. Ito ve arkadaşları, *MADS-box* transkripsiyon faktörü olan *RIN*'in (*RIPENING INHIBITOR*) kodlama dizisindeki üç bölgeyi hedefleyerek, düşük pigmentasyon ve değişen derecelerde eksik olgunlaşma fenotipleri ve çoklu mutasyona uğramış alellerini elde etmişlerdir (Ito, 2015). *RIN*'in nakavt mutan, yabancı tipten çok daha düşük de olsa likopen birikimi gibi fizyolojik değişiklikler ve pektat liyaz ve poligalakturonaz gibi meyve yumuşatıcı enzimlerin ekspresyonu gibi fizyolojik değişikliklerle bağlantılı meyve olgunlaşmasının

indüklendiğini göstermiştir (Ito, 2017). Başka bir çalışmada, *RIN*'in meyve olgunlaşması için gerekli olduğunu, ancak meyve olgunlaşmasının uyarılması için gerekli olmadığını göstermiştir (Ito, 2020). Domates meyve olgunlaşması ile ilgili faktörlerin virüs kaynaklı gen susturulması ile, organel RNA tanıma motifi içeren *protein4*'ün (*ORRM4*) domates meyve olgunlaşmasını pozitif olarak düzenlediğini göstermiştir. *SlORRM4*'ün kodlama dizisi, CRISPR/Cas9 yöntemi kullanılarak düzenlenmiş, bu da düşük etilen üretimi ve solunum hızı ile bağlantılı olarak meyve olgunlaşmasında bir gecikmeye yol açmıştır. Bu çalışmayla, *ORRM4*'ün, meyve olgunlaşma sürecini düzenlemede önemli bir rolü olan Mitokondride lokalize bir RNA düzenleme faktörü olduğu sonucuna varılmıştır (Yang, 2017).

Meyvelerin uzun raf ömrü, domateste arzu edilen bir diğer özelliktir. Yu ve arkadaşları, CRISPR/Cas9 aracılı düzenleme kullanarak *ALC* (*Alcobaca*) geninin nakavt edildiğini ve bunun sonucunda pigment birikiminin geciktiğini bildirmiştir (Yu, 2017). Ancak meyve olgunlaşmasını, hasat zamanını veya olgunlaşmış meyve rengini etkilememiştir. En önemlisi, *ALC* mutasyonunun meyve raf ömrünü önemli ölçüde iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada ise meyve olgunlaşması sırasında *SIGH3.2* geninin ifadesinin indüklendiğini bildirilmiştir. *SIGH3.2*'nin RNAi aracılığıyla susturulması, transgenik meyvelerdeki artan IAA ve IBA seviyeleri nedeniyle meyvelerin raf ömrünü artırmıştır (Sravankumar, 2018).

Klap ve arkadaşları, M82 çeşidinin EMS ile mutajenize edilmiş bir popülasyonundan bir partenokarpik mutant tanımlamışlardır (Klap, 2017). CRISPR/Cas9 yöntemini kullanarak *AGAMOUS-LIKE 6* (*SlAGL6*) geninin nakavt hatlarını oluşturmuşlardır. Mutantlar, ısı stresi koşulları altında meyve üretimi ile sonuçlanan fakültatif partenokarpi sergilemiştir. *SlIAA9* üzerinde başka bir gen düzenleme çalışmasıyla, partenokarpi ve değiştirilmiş yaprak morfolojisi elde edilmiştir (Ueta, 2017).

Domateste karotenoidler ve antosiyaninler için yapılmış az sayıda gen düzenleme çalışması bulunmaktadır. *Solanum lycopersicum* AC çeşidinde *Stay-green 1* (*SGR1*), *likopen ε-siklaz* (*LCY-E*), *betalikopen siklaz* (*Blc*), *likopen b-siklaz 1* (*LCY-B1*) ve *LCY-B2* için multipleks CRISPR/Cas9 genom düzenlemesi yapılmıştır (Li, 2018). Sadece *SGR1* mutasyonuna sahip nakavt hatlar, kalan kombinasyonlara kıyasla en yüksek likopeni (5.1 kat) ve fitoen, prolikopen, α-karoten ve lutein gibi diğer karotenoidleri de artırmıştır. *SGR1* mutasyonuna sahip tüm mutantlar, pembe rengin

görüldüğü aşamadan sonra karakteristik pas rengini göstermiştir. Čermák ve arkadaşları, geminivirüs replikonlarını kullanarak bir MYB transkripsiyon faktörlerini kodlayan *Anthocyanin1 (ANT1)* genini düzenlemek için hem TALEN'lerin hem de CRISPR/Cas9'un kullanıldığını rapor etmişlerdir (Čermák, 2015). Bir karnabahar mozaik virüsü 35S promotörünü upstream bölgeye aktararak endojen *ANT1* kodlama dizisini aşırı ifade ettirmişlerdir. Hedef dışı herhangi bir değişiklik yapılmadan her iki yöntem için de hemen hemen aynı verim gözlenmiştir. Ayrıca, bu kromozomal değişiklikler, bir sonraki nesle Mendel kalıtımı ile aktarıldığı gösterilmiştir.

Diğer bazı CRISPR/Cas9 gen düzenleme çalışmalarında, yapraklarda artan GABA içeriği ve askorbik asit içeriği (Li, 2018), yaprak karmaşıklığı, şekil ve tırtıklarda değişiklikler (Shimatani, 2017; Xu, 2016) ile sonuçlanmıştır.

3.4.4. CRISPR/Cas9 Aracılı Erkek Kısır Domates Bitkilerin Üretimi

Tarımsal bitkilerinin birçok ticari çeşidi, çok çeşitli ortamlarda istikrarlı bir şekilde performans gösteren F1 melezleridir. Erkek kısırlığının ıslah programlarına dahil edilmesi, hibrit tohum üretimi için gereken emeği azaltır ve yüksek çeşit saflığı sağlar (Kim ve Zhang, 2018). Domates erkek kısırlığına, ilk mutantın tanımlanmasından bu yana bitki ıslahçıları tarafından büyük önem verilmiş ve erkek kısırlığının domates hibrit tohumlarının üretilmesi için kullanımı geniş çapta tartışılmıştır (Sawhney, 2004). Bu amaçla erkek steril 10 (*ms-10*), *ms-15*, *ms-32*, *pozisyonel steril-2 (ps-2)*, *exserted stigma (ex)* ve *7B-1* gibi erkek kısırlığını kontrol eden farklı genler üzerinde çalışılmış ve etkili uygulamaları için çeşitli fikirler ve sistemler geliştirilmiştir (Zhang, 2016; Pucci, 2017; Cao, 2019; Liu, 2019). Ancak bugüne kadar erkek steril hatlar, domates hibrit tohum üretiminde büyük ölçekte kullanılmamıştır.

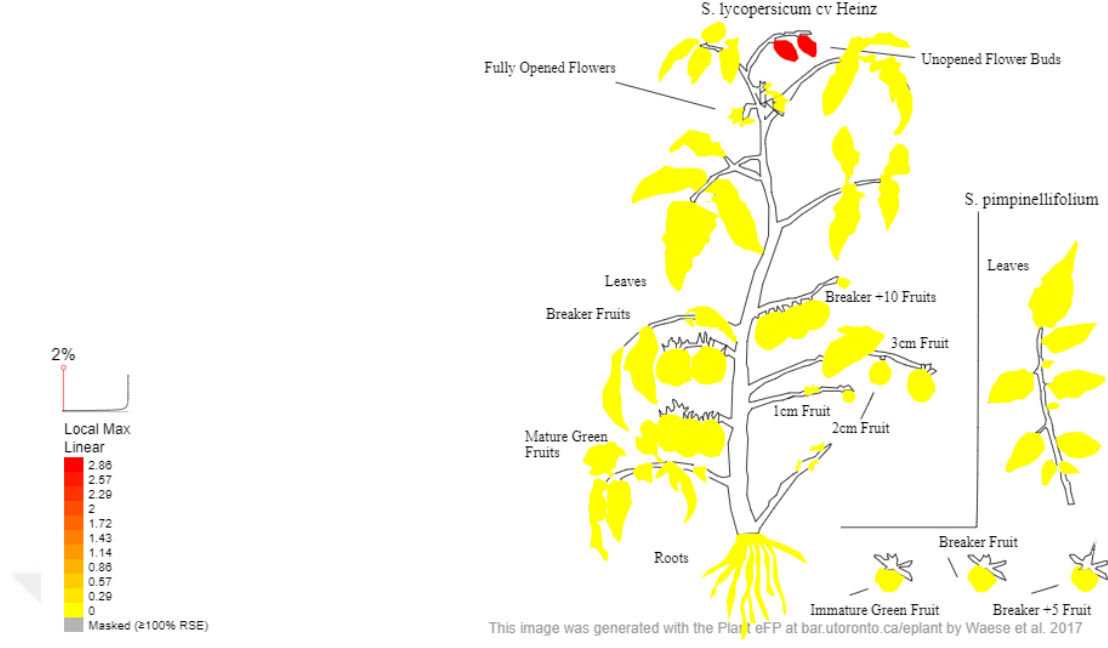
Pek çok çekinik gen erkek-steril domates mutasyonu hibrit tohumlar üretmek için faydalı olsa da iki ana faktör ticari uygulamalarını sınırlandırmıştır (Cao, 2019; Liu, 2019). Bunlardan ilki büyük miktarlarda saf erkek-steril tohumların çoğaltılmasının zorluğudur. İkincisi ise geleneksel geri çaprazlamanın, uzun bir zaman ve birçok nesil gerektirdiği gerçeğidir. Homozigot erkek steril bitkilerin tohumlarını elde etmek için klasik yaklaşım, homozigot erkek steril bitkileri (*ms/ms*) heterozigot erkek fertil (*Ms/ms*) bitkilerle çaprazlamaktır. Böyle bir çaprazlamadan gelen döl, %50 erkek steril (*ms/ms*) ve %50 erkek fertil bitkileri (*Ms/ms*) ayıracaktır. Buradan da

anlaşıldığı gibi klasik sistem ile erkek steril bitkileri elde etmek zaman ve işgücü kaybına yol açmaktadır. Fakat günümüzde bu sorunların üstesinden genom düzenleme teknolojileriyle gelinmektedir. Bunlardan en fazla kullanılanı CRISPR genom düzenleme sistemidir. Her ne kadar bu teknik yaygın olsa da günümüzde CRISPR ile düzenlenen genler ile elde edilen erkek kısır domates bitkileri çok azdır.

Yapılan bir çalışmada, domateste mikrosporogenez sırasında tapetumun mayoz ve hücre ölümünü düzenleyen ve *bHLH* transkripsiyon faktörünü kodlayan *SIMS10* geni (*Solyc02g079810*) nakavt edilmiştir (Jung, 2020). Bu genom düzenleme sonrası polen üretmeyen erkek steril bitkiler elde edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise domates anterinde ifade olan *LeRBOH* (*Solyc01g099620*) ve *LeRBOHE* (*Solyc07g042460*) genlerinde CRISPR/Cas9 ile mutasyon oluşturulmuştur. Bu mutasyon sonucunda *lerbohe* ve *lerboh* mutantlarının tam erkek kısırlığı sergilediği ancak yabancı tip polenleri kabul edip normal meyve üretebildiği görülmüştür (Dai, 2021). Domateste yapılan en son çalışmalardan birisi ise *bHLH* transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerden olan *ABORTED MICROSPORES* gene (*AMS*) geni üzerinedir. *ABORTED MICROSPORES* GENE (*AMS*) geni CRISPR/Cas9 ile mutasyona uğratılmıştır. Mutasyon sonucunda, *SIAMS* ile susturulmuş (%75), nakavt edilmiş (%89) ve overeksprese edilmiş bitkilerin (%60) canlı olmayan polen oranlarının, yabancı tip bitkilerden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir (Bao, 2022).

4. *SLPHD_MS1*

MS1, yüksek bitkilerde tapetal gelişim ve mikrospor olgunlaşması için gerekli olan hayati, sporofitik bir gendir (Wilson, 2001). *Arabidopsis MALE STERILITY1 (SLPHD_MS1)* geni anter ve polen gelişimini sağlamaktadır. *Arabidopsis thaliana MALE STERILITY1 (MS1)* geni, canlı polen oluşumu için kritiktir ve *PHD-finger* sınıfı transkripsiyon faktörleri ile homolojiye sahiptir (Wilson, 2001). *MS1* geni, tapetumda polen duvarı ve polen kabuğu materyalinin indüksiyonunda ve nihayetinde canlı polen üretiminde kritik bir rol oynar (Yang, 2007). *KALICI TAPETAL HÜCRE1 (OsPTC1)* geni yakın zamanda çeltikte *SLPHD_MS1*'in varsayılan ortoloğu olarak tanımlanmış ve benzer bir işleve sahip olduğu görülmüştür (Li, 2011). Son çalışmalar, *ZmMs7* ve onun ortoloğu *SLPHD_MS1*'in, tapetal gelişimi ve polen oluşumunda transkripsiyon aktivatörleri olarak hareket ettiğini göstermiştir (An, 2020; Zhang, 2018). Bu genlerin korunan işlevleri, muhtemelen farklı bitki türleri arasında erkek üremesini kontrol eden genetik ağlarda önemli bir role sahiptir. Domateslerde, *bHLH* transkripsiyon faktörünü kodlayan *SIMS10 (Soly02g079810)* geninin nakavt edilmesiyle elde edilen erkek kısır hatlarda *SLPHD_MS1*'in ekspresyon seviyesinin azaldığı belirlenmiştir (Jung, 2020). *MS1*'in ekspresyon seviyesi, polen üretmediği için tamamen steril olan *ms32* mutantında da güçlü bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Liu, 2019). Domates erkek fertil ebeveyni (*T-1082*) ve erkek steril *ms10* arasında yapılan transkriptom karşılaştırması, *ms10*'un mayoz bölünme, tapetum gelişimi, hücre duvarı bozulması, polen duvarı oluşumu, taşıma ve lipid metabolizması gibi anter gelişim süreçlerinde yer alan 246 genin düzenlenmesinde kilit rol oynadığını göstermiştir (Jeong, 2014). Bu genler arasında, *MS1*'in (*Soly04g008420*) ifadesi, erkek fertil ebeveyne (*T-1082*) kıyasla anter gelişiminin *ms10* çiçek tomurcuklarında önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Ayrıca bu genin çiçek tomurcuklarında ifadesinin yüksek olduğu ePlant (http://bar.utoronto.ca/eplant_tomato/) veri tabanında görülmüştür.



Şekil 4.1. *MS1* geninin dokulara göre ekspresyonu

Tüm bu yapılan çalışmalar göstermiştir ki modern ıslahta erkek kısırlığın kullanımının ne kadar önemli olduğu görülmüştür. İşte bu sebepten genlerin fonksiyonlarının kanıtlanması ve bunu yaparken genom düzenlemeyi kullanmanın önemi giderek artmıştır. Bu sebeple bu çalışmanın amacı;

1. Erkek kısırlık ile ilişkili *SIPHD_MS1* geninin fonksiyonunun kanıtlanması
2. Domateste CRISPR/CAS9 sisteminin optimizasyonu
3. Domateste erkek steril hatlar elde ederek işgücü, zaman ve maliyet kaybını azaltmaktır.

5. MATERİYAL VE METHOD

5.1. Bitki Materyali ve Doku Kültür Ortamı

Gen aktarım çalışmalarında Croker domates çeşidi materyal olarak kullanılmıştır. Croker domates çeşidi ile ilgili bilgiler EK-1’de verilmiştir. Doku kültürü çalışmaları ve bu kotiledonları doku kültürü ortamında üretmek için kullanılmıştır. Mikrosantrifüj tüp içerisindeki domates tohumlarının üzerine %70’lik etil alkol eklenerek 30 saniye bekletilip alkol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra %20’lik sodyum hipoklorit eklenerek 20 dakika bekletilmiştir. Son olarak da tohumlar 5 kez steril distile su ile yıkanarak hormonsuz MS büyüme ortamına (MS (2.2 g/L) + Sükroz (30 g/L) + Fitajel (2.8 g) pH:5.8) ekimi gerçekleştirilmiştir. 25 °C’de fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan bitki büyüme kabininde çimlendirilmiştir. 8-10 günlük domates fidelerinin kotiledon kısımları gen aktarım çalışmalarında eksplant olarak kullanılmıştır. Gen aktarım sonrasında ko-kültüvasyon için besi ortamı olarak (MS (4.4 g/L) + 0.1 mg/ml IAA + 3 mg/ml BA + Sükroz (30 g/L) + Fitajel (2.8 g) pH:5.8) kullanılmıştır. Bitki rejenerasyon besi ortamı olarak (MS (4.4 g/L) + 0.1 mg/ml IAA + 3 mg/ml BA + Higromisin 10 mg/ml + Sükroz (30 g/L) + Fitajel (2.8 g) pH:5.8) kullanılmıştır.

5.2. Kullanılan Bakteri Suşları ve Besi Ortamları

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve plazmitler Tablo 5.1’de belirtilmiştir. Gen klonlama çalışmalarında *Escherichia coli* (*E. coli*) (Dh5 α) ve *Agrobacterium tumefaciens* (GV 3101) bakterileri kullanılmıştır. *E. coli* hücreleri Luria broth (LB) besi ortamında çalkalamalı inkübatörde 37 °C’de ve katı LB besiyerinde agar petrilerde büyütülmüştür. *A. tumefaciens* Luria broth (LB) besi ortamında çalkalamalı inkübatörde 28 °C’de ve katı LB’de agar petrilerde büyütülmüştür. Uzun süreli koruma için, uygun büyüme koşullarında büyütülen bakteriler (O.D₆₀₀ = 0,8) 5000 x g’de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen pellet 300 ul LB besi ortamında çözülmüştür. Daha sonra 800 ul %85 gliserol eklenerek 80 °C’de stoklanmıştır. Çalışmalarda bitki ifade vektörü olarak pHSE401 plazmiti (Addgene, Plasmid #62201) kullanılmıştır.

Tablo 5.1. Kullanılan bakteri suşları ve besi ortamları

Suş	Ti-plasmid types	Kromozom bilgisi	Antibiyotik dirençlilik	Referans
<i>GV 3101 (pMP 90)</i>	a disarmed nopaline-type pTiC58ΔT-DNA	C58	Rm ^R , Gm ^R	Koncz ve Schell, 1986
<i>E. Coli (Dh5α)</i>	-	-	-	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center
Plazmit pHSE401			Spect.	Addgene

Gm, gentamicin; Km, kanamycin; Rm, rifampicin, Tc: tetracycline.

5.3. Besi Ortamları

Besi ortamlarının hazırlanışı ve bileşenleri EK2’de listelenmiştir.

5.4. Tamponlar ve Solüsyonlar

Tamponların kimyasal içerikleri ile hazırlanışı EK3’de listelenmiştir.

5.5. Kimyasal ve Enzimler

Kullanılan kimyasallar ve enzimler EK4’de listelenmiştir.

5.6. Method

5.6.1. gRNA’nın dizayn edilmesi

SIPHD_MS1-like (Soly04g008420) genine ait nükleotid sekansları Phytozome v12 veri tabanından elde edilmiştir. Daha sonra CRISPR P.2.0 programı kullanılarak öncelikle *SIPHD_MS1* genini exon 1 ve diğer exzonlarını hedefleyen gRNA dizaynı gerçekleştirilmiştir. Dizayn edilen gRNA’ların hedef dışı mutasyonların belirlenebilmesi için CRISPR P.2.0 programı kullanılmıştır. Etkili bir gRNA elde etmek için On-target skoru, GC içerikleri, gen üzerindeki lokasyonları, off-target kapasitesi ve 17. Nükleotid A ve T bazının bulunması gibi kriterler baz alınarak tasarlanmıştır (Secgin, 2021). Dizayn edilen 19 nükleotid uzunluğunda gRNA’lar primer olarak sentezletilmiştir.

5.6.2. Doku kültürü aracılı gen aktarımında kullanılacak bitki ifade vektörünün (pHSE401) oluşturulması

gRNA tasarımı yapıldıktan sonra pHSE401 plazmidi kullanılarak golden gate klonlama yöntemi aracılığı ile bir vektöre 2 gRNA klonlaması yapılmıştır (Xing, 2014). İlk olarak sentezletilen primerler ile pCBC-DT1T2 (Plasmid #50590) vektörü kullanılarak PCR yapılmış ve golden gate PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu

PCR işlemi ile gRNA'ların uç kısımları pHSE401 vektörüne klonlamaya uygun hale getirilmiştir. PCR sonrası Klonlama Tablo 5.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen PCR reaksiyonu CRISPR/Cas9 pHSE401 vektörüne klonlamak için Tablo 5.3'deki reaksiyon oluşturularak bitki ifade vektörü elde edilmiştir.

Tablo 5.2. Golden gate cloning PCR reaksiyonu

Bileşenler	Miktar (µl)	Döngü koşulları
10× Q5 polimeraz enzim Buffer	5	
MgSO ₄ (25mM)	3	
dNTPs (2mM)	4	
Q5 polimeraz enzim	1	1. One cycle: 94 °C, 2 dk.
pCBC-DT1T2 (diluted to 200 times) plazmid (adgene 50590)	1	2. 30 cycles: 94 °C, 15 sn; 60 °C, 30 sec; 68 °C, 1 dk.
DT1-BsF (20 µM) gRNA1 ileri primer	1	3. One cycle: 68 °C, 5 dk
DT1-F0 (1 µM) gRNA 2 ileri primer	1	
DT2-R0 (1 µM) gRNA 2 reverse primer	1	
DT2-BsR (20 µM) gRNA1 geri primer	1	
ddH ₂ O	32	
Total hacim	50 ul	

Tablo 5.3. Golden gate reaksiyonunun oluşturulması

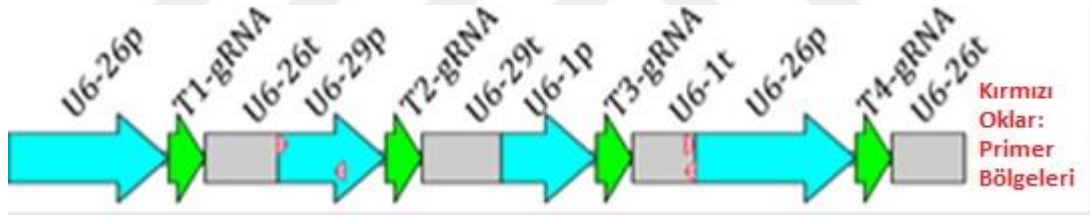
Bileşenler	Miktar (µl)	Döngü koşulları
Purified PCR fragments (~100 ng/µl)	2	
pHSE401 (~100 ng/µl)	2	
10× T4 DNA Ligase Buffer (NEB)	1.5	
10× BSA	1.5	5 saat 37°C
BsaI (NEB)	1	5 dakika 50°C
T4 DNA Ligase (HC, NEB)	1	10 daika 80°C
ddH ₂ O	6	
Total hacim	15	

Klonlama aşaması tamamlandıktan sonra elde edilen vektör kompetant *E. coli Dh5α* bakterisine ısı-şok yöntemi ile aktarılmıştır. Transformasyon sonrasında elde edilen bakteriler 50 mg/L kanamisin içeren katı LB besiyerine yayılarak 17 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda tek koloniler gözlemlenmiştir. Doğru klonları belirlemek için U6-29p-F: TTAATCCAACTACTGCAGCCTGAC ve U6-1t-R: AACGGACCAATCACTTTGTCTTAGC primerleri kullanılarak koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR bileşenleri ve koşulları Tablo 5.4'de gösterilmiştir.

Tablo 5.4. Koloni PCR Bileşenleri ve koşulları

Koloni PCR Bileşenleri		Koloni PCR Protokolü			
Bileşenler	Miktar	Sıra	Sıcaklık	Süre	
NEB 2x Taq DNA Master mix	12.5 µl	1	95 °C	3 dk	1 döngü
Primer F	1 µl	2	95 °C	30 sn	
Primer R	1 µl	3	55	30 sn	34 döngü
Nüklea free su	10.5 µl	4	68 °C	1 dk	
DNA (kloni pipet ucu ile bulaştırılmıştır)	-	5	68 °C	5 dk	1 döngü
			4 °C	Store	1 döngü
Toplam	25 µl				

PCR sonucu belirlenmiş olan kolonilerden plazmit izolasyonu yapmak için bakteriler, içerisine 50 mg/L Kanamisin eklenmiş 10 ml sıvı LB besin ortamında 37 °C 200 rpm’de 1 gece boyunca inkübatörde büyütülmüştür. Plazmit izolasyonu için Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep kit kullanılmış ve ilgili firmanın protokolü takip edilmiştir. Plazmitlerin konsantrasyonu NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer ile ölçülmüştür. Daha sonra % 0.4’lük agaroz jelde yürütülerek plazmitler kontrol edildikten sonra sanger dizilemeye gönderilmiştir.



Şekil 5.1. pHSE401 plazmitinin gRNA klonlama bölgesinin haritası

5.6.3. Plazmitlerin Kompetan *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 bakterisine aktarılması

Sekanslama sonucunda doğrulanan pHSE401 plazmitleri kompetan *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 suşunun hücrelerine elektroporasyon ile aktarılmıştır. Elde edilen bakterilerin büyütülmesi için 500 ml katı LB besi ortamı hazırlanarak otoklav sonrasında 30 mg/L Gentamisin+ 10 mg/L rifamisin + 100 mg/L Kanamisin eklenmiş ve petrilere dökülmüştür. Kompetan *A. bacterium* bakterisi – 80 °C’den buz üzerine alınarak 10 dakika bekletilmiştir. 10 µl ligasyon ürünü 50 µl kompetan *Agrobacterium* bakterisi bulunan 1.5 ml lik ependorf tüplere eklenip tüpün alt ucunu parmak ucuyla 3-5 kez vurularak karışması sağlanmıştır. Daha önceden buz üzerinde bekletilen elektroporasyon küveytine (Gene Pulser®/MicroPulser™ Electroporation Cuvettes, 0.1 cm gap) karışım transfer edilmiştir. Ardından Biorad

Gene Pulser®/Micropulser™ cihazı ile transformasyon gerçekleştirilmiştir. Küveyt üzerine 900 µl LB besi ortamı eklenerek 2 ml'lik ependorf tüp içerisinde 28°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 100 µl bakteri süspansiyonu yayma aparatı yardımı ile katı LB besi ortamına yayılarak 28°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra tek koloniler gözlemlenmiştir. Seçilen her bir koloni için 10 µl steril su içeren PCR tüpü hazırlanıp her bir koloniden pipet ucu ile bakteri alınarak bakteri suya bulaştırılmıştır. Elde edilen bakterili suyun 2 µl'si koloni PCR için 8 µl'si ise bakteri sıvı kùltüre ekimi yapılarak stok oluşturulmuştur. Koloni PCR için tablo 5.5'teki PCR bileşenleri ve koşulları kullanılmıştır.

Tablo 5.5. Koloni PCR Bileşenleri ve koşulları

Koloni PCR Bileşenleri		Koloni PCR Protokolü			
Bileşenler	Miktar	Sıra	Sıcaklık	Süre	
NEB 2x Taq DNA Master mix	12.5 µl	1	95 °C	3 dk	1 döngü
Primer F	1 µl	2	95 °C	30 sn	
Primer R	1 µl	3	55	30 sn	34 döngü
Nüklea free su	10.5 µl	4	68 °C	1 dk	
DNA (kloni pipet ucu ile bulaştırılmıştır)	-	5	68 °C	5 dk	1 döngü
			4 °C	Store	1 döngü
Toplam	25 µl				

5.6.4. Bitki Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu ve Tohumların Çimlendirilmesi

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

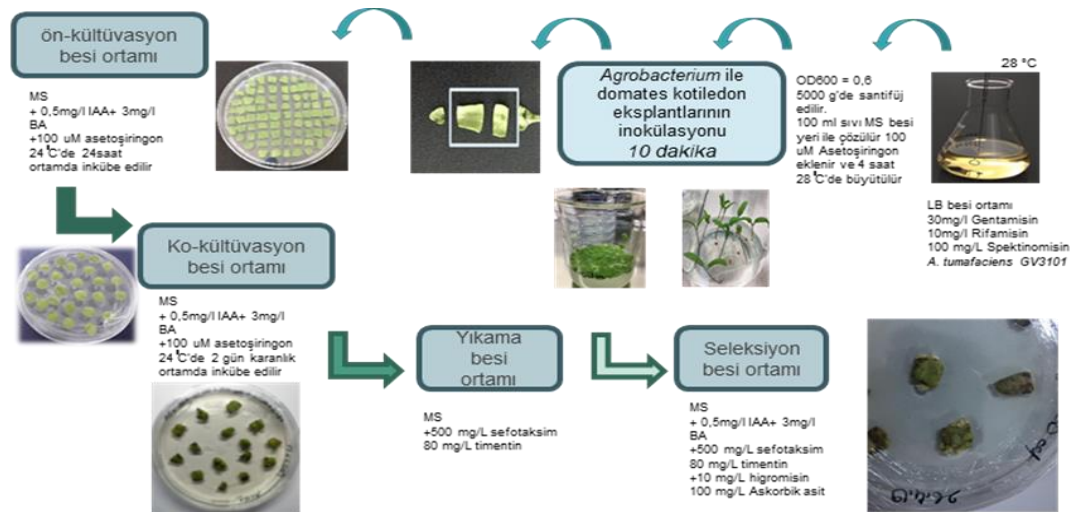
5.6.5. Domates Bitkisine Gen Aktarımı

5.6.5.1. Kotiledon Eksplantlarının Ön-kültür Ortamına Alınması

Daha önce optimize edilen Crocker çeşidi ekplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Buradan yola çıkarak 10 günlük domates fidelerinin kotiledon eksplantları *Agrobacterium tumefaciens* hücreleri ile inoküle edilmeden 6 saat önce 3 mg/L BA+0.5 mg/L IAA+100 mg/L Askorik Asit+100 mg/L Asetoşiringon içeren MS besi ortamına transfer edilmiştir. Herbir petride 10 kotiledon olmak üzere 5 petri kabında 50 eksplant kullanılmıştır.

5.6.5.2. Agrobacterium Hücre Kültürünün Hazırlanması

Gen aktarımında *Agrobacterium GV3101* suşu kullanılmıştır. pHSE401+2 gRNA vektörünü içeren *Agrobacterium* hücreleri gentamisin (30 mg/L), kanamisin (50 mg/L) ve rifamisin (10 mg/L) antibiyotiklerini içeren 50 ml sıvı LB ortamında 28°C’de 200 rpm’de 1 gün süreyle OD600 0,8’e gelene kadar büyütülmüştür. Kültürler 50 ml’lik falkon tüpe aktararak 5000 rpm de 5 dakika santifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bakteri peleti Vir genlerinin aktivasyonu için 200 µM asetoşiringon, 30 mg/L gentamisin, 50 mg/L kanamisin ve 10 mg/L rifamisin içeren LB besi ortamında çözülerek 4 saat süre ile 28°C’de 200 rpm’de büyütülmüştür. Kültürler 50 ml’lik falkon tüpe aktararak 5000 rpm de 5 dakika santifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bakteri kültürünün OD600’si 0,6 olacak şekilde Sıvı MS besi ortamı ile çözülerek gen aktarımı için hazırlanmıştır. *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımında izlenen yol şekil 5.2’de kısaca özetlenmiştir.



Şekil 5.2. A. tumefaciens GV3101 bakterisi ile gen aktarım yönteminin özeti

5.6.5.3. Kotiledon Eksplantlarının Agrobacterium ile İnokülasyonu ve Ko-Kültüvasyon Besi Ortamına Alınması

Ön kültür ortamında bekletilen kotiledonlar *Agrobacterium* kültürü ile 10 dakika muamele edilmiş ve ardından 3 mg/L BA+0.5 mg/L IAA+100 mg/L Askorbik Asit+100 mg/L Asetoşiringon içeren ko-kültüvasyon ortamına alınmıştır. Eksplantlar 2 gün 25 °C’de karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Ko-kültüvasyondan sonra kotiledon eksplantları üzerinde üremiş olan fazla bakterileri uzaklaştırmak için yıkama besisi ortamına alınmıştır. Eksplantlar yıkama besisi ortamında 2 kez her bir yıkamada 10 dakika süre ile timentin (160 mg/L) ve 10 dakika süre Sefotaksim (125 mg/L) ile yıkanarak steril kurutma kağıtlarında kurumaya bırakılmıştır.

5.6.5.4. Eksplantların Selektif Besi Ortamına Aktarılması

Eksplantlar, ko-kültüvasyondan sonra MS+3 mg/L BA+0.5 mg/L IAA+ 10 mg/L Higromisin+ 100 mg/L Askorik Asit+160 mg/L Timentin+125 mg/L Sefotaksim içeren seleksiyon besisi ortamına transfer edilmiştir. Seleksiyon besisi ortamına alınan eksplantlar 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyodunda 25 °C’de bitki büyütme kabininde kallus oluşturmak üzere inkübasyona bırakılmıştır. Her bir petri kabına yaklaşık 8 eksplant yerleştirilmiş ve her çalışmada 50 eksplant kullanılmıştır. 4-5 hafta sonra, rejenere sürgünler (2-4 cm) MS+0.5 mg/L IAA+ 10 mg/L Higromisin+160 mg/L Timentin içeren köklendirme ortamına aktarılmış ve devamında toprak ve torf (1:1) karışımı içeren saksılara transfer edilmiştir.

5.6.5.5. Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Aklimatizasyonu

Doku kültüründen elde edilen bitkilerin aktarılacağı tüm saksılar çamaşır suyu ile yıkanarak temizlenmiştir. Torflar Buzdolap poşetlerine doldurularak otoklav yardımı ile iki defa 121°C’de 20 dk bekletilerek steril edilmiştir. Steril torflar 1 Lt’lik saksılara doldurularak hazırlanmıştır. 1 Lt ‘lik steril kavanozlarda bulunan steril bitkiler köklerine zarar vermeden dikkatli bir şekilde kavanozdan çıkarılarak köklerinde bulunan fazla MS besiyeri musluk suyu ile yıkanmıştır. Daha sonra bitkilerin torf içeren saksılara dikimi gerçekleştirilmiştir. Bitkiler 0,5 mg/L IAA içeren Hoagland solüsyonu ile sulanmıştır. Sulama yapıldıktan sonra saksılara bir çubuk dikilerek bitkilerin nem kaybını engellemek ve dış ortama uyumunu sağlamak için buzdolabı poşeti ile kapatılmıştır. Bitkiler iklim odasına 16/8 saat aydınlık /karanlık periyotta 25 °C’de büyümeye bırakılmıştır. Dikim işleminden 3 gün sonra saksıların

üzerinde bulunan buzdolabı poşeti çıkarılmış, 1-2 saat bekletildikten sonra tekrar takılmış, 12. gün ise tamamen çıkarılmıştır. 20 gün sonra bitkiler 30 Lt'lik saksılara transfer edilerek hasat dönemine kadar haftada bir hoagland solüsyonu ve NPK gübresi suda çözülerek sulanması gerçekleştirilmiştir.

5.6.6. T0 Aday Bitkilerin Moleküler Olarak Belirlenmesi

Aday genom düzenlenmiş bitkilerden ve gen aktarılmamış Crocker bitkilerinden genomik DNA izolasyonu Quick-DNA™ Plant/Seed Miniprep Kit (Zymo Research) kiti kullanılarak firmanın önermiş olduğu protokole göre yapılmıştır. Higromisin geni içeren tüm genom düzenlenmiş T0 bitkiler *HptII* spesifik primerleri kullanılarak PCR ile kontrol edilmiştir. PCR bileşenleri Tablo 5.6'de ve koşulları Tablo 5.7'da verilmiştir. PCR işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerine 3 µl 6x yükleme boyasından eklenerek %0,8'lik agaroz jelde Biorad jel elektroforez cihazında 90 volt 45 dakika yürütülmüştür. PCR ürünlerinin yüklendiği bu aragoz jelde beklenen bant büyüklüğüne sahip bitkiler pozitif olarak kabul edilmiş ve sanger dizilemeye gönderilmiştir.

Tablo 5.6. Aday genom düzenlenmiş T0 bitkilerin belirlenmesinde kullanılan PCR bileşenleri

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

Tablo 5.7. Aday genom düzenlenmiş T0 bitkilerin belirlenmesinde kullanılan PCR protokolü

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

5.6.7. Genom Düzenlenmiş Bitkilerde Mutasyon Analizleri

SIPHD_MS1 geninde meydana gelen mutasyonları belirlemek için örneklerden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu Plant/Seed DNA Mini Prep. (Zymo research) kiti kullanılarak yapılmıştır. PCR sonuçlarına göre pozitif

transgenik bitkiler tespit edilmiştir. Teorik olarak genom düzenlenmiş bitkilerde mutasyonları belirlemek amacıyla *SIPHD_MS1* gen bölgesinde gRNA19 ve gRNA25'in hedeflediği bölgeleri kapsayacak şekilde NCBI primerblast ile primer dizayn edilmiş ve PCR ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonu *SIPHD_MS1* genine spesifik primeler kullanılarak Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs# M0530L, USA) ile oluşturulmuştur. PCR koşulları ve bileşenleri Tablo 5.8 ile Tablo 5.9'de verilmiştir. PCR ürünleri %0,8'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra jelde izole edilmiştir. PCR ürünlerinde mutasyonların tespiti için sanger sekanslama kullanılmıştır. Sanger dizileme ile elde edilen diziler veri tabanlarında bulunan hedef gen dizileriyle karşılaştırılmıştır. *SIPHD_MS1* geninin yabani tip referans sekansı ile karşılaştırılmıştır. Bitkilerden elde edilen mutasyon ile fenotipik değişiklikler incelenerek mutasyon frekansı Synthego ICE ile belirlenmiştir.

Tablo 5.8. T0 bitkilerinde Phusion High-Fidelity DNA polimeraz PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
5X Phusion HF Buffer	4
10 mM dNTPs	0,4
10 µM Primer F	1
10 µM Primer R	1
Template DNA 100 ng/µl	2
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	0,2
DMSO	1
Nüklea free su	10,4
Toplam	20

Tablo 5.9. To bitkilerinde Phusion High-Fidelity DNA polimeraz PCR koşulları

Sıra	Sıcaklık	Süre	Döngü
1	98 °C	3 dk	1 döngü
2	98 °C	10 sn	
3	57	30 sn	34 döngü
4	72 °C	20 sn	
	72 °C	5 dk	1 döngü
5	4 °C	Store	1 döngü

5.6.8. Genomu Düzenlenmiş Bitkilerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

SIPHD_MS1 geni hedeflenen mutant bitkiler fenotipik olarak kontrol bitkileri ile karşılaştırılmıştır. *SIPHD_MS1* geni hedeflenen mutant hatların kontrol bitkilere göre çiçek yapıları, polen canlılıkları ve morfolojik görüntüleri karşılaştırılmıştır.

5.6.9. Genom Düzenlenmiş Bitkilerin Polen Canlılıklarının Belirlenmesi

Çalışmada yer alan bitkilere ait çiçek tozlarının canlılık düzeylerini belirleyebilmek için 2.3.5 *Triphenyl Tetrazolium Chloride* (TTC) kullanılarak yapılmıştır.

10 ml TTC çözeltisi hazırlamak için önce 0,1 g TTC, 1 ml steril saf su içinde çözölmüş, ayrıca 6 g sakkaroz 9 ml saf su içinde eritilmiş ve ayrı ayrı hazırlanan bu iki karışım bir 50 ml'lik falkon tüp içerisinde birleştirilip karıştırılmıştır. Falkon tüp alüminyum folyo ile sarılarak ışık alması engellenmiştir. Daha sonra denemede yer alan mutant bitki hatları ile gen aktarılmamış Crocker bitkilerinden çiçek tozları 1.5 ml'lik santrifüj tüpler içerisine polenler toplanmıştır. Her biri için 2'şer lam hazırlanmış ve lamin her iki tarafına bir damla TTC damlatılmıştır. Damlanın üzerine sulu boya fırçasıyla polen ekimi yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra damlanın üzeri kabarcık kalmayacak şekilde lamelle kapatılmıştır. TTC boya maddesi çiçek tozlarının ekiminden 3 saat sonra boyanmalarını sağlamıştır. Lamin her iki ucunda da 5'şer bölgede ışık mikroskobunda sayım yapılmıştır. Işık mikroskobunda yapılan gözlemler sonucu TTC boya maddesi ile boyanmayan çiçek tozları cansız, pembe renk olan çiçek tozları yarı canlı, kırmızıya boyanan çiçek tozları ise canlı olarak değerlendirilmiştir. Lamin 3 farklı bölgesinde 100'er adet polen sayılarak kırmızıya boyanan çiçek tozlarının oranına göre hesaplama yapılmıştır.

5.6.10. Eş-İfade Analizi

Co-expression analizi için Genevestigator 9.0.0 (<https://genevestigator.com/>) yazılımı kullanılmıştır. Domatesde erkek kısırlık ile ilgili expression verisi bulunmadığı için analiz *Arabidopsis thaliana* üzerinden gerçekleştirilmiştir. İlk adım olarak erkek kısırlık ile ilgili anahtar kelime araştırması yapılarak data seçimi yapılmıştır. Daha sonra ikinci adımda ilgilenilen *SIPHD_MS1* (*Solyc04g008420*) geninin *Arabidopsis*'deki homoloğu olan *AT5G22260* geni seçilmiştir. Üçüncü adımda Co-expression aracı kullanılmıştır. Bu işlemde *AT5G22260* geni ile pozitif korelasyona sahip en çok eksprese olan 20 gen seçilmiştir. Seçim işleminde 0.99 korelasyon katsayısı kullanılmıştır ve genimizle birlikte en çok ifade olan diğer genler analiz edilmiştir. En son olarak ta en çok ifade olan bu genlerin anatomi analizi ve hiyerarşik gruplama yapılmıştır. Bu analizden sonra en çok ifade olan genlerden 3 tanesi seçilerek QPCR'da ifade analizleri gerçekleştirilmiştir.

5.6.11. T0 Genom Düzenlenmiş Bitkilerden RNA İzolasyonu ve Kantitatif RT-qPCR

RNA izolasyonuna başlamadan önce kullanılacak olan saf su, havanlar, mikrosantrifüj tüpler, pipet uçları, pensler ve diğer tüm malzemeler 2 kere otoklavda steril edilmiştir. Porselen havan ve mikrosantrifüj tüpler kullanılmadan önce Invitrogen™ RNaseZap™ RNase Decontamination Solution (AM9780) ile silinerek, sıvı azot ile muamele edilmiştir. RNA izolasyonu, Direct-zol RNA Miniprep Plus Kit (R2070) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen toplam RNA'nın kalitesi ve miktarı %1.5'lik agaroz jel ve Nanodrop spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Bir mikrogram RNA alınarak Biorad iScript™ cDNA Synthesis Kit (1708891) kullanılarak tablo 5.10'deki gibi hazırlanmış ve cDNA sentezi kitin protokolüne (tablo 5.11) göre yapılmıştır.

Tablo 5.10. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

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

Tablo 5.11. cDNA sentezi PCR koşulları

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

SIPHD_MS1 (*Solyc04g008420*) geni ile Genevestigator yazılımında analiz edilen ve pozitif eş-ifadeye sahip *Solyc01g095080* (*ACS1*), *Solyc04g007380* (*PR5K*), *Solyc02g079120* genlerin ifadesi QPCR ile tespit edilmiştir. QPCR işlemlerinde 1 µg cDNA kullanılmıştır. GoTaq® qPCR A6001 mix ile QPCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler 3 teknik tekrarlı olarak hazırlanmıştır. Çalışmada gen ifadesinin belirlenebilmesi için domates *Ubikuitin* geni internal kontrol geni olarak kullanılmıştır. QPCR'da kullanılan primerler ve sekansı EK5'de sunulmuştur. PCR bileşenleri Tablo 5.12 ve protokolü Tablo 5.13'de verilmiştir.

Tablo. 5.12. RT-qPCR sentezi reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Reaksiyon hacmi (µl)
GoTaq® qPCR A6001 mix, 2X	10
Forwar Primer (10 uM)	0,5
Reverse Primer (10 uM)	0,5
cDNA	1
Nükelaz free su	8
Total hacim	20

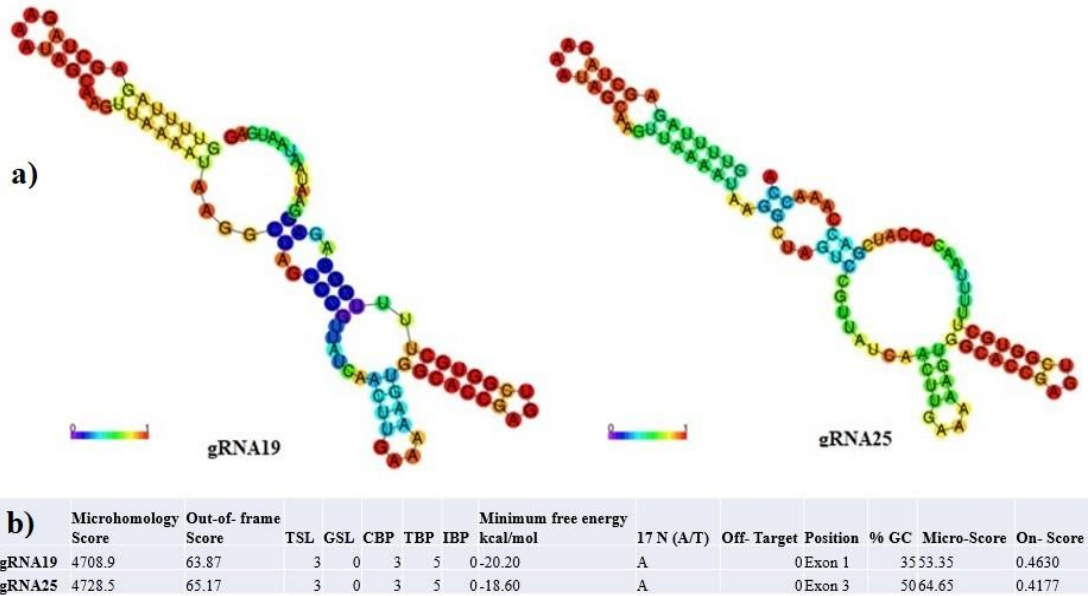
Tablo 5.13. RT-qPCR koşulları

Reaksiyon basamağı	Sıcaklık °C	Süre	Döngü
Polimeraz aktivasyon sıcaklığı	95	2 dk	1
Denatürasyon	95	3 sn	40
Bağlanma/ uzama	60	30 sn	
Melt curve analiz	65-95 (0,5 derece artılır her 5 döngüde)	--	
Store	4	süresiz	

6. BULGULAR

6.1. gRNA dizayn edilmesi

SIPHD_MS1 (*Solyc04g008420*) genine ait nükleotid sekansları Phytozome v12 veritabanı kullanılarak elde edilmiştir. Daha sonra CRISPR P.2.0 programı kullanılarak öncelikle *SIPHD_MS1* genini exon 1 ve diğer exonlarını hedefleyen gRNA dizaynı gerçekleştirilmiştir. Etkili bir gRNA elde etmek için GC içerikleri, gen üzerindeki lokasyonları, off-target kapasitesi ve 17. Nükleotid A ve T bazının bulunması gibi kriterler baz alınarak tasarlanmıştır. (Mohr, 2016; Liu, 2020). Tasarlanan gRNA'lar "MFE secondary structure", "Centroid secondary structure" ve RNA free enerjilerinin kontrolü RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RFold.cgi>) kullanılarak yapılmıştır. Dizayn edilen 19 nükleotid uzunluğunda gRNA'lar primer olarak sentezletilmiştir. *SIPHD_MS1* gRNA19 ve gRNA25'in scaffold ile oluşturduğu sekonder yapıları RNAfold webserver görüntüsü şekil 6.1'de verilmiştir.



Şekil 6.1. *SIPHD_MS1* gRNA19 ve gRNA25'in scaffold ile oluşturduğu sekonder yapıları RNAfold webserver görüntüsü

6.2. CRISPR/Cas9 vektörü pHSE401'in oluşturulması

6.2.1. DT1T2 PCR Reaksiyonunu gerçekleştirilmesi

6.2.2. DT1 PCR ürünlerinin jelden izolasyonu

PCR ürünlerinin jelden izolasyonu ‘‘NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up’’ (MG) kiti kullanılarak yapılmıştır. Ultraviyole ışık altında bir bistüri yardımı ile istenilen bant jelden kesilerek 1.5 ml’lik santrifüj tüpe alınmış ve tartılmıştır. Her bir 100 mg agaroz jel için %2 tampon NTI eklenmiştir. Agaroz jel tamamen çözünene kadar 50 °C’de tutulmuş, 2-3 dakikada bir hafifçe vortekslenmiştir. Daha sonra örnekler NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kolona transfer edilerek 11,000 x g’de 30 s santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde kalan sıvı atılmıştır. NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column’a 700 ul NT3 buffer eklenerek 11,000 x g’de 30 s santrifüj edilerek toplama tüpünde kalan sıvı atılmıştır. Bu adım tekrar edilmiştir. Toplama tüpünde kalan sıvı atılarak buffer NT3 kalıntısı olmaması için NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column’a 700 ul NT3 buffer eklenerek 11,000 x g’de 60 s santrifüj edilmiştir. NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kolonu 1.5 ml’lik santrifüj tüpüne alınarak 50 ul nükleazsız su eklenmiştir. Plazmit büyüklüğü yaklaşık 18,500 bp olduğundan nükleazsız su önceden 70 °C’ye ısıtılarak eklenmiştir ve su eklenen tüpler etüv içerisinde 5 dakika 70 °C inkübe edilerek 11,000 x g’de 60 s santrifüj edilmiştir. Jel ekstraksiyon ürünlerinin miktar ve kalite tayini Thermo Fisher NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer’de belirlenmiştir (Tablo 6.1).

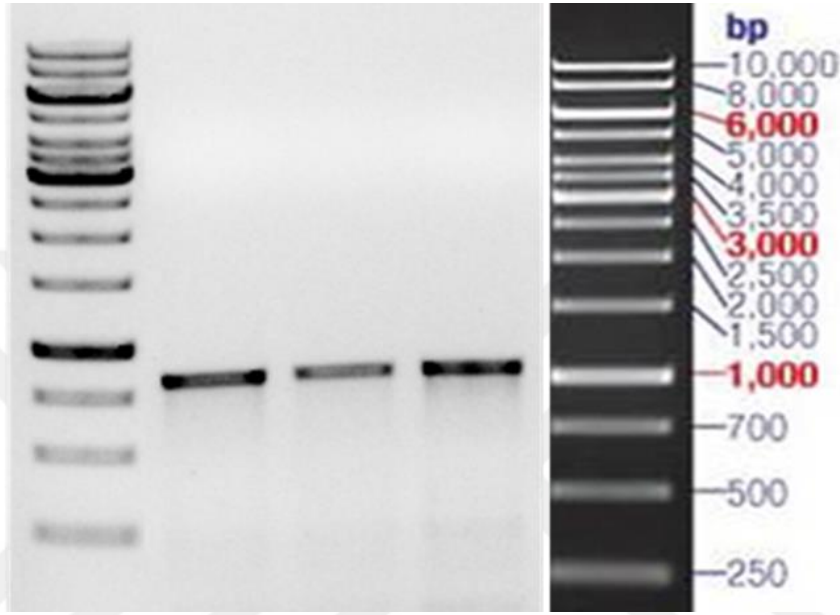
Tablo 6.1. PCR ürünleri Jelden ekstraksiyon Nanodrop sonuçları

PCR Ürünü Adı	Konsantrasyonu	A260/230 oranı	A260/280 oranı
DT1 PCR1	34 ng	1,79	1,82

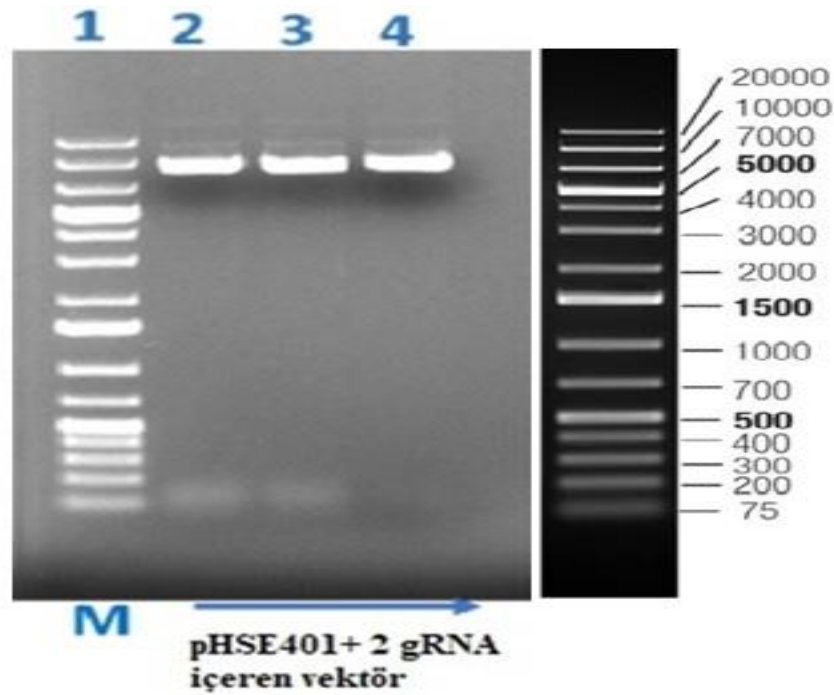
6.2.3. Golden Gate Reaksiyonu ve Ligasyon Ürünlerinin *E. coli* bakterisine Transferi

SIPHD_MS1 genini hedef alan gRNA’lar PCR sonucunda oluşturulan gen kasetlerinin pHSE401 vektöründe birleştirilmesiyle CRISP/Cas9 ifade vektörü elde edilmiştir. Klonlama aşaması tamamlandıktan sonra elde edilen vektör kompetant *E. coli Dh5α* bakterisine ısı şok yöntemi ile aktarılmıştır. Transformasyon sonrasında elde edilen bakteriler 50 mg/L kanamisin içeren katı LB besiyerine yayılarak 17 saat 37°C’de inkübasyon sonrasında tek koloniler gözlemlenmiştir. Doğru kolonileri belirlemek amacıyla U6-26p-F ve U6-29p-R primerleri kullanılarak koloni PCR yapılmıştır. PCR sonucu belirlenmiş olan kolonilerden plazmit izolasyonu yapmak

için bakteriler, içerisine 50 mg/L Kanamisin eklenmiş 10 ml sıvı LB besin ortamında 37 °C 200 rpm’de 1 gece boyunca inkübatörde büyütölmüştür. Plazmit izolasyonu için Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep kit kullanılmış ve ilgili firmanın protokolü takip edilmiştir. Plazmitlerin varlığı ve konsantrasyonu NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre ile öölölmüştür. Ardından plazmitler % 0,4’lük agaroz jelde yürütölerek kontrol edildikten sonra sanger dizilemeye gönderilmiştir.



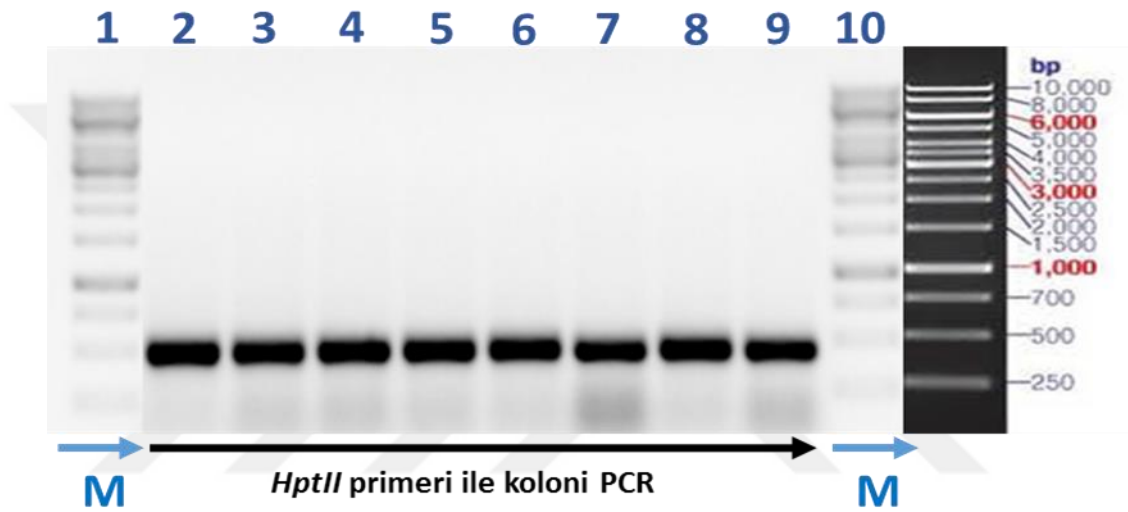
şekil 6.4. U6-26p-F ve U6-29p-R primerleri ile yapılan koloni PCR jel göröntüsü



şekil 6.5. pHSE401+ 2 gRNA plazmitinin % 0,4’lük agaroz jel göröntüsü

6.2.4. pHSE401+ 2 gRNA plazmitlerinin Kompetan *Agrobacterium* Gv3101 suşuna transferi

Sanger dizileme sonucunda gRNA klonlaması başarılı olan plazmitler *Agrobacterium GV3101* suşuna elektroporasyon yöntemi ile transfer edilmiştir. Katı besi ortamında 2 gün süre büyümeye bırakıldıktan sonra oluşan koloniler PCR ile doğrulanmıştır. Koloni PCR *HptII* primerleri ile yapılmış ve 455 bp bantlar (Şekil 6.6) elde edilmiştir. Doğrulama yapılan bateriler stok oluşturularak gen aktarım çalışmasında kullanılmıştır.



Şekil 6.6. *Agrobacterium Gv3101* *hptII* primerleri ile koloni PCR yapılması. 1 ve 10: GeneRuler 1kb DNA markör (SM0311). 2-9: *SIPHD_MS1* hatları

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

SIPHD_MS1 geninde istenilen yönde mutasyonlar oluşturmak için *Agrobacterium tumefaciens GV3101* suşu kullanılarak 8 günlük domates fidelerinin kotiledonlarına transformasyon yapılmıştır. Her bir gRNA için toplam 50 kotiledon eksplantı kullanılmıştır. Transformasyondan 14-15 gün sonra kallus oluşumu başlamış ve 30 gün sonra ise varsayımsal genom düzenlenmiş bitkiler oluşmuştur. Transformasyon sonucunda elde edilen varsayımsal transgenik ve genomu düzenlenmiş 7 hat Tablo 6.2’de gösterilmiştir. Elde edilen bitkicikler köklendirme besi ortamına alınarak köklendirilmiştir. Doku kültürü ortamında köklendirilen bitkiler torf ve toprak içeren saksılara alınarak iklim odasında büyütülmüştür (Şekil 6.7).

Tablo 6.2. Transformasyon sonucunda elde edilen transgenik ve genom düzenlenmiş hatların miktarı

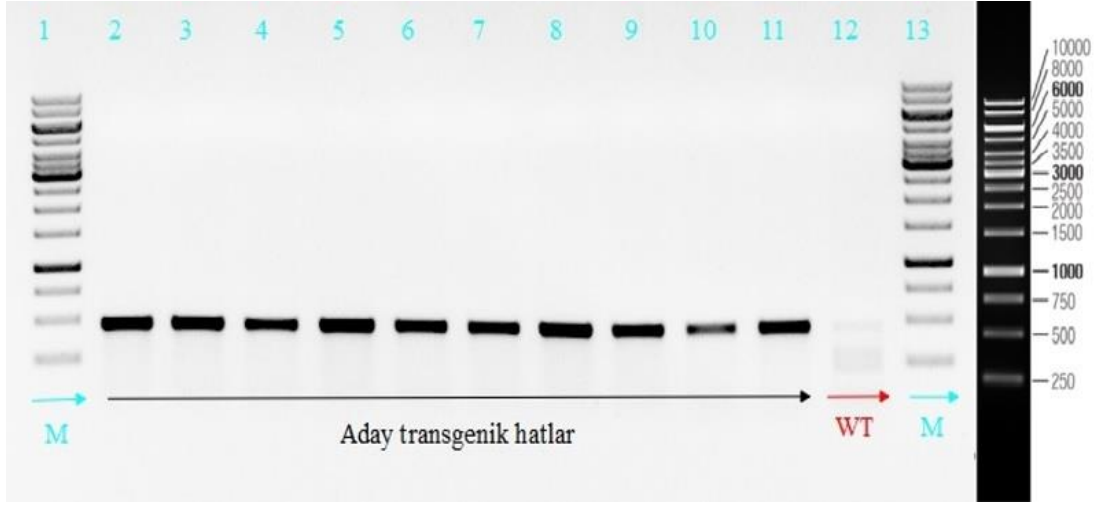
Genotip	Binary Vektör	Transforme edilen eksplant sayısı	Rejenere Bitki	Mutant Hatlar	Mutasyon Oranı
Crocker	pHSE401-SIPHD_MS1	50	20	7	% 14



Şekil 6.7. *Agrobacterium* aracılı gen aktarım sonrasında genom düzenlenmiş bitkilerin yetiştirilmesi. (a): Trasforme edilen eksplantların seleksiyon besi ortamına alınması. (b): Rejenere olan trasngenik bitkicikler. (c): 2-3 cm boyutlarında bitkiciklerin köklendirme besi ortamına alınarak köklendirilmesi. (d-e): Köklenen trasngenik bitkilerin saksıya alınarak akklimizasyonu ve nem kaybının önlenmesi. (f): Bitkilerin 30 Lt'lik saksılara transferi. (g): Bitkilerin iklim odasında büyütülmesi

6.2.6. T0 Transgenik Mutant Aday Bitkilerin Moleküler Olarak Tanımlanması

Gen aktarım çalışmalarıyla elde edilen transgenik adayı domates bitkileri iklim odasında 25 °C'de 16-8 saat aydınlık/karanlık periyotta büyütülmüştür (Şekil 6.7). Elde edilen transgenik adayı bitkilerin transgenik olup, olmadıkları PCR analizleri ile belirlenmiştir. Transgenik adayı domates bitkilerinin teyit edilmesi için *HpttII* primerleri kullanılmıştır. Yapılan analiz sonucunda toplam *SIPHD_MS1* mutant hatların tamamı transgenik olarak belirlenmiştir. Yapılan PCR sonuçlarıyla ilgili jel görüntüleri şekli 6.8'de gösterilmiştir. Transgenik oldukları belirlenen mutant hatlar muhafazaya alınarak hasat dönemine kadar yetiştirilmiştir. PCR sonucunda aday transgenik hatlarda sekans ile mutasyon analizi yapılmıştır. PCR sonucunda pozitif çıkan tüm bitkiler altkültüre alınmıştır.



Şekil 6.8. Aday transgenik ve gen aktarımı yapılmamış crocker bitkilerinde *HptII* geni ile yapılan PCR sonucu. 1 ve 13: GeneRuler 1kb DNA markör (SM0311). 2-11 Aday transgenik hatlar. 12: kontrol wt

6.2.7. Genomu Düzenlenmiş Bitkilerin Morfolojik Tanımlanması

Erkek kısır domates hatları elde etmek için *SIPHD_MS1* geninin hedeflenmesi sonrasında toplam 7 hat elde edilmiştir. Bitkiler hasat dönemine kadar iklim odasında büyütülmüştür. *SIPHD_MS1* mutant hatlar morfolojik olarak gen aktarımı yapılmamış crocker bitkileri ile karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık tespit edilememiştir (Şekil 6.9).

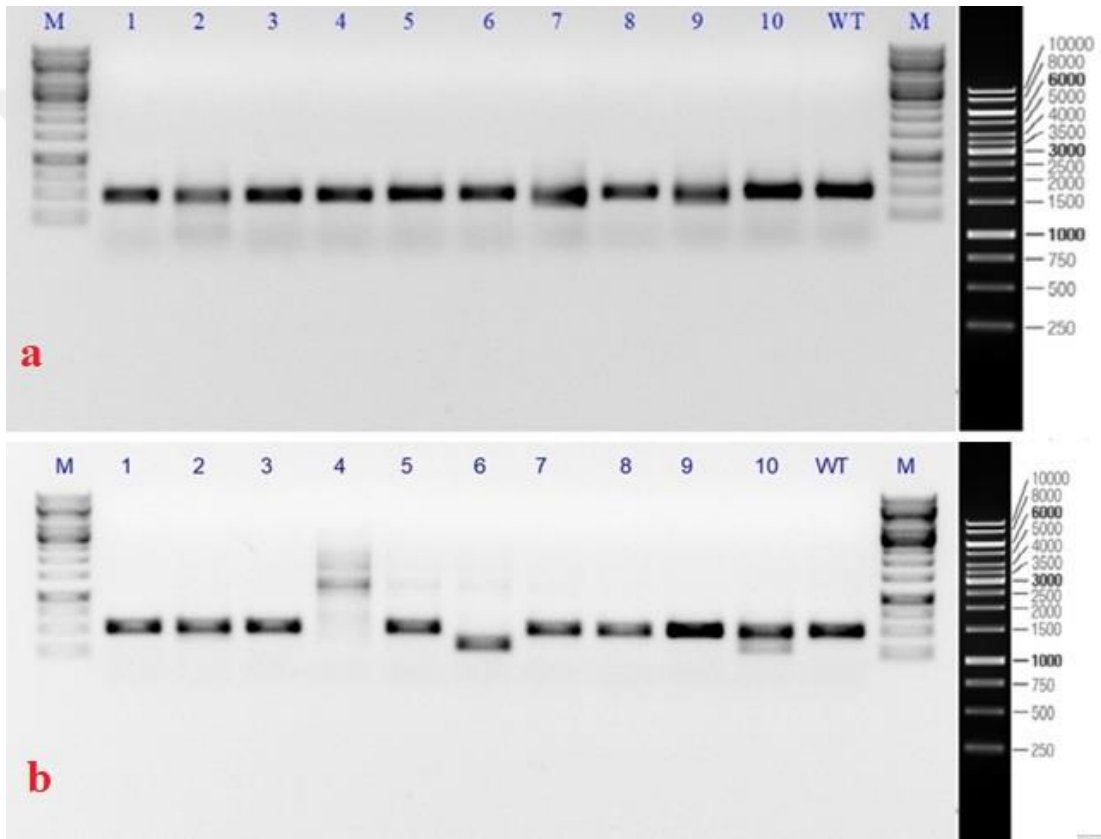


Şekil 6.9. Bitkilerin hasat dönemine kadar iklim odasında büyütülmesi. (a) *SIPHD_MS1* mutant hatlar. (b) Gen aktarımı yapılmamış crocker bitkileri

6.2.8. Genomu Düzenlenmiş Bitkilerde Mutasyon Analizi

SIPHD_MS1 geninde meydana gelen mutasyonları belirlemek için transgenik hatlardan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. *SIPHD_MS1* genine yönelik spesifik

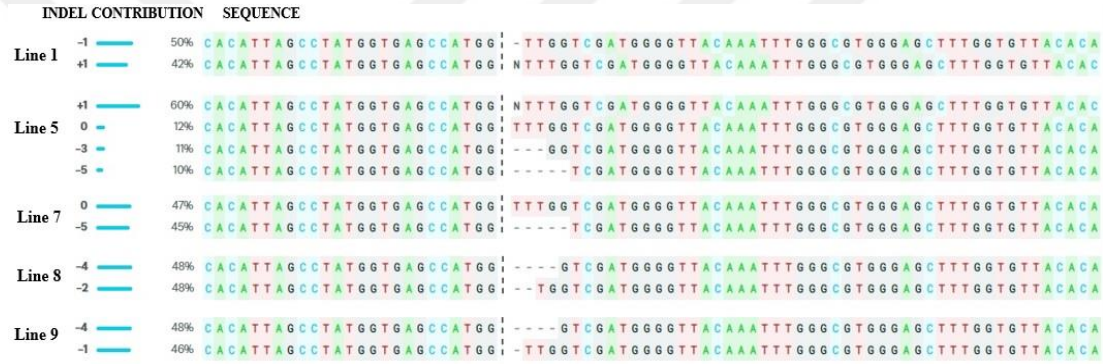
primerler gRNA19 ve gRNA25 bölgelerini kapsayacak şekilde NCBI primerblast kullanılarak tasarlanmıştır. Bu primerler kullanılarak PCR ile *SIPHD_MS1* geni çoğaltılmıştır. PCR sonucunda *SIPHD_MS1* geni gRNA19 için 500 bp, gRNA25 geni için ise 505 bp’de beklenen bantlar elde edilmiş ve sekansa gönderilmiştir (şekil 6.10). Sekans sonuçları WT bitkilerin sekansı ile alignent yapılarak mutasyon analizleri yapılmıştır. Mutasyon oluşması beklenen gRNA hedef bölgesi belirlenmiştir. *SIPHD_MS1* geni hedeflenerek oluşturulan mutasyonlar gen aktarımı yapılmamış crocker bitkilerinin sekanslarına göre analiz edilmiştir. Analizler Synthego ICE (<https://ice.synthego.com/>) ile yapılmıştır.



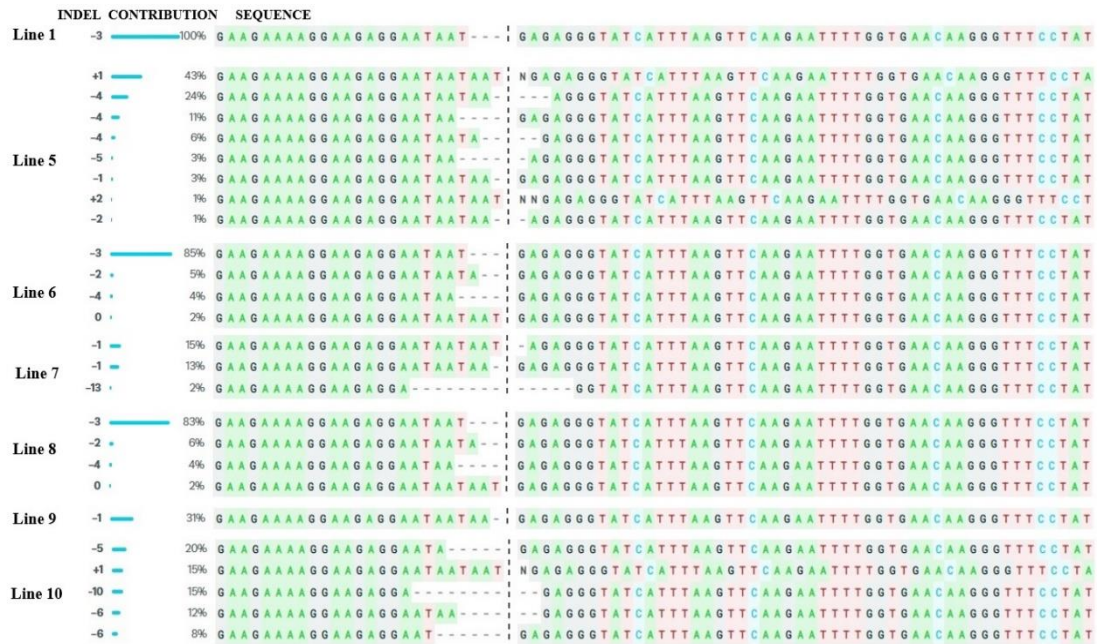
Şekil 6.10. CRISPR/Cas9 ile elde edilen mutant hatlarda ve wt bitkilerde *SIPHD_MS1* genlerinin amplifikasyonu. a) *SIPHD_MS1* geninde gRNA 19 ile oluşturulan mutasyonlu bölgenin PCR ile taranması b) *SIPHD_MS1* geninde gRNA 25 ile oluşturulan mutasyonlu bölgenin PCR ile taranması

Mutant hatlar incelendiğinde homozigot ve heterozigot olmak üzere 2 tip mutasyon olduğu görülmüştür. Hat 1 ve 4 homozigot iken hat 5’in heterozigot olduğu görülmüştür. Geriye kalan hatların biallelik olduğu tespit edilmiştir. Mutant bitkilerde, CRISPR/Cas9 tarafından indüklenen mutasyon değişikliklerinde, insersiyonlar ve delesyonlar görülmüştür. *SIPHD_MS1* geninde gRNA 19 ile oluşturulan homozigot

mutasyonlar analiz edildiğinde Line 1 de PAM sekansının 4-6 bp upstream bölgesinde T, A ve A nükleotidleri silinmiştir. *SIPHD_MS1* geninde gRNA 19 ile oluşturulan heterozigot mutasyonlar analiz edildiğinde Line 5 de PAM sekansının 4 bp upstream bölgesinde G nükleotidi eklenmiş ve diğerlerinde ise upstream bölgelerde delesyonlar olmuştur. Line 6, Line 7, Line 8 de delesyonlar, Line 10 da ise hem delesyon hem de insersiyonlar meydana gelmiştir. *SIPHD_MS1* geninde gRNA 25 ile oluşturulan homozigot mutasyonlar analiz edildiğinde Line 1 de PAM sekansının 4 bp upstream bölgesinde T nükleotidi silinmiştir. *SIPHD_MS1* geninde gRNA 25 ile oluşturulan heterozigot mutasyonlar analiz edildiğinde Line 5 de hem insersiyon hem de delesyon görülmüştür. Line 8 ve Line 9 da PAM dizisinin upstream bölgesinde değişik uzunluklarda delesyonlar görülmüştür.



Şekil 6.11. *SIPHD_MS1* geninde gRNA 25 ile oluşturulan mutasyonlar



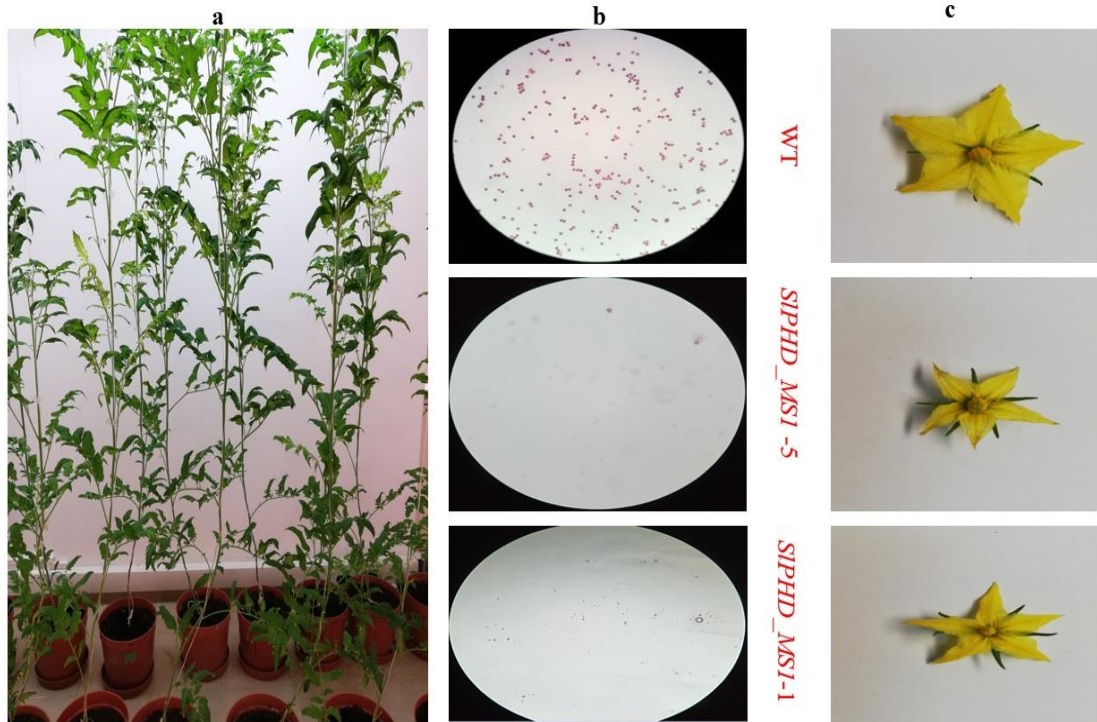
Şekil 6.12. *SIPHD_MS1* geninde gRNA 19 ile oluşturulan mutasyonlar

6.2.9. *SIPHD_MS1* Mutant Hatlarda Polen Canlılığını Kontrolü ve Tohum Oluşumunun Belirlenmesi

Denemede yer alan *SIPHD_MS1* mutant domates bitkileri ve gen aktarımı yapılmamış crocker bitkilerinin çiçek tozu canlılıklarını saptamak amacıyla *TTC* canlılık testleri uygulanmıştır. *TTC* canlılık testinde kırmızı renkte olan çiçek tozları ‘canlı’, pembe boyananlar ‘yarı canlı’ ve hiç boyanmayanlar ise ‘cansız’ olarak değerlendirilmeye alınmıştır (Tablo 6.3). Denemede yer alan çeşitlerde yapılan *TTC* uygulamasında çeşitler arasındaki farklılık belirlenmiştir (Şekil 6.13).

Tablo 6.3. Wt ve mutant bitkilerde polen canlılıklarının kontrolü

Genotipler	Canlılık düzeyleri		
	Canlı %	Yarı canlı %	Cansız %
Crocker (WT)	85,10	10,63	4,25
<i>SIPHD_MS1</i> Hat 5	4	12	84
<i>SIPHD_MS1</i> Diğer Hatlar	0	0	0



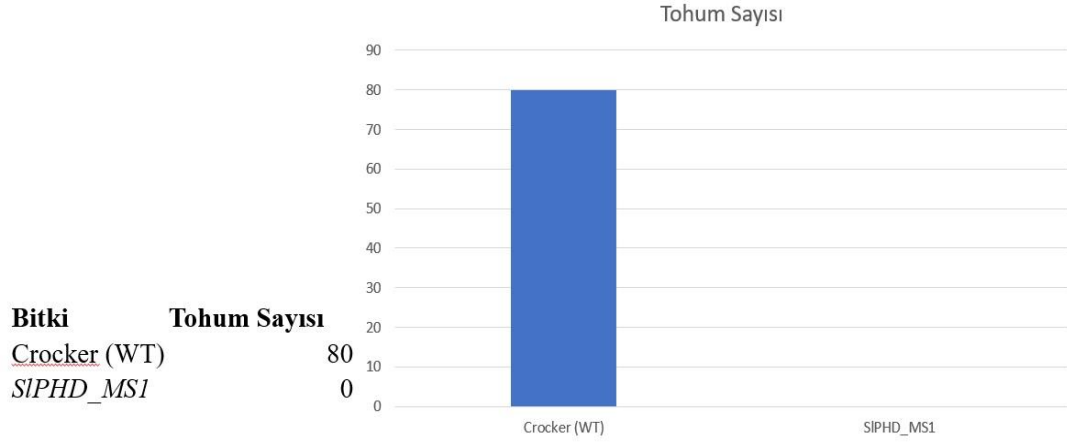
Şekil 6.13. Wt ve *SIPHD_MS1* mutant bitkilerin: a) İklim odasında büyütülmesi. b) *TTC* testi ile polen canlılığın ışık mikroskop görüntüsü. c) Wt ve *SIPHD_MS1* mutant bitkilerin çiçek yapılarının görüntüsü

Polen canlılıkları belirlenen mutant hatlarda polen oluşumu engellendiğinden dolayı bu hatların meyvelerinde tohum oluşumu gözlenmemesi gerekir. Meyve

olgunlaşması tamamlanan domates bitkilerinde hasat yapılarak tohum oluşumları kontrol edilmiştir. Bunların yanı sıra bitkilerde meyve şekilleri meyve odacık sayısı ve bitkilerde oluşan salkım sayısı mutant ve wt bitkiler ile karşılaştırılmıştır. WT ve *SIPHD_MS1* mutant hatlarda salkım sayısı 4 olarak belirlenirken bitkilerin meyve odacık sayıları ise 2 olarak gözlemlenmiş, mutant ve kontrol bitkilerinde farklılık gözlemlenmemiştir. Şekil 6.13c’de gösterildiği gibi Wt ve mutant hatların, çiçek yapısı, çiçek rengi gibi diğer morfolojik özellikler bakımından da farklılık gözlemlenmemiştir. Şekil 6.14’de görüldüğü gibi Wt, *SIPHD_MS1* mutant hatlarında 10 adet meyvenin toplam tohum sayısı hesaplanarak ortalaması alınmış ve meyve başına tohum sayıları belirlenmiştir. Wt bitkilerin meyve başına tohum sayısı 80 olarak gözlemlenirken *SIPHD_MS1* Genomu düzenlenmiş hatlarda tohum oluşumu gözlenmemiştir. WT bitkilere göre mutant hatlarda %100 tohum oluşumu engellenmiştir (Şekil 6.15).



Şekil 6.14. WT ve *SIPHD_MS1* mutant bitkilerin olgunlaşma sonrasında hasat edilen meyvelerin ve meyvede oluşan tohumların görüntüsü

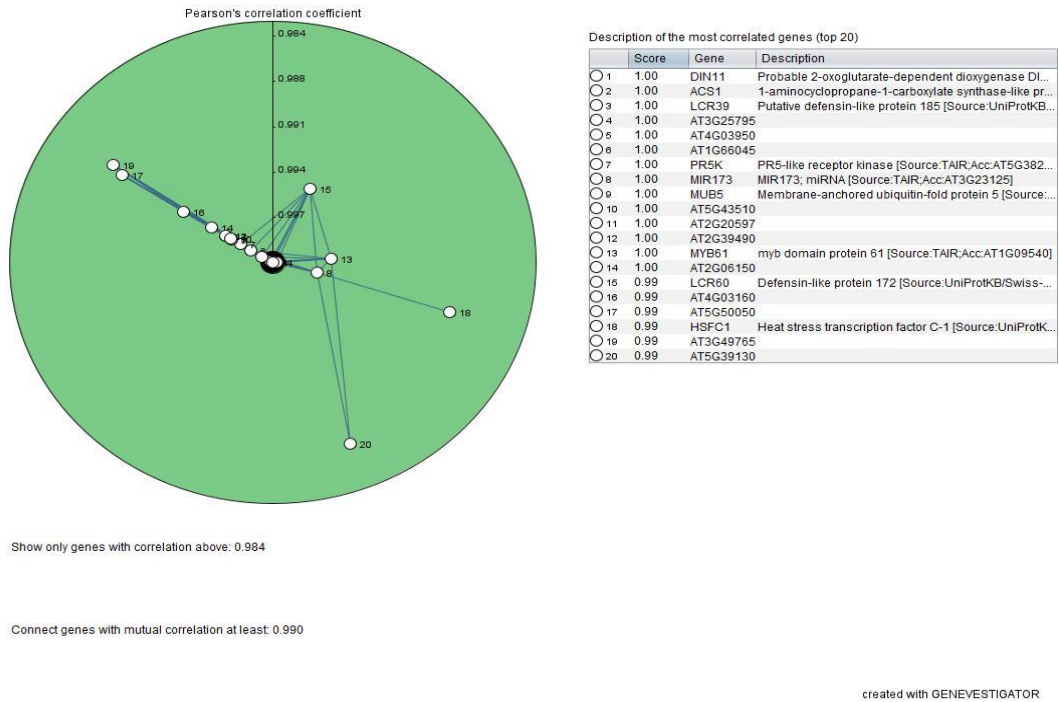


Şekil 6.15. Wt ve *SIPHD_MS1* mutant bitkilerden elde edilen meyve başına tohum sayısı

6.2.10. Eş-İfade Analizi

Eş-ifade analizine göre en çok ifade olan genler şekil 6.16’da verilmiştir. Şekilden de anlaşıldığı üzere bazı genler hakkında atıflandırma bilgisi varken bazıları hakkında literatür bilgisi yoktur ve tam olarak görevleri bilinmemektedir. Aşağıda *AT5G22260* ile birlikte pozitif bir korelasyon ile ifadesi en fazla artan 20 gen verilmiştir. Bu genlerden *AT3G61510* (*ACS1*), *AT5G38280* (*PR5K*) ve *AT2G39490* daha sonra doğrulamak amaçlı domatestte ortologları bulunup QPCR yapılmıştır.

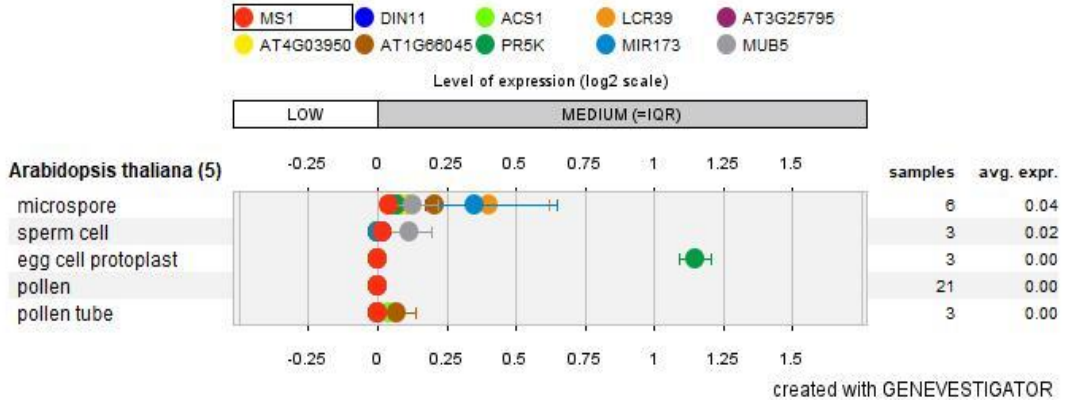
Dataset: 11 perturbations from data selection: DATA-AT_mRNASeq_ARABI_GL-8
Lead Gene: MS1 from selection: AT-2



Şekil 6.16. Genevestigator ile yapılan co-expression analizi

Dataset: 5 anatomical parts from data selection: DATA-AT_mRNASeq_ARABI_GL-8

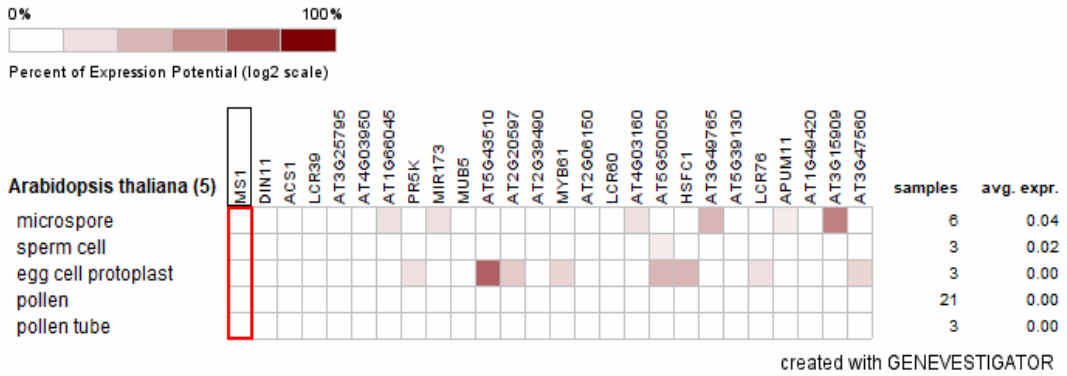
Showing 10 measure(s) of 10 gene(s) on selection: AT-5



Şekil 6.17. *MS1* geni ile farklı anatomik dokularda ifade olan 10 gen

Dataset: 5 anatomical parts from data selection: DATA-AT_mRNASeq_ARABI_GL-8

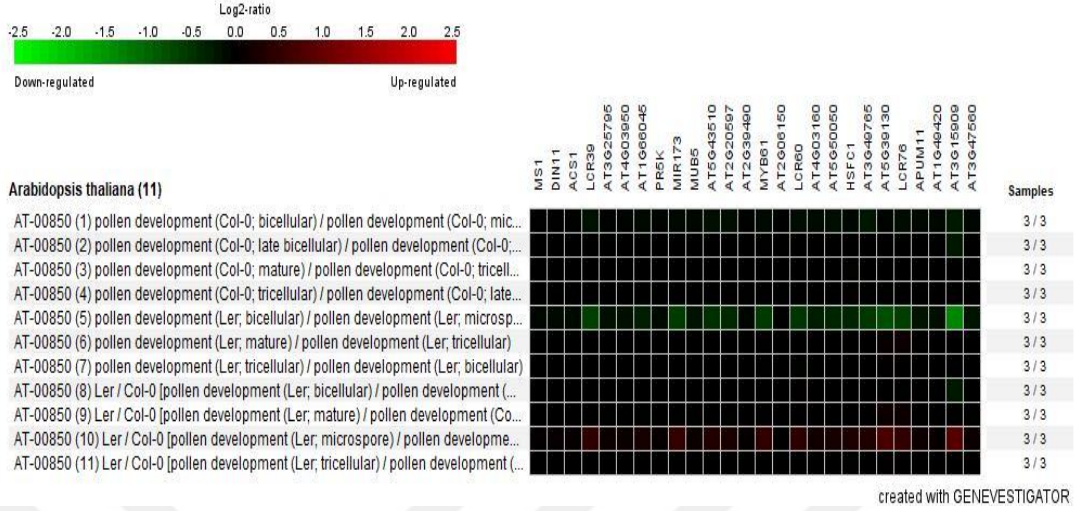
Showing 26 measure(s) of 26 gene(s) on selection: AT-5



Şekil 6.18. *MS1* geni ile farklı anatomik dokularda ifade olan genler ve ekspresyon yüzdeleri

Şekil 6.17 ve Şekil 6.18'te *AT5G22260 (MS1)* ile birlikte pozitif eş-ifade olan genlerin hangi dokularda ifadesinin olduğu görülmektedir. Şekil 6.17'de 10 gen gösterilmişken Şekil 6.18'te genlerin tamamı verilmiştir. Şekil 6.18'te *AT5G22260 (MS1)* geni ile *AT3G49620 (DIN11)*, *AT3G61510 (ACS1)*, *AT3G23167 (LCR39)*, *AT3G25795*, *AT4G03950*, *AT1G77870 (MUB5)*, *AT2G39490*, *AT2G06150*, *AT2G20208 (LCR60)*, *AT5G39130* genleri aynı ekspresyon paternine sahiptirler. Bu veriler de baz alınarak QPCR için seçilen *ACS1* ve *AT2G39490* genlerinin güvenilirliği artırılmıştır. *AT5G38280 (PR5K)* geni ise Şekil 6.17'de görüldüğü gibi hem mikrospor hem de yumurta hücresi protoplastında eksprese olduğundan dolayı QPCR için seçilen genlerden birisi olmuştur.

Dataset: 11 perturbations from data selection: DATA-AT_mRNASeq_ARABI_GL-8
Showing 26 measure(s) of 26 gene(s) on selection: AT-5



Şekil 6.19. Hiyerarşik kümeleme

Şekil 6.19’te, *AT5G22260* (*MS1*) ile en çok ortak ifade olan 25 geni gösteren hiyerarşik kümelemesi, Genevestigator aracı kullanılarak gösterilmiştir. Yeşilden kırmızıya uzanan renk dikdörtgenleri, gen ekspresyon potansiyelinin artışı göstermektedir. Şekilden de anlaşılacağı üzere genlerin ekspresyonu en çok mikrosporda artış göstermekte iken ekspresyonun azaldığı safha ise polen gelişiminin biselular aşamasında olduğu görülmektedir. *AT5G22260* (*MS1*), *AT3G49620* (*DIN11*), *AT3G61510* (*ACS1*), *AT3G25795*, *AT4G03950*, *AT5G38280* (*PR5K*), *AT1G77870* (*MUB5*), *AT2G39490*, *AT2G06150* polen gelişiminin tüm aşamalarındaki ekspresyon deseni aynıdır. Bu hiyerarşik analiz ile *AT3G61510* (*ACS1*), *AT5G38280* (*PR5K*) ve *AT2G39490* genlerinin QPCR için seçilmesinde yol göstermiştir. Bu işlemler bittikten sonra bu genlerin domatesteki ortologları bulunmuş ve QPCR yapılmıştır. Bu genler tablo 6.4’de verilmiştir.

Tablo 6.4. *Arabidopsis thaliana*’daki genlerin *Solanum lycopersicum*’daki ortologları

<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
<i>AT3G61510</i> (<i>ACS1</i>)	<i>Solyc01g095080</i>
<i>AT5G38280</i> (<i>PR5K</i>)	<i>Solyc04g007380</i>
<i>AT2G39490</i>	<i>Solyc02g079120</i>

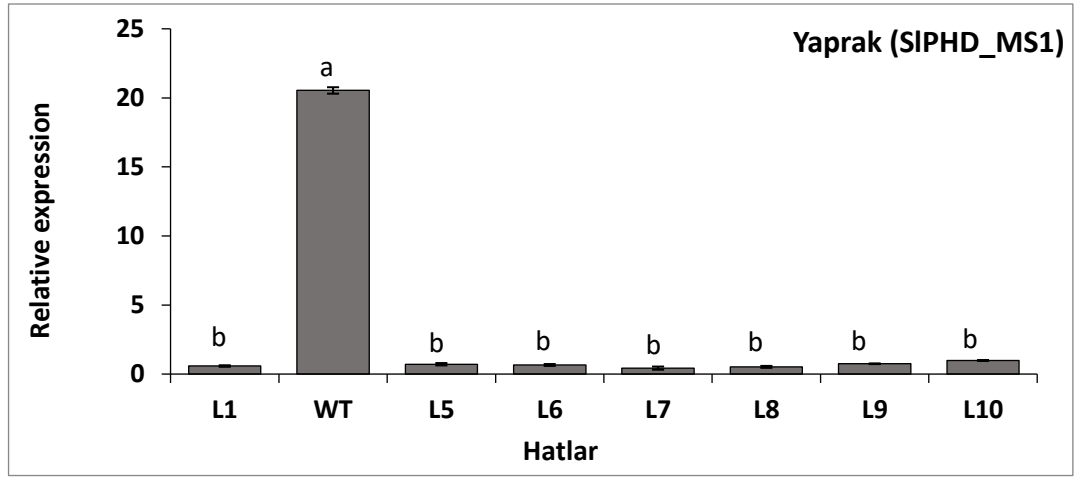
6.2.11. Genomu Düzenlenmiş Mutant Bitkilerde *SIPHD_MS1* geninin RT-qPCR ile Belirlenmesi

Sera koşullarında yetişen bitkilerden çiçek ve yaprak örnekleri alınarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu örneklerden RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA'lar cDNA'ya dönüştürölmüştür. Bu RNA örneklerinden 1000 ng olacak şekilde kullanılıp RT-qPCR yapılmıştır. QPCR işlemleri bittikten sonra sonuçlar Delta-Delta Ct Metod'unu göre hesaplanmıştır. Çıkan sonuçlara göre WT' a göre genomu düzenlenmiş hatlarda genlerin ekspresyonunda gözle görölür derecede bir azalma olmuştur. Bu ekspresyondaki azalma miktarı *SIPHD_MS1* geninde yaprak dokularında yaklaşık 20 kat iken çiçek dokularında 12 kat olduğu görölmüştür (şekil 6.20, şekil 6.21).

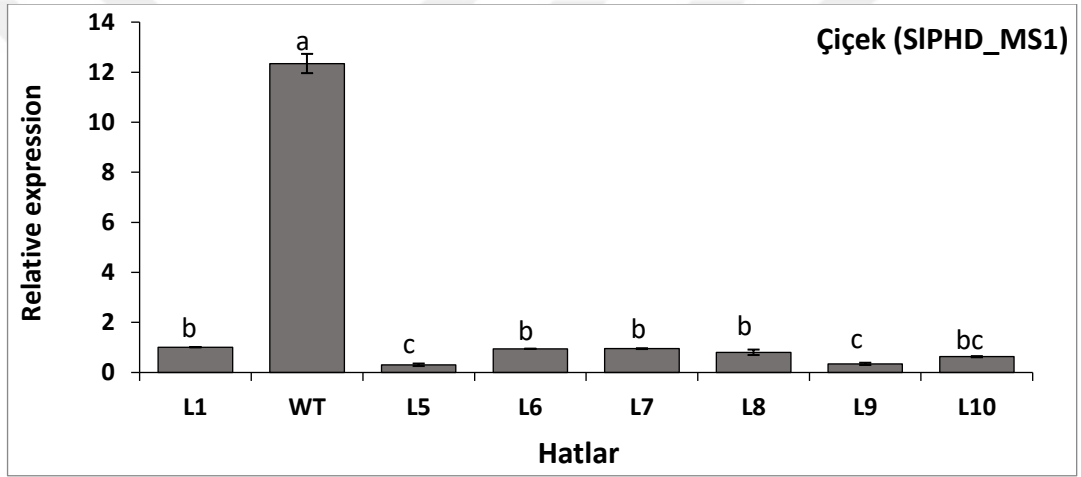
Solyc04g007380 (PR5K) geninin analiz sonuçlarına göre eş-ifade analizindeki sonuçları doğrular nitelikte çıkmıştır. *Solyc04g007380 (PR5K)* geninin ekspresyonu WT'da hem yaprak hem de çiçeklerde artış göstermişken mutant (genom edited) hatlarda ciddi derece gen ifadesi azalmıştır (şekil 6.22, şekil 6.23). *Solyc04g007380 (PR5K)* geninin en düşük ekspresyonu hem yaprakta hem de çiçekte Line 1 iken en yüksek ifadesi ise Line 10'da görölmüştür.

Solyc01g095080 (ACS1) geninin QPCR sonuçlarına bakıldığında *SIPHD_MS1* geni ile birlikte ifade olduğu doğrulanmıştır. *Solyc01g095080 (ACS1)* geninin ekspresyonu gen aktarımı yapılmamış crocker'de hem yaprak hem de çiçeklerde artış göstermişken genom düzenlemesi yapılmış hatlarda ise ifadesi azalmıştır (şekil 6.24, şekil 6.25). *Solyc01g095080 (ACS1)* geninin mutant hatlarda en düşük ifadesi yaprak dokusunda Line 6 ve Line 7'de görölürken en yüksek ifadesi ise Line 5 ve Line 9'da görölmüştür. Çiçek dokularında ise en düşük ifade Line 9 ve Line 10'da görölürken en yüksek ifade Line 1 ve Line 7'de görölmüştür.

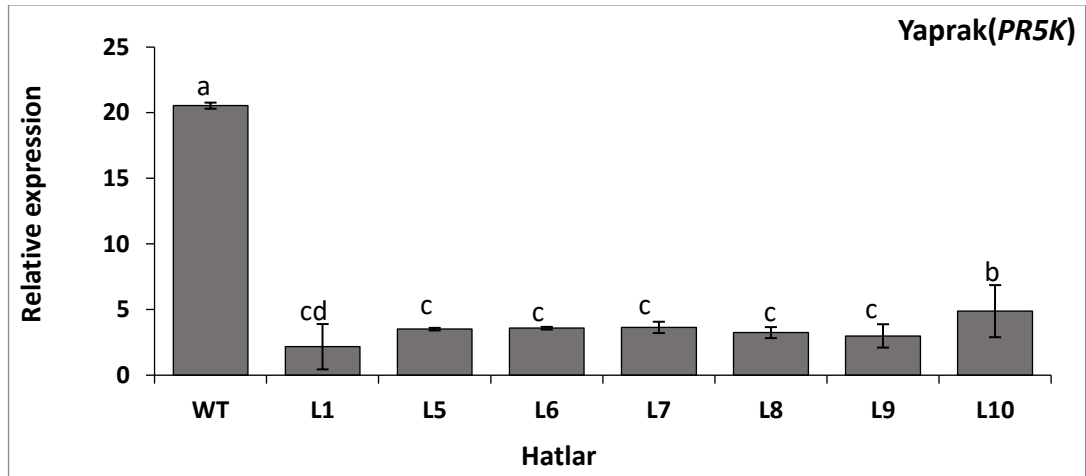
En son olarak da *Solyc02g079120* geninin QPCR sonuçlarına bakıldığında yaprak dokusundaki sonuçlar eş-ifade analizi ile uyurken çiçek dokusundan yapılan QPCR sonuçları uyurmamaktadır (şekil 6.26, şekil 6.27). *Solyc02g079120* geninin mutant hatlarda en düşük ekspresyonu yaprakta Line 7 ve Line 8'de görölürken en yüksek ifadesi ise Line 1 ve Line 9'da görölmüştür. Mutant hatların çiçek dokusundan yapılan QPCR sonuçlarında Line 1 ve Line 7 WT'ye göre düşük iken diğer hatların ekspresyonu ya çok yakın ya da WT'ye göre yüksektir. Bu sonuca göre çiçek dokusundan *Solyc02g079120* geni için yapılan QPCR sonuçları co-expressiona göre uyurmamaktadır.



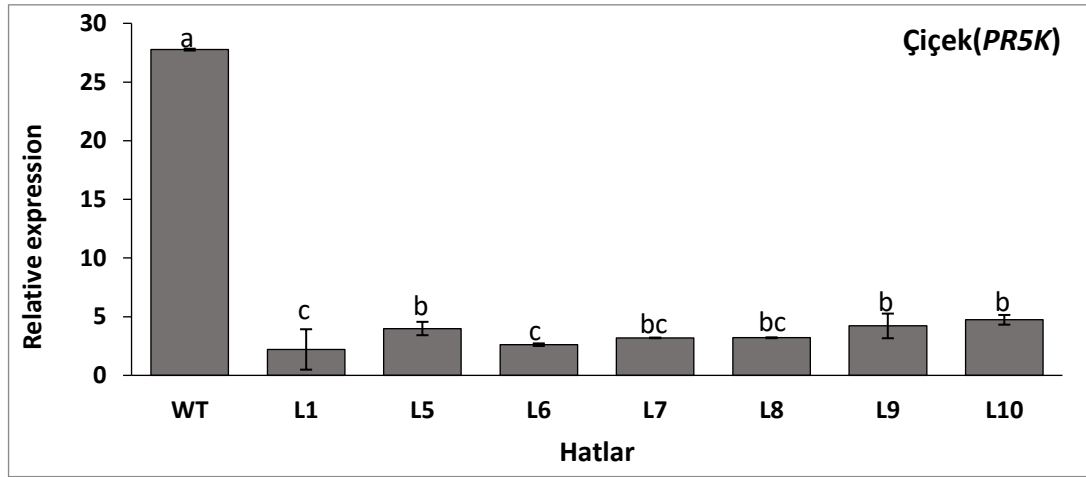
Şekil 6.20. WT ve mutant bitkilerin yapraklarında *SIPHD_MS1* genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi



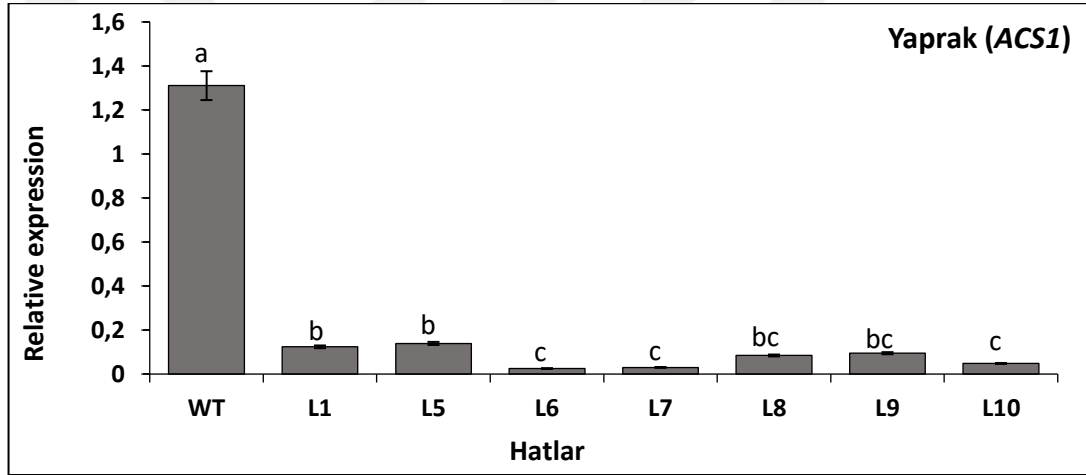
Şekil 6.21. WT ve mutant bitkilerin çiçeklerinde *SIPHD_MS1* genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi



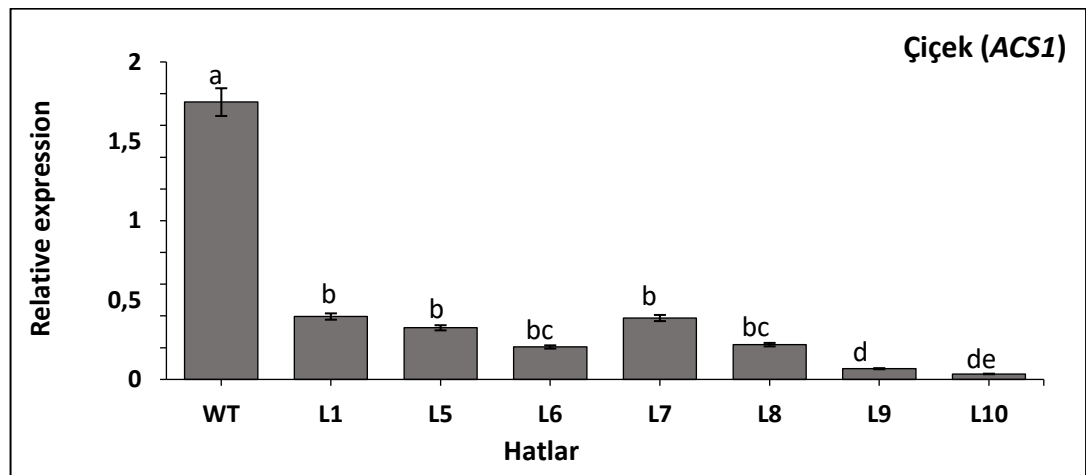
Şekil 6.22. WT ve *SIPHD_MS1* mutant bitkilerin yapraklarında *Solyc04g007380* (PR5K) genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi



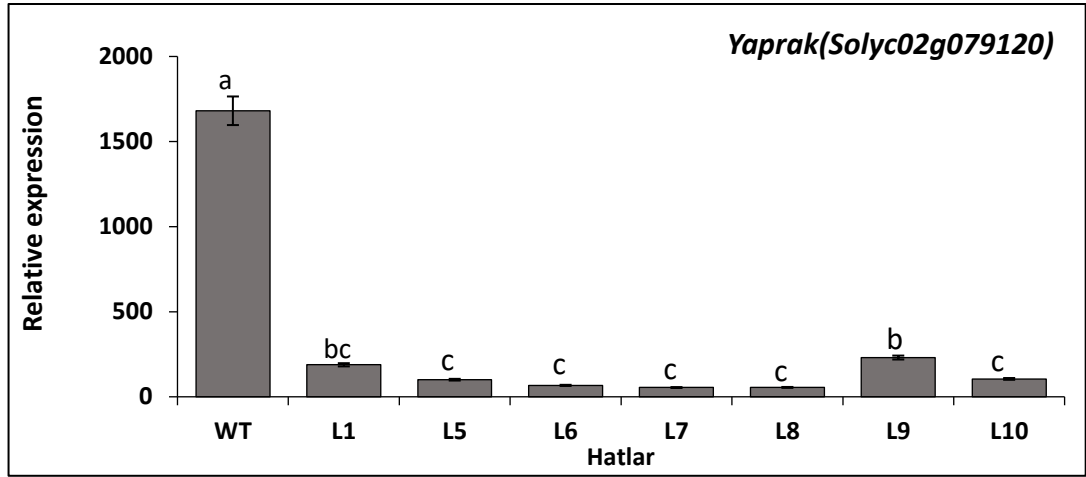
Şekil 6.23. WT ve *SIPHD_MS1* mutant bitkilerin çiçeklerinde *Solyc04g007380 (PR5K)* genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi



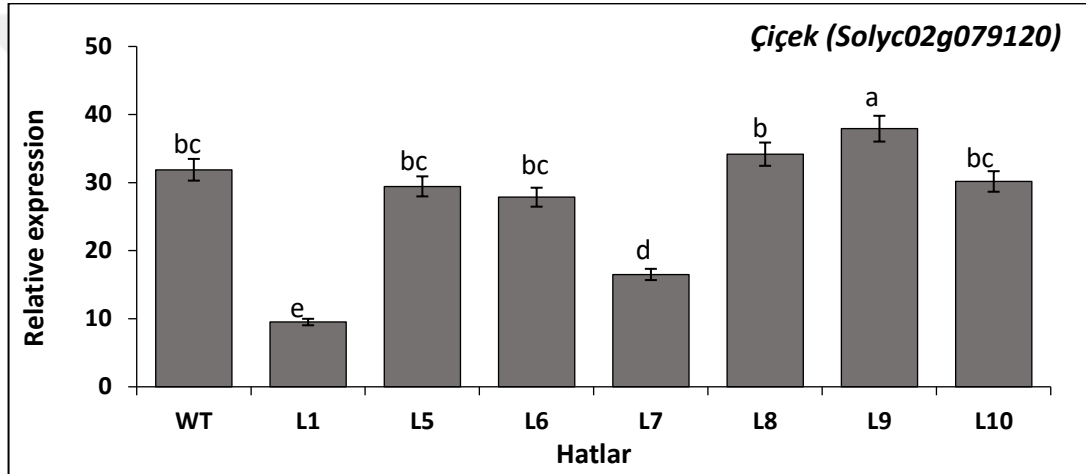
Şekil 6.24. WT ve *SIPHD_MS1* mutant bitkilerin yapraklarında *Solyc01g095080 (ACS1)* genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi



Şekil 6.25. WT ve *SIPHD_MS1* mutant bitkilerin çiçeklerinde *Solyc01g095080 (ACS1)* genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi



Şekil 6.26. WT ve *SIPHD_MS1* mutant bitkilerin yapraklarında *Solyc02g079120* genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi



Şekil 6.27. WT ve *SIPHD_MS1* mutant bitkilerin çiçeklerinde *Solyc02g079120* genin ifadesinin RT-QPCR ile belirlenmesi

7. SONUÇ

Genom düzenlemedeki son gelişmeler, bitkilerin ve diğer organizmaların genomlarını doğru bir şekilde değiştirmeyi kolaylaştırmıştır. CRISPR/Cas9 sistemi, fonksiyonel çalışmalar ve genetik çeşitlilik için güçlü bir genetik düzenleme aracıdır. Bu düzenleme sisteminde mutasyonlar, hedef gen bölgelerinde verimli ve hassas bir şekilde oluşturulur. İslahçıların klasik sistemler ile bitkilerin istenilen özelliklerini iyileştirmesi ve geliştirmesi hem zaman hem de maliyet açısından bir zorluk oluşturmaktadır. İslahçılar bir bitkini özelliklerini istenilen seviyeye getirebilmesi için yıllar süren çabaları ile uğraşmakta ve bazen de istedikleri sonuçlara ulaşamamaktadır. Bu yüzden ıslahçılar için modern teknolojileri kullanma ihtiyacı doğmuştur. Günümüzde CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi erkek kısır bitkilerin oluşturulmasında kullanılmaya başlamıştır. CRISPR-Cas9 teknolojisi erkek kısır buğday (Ye, 2022), soya fasulyesi (Chen, 2021), çeltik (Teng, 2021) ve domates (Jung, 2020) bitkilerinin oluşturulması için etkin bir şekilde kullanılmıştır. Bu metot ile erkek kısır domates bitkileri sorunsuz ve hassas bir şekilde geliştirilebilir. Ek olarak hem zaman ve maliyetten tasarruf edilebilir hem de nokta atışı bir düzenleme ile ıslahta istenilen kalite yakalanabilir.

MS1 (Soly04g008420), Arabidopsis MALE STERILITY1 (MS1) genine benzer ve hücre ölümünü düzenleyerek tapetum dejenerasyonunda rol oynamaktadır (Vizcay-Barrena ve Wilson 2006). qRT-PCR ile tespit edilen SIPHD_MS1'in ifade seviyesi de fertil hatlara kıyasla Ms10 mutantında önemli ölçüde azalmıştır. QRT-PCR'ye dayalı olarak, CRISPR mutant hatlarımızda hedef gen ekspresyonu etkili bir şekilde susturulmuştur. Bu çalışma ile SIPHD_MS1 geninin (Soly04g008420) CRISPR/Cas9 sistemi ile yeni erkek steril domates hatları üretmek için uygun bir gen olduğu kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdelrahman, M., Al-Sadi, A. M., Pour-Aboughadareh, A., Burritt, D. J., Tran, L. S. P. (2018). Genome editing using CRISPR/Cas9–targeted mutagenesis: An opportunity for yield improvements of crop plants grown under environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 131, 31-36.
- Alwin, S., Gere, M. B., Guhl, E., Effertz, K., Barbas III, C. F., Segal, D. J., Cathomen, T. (2005). Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. *Molecular Therapy*, 12(4), 610-617.
- An, X., Ma, B., Duan, M., Dong, Z., Liu, R., Yuan, D., Wan, X. (2020). Molecular regulation of ZmMs7 required for maize male fertility and development of a dominant male-sterility system in multiple species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38), 23499-23509.
- Anton, T., Bultmann, S., Leonhardt, H., Markaki, Y. (2014). Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. *Nucleus*, 5(2), 163-172.
- Ariizumi, T., Kishimoto, S., Kakami, R., Maoka, T., Hirakawa, H., Suzuki, Y., Ezura, H. (2014). Identification of the carotenoid modifying gene PALE YELLOW PETAL 1 as an essential factor in xanthophyll esterification and yellow flower pigmentation in tomato (*Solanum lycopersicum*). *The Plant Journal*, 79(3), 453-465.
- Arnould, S., Delenda, C., Grizot, S., Desseaux, C., Paques, F., Silva, G. H., Smith, J. (2011). The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Engineering, Design & Selection*, 24(1-2), 27-31.
- Bai, Y., Kissoudis, C., Yan, Z., Visser, R. G., van der Linden, G. (2018). Plant behaviour under combined stress: tomato responses to combined salinity and pathogen stress. *The Plant Journal*, 93(4), 781-793.
- Baltes, N. J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P. A., Voytas, D. F. (2014). DNA replicons for plant genome engineering. *The Plant Cell*, 26(1), 151-163.
- Bao, H., Ding, Y., Yang, F., Zhang, J., Xie, J., Zhao, C., Yang, Z. (2022). Gene silencing, knockout and over-expression of a transcription factor ABORTED MICROSPORES (SIAMS) strongly affects pollen viability in tomato (*Solanum lycopersicum*). *BMC genomics*, 23(1), 1-15.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712.
- Barrangou, R. (2013). CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4(3), 267-278.
- Bauchet, G., Grenier, S., Samson, N., Bonnet, J., Grivet, L., Causse, M. (2017). Use of modern tomato breeding germplasm for deciphering the genetic control of agronomical traits by Genome Wide Association study. *Theoretical and applied genetics*, 130(5), 875-889.
- Bawa, A. S., Anilakumar, K. R. (2013). Genetically modified foods: safety, risks and public concerns—a review. *Journal of food science and technology*, 50(6), 1035-1046.
- Beerli, R. R., Segal, D. J., Dreier, B., Barbas III, C. F. (1998). Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25), 14628-14633.

- Begemann, M. B., Gray, B. N., January, E., Gordon, G. C., He, Y., Liu, H., Oufattole, M. (2017). Precise insertion and guided editing of higher plant genomes using Cpf1 CRISPR nucleases. *Scientific reports*, 7(1), 1-6.
- Bewicke-Copley, F., Kumar, E. A., Palladino, G., Korfi, K., Wang, J. (2019). Applications and analysis of targeted genomic sequencing in cancer studies. *Computational and structural biotechnology journal*, 17, 1348-1359.
- Bharat, S. S., Li, S., Li, J., Yan, L., Xia, L. (2020). Base editing in plants: Current status and challenges. *The Crop Journal*, 8(3), 384-395.
- Bikard, D., Marraffini, L. A. (2013). Control of gene expression by CRISPR-Cas systems. *F1000prime reports*, 5.
- Bitinaite, J., Wah, D. A., Aggarwal, A. K., Schildkraut, I. (1998). Fok I dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the national academy of sciences*, 95(18), 10570-10575.
- Boch, J., Bonas, U. (2010). Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual review of phytopathology*, 48, 419-436.
- Bolger, A., Scossa, F., Bolger, M. E., Lanz, C., Maumus, F., Tohge, T., Quesneville, H., Alseekh, S., Sørensen, I., Lichtenstein, G., Fich, E. A., Conte, M., Keller, H., Schneeberger, K., Schwacke, R., Ofner, I., Vrebalov, J., Xu, Y., Osorio, S., Aflitos, S. A., Fernie, A. R. (2014). The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nature genetics*, 46(9), 1034–1038.
- Bonas, U., Stall, R. E., Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular and General Genetics MGG*, 218(1), 127-136.
- Bortesi, L., Zhu, C., Zischewski, J., Perez, L., Bassié, L., Nadi, R., Schillberg, S. (2016). Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant biotechnology journal*, 14(12), 2203-2216.
- Bortesi, L., Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, 33(1), 41-52.
- Brake, M., Al-Qadumii, L., Hamasha, H., Migdadi, H., Awad, A., Haddad, N., Sadder, M. T. (2022). Development of SSR Markers Linked to Stress Responsive Genes along Tomato Chromosome 3 (*Solanum lycopersicum* L.). *Biotech (Basel (Switzerland))*, 11(3), 34.
- Branzei, D., Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(4), 297-308.
- Broccanello, C., Chiodi, C., Funk, A., McGrath, J. M., Panella, L., Stevanato, P. (2018). Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants. *Plant Methods*, 14(1), 1-8.
- Butler, N. M., Douches, D. S. (2016). Sequence-specific nucleases for genetic improvement of potato. *American Journal of Potato Research*, 93(4), 303-320.
- Buxdorf, K., Rubinsky, G., Barda, O., Burdman, S., Aharoni, A., Levy, M. (2014). The transcription factor *SISHINE3* modulates defense responses in tomato plants. *Plant molecular biology*, 84(1), 37-47.
- Carlson, D. F., Fahrenkrug, S. C., Hackett, P. B. (2012). Targeting DNA with fingers and TALENs. *Molecular therapy-Nucleic acids*, 1(1), e3.
- Cao, X., Liu, X., Wang, X., Yang, M., van Giang, T., Wang, J., Huang, Z. (2019). B-class MADS-box *TM6* is a candidate gene for tomato male sterile-1526. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(7), 2125-2135.

- Carroll, D. (2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188(4), 773-782.
- Causse, M., Duffe, P., Gomez, M. C., Buret, M., Damidaux, R., Zamir, D., Rothan, C. (2004). A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1671-1685.
- Čermák, T., Baltes, N. J., Čegan, R., Zhang, Y., Voytas, D. F. (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome biology*, 16(1), 1-15.
- 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 research*, 39(12), e82-e82.
- Chapdelaine, P., Pichavant, C., Rousseau, J., Paques, F., Tremblay, J. P. (2010). Meganucleases can restore the reading frame of a mutated dystrophin. *Gene therapy*, 17(7), 846-858.
- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H., Gao, C. (2019). CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 70(1), 667-697.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., Kim, J. S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome research*, 24(1), 132-141.
- Chu, V. T., Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K., Kühn, R. (2015). Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature biotechnology*, 33(5), 543–548.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- Cong, L., Zhang, F. (2015). Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. In *Chromosomal mutagenesis* (pp. 197-217). Humana Press, New York, NY.
- Dai, X., Han, H., Huang, W., Zhao, L., Song, M., Cao, X., Xie, H. (2021). Generating Novel Male Sterile Tomatoes by Editing Respiratory Burst Oxidase Homolog Genes. *Frontiers in plant science*, 12.
- Damalas, C. A., Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International journal of environmental research and public health*, 8(5), 1402-1419.
- Danilo, B., Montes, É., Archambeau, H., Lodé, M., Rousseau-Gueutin, M., Chèvre, A. M., Mazier, M. (2022). I-SceI and customized meganucleases-mediated genome editing in tomato and oilseed rape. *Transgenic Research*, 31(1), 87-105.
- Ding, Y., Zhu, J., Zhao, D., Liu, Q., Yang, Q., Zhang, T. (2021). Targeting cis-regulatory elements for rice grain quality improvement. *Frontiers in Plant Science*, 12. 705834.
- Diouf, I. A., Derivot, L., Bitton, F., Pascual, L., Causse, M. (2018). Water deficit and salinity stress reveal many specific qtl for plant growth and fruit quality traits in tomato. *Front. Plant Sci.* 9, 279.
- Di Pietro, A., García-Maceira, F. I., Meglecz, E., Roncero, M. I. G. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular microbiology*, 39(5), 1140-1152.
- Divi, U. K., Krishna, P. (2009). Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New biotechnology*, 26(3-4), 131–136.
- Dong, O. X., Yu, S., Jain, R., Zhang, N., Duong, P. Q., Butler, C., Ronald, P. C. (2020). Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9. *Nature communications*, 11(1), 1-10.

- Dreier, B., Beerli, R. R., Segal, D. J., Flippin, J. D., Barbas, C. F. (2001). Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-ANN-3' family of DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29466-29478.
- Dreier, B., Segal, D. J., Barbas III, C. F. (2000). Insights into the molecular recognition of the 5'-GNN-3' family of DNA sequences by zinc finger domains. *Journal of molecular biology*, 303(4), 489-502.
- Dreier, B., Fuller, R. P., Segal, D. J., Lund, C. V., Blancafort, P., Huber, A., Barbas, C. F. (2005). Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-CNN-3' family DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35588-35597.
- Du, Y., Luo, S., Li, X., Yang, J., Cui, T., Li, W., Zhou, L. (2017). Identification of substitutions and small insertion-deletions induced by carbon-ion beam irradiation in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 8, 1851.
- Durai, S., Mani, M., Kandavelou, K., Wu, J., Porteus, M. H., Chandrasegaran, S. (2005). Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic acids research*, 33(18), 5978-5990.
- Elrod-Erickson, M., Pabo, C. O. (1999). Binding Studies with Mutants of Zif268: Contribution of individual side chains to binding affinity and specificity in the Zif268 zinc finger-DNA complex. *Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 19281-19285.
- Esvelt, K. M., Mali, P., Braff, J. L., Moosburner, M., Yaung, S. J., Church, G. M. (2013). Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nature methods*, 10(11), 1116-1121.
- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A. (2017). Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Front. in Plant Sci.* 8, 1147.
- Feng, Z., Mao, Y., Xu, N., Zhang, B., Wei, P., Yang, D. L., Zhu, J. K. (2014). Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(12), 4632-4637.
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J. D., Saha, S., Tecle, I. Y., Strickler, S. R., Mueller, L. A. (2015). The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic acids research*, 43(D1), D1036-D1041.
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology*, 31(9), 822-826.
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., Joung, J. K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature biotechnology*, 32(3), 279-284.
- Gao, J., Wang, G., Ma, S., Xie, X., Wu, X., Zhang, X., Wu, Y., Zhao, P., Xia, Q. (2015). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant molecular biology*, 87(1-2), 99–110.
- Gao, L., Gonda, I., Sun, H., Ma, Q., Bao, K., Tieman, D. M., Fei, Z. (2019). The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nature genetics*, 51(6), 1044-1051.
- Gascuel, Q., Diretto, G., Monforte, A. J., Fortes, A. M., Granell, A. (2017). Use of natural diversity and biotechnology to increase the quality and nutritional content of tomato and grape. *Frontiers in plant science*, 8, 652.

- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), E2579-E2586.
- Gasparis, S., Kała, M., Przyborowski, M., Łyżnik, L. A., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A. (2018). A simple and efficient CRISPR/Cas9 platform for induction of single and multiple, heritable mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant methods*, 14(1), 1-14.
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., Liu, D. R. (2017). Programmable base editing of A• T to G• C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551(7681), 464-471.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K. (2017). Tomato tolerance to abiotic stress: a review of most often engineered target sequences. *Plant growth regulation*, 83(2), 175-198.
- Gharbi, E., Martínez, J.-P., Benahmed, H., Lepoint, G., Vanpee, B., Quinet, M. (2017). Inhibition of ethylene synthesis reduces salt-tolerance in tomato wild relative species *Solanum chilense*. *J. Plant Physiol.* 210, 24–37.
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., Qi, L. S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442–451.
- Gil-Humanes, J., Wang, Y., Liang, Z., Shan, Q., Ozuna, C. V., Sánchez-León, S., Voytas, D. F. (2017). High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *The Plant Journal*, 89(6), 1251-1262.
- Greisman, H. A., Pabo, C. O. (1997). A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites. *Science*, 275(5300), 657-661.
- Grissa, I., Vergnaud, G., Pourcel, C. (2007). CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W52-W57.
- Gupta, A., Christensen, R. G., Rayla, A. L., Lakshmanan, A., Stormo, G. D., & Wolfe, S. A. (2012). An optimized two-finger archive for ZFN-mediated gene targeting. *Nature methods*, 9(6), 588-590.
- Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B., Taipale, J. (2018). CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature medicine*, 24(7), 927-930.
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS computational biology*, 1(6), e60.
- Hendelman, A., Zebell, S., Rodriguez-Leal, D., Dukler, N., Robitaille, G., Wu, X., Lippman, Z. B. (2021). Conserved pleiotropy of an ancient plant homeobox gene uncovered by cis-regulatory dissection. *Cell*, 184(7), 1724-1739.
- Hirano, S., Nishimasu, H., Ishitani, R., Nureki, O. (2016). Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR-Cas9. *Molecular cell*, 61(6), 886-894.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F., Konermann, S., Agarwala, V., Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, 31(9), 827-832.
- Huibers, R. P., Loonen, A. E., Gao, D., Van den Ackerveken, G., Visser, R. G., Bai, Y. (2013). Powdery mildew resistance in tomato by impairment of SIPMR4 and SIDMR1. *PLoS One*, 8(6), e67467.

- Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Mikami, M., Toki, S. (2015). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochemical and biophysical research communications*, 467(1), 76-82.
- Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Mikami, M., Shima, Y., Nakamura, N., Toki, S. (2017). Re-evaluation of the rin mutation and the role of RIN in the induction of tomato ripening. *Nature plants*, 3(11), 866-874.
- Ito, Y., Sekiyama, Y., Nakayama, H., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Shima, Y., Toki, S. (2020). Allelic mutations in the ripening-inhibitor locus generate extensive variation in tomato ripening. *Plant physiology*, 183(1), 80-95.
- Jamieson, A. C., Miller, J. C., & Pabo, C. O. (2003). Drug discovery with engineered zinc-finger proteins. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(5), 361-368.
- Jeong, H. J., Kang, J. H., Zhao, M., Kwon, J. K., Choi, H. S., Bae, J. H., Kang, B. C. (2014). Tomato Male sterile 10 35 is essential for pollen development and meiosis in anthers. *Journal of experimental botany*, 65(22), 6693-6709.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*, 31(3), 233-239.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 337(6096), 816-821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *elife*, 2, e00471.
- Joung, J. K., Sander, J. D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(1), 49-55.
- Jung, Y. J., Kim, D. H., Lee, H. J., Nam, K. H., Bae, S., Nou, I. S., Kang, K. K. (2020). Knockout of SlMS10 Gene (Solyc02g079810) Encoding bHLH transcription factor using CRISPR/Cas9 System confers male sterility phenotype in tomato. *Plants*, 9(9), 1189.
- Just, D., Garcia, V., Fernandez, L., Bres, C., Mauxion, J. P., Petit, J., Rothan, C. (2013). Micro-Tom mutants for functional analysis of target genes and discovery of new alleles in tomato. *Plant Biotechnology*, 13-0622.
- Karlova, R., Chapman, N., David, K., Angenent, G. C., Seymour, G. B., and de Maagd, R. A. (2014). Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *J. Exp. Bot.* 65, 4527–4541. Kim, J. S., Pabo, C. O. (1998). Getting a handhold on DNA: design of poly-zinc finger proteins with femtomolar dissociation constants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 2812-2817.
- Kim, J. Y., Kim, S.-K., Jung, J., Jeong, M.-J., and Ryu, C.-M. (2018). Exploring the sound-modulated delay in tomato ripening through expression analysis of coding and non-coding RNAs. *Ann. Bot.* 122, 1231–1244.
- Kim, Y. G., Cha, J., Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1156-1160.
- Kim, Y. J., Zhang, D. (2018). Molecular control of male fertility for crop hybrid breeding. *Trends in Plant Science*, 23(1), 53-65.
- Klap, C., Yeshayahou, E., Bolger, A. M., Arazi, T., Gupta, S. K., Shabtai, S., Barg, R. (2017). Tomato facultative parthenocarpy results from Sl AGAMOUS-LIKE 6 loss of function. *Plant Biotechnology Journal*, 15(5), 634-647.

- Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Topkar, V. V., Nguyen, N. T., Zheng, Z., Gonzales, A. P., Li, Z., Peterson, R. T., Yeh, J. R., Aryee, M. J., Joung, J. K. (2015). Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 523(7561), 481–485.
- Kleinstiver, B. P., Pattanayak, V., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Zheng, Z., Joung, J. K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529(7587), 490–495.
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603), 420–424.
- Koseoglou, E. (2017). The study of SIPMR4 CRISPR/Cas9-mediated tomato allelic series for resistance against powdery mildew. Wageningen University.
- Krauss, S., Schnitzler, W. H., Grassmann, J., Woitke, M., (2006). The influence of different electrical conductivity values in a simplified recirculating soilless system on inner and outer fruit quality characteristics of tomato. *J. Agric. Food Chem.* 54, 441–448.
- Kurihara, Y. (2020). uORF shuffling fine-tunes gene expression at a deep level of the process. *Plants*, 9(5), 608.
- Lawrenson, T., Harwood, W. A. (2019). Creating targeted gene knockouts in barley using CRISPR/Cas9. In *Barley* (pp. 217–232). Humana Press, New York, NY.
- Li, C., Unver, T., Zhang, B. (2017). A high-efficiency CRISPR/Cas9 system for targeted mutagenesis in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Scientific reports*, 7(1), 1–10.
- Li, H., Yuan, Z., Vizcay-Barrena, G., Yang, C., Liang, W., Zong, J., Zhang, D. (2011). PERSISTENT TAPETAL CELL1 encodes a PHD-finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in rice. *Plant physiology*, 156(2), 615–630.
- Li, J. F., Norville, J. E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Sheen, J. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology*, 31(8), 688–691.
- Li, J., Zhang, X., Sun, Y., Zhang, J., Du, W., Guo, X., Xia, L. (2018). Efficient allelic replacement in rice by gene editing: a case study of the NRT1. 1B gene. *Journal of integrative plant biology*, 60(7), 536–540.
- Li, J., Chen, G. B., Rasheed, A., Li, D., Sonder, K., Zavala Espinosa, C., Li, H. (2019). Identifying loci with breeding potential across temperate and tropical adaptation via EigenGWAS and EnvGWAS. *Molecular ecology*, 28(15), 3544–3560.
- Li, R., Li, R., Li, X., Fu, D., Zhu, B., Tian, H., Zhu, H. (2018). Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant biotechnology journal*, 16(2), 415–427.
- Li, R., Liu, C., Zhao, R., Wang, L., Chen, L., Yu, W., Zhang, S., Sheng, J., Shen, L. (2019b). CRISPR/Cas9-Mediated SINPR1 mutagenesis reduces tomato plant drought tolerance. *BMC plant biology*, 19(1), 38.
- Li, S., Xia, L. (2020). Precise gene replacement in plants through CRISPR/Cas genome editing technology: current status and future perspectives. *aBIOTECH*, 1(1), 58–73.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P., Yang, B. (2012). High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature biotechnology*, 30(5), 390–392.
- Li, Y., Wang, H., Zhang, Y., Martin, C., (2018b). Can the world's favorite fruit, tomato, provide an effective biosynthetic chassis for high-value metabolites?. *Plant Cell Rep.* 37, 1443–1450.

- Li, X., Wang, Y., Chen, S., Tian, H., Fu, D., Zhu, B., Zhu, H. (2018). Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Frontiers in plant science*, 9, 559.
- Li, Z., Liu, Z. B., Xing, A., Moon, B. P., Koellhoffer, J. P., Huang, L., Cigan, A. M. (2015). Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant physiology*, 169(2), 960-970.
- Liang, F., Han, M., Romanienko, P. J., Jasin, M. (1998). Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9), 5172-5177.
- Lin, S., Staahl, B. T., Alla, R. K., Doudna, J. A. (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *elife*, 3, e04766.
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug delivery*, 25(1), 1234-1257.
- Lin, Y., Cradick, T. J., Brown, M. T., Deshmukh, H., Ranjan, P., Sarode, N., Bao, G. (2014). CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic acids research*, 42(11), 7473-7485.
- Lindsay, C. R., Roth, D. B. (2014). An unbiased method for detection of genome-wide off-target effects in cell lines treated with zinc finger nucleases. In *Gene Correction* (pp. 353-369). Humana Press, Totowa, NJ.
- Lipp, M., Shillito, R., Giroux, R., Spiegelhalter, F., Charlton, S., Pinero, D., Song, P. (2005). Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC International*, 88(1), 136-155.
- Liu, L., Zhang, J., Xu, J., Li, Y., Guo, L., Wang, Z., Zhang, X., Zhao, B., Guo, Y. D., Zhang, N. (2020). CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis of *SILBD40*, a lateral organ boundaries domain transcription factor, enhances drought tolerance in tomato. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 301, 110683.
- Liu, Q., Segal, D. J., Ghiara, J. B., & Barbas III, C. F. (1997). Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(11), 5525-5530.
- Liu, Q., Xia, Z., Case, C. C. (2002). Validated zinc finger protein designs for all 16 GNN DNA triplet targets. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 3850-3856.
- Liu, X., Yang, M., Liu, X., Wei, K., Cao, X., Wang, X., Huang, Z. (2019). A putative bHLH transcription factor is a candidate gene for male sterile 32, a locus affecting pollen and tapetum development in tomato. *Horticulture research*, 6.
- Liu, M., Rehman, S., Tang, X., Gu, K., Fan, Q., Chen, D., Ma, W. (2019b). Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Frontiers in genetics*, 9, 691.
- Liu, Y., Ma, S., Wang, X., Chang, J., Gao, J., Shi, R., Xia, Q. (2014). Highly efficient multiplex targeted mutagenesis and genomic structure variation in *Bombyx mori* cells using CRISPR/Cas9. *Insect biochemistry and molecular biology*, 49, 35-42.
- Liu, Z., Alseekh, S., Brotman, Y., Zheng, Y., Fei, Z., Tieman, D. M., (2016). Identification of a *Solanum pennellii* Chromosome 4 Fruit Flavor and Nutritional Quality-Associated Metabolite QTL. *Front. Plant Sci.* 7, 1671.
- Lomov, N. A., Viushkov, V. S., Petrenko, A. P., Syrkina, M. S., Rubtsov, M. A. (2019). Methods of evaluating the efficiency of CRISPR/Cas genome editing. *Molecular Biology*, 53(6), 862-875.

- Luo, J., Li, S., Xu, J., Yan, L., Ma, Y., Xia, L. (2021). Pyramiding favorable alleles in an elite wheat variety in one generation by CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing. *Molecular Plant*, 14(6), 847-850.
- Luo, M., Gilbert, B., Ayliffe, M. (2016). Applications of CRISPR/Cas9 technology for targeted mutagenesis, gene replacement and stacking of genes in higher plants. *Plant Cell Reports*, 35(7), 1439-1450.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Liu, Y. G. (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular plant*, 8(8), 1274-1284.
- Maeder, M. L., Angstman, J. F., Richardson, M. E., Linder, S. J., Cascio, V. M., Tsai, S. Q., Ho, Q. H., Sander, J. D., Reyon, D., Bernstein, B. E., Costello, J. F., Wilkinson, M. F., Joung, J. K. (2013). Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nature biotechnology*, 31(12), 1137–1142.
- Maeder, M. L., Linder, S. J., Cascio, V. M., Fu, Y., Ho, Q. H., Joung, J. K. (2013). CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature methods*, 10(10), 977-979.
- Maeder, M. L., Gersbach, C. A. (2016). Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Molecular Therapy*, 24(3), 430-446.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467-477.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct*, 1(1), 1-26.
- Makarova, K. S., Koonin, E. V. (2015). Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. *CRISPR*, 47-75.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. (2013). The basic building blocks and evolution of CRISPR–Cas systems. *Biochemical Society Transactions*, 41(6), 1392-1400.
- 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.
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., Church, G. M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature biotechnology*, 31(9), 833-838.
- Mamay, M., Yanık, E. (2012). Şanlıurfa’da domates alanlarında Domates Güvesi [*Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae)]’nin ergin populasyon gelişiminin belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 2(3), 189-198.
- Mani, M., Kandavelou, K., Dy, F. J., Durai, S., Chandrasegaran, S. (2005a). Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases. *Biochemical and biophysical research communications*, 335(2), 447-457.
- Mani, M., Smith, J., Kandavelou, K., Berg, J. M., Chandrasegaran, S. (2005b). Binding of two zinc finger nuclease monomers to two specific sites is required for effective double-strand DNA cleavage. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(4), 1191-1197.
- Manova, V., Gruszka, D. (2015). DNA damage and repair in plants—from models to crops. *Frontiers in plant science*, 6, 885.

- Mao, Y., Botella, J. R., Liu, Y., Zhu, J. K. (2019). Gene editing in plants: progress and challenges. *National Science Review*, 6(3), 421-437.
- Martí, R., Roselló, S., Cebolla-Cornejo, J., (2016). Tomato as a source of carotenoids and polyphenols targeted to cancer prevention. *Cancers (Basel)* 8, E58.
- Martín-Pizarro, C., and Posé, D. (2018). Genome editing as a tool for fruit ripening manipulation. *Front. Plant Sci.* 9, 1415.
- Meissner, R., Chague, V., Zhu, Q., Emmanuel, E., Elkind, Y., Levy, A. A. (2000). A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *The Plant Journal*, 22(3), 265-274.
- Menda, N., Semel, Y., Peled, D., Eshed, Y., Zamir, D. (2004). In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *The Plant Journal*, 38(5), 861-872.
- Meyer, R. S., Purugganan, M. D. (2013). Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature reviews genetics*, 14(12), 840-852.
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., Qu, L. J. (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell research*, 23(10), 1233-1236.
- Miki, D., Zhang, W., Zeng, W., Feng, Z., Zhu, J. K. (2018). CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in Arabidopsis using sequential transformation. *Nature Communications*, 9(1), 1-9.
- Mir, A., Edraki, A., Lee, J., Sontheimer, E. J. (2018). Type II-C CRISPR-Cas9 biology, mechanism, and application. *ACS chemical biology*, 13(2), 357-365.
- Moretti, C. L., Mattos, L. M., Calbo, A. G., Sargent, S. A. (2010). Climate changes and potential impacts on postharvest quality of fruit and vegetable crops: A review. *Food Research International*, 43(7), 1824-1832.
- Musunuru, K. (2017). The hope and hype of CRISPR-Cas9 genome editing: a review. *JAMA cardiology*, 2(8), 914-919.
- Nambiar, T. S., Billon, P., Diedenhofen, G., Hayward, S. B., Taghialatela, A., Cai, K., Ciccio, A. (2019). Stimulation of CRISPR-mediated homology-directed repair by an engineered RAD18 variant. *Nature communications*, 10(1), 1-13.
- Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D., Kamoun, S. (2017). Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Scientific reports*, 7(1), 1-6.
- Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S. M., Canny, M. D., Brun, C. M., Strecker, J., Durocher, D. (2014). Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science*, 344(6180), 189-193.
- Ortigosa, A., Gimenez-Ibanez, S., Leonhardt, N., Solano, R. (2019). Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of Sl JAZ 2. *Plant biotechnology journal*, 17(3), 665-673.
- Pabo, C. O., Peisach, E., Grant, R. A. (2001). Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biochemistry*, 70(1), 313-340.
- Pareek, M., Rajam, M. V. (2017). RNAi-mediated silencing of MAP kinase signalling genes (Fmk1, Hog1, and Pbs2) in *Fusarium oxysporum* reduces pathogenesis on tomato plants. *Fungal biology*, 121(9), 775-784.
- Parmar, N., Singh, K. H., Sharma, D., Singh, L., Kumar, P., Nanjundan, J., Thakur, A. K. (2017). Genetic engineering strategies for biotic and abiotic stress tolerance and quality enhancement in horticultural crops: a comprehensive review. *3 Biotech*, 7(4), 1-35.

- Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J. P., Ma, E., Doudna, J. A., Liu, D. R. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature biotechnology*, 31(9), 839-843.
- Pavletich, N. P., Pabo, C. O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, 252(5007), 809-817.
- Pavletich, N. P., Pabo, C. O. (1993). Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science*, 261(5129), 1701-1707.
- Pem, D., Jeewon, R., (2015). Fruit and vegetable intake: benefits and progress of nutritioneducation interventions- narrative review article. *Iran J. Public Health* 44, 1309–1321.
- Peng, F., Zhang, W., Zeng, W., Zhu, J. K., Miki, D. (2020). Gene targeting in Arabidopsis via an all-in-one strategy that uses a translational enhancer to aid Cas9 expression. *Plant Biotechnology Journal*, 18(4), 892.
- Pérez-Martín, F., Yuste-Lisbona, F. J., Pineda, B., Angarita-Díaz, M. P., García-Sogo, B., Antón, T. (2017). A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant Biotechnol. J.* 15, 1439–1452.
- Piatek, A., Ali, Z., Baazim, H., Li, L., Abulfaraj, A., Al-Shareef, S., Aouida, M., Mahfouz, M. M. (2015). RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant biotechnology journal*, 13(4), 578–589.
- Porteus, M. H. (2006). Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Molecular Therapy*, 13(2), 438-446.
- Prieto, J., Redondo, P., López-Méndez, B., D'Abramo, M., Merino, N., Blanco, F. J., Molina, R. (2018). Understanding the indirect DNA read-out specificity of I-CreI Meganuclease. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
- Pucci, A., Picarella, M. E., Mazzucato, A. (2017). Phenotypic, genetic and molecular characterization of 7B-1, a conditional male-sterile mutant in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 130(11), 2361-2374.
- Puchta, H. (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of experimental botany*, 56(409), 1-14.
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173–1183.
- Raiola, A., Rigano, M. M., Calafiore, R., Frusciante, L., and Barone, A., (2014). Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. *Mediators Inflammation* 2014.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380-1389.
- Reis, R. S., Deforges, J., Sokoloff, T., Poirier, Y. (2020). Modulation of shoot phosphate level and growth by PHOSPHATE1 upstream open reading frame. *Plant Physiology*, 183(3), 1145-1156.
- Rodríguez-Leal, D., Lemmon, Z. H., Man, J., Bartlett, M. E., Lippman, Z. B. (2017). Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell*, 171(2), 470-480.
- Román-Rodríguez, F. J., Ugalde, L., Alvarez, L., Díez, B., Ramírez, M. J., Risueño, C., Río, P. (2019). NHEJ-mediated repair of CRISPR-Cas9-induced DNA breaks efficiently

- corrects mutations in HSPCs from patients with fanconi anemia. *Cell Stem Cell*, 25(5), 607-621.
- Ron, M., Kajala, K., Pauluzzi, G., Wang, D., Reynoso, M. A., Zumstein, K., Brady, S. M. (2014). Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. *Plant physiology*, 166(2), 455-469.
- Rothan, C., Diouf, I., Causse, M. (2019). Trait discovery and editing in tomato. *Plant J.* 97, 73-90.
- Salk, J. J., Schmitt, M. W., Loeb, L. A. (2018). Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations. *Nature Reviews Genetics*, 19(5), 269-285.
- Sánchez-León, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C. V., Giménez, M. J., Sousa, C., Voytas, D. F., Barro, F. (2018). Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant biotechnology journal*, 16(4), 902-910.
- Sander, J. D., Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32(4), 347-355.
- Sauer, N. J., Mozoruk, J., Miller, R. B., Warburg, Z. J., Walker, K. A., Beetham, P. R., Gocal, G. F. (2016). Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant biotechnology journal*, 14(2), 496-502.
- Sauvage, C., Segura, V., Bauchet, G., Stevens, R., Do, P. T., Nikoloski, Z., Causse, M. (2014). Genome-wide association in tomato reveals 44 candidate loci for fruit metabolic traits. *Plant physiology*, 165(3), 1120-1132.
- Sawhney, V. K. (2004). Photoperiod-sensitive male-sterile mutant in tomato and its potential use in hybrid seed production. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79(1), 138-141.
- Secgin, Z., Kavas, M., Yildirim, K. (2021). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration for CRISPR/Cas9 genome editing of commercial tomato cultivars. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 45(6), 704-716.
- Semenova, E., Jore, M. M., Datsenko, K. A., Semenova, A., Westra, E. R., Wanner, B., Severinov, K. (2011). Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(25), 10098-10103.
- Shen, L., Hua, Y., Fu, Y., Li, J., Liu, Q., Jiao, X., Wang, K. (2017). Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Science China Life Sciences*, 60(5), 506-515.
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H. R., Archibald, R. L., Yang, M., Habben, J. E. (2017). ARGOS 8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant biotechnology journal*, 15(2), 207-216.
- Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., Koonin, E. V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature reviews microbiology*, 15(3), 169-182.
- Silva, G., Poirot, L., Galetto, R., Smith, J., Montoya, G., Duchateau, P., Pâques, F. (2011). Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Current gene therapy*, 11(1), 11-27.
- Shi, Y., Berg, J. M. (1995). A direct comparison of the properties of natural and designed zinc-finger proteins. *Chemistry & biology*, 2(2), 83-89.

- Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., Ishii, H., Kondo, A. (2017). Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature biotechnology*, 35(5), 441-443.
- Slaymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X., Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6268), 84-88.
- Smith, J., Bibikova, M., Whitby, F. G., Reddy, A. R., Chandrasegaran, S., Carroll, D. (2000). Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic acids research*, 28(17), 3361-3369.
- Song, F., Stieger, K. (2017). Optimizing the DNA donor template for homology-directed repair of double-strand breaks. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 7, 53-60.
- Soyk, S., Müller, N. A., Park, S. J., Schmalenbach, I., Jiang, K., Hayama, R., Lippman, Z. B. (2017). Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nature Genetics*, 49(1), 162-168.
- Sravankumar, T., Naik, N., Kumar, R. (2018). A ripening-induced SLGH3-2 gene regulates fruit ripening via adjusting auxin-ethylene levels in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant molecular biology*, 98(4), 455-469.
- Stevens, R., Page, D., Gouble, B., Garchery, C., Zamir, D., Causse, M. (2008). Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant, cell & environment*, 31(8), 1086-1096.
- Sun, Y. D., Liang, Y., Wu, J. M., Li, Y. Z., Cui, X., Qin, L. (2012). Dynamic QTL analysis for fruit lycopene content and total soluble solid content in a *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium* cross. *Genetics and Molecular Research*, 11(4), 3696-3710.
- Sun, Y., Zhang, X., Wu, C., He, Y., Ma, Y., Hou, H., Xia, L. (2016). Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Molecular plant*, 9(4), 628-631.
- Suresh, B. V., Roy, R., Sahu, K., Misra, G., Chattopadhyay, D. (2014). Tomato genomic resources database: an integrated repository of useful tomato genomic information for basic and applied research. *PloS One* 9, e86387.
- Suzuki, S., Ohta, K. I., Nakajima, Y., Shigeto, H., Abe, H., Kawai, A., Miki, T. (2020). Meganuclease-based artificial transcription factors. *ACS Synthetic Biology*, 9(10), 2679-2691.
- Svitashev, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J. K., Mark Cigan, A. (2016). Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature communications*, 7(1), 1-7.
- Tashkandi, M., Ali, Z., Aljedaani, F., Shami, A., Mahfouz, M. M. (2018). Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant signaling & behavior*, 13(10), e1525996.
- Thakore, P. I., & Gersbach, C. A. (2015). Genome engineering for therapeutic applications. In *Translating Gene Therapy to the Clinic* (pp. 27-43). Academic Press.
- Tieman, D., Zhu, G., Resende Jr, M. F., Lin, T., Nguyen, C., Bies, D., Klee, H. (2017). A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science*, 355(6323), 391-394.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), 671-677.
- Tohge, T., Fernie, A. R., (2015). Metabolomics-inspired insight into developmental, environmental and genetic aspects of tomato fruit chemical composition and quality. *Plant Cell Physiol.* 56, 1681-1696.

- Truong, L. N., Li, Y., Shi, L. Z., Hwang, P. Y. H., He, J., Wang, H., Wu, X. (2013). Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(19), 7720-7725.
- Tuladhar, R., Yeu, Y., Tyler Piazza, J., Tan, Z., Rene Clemenceau, J., Wu, X., ... & Lum, L. (2019). CRISPR-Cas9-based mutagenesis frequently provokes on-target mRNA misregulation. *Nature communications*, 10(1), 1-10.
- Ueta, R., Abe, C., Watanabe, T., Sugano, S. S., Ishihara, R., Ezura, H., Osakabe, K. (2017). Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
- Viuda-Martos, M., Sanchez-Zapata, E., Sayas-Barberá, E., Sendra, E., PérezÁlvarez, J. A., and Fernández-López, J., (2014). Tomato and tomato by products. Human health benefits of lycopene and its application to meat products: a review. *Crit. Rev. In Food Sci. Nutr.* 54, 1032–1049.
- Wah, D. A., Bitinaite, J., Schildkraut, I., Aggarwal, A. K. (1998). Structure of Fok I has implications for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10564-10569.
- Wang, C., Shen, L., Fu, Y., Yan, C., Wang, K. (2015). A simple CRISPR/Cas9 system for multiplex genome editing in rice. *J Genet Genomics*, 42(12), 703-706.
- Wang, G. D., Xie, H. B., Peng, M. S., Irwin, D., Zhang, Y. P. (2014). Domestication genomics: evidence from animals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 2(1), 65-84.
- Wang, M., Lu, Y., Botella, J. R., Mao, Y., Hua, K., Zhu, J. K. (2017). Gene targeting by homology-directed repair in rice using a geminivirus-based CRISPR/Cas9 system. *Molecular plant*, 10(7), 1007-1010.
- Wang, M., Mao, Y., Lu, Y., Tao, X., Zhu, J. K. (2017). Multiplex gene editing in rice using the CRISPR-Cpf1 system. *Molecular plant*, 10(7), 1011-1013.
- Wen, J., Jiang, F., Weng, Y., Sun, M., Shi, X., Zhou, Y., Wu, Z. (2019). Identification of heat-tolerance QTLs and high-temperature stress-responsive genes through conventional QTL mapping, QTL-seq and RNA-seq in tomato. *BMC plant biology*, 19(1), 1-17.
- Wilson, Z. A., Morroll, S. M., Dawson, J., Swarup, R., Tighe, P. J. (2001). The Arabidopsis MALE STERILITY1 (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *The Plant Journal*, 28(1), 27-39.
- Wolter, F., Klemm, J., Puchta, H. (2018). Efficient in planta gene targeting in Arabidopsis using egg cell-specific expression of the Cas9 nuclease of *Staphylococcus aureus*. *The plant journal*, 94(4), 735-746.
- Xie, K., Yang, Y. (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR–Cas system. *Molecular plant*, 6(6), 1975-1983.
- Xu, C., Liberatore, K. L., MacAlister, C. A., Huang, Z., Chu, Y. H., Jiang, K., Lippman, Z. B. (2015). A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature genetics*, 47(7), 784-792.
- Xu, C., Park, S. J., Van Eck, J., Lippman, Z. B. (2016). Control of inflorescence architecture in tomato by BTB/POZ transcriptional regulators. *Genes & Development*, 30(18), 2048-2061.
- Xu, G., Yuan, M., Ai, C., Liu, L., Zhuang, E., Karapetyan, S., Dong, X. (2017). uORF-mediated translation allows engineered plant disease resistance without fitness costs. *Nature*, 545(7655), 491-494.

- Yang, C., Vizcay-Barrena, G., Conner, K., Wilson, Z. A. (2007). MALE STERILITY1 is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis. *The Plant Cell*, 19(11), 3530-3548.
- Yang, L., Huang, W., Xiong, F., Xian, Z., Su, D., Ren, M., Li, Z. (2017). Silencing of Sl PL, which encodes a pectate lyase in tomato, confers enhanced fruit firmness, prolonged shelf-life and reduced susceptibility to grey mould. *Plant Biotechnology Journal*, 15(12), 1544-1555.
- Yang, Y., Zhu, G., Li, R., Yan, S., Fu, D., Zhu, B., Tian, H., Luo, Y., Zhu, H. (2017). The RNA Editing Factor SlORRM4 Is Required for Normal Fruit Ripening in Tomato. *Plant physiology*, 175(4), 1690–1702.
- Ye, J., Liu, G., Chen, W., Zhang, F., Li, H., Ye, Z., Zhang, Y. (2019). Knockdown of SlNL33 accumulates ascorbate, enhances disease and oxidative stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Growth Regulation*, 89(1), 49-58.
- Yin, K., Qiu, J. L. (2019). Genome editing for plant disease resistance: applications and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1767), 20180322.
- Yin, Y., Qin, K., Song, X., Zhang, Q., Zhou, Y., Xia, X., Yu, J. (2018). BZR1 Transcription Factor Regulates Heat Stress Tolerance Through FERONIA Receptor-Like Kinase-Mediated Reactive Oxygen Species Signaling in Tomato. *Plant & cell physiology*, 59(11), 2239–2254.
- Yu, Q. H., Wang, B., Li, N., Tang, Y., Yang, S., Yang, T., Xu, J., Guo, C., Yan, P., Wang, Q., & Asmutola, P. (2017). CRISPR/Cas9-induced Targeted Mutagenesis and Gene Replacement to Generate Long-shelf Life Tomato Lines. *Scientific reports*, 7(1), 11874.
- Yu, W., Wang, L., Zhao, R., Sheng, J., Zhang, S., Li, R., Shen, L. (2019). Knockout of SlMAPK3 enhances tolerance to heat stress involving ROS homeostasis in tomato plants. *BMC plant biology*, 19(1), 354.
- Zess, E., Begemann, M. (2021). CRISPR-Cas9 and beyond: what's next in plant genome engineering. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57(4), 584-594.
- Zhang, C., Wang, Y., Wang, F., Zhao, S., Song, J., Feng, F., Yang, J. (2021). Expanding base editing scope to near-PAMless with engineered CRISPR/Cas9 variants in plants. *Molecular Plant*, 14(2), 191-194.
- Zhang, D., Wu, S., An, X., Xie, K., Dong, Z., Zhou, Y., ... & Wan, X. (2018). Construction of a multicontrol sterility system for a maize male-sterile line and hybrid seed production based on the ZmMs7 gene encoding a PHD-finger transcription factor. *Plant Biotechnology Journal*, 16(2), 459-471.
- Zhang, H., Si, X., Ji, X., Fan, R., Liu, J., Chen, K., Gao, C. (2018). Genome editing of upstream open reading frames enables translational control in plants. *Nature Biotechnology*, 36(9), 894-898.
- Zhang, L., Huang, Z., Wang, X., Gao, J., Guo, Y., Du, Y., Hu, H. (2016). Fine mapping and molecular marker development of anthocyanin absent, a seedling morphological marker for the selection of male sterile 10 in tomato. *Molecular Breeding*, 36(8), 1-10.
- Zhang, S., Wang, L., Zhao, R., Yu, W., Li, R., Li, Y., Shen, L. (2018). Knockout of SlMAPK3 reduced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(34), 8949-8956.
- Zhang, T., Wu, A., Yue, Y., Zhao, Y. (2020). uORFs: important cis-regulatory elements in plants. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6238.
- Zheng, Z., Liebers, M., Zhelyazkova, B., Cao, Y., Panditi, D., Lynch, K. D., Le, L. P. (2014). Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nature medicine*, 20(12), 1479-1484.

- Zhao, J., Sauvage, C., Zhao, J., Bitton, F., Bauchet, G., Liu, D., Causse, M. (2019). Meta-analysis of genome-wide association studies provides insights into genetic control of tomato flavor. *Nature communications*, 10(1), 1-12.
- Zhu, G., Wang, S., Huang, Z., Zhang, S., Liao, Q., Zhang, C., Huang, S. (2018). Rewiring of the fruit metabolome in tomato breeding. *Cell*, 172(1-2), 249-261.
- Zhao, J., Sauvage, C., Zhao, J., Bitton, F., Bauchet, G., Liu, D. (2019). Meta-analysis of genome-wide association studies provides insights into genetic control of tomato flavor. *Nat. Commun.* 10, 1534.
- Zhao, Y., Zhang, C., Liu, W., Gao, W., Liu, C., Song, G., Xie, C. (2016). An alternative strategy for targeted gene replacement in plants using a dual-sgRNA/Cas9 design. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- Zhou, H., Liu, B., Weeks, D. P., Spalding, M. H., Yang, B. (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic acids research*, 42(17), 10903-10914.
- Zhou, R., Kong, L., Wu, Z., Rosenqvist, E., Wang, Y., Zhao, L. (2019). Physiological response of tomatoes at drought, heat and their combination followed by recovery. *Physiol. Plant* 165, 144–154.
- Zischewski, J., Fischer, R., Bortesi, L. (2017). Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnology advances*, 35(1), 95-104.

EKLER

EK-1 BİTKİ MATARYELLERİNİN ÖZELLİKLERİ

CROCKER

ÜRÜN: DOMATES



Segment: SIRIK SALKIM DOMATES

Üretim Tipi: Sera

Tüketim Şekli: Taze

Erkencilik: Erkenci

Yetiştirme Dönemi: İlkbahar - Yaz

Renk: Kırmızı

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

Şekil Ek 1. Crocker çeşidinin özellikleri (<https://www.syngenta.com.tr/Crocker>)

EK-2 BESİ ORTAMLARININ HAZIRLANIŞI VE BİLEŞENLERİ

Liquid Media

Luria Broth (LB) g/L (himedia)

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

MS Media gr/L (Duchefa)

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

SOC Media

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

Hoagland Solutions

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

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

Solid Media

LB Agar g/l (himedia)

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

MS Media gr/L (Duchefa)

MS	4.4
Sükroz	30
Phytigel	2.8
pH 5.8'e 1M NaOH ile ayarlanır 121 °C'de 20 dk otoklavda sterilizasyon yapılır.	

EK-3 TAMPONLAR VE SOLÜSYONLAR

Agaroz Jel Elektroforez

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

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

Loading Buffer (6X)

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

Ethidium Bromide Solution

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

Rekombinant Kolonilerin Seçimi

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

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

IPTG (Isopropyl--D-thiogalactoside)

IPTG	100 mg
dH2O	1 ml
Solüsyon filtre ile steril edilerek -20 °C’de saklanır.	

Kompetan *E. coli* Hücrelerin Hazırlanmasında Kullanılan Tamponlar

Buffer 1

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

Buffer 2

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

EK-4 KİMYASAL, ENZİMLER ve ANTİBİYOTİKLER

DNA Markörler

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

Kitler

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

Enzimler

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

Kimyasallar

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

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

Yeast extract
ZnSO₄.7H₂O

Merck
Merck

Antibiyotik ve Hormon stok solüsyonlarının hazırlanması

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

EK-5 PRİMER LİSTESİ

Primer İsmi	Primer Sekansı	Uzunluk
DT1-BsF/guide19 SIPHD_MS1	AATAATGGTCTCTATTGGAAGAGGAATA ATAATGAGGTT	39 bp
DT1-F0/ guide19 SIPHD_MS1	TGGAAGAGGAATAATAATGAGGTTTTA GAGCTAGAAATAGC	41 bp
DT2-R0/ guide25 SIPHD_MS1	AAC TGGTTTGGTCGATGGGGTTACAATC TCTTAGTCGACTCTAC	44 bp
DT2-BsR/ guide25 SIPHD_MS1	ATTATTGGTCTCTAAACTGGTTTGGTCG ATGGGGTTACAA	40 bp
U6-26p-F	TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC	25 bp
U6-29p-R	AGCCCTCTTCTTTCGATCCATCAAC	25 bp
U6-26p-F	TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC	25 bp
U6-29p-R	TTAATCCAACTACTGCAGCCTGAC	25 bp
<i>HPTII</i> Forward	CGAAAAGTTCGACAGCGTC	19 bp
<i>HPTII</i> Reverse	GGTGTCGTCCATCACAGTTTG	21 bp
<i>SIPHD_MS1</i> gRNA 19 Mutation Forward	TGCATGTAACCTCTTGCTTTCTGCGA	25 bp
<i>SIPHD_MS1</i> gRNA 19 Mutation Reverse	ACACATGCATTGGTGGATGTCTATGAA	27 bp
<i>SIPHD_MS1</i> gRNA 25 Mutation Forward	TTCATTTTCCTTTAAACTTGC	21 bp
<i>SIPHD_MS1</i> gRNA 25 Mutation Reverse	AATAGCCCTGGATAACATGA	20 bp
<i>SIPHD_MS1</i> qRT-PCR Forward	TGGCGCAACCTTATGAAGGACA	21 bp
<i>SIPHD_MS1</i> qRT-PCR Reverse	TTGTAGCAAAGACGCCCGTA	20 bp
<i>PR5K</i> qRT-PCR Forward	TGGATTAAC TGGTATTGTGGAGG	23 bp
<i>PR5K</i> qRT-PCR Reverse	TGCAGAGATTCGAGTTCACC	20 bp
<i>ACS1</i> qRT-PCR Forward	AAGAGCATGGCGAAAAC TCG	20 bp
<i>ACS1</i> qRT-PCR Reverse	TTGGATAACTCCGTTGGGGT	20 bp
<i>Solyc02g079120</i> qRT-PCR Forward	GCATCAAAAGGCCTAGAAGAGC	22 bp
<i>Solyc02g079120</i> qRT-PCR Reverse	TGGCGATATACGCAACTCACA	21 bp

EK-6 DOMATES MEYVELERİNİ MORFOLOJİK GÖRÜNTÜLERİ



ÖZ GEÇMİŞ

Gökhan GÖKDEMİR, Simav Cumhuriyet Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden 2013 yılında mezun oldu. 2014-2017 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsünde Yüksek lisans Eğitimini tamamladı. Mezuniyetinden bu yana Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsünde doktora eğitimine devam etmekte olup, orta derecede İngilizce bilmektedir. (05.06.2023)

İletişim Bilgileri

ORCID ID : orcid.org/0000-0001-9909-3662

Yayınlar:

1. Kavas, M., Kizildogan, A., **Gökdemir, G.**, & Baloglu, M. C. (2015). Genome-wide investigation and expression analysis of AP2-ERF gene family in salt tolerant common bean. EXCLI journal, 14, 1187–1206. <https://doi.org/10.17179/excli2015-600>
2. Kavas, M., **Gökdemir, G.**, Seçgin, Z., & Bakhsh, A. (2020). Ectopic expression of common bean ERF transcription factor PvERF35 promotes salt stress tolerance in tobacco. Plant Biology, 22(6), 1102-1112. doi.org/10.1111/plb.13167.
3. Kavas, M., Yıldırım, K., Seçgin, Z., & **Gökdemir, G.** (2020). Discovery of simple sequence repeat (SSR) markers in hazelnut (*Corylus avellana* L.) by transcriptome sequencing and SSR-based characterization of hazelnut cultivars. Scandinavian Journal of Forest Research, 35(5-6), 227-237. doi.org/10.1080/02827581.2020.1797155.
4. Seçgin, Z., **Gökdemir, G.**, Atabay, E. S., Kızıldoğan, A. K., & Kavas, M. (2020). Development of new total RNA isolation method for tissues with rich phenolic compounds. Turkish Journal of Biochemistry, 45(4), 343-350. doi.org/10.1515/tjb-2019-0375.
5. Kavas, M., Yıldırım, K., Seçgin, Z., Abdulla, M. F., & **Gökdemir, G.** (2021). Genome-wide identification of the BURP domain-containing genes in *Phaseolus vulgaris*. Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology, 27(9), 1885–1902. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01052-9>
6. Kavas, M., Mostafa, K., Seçgin, Z., Yerlikaya, B., Yıldırım, K., **Gökdemir, G.** (2022). Genome-Wide Analysis of Duf221 Domain-Containing Gene Family in Common Bean and Identification of Its Role on Abiotic and Phytohormone Stress Response. Genetic Resources and Crop Evolution. <https://doi.org/10.1007/s10722-022-01421-7>
7. **Gökdemir, G.**, Seçgin, Z., Uluişik, S., Kavas, M. (2022). CRISPR/Cas9 knock-out of SLPHD_MS1 (Solyc04g008420) gene results in complete male sterility in tomato. Plant Growth Regulation. <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00869-y>

8. Kavas, M., Abdulla, M. F., Mostafa, K., Seçgin, Z., Yerlikaya, B. A., Otur, Ç., **Gökdemir, G.**, Kurt Kızıldoğan, A., Al-Khayri, J. M., & Jain, S. M. (2022). Investigation and Expression Analysis of R2R3-MYBs and Anthocyanin Biosynthesis-Related Genes during Seed Color Development of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plants*, 11(23), 3386. <https://doi.org/10.3390/plants11233386>

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. Türkiye Birinciliği

TEKNOFEST 2020 Biyoteknoloji ve inovasyon yarışması Proje kategorisi

Proje Başlığı: CRISPR-Cas9 Genom Düzenleme Aracı Kullanılarak Erkek Kkısır Domates Bitkilerinin Geliştirilmesi

