

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**GEN DÜZENLEME TEKNOLOJİSİ (CRISPR) KULLANILARAK
CANAVAR OTU(*Orobanch* spp., *Phelipanche* spp.)' NA DAYANIKLI
DOMATES ISLAHI**

Alparslan KARABENİZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**GEN DÜZENLEME TEKNOLOJİSİ (CRISPR) KULLANILARAK
CANAVAR OTU(*Orobanch*e spp., *Phelipanche* spp.)' NA DAYANIKLI
DOMATES ISLAHI**

Alparslan KARABENİZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2025

ANTALYA

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

**GEN DÜZENLEME TEKNOLOJİSİ (CRISPR) KULLANILARAK
CANAVAR OTU (*Orobanch* spp., *Phelipanche* spp.)' NA DAYANIKLI
DOMATES ISLAHI**

**Alparslan KARABENİZ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**Bu tez TAGEM tarafından TAGEM-21/AR-GE/02 nolu proje ile
desteklenmiştir.**

TEMMUZ 2025

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

**GEN DÜZENLEME TEKNOLOJİSİ (CRISPR) KULLANILARAK
CANAVAR OTU (*Orobancha* spp., *Phelipanche* spp.)' NA DAYANIKLI
DOMATES ISLAHI**

Alparslan KARABENİZ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 10/07/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nedim MUTLU (Danışman)

Doç. Dr. Cengiz İKTEN

Doç. Dr. Yasin Emre KİTİŞ

Doç Dr. Hasan PINAR

Dr. Öğr. Üyesi Serkan TOKGÖZ

ÖZET

GEN DÜZENLEME TEKNOLOJİSİ (CRISPR) KULLANILARAK CANAVAR OTU(*Orobancha* spp., *Phelipanche* spp.)' NA DAYANIKLI DOMATES ISLAHI

Alparslan KARABENİZ

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Temmuz 2025; 109 sayfa

Domates (*Solanum lycopersicum*), dünya genelinde yaygın üretimi ve yüksek tüketim oranlarıyla öne çıkan, önemli ekonomik değere sahip temel tarım ürünlerinden biridir. Ancak çevresel koşullar, toprak yapısı, bitki besleme stratejileri, sulama sistemleri ve çeşitli patojenler gibi üretimi sınırlandırıcı faktörler, domates tarımında verim ve kalite kayıplarına yol açabilmektedir. Özellikle dünya çapında ve Türkiye’de domates üretimini kısıtlayan önemli sorunlardan biri, tamamen parazitik yaşam sürdüren ve yaşam döngüsünü konukçu bitki üzerine kuran *Orobancha* spp. ve *Phelipanche* spp. gibi “canavar otu” türleridir. Uygun çevresel şartlar altında, konukçu bitkilerin köklerinden karotenoid metabolizması aracılığıyla sentezlenip salgılanan strigolakton hormonları sayesinde çimlenen canavar otu tohumları, domates bitkisine tutunarak ciddi zararlar meydana getirmektedir.

Bu çalışmada, kök paraziti *Orobancha* spp. ve *Phelipanche* spp. türlerine karşı dayanıklı domates (*Solanum lycopersicum*) hatlarının geliştirilmesi amacıyla, strigolakton biyosentezinde görev alan SLCCD8 genine yönelik CRISPR/Cas9 gen düzenleme teknolojisi uygulanmıştır. Bu kapsamda özgün rehber RNA (gRNA) dizileri tasarlanarak, Cas9 proteini ile birlikte *Agrobacterium* aracılığıyla domates bitkilerine aktarılmış ve bitki transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Gen düzenleme sonrası oluşan “çerçeve içi (in-frame)” mutasyonlar taşıyan T1 ve T2 generasyonlar, hem hidroponik sistemde hem de saksı denemelerinde T3 generasyonu ise hidroponik sistemde canavar otu dayanıklılığı açısından test edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, mutasyona uğramış D38 genotipinde canavar otu tüberkül gelişiminin gözlenmemesi, bu mutasyonun parazite karşı etkin bir dayanıklılık sağladığını ortaya koymuştur. Ayrıca D38 hattı, biyotik stres koşullarına rağmen gelişim şeklini korumuş, bu da elde edilen genotiplerin ıslah programlarında doğrudan kullanım potansiyelini göstermiştir. Moleküler düzeyde yapılan RT-qPCR gen ifade analizleri sonucunda, mutant bitkilerde CCD8 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı; buna karşılık CCD7 ve MAX1 genlerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışma, klasik kimyasal mücadele yöntemlerinin sınırlarını aşan, çevre dostu ve hedefe yönelik bir dayanıklılık ıslah stratejisi sunmakta; aynı zamanda CRISPR/Cas9 sisteminin domatesta parazit yabancı otlara karşı fonksiyonel genetik yaklaşım olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Elde edilen bulgular, CRISPR/Cas9 ile gen düzenleme temelli dayanıklılık mekanizmalarının, gelecekte domates gibi stratejik tarım ürünlerinde sürdürülebilir ıslah programlarına katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Agrobacterium*-aracılı transformasyon, Canavar otu, CCD8, çerçeve içi mutasyon, CRISPR-Cas9, Dayanıklılık ıslahı, Domates (*Solanum lycopersicum*), Gen düzenleme, Parazit yabancı otlar, Strigolakton.

JÜRİ: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Cengiz İKTEN

Doç. Dr. Yasin Emre KİTİŞ

Doç Dr. Hasan PINAR

Dr. Öğr. Üyesi Serkan TOKGÖZ

ABSTRACT

GENE EDITING TECHNOLOGY (CRISPR) FOR BREEDING TOMATO RESISTANT TO BROOMRAPE (*Orobanche* spp., *Phelipanche* spp.)

Alparslan KARABENİZ

PhD Thesis in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Nedim MUTLU

July 2025; 109 pages

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the major agricultural crops with high global production and consumption rates, possessing significant economic value. However, various limiting factors such as environmental conditions, soil properties, nutrient management strategies, irrigation systems, and diverse pathogens lead to yield and quality losses in tomato cultivation. One of the most critical constraints in tomato production worldwide and in Turkey is the infestation of parasitic weeds known as broomrapes, including *Orobanche* spp. and *Phelipanche* spp., which maintain their life cycle by fully parasitizing host plants. Under favorable environmental conditions, the seeds of these parasitic weeds germinate in response to strigolactone hormones synthesized and secreted via the carotenoid pathway from host plant roots, ultimately attaching to the tomato plant and causing significant damage.

In this study, CRISPR/Cas9 gene editing technology was applied to develop tomato (*Solanum lycopersicum*) lines resistant to the root parasitic weeds *Orobanche* spp. and *Phelipanche* spp., by targeting the *SLCCD8* gene, which plays a role in strigolactone biosynthesis. For this purpose, custom-designed guide RNA (gRNA) sequences were constructed and transferred into tomato plants along with the Cas9 protein via *Agrobacterium*-mediated transformation. The resulting "in-frame" mutations were introduced into the genome, and the T1 and T2 generations were evaluated for broomrape resistance in both hydroponic systems and pot trials, while the T3 generation was tested in hydroponic systems only.

According to the results obtained, the absence of broomrape tubercle formation in the mutant D38 genotype demonstrated that the mutation conferred effective resistance against the parasite. Moreover, the D38 line maintained its developmental performance under biotic stress conditions, indicating its potential for direct use in breeding programs. At the molecular level, RT-qPCR-based gene expression analyses revealed that *CCD8* gene expression in mutant plants was significantly higher compared to the control group, whereas *CCD7* and *MAX1* expression levels showed no statistically significant difference.

This study presents a targeted and environmentally friendly resistance breeding strategy that goes beyond the limitations of conventional chemical control methods. Additionally, it demonstrates the applicability of the CRISPR/Cas9 system as a functional genetic tool for combating parasitic weeds in tomato. The findings suggest that gene-editing-based resistance mechanisms using CRISPR/Cas9 may contribute significantly to sustainable breeding programs for strategic crops such as tomato in the future.

KEYWORDS: Agrobacterium-mediated transformation, Broomrape, CCD8, CRISPR-Cas9, Gene editing, In-frame mutation, Parasitic weeds, Resistance breeding, Strigolactone, Tomato (*Solanum lycopersicum*)

COMMITTEE: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Assoc. Prof. Dr. Cengiz İKTEN

Assoc. Prof. Dr. Yasin Emre KİTİŞ

Assoc. Prof. Dr. Hasan PINAR

Asst. Prof. Dr. Serkan TOKGÖZ

ÖNSÖZ

Domates, Orta ve Güney Amerika orijinli bir bitki türü olmasına rağmen, zamanla adaptasyon kabiliyeti nedeniyle birçok ülkede yetiştiriciliği yapılan bir sebze türü haline gelmiştir. Kök paraziti olan canavar otları (*Phelipanche* spp. /*Orobanch*e spp.) domateste önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Birçok herbisit, canavar otlarını kontrol etmek için kullanılmış olsa da konukçu bitkiye seçicilik ana engel olarak kalmıştır. Bu nedenle genetik dayanıklı çeşitlerin kullanılması kimyasalların neden olduğu sorunları azaltmakta ve mücadele için etkili bir yöntem olmaktadır. Bu nedenle kültür bitkilerinde yeni biyoteknolojik yaklaşımların kullanılarak onlara dayanıklılık kazandırılması gerekliliği doğmuştur. Bu çalışmada CRISPR-Cas9 tekniği kullanılarak domateste strigolakton biyosentezinde görev alan *CCD8* geninin mutasyonu ile (çerçeve içi delesyon) ile elde edilen genotipin mutant olmayan kültür domateslerine göre sağladıkları dayanıklılığın araştırılması amaçlanmıştır.

Doktora tez konumun belirlenmesi ve çalışmanın her aşamasında sağladıkları yol gösterici rehberlik, destek ve teşvik edici katkılarından dolayı değerli danışman hocam Prof. Dr. Nedim MUTLU'ya; bilgi ve deneyimleriyle çalışmama önemli katkılar sunan Prof. Dr. Songül SEVER MUTLU, Prof. Dr. Hasan PINAR'a ve Dr. İnanç SOYLU en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecim boyunca özverili yardımları, iş birliği ve destekleri için laboratuvar çalışma arkadaşlarım Adem KABA, Fatma AKÇAKALE KABA, Dr. Cansu ŞİMŞEK, Dr. Selcen DOĞAN, Dr. Vese PAKASHTICA, Enes GÜLMEZ, Gülan ATA, Yüksel Bora ÖZEL, Şevket ÖLMEZ, Halim can KAYIKÇI, Mahmadou ZONON, Kerem YENİÇAĞ, Ahmet KARAÇAN, Musa AVCI, Oğuzhan GÜNAYDIN ve Bahar SANCAR'a gönülden teşekkür ederim. Özellikle canavar otu biyolojik denemelerinde ve tüm süreçteki değerli katkılarından dolayı Dr. Esra ÇİĞNİTAŞ'a ayrıca şükranlarımı sunarım. Hayatımın her döneminde ve aldığım tüm kararlarda yanımda olan, manevi desteğiyle bana güç veren aileme ve en büyük desteği ve sabrı ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Mariem BOUALI KARABENİZ'e sonsuz sevgi, saygı, minnet ve şükranlarımı ifade ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	7
2.1. Domatesin (<i>Solanum lycopersicum</i>) Sınıflandırılması, Yayılışı, Genetik ve Fizyolojik Özellikleri.....	7
2.2. Canavar Otunun (<i>Orobanch</i> spp. ve <i>Phelipanche</i> spp.) Biyolojisi.....	12
2.3. Canavar Otunun Domates Üretimindeki Etkileri ve Mücadelesi	13
2.4. Strigolaktonların Biyosentezi ve Fonksiyonları	15
2.5. Strigolakton Biyosentezinde Görev Alan Genler	20
2.6. CRISPR/Cas9 Gen Düzenleme Teknolojisi	22
2.7. Cas Proteinleri	24
2.8. CRISPR/Cas9 Sisteminin Bitki Islahında Kullanımı	28
3. MATERYAL VE METOT.....	30
3.1. Biyoinformatik Çalışmalar	30
3.1.1. <i>Solanum lycopersicum</i> genomu üzerinde SLCCD8 genine özgü gRNA hedef dizilerinin doğrulanması	31
3.1.2. Klonlama Vektörünün Tasarımı	33
3.2. SLCCD8 gRNA Dizilerini ve pFGC-pcoCas9 Vektörünü İçeren Plazmidlerin Klonlanması	34
3.2.1. Bakteriyel Kültür Ortamlarının Hazırlanması	34

3.2.2. <i>E. coli</i> DH5 α Kompetent Hücrelerinin Hazırlanması.....	34
3.2.3. SICCD8-gRNA1/2 Dizilerini Taşıyan pTZ57R Plazmidlerinin Transformasyonu ve İzolasyonu	35
3.2.4. SICCD8-gRNA1/2 Plazmidlerinin Doğruluk Analizi	35
3.2.5. pFGC-pcoCas9 Vektörünün Hazırlanması ve Moleküler Doğrulaması..	36
3.3. SICCD8'e ait sgRNA1 ve sgRNA2 Fragmanlarının Birleştirilmesi ve pFGC-pcoCas9 Vektörüne Ligasyonu.....	36
3.4. SICCD8-gRNA1+2 Yapılarını Taşıyan pFGC-pcoCas9 Plazmitlerinin <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 Suşuna Transformasyonu.....	39
3.4.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 Suşuna Ait Kompetent Hücrelerin Hazırlanması	39
3.4.2. SICCD8-gRNA1+2 Dizilerini Taşıyan pFGC-pcoCas9 Plazmitlerinin <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 Suşuna Transformasyonu	40
3.5. Bitki Transformasyonu	41
3.5.1. Bitki Doku Kültürü - <i>Agrobacterium</i> Aracılı Transformasyonu	41
3.5.2. Tohumların çimlendirme ortamına hazırlanması	42
3.5.3. Tohumların sayımı ve sterilizasyonu.....	42
3.5.4. Tohumların çimlendirme ortamına ekilmesi	43
3.5.5. Kotiledon yapraklarının kesimi ve ön kültür ortamına aktarılması.....	44
3.5.6. <i>Agrobacterium</i> solüsyonunun hazırlanması, OD ölçümü ve hazırlık, transformasyon.....	45
3.5.7. Birincil rejenerasyon ortamına aktarılma	47
3.5.8. İkincil rejenerasyon ortamına aktarılma	47
3.5.9. Köklendirme ortamına transfer.....	48
3.6. Bitkilerin Dış Ortama Alışma (Aklimatizasyon) Süreci.....	49
3.7. Transgenik ve Mutant Hatların Belirlenmesi	49
3.8. Hidroponik sistem denemeleri ile genotiplerin canavar otuna karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi	51
3.9. Saksı denemeleri ile genotiplerin canavar otuna karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi.....	51

3.10. Dayanıklı Mutant Genotipin Gen Ekspresyon Analizleri.....	52
3.10.1.RNA izolasyonu	52
3.10.2.RT-qPCR işlemleri	52
3.11. İstatistik Analiz.....	53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	54
4.1. Biyoinformatik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular.....	54
4.1.1. İkili Vektörün Belirlenmesi	57
4.2. Laboratuvar Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular.....	58
4.2.1. pTZ57R-SICCD8-gRNA1/2 ve pFGC-pcoCas9 Vektörlerinin Klonlanması ve Doğrulanması.....	58
4.2.2. SICCD8 gRNA1 ve gRNA2 Dizilerinin Birleştirilmesi ve pFGC- pcoCas9 Vektörüne Ligasyonu	62
4.2.3. SICCD8-gRNA1+2 Dizilerini Taşıyan pFGC-pcoCas9 Plazmidlerinin <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 Suşuna Transformasyonu	67
4.3. Bitki Transformasyonu ile İlgili Bulgular	70
4.4. Transgenik ve Mutant Hatların Belirlenmesi ile İlgili Bulgular.....	71
4.5. Hidroponik Sistem Denemeleri ile Genotiplerin Canavar Otuna Karşı Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi	76
4.6. Saksı Denemeleri ile Genotiplerin Canavar Otuna Karşı Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi	82
4.7. Dayanıklı Mutant Genotipin Gen Ekspresyon Analizleri.....	87
5. SONUÇ	90
6. KAYNAKLAR.....	93
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Gen Düzenleme Teknolojisi (CRISPR) Kullanılarak Canavar Otu (*Orobanch* spp., *Phelipanche* spp.)'na Dayanıklı Domates Islahı**” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

10/07/2025

Alparslan KARABENİZ



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C : Santigrad derece

µl : Mikro litre

G : Gram

Mg : Miligram

ml : Mililitre

Mm : Milimolar

Ng : Nanogram

V : Volt

Kisaltmalar

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

ALS : Aceto Lactase Synthase

AM : Arbusküler Mikorhiza

Bp : Base Pair

Cas9 : Crispr Associated Protein 9

CCD7 : Carotenoid Cleavage Dioxygenase 7

CCD8 : Carotenoid Cleavage Dioxygenase 8

cDNA : Complementary Deoxyribonucleic Acid

CLM : Confocal Laser Microskopi

CTAB : Cetyl Trimethylammonium Bromide

CV : Coefficient of Variation

DArT : Diversity Arrays Technique

DLC	:Dehydrocostus Lactone
DMBQ	:Dimethoxy_Benzoquinone
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
DsRNA	:Double Strand Ribonucleik Asit
<i>df</i>	:Degrees of freedom
EMS	:Ethyl Methane Sulfonate
EtBr	:Ethidium Bromide
FAO	:Food And Agriculture Organization
FNM	:Fast Neutron Mutagenesis
GLDP	:Global Lentil Diversity Panel
<i>HaOr</i>	: <i>Helianthus annuus Orobanç</i> Dayanıklılık Geni
HIF	:Houstorial Initiation Factor
ICARDA	:International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
IMI	:Imidazolinone
INDEL	:Insertion And Deletion
IR	:Incompatible Response
LC-MS/MS	:Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry
<i>LGS</i>	:Low Germination Stimülant
LRR	:Leucine-Rich Repeat
LSD	:List Significant Differences
M6PR	:Mannoz 6-Fosfat Redüktaz
MALDI-TOF	:Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry
MAS	:Marker Asisted Selection
<i>MAX1</i>	:More Axillary Growth1
MgCl ₂	:Magnezyum Klorür

NT	:Nükleotid
<i>Or</i>	:Orobanj Dayanıklılık Geni
PCR	:Polimerase Chain Reaction
PEB	:Polyetilen Bag Assay
PMF	:Peptide Mass Finger
PR	:Pathogen Related
qPCR	:Quantitative Polymerase Chain Reaction
QTL	:Quantitative Trait Locus
RAPD	:Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic Acid
RIL	:Recombinant Inbred Lines
RNA	:Ribo Nükleik Asit
RNAi	:Rna interference
ROS	:Reactive Oxygen Species
RSG	:Resistant Striga Gesneroides Geni
RT-PCR	:Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SCAR	:Sequence Characterized Amplified Region
SL	:Strigolacton
SPTPA	:Sand Packed Titer Plate Assay
SSR	:Simple Sequence Repeat
TILLING	:Targeting Induced Local Lesions İn Genome
TRV	:Tobacco Rattle Virus
TTC	:Trifenil Tetrazolyum Klorür
TÜİK	:Türkiye İstatistik Kurumu
VIGS	:Virus-Induced Gene Silencing
WT	:Wild Type

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 16. yüzyılda domatesin olası yayılım rotası (Esquinas-Alcázar ve Nuez, 1995).....	8
Şekil 2.2. farklı kırmızı tonlarında renklenme gösteren domates meyveleri (Bülbül 2021).....	9
Şekil 2.3. Domatesin Dünya Genelindeki Üretim Alanları (FAO 2023).....	10
Şekil 2.4. Domates üretiminin kıtalara göre dağılımı (FAO, 2023)	10
Şekil 2.5. Domates üretiminde önde gelen ülkelerin sıralaması (FAO, 2023)	11
Şekil 2.6. Strigolakton yapısı (Ruyter-Spira vd. 2013).....	16
Şekil 2.7. Strigolakton biyosentez yolağı (Cheng vd. 2013)	17
Şekil 2.8. Strigolaktonlar ve sürgün dallanması (Yamada ve Umehara 2015).....	19
Şekil 2.9. crRNA ve tracrRNA baz eşleşmesi (O'Reilly vd. 2019).....	24
Şekil 2.10. CRISPR lokusu (Anonymous 2016).....	24
Şekil 2.11. sgRNA yapısı (Nishimasu vd. 2014).....	28
Şekil 3.1. Oluşturulan sgRNA1 ve sgRNA2 kasetlerine ait temsili görsel (RE 1: PacI (5'...TTAAT/TAA...3'), RE 2: AclI (5'...AA/CGTT...3')).....	30
Şekil 3.2. Tasarlanan primerler ile PCR ürünleri elde edilerek, hedef bölgelerin doğrulanması	31
Şekil 3.3. Plazmitlerin her iki ucuna eklenen restriksiyon enzim bölgeleri.....	36
Şekil 3.4. pFGC-pcoCas9 vektörüne ait temsili plazmit haritası.....	37
Şekil 3.5. <i>Agrobacterium</i> kompetent hücreleriyle yapılan transformasyon işlemlerinde kullanılan elektroporasyon cihazı	40
Şekil 3.6. Tohum sayımı ve sterilizasyon a) 267 F1 tohumunun sayımı; b) Sterilizasyon solüsyonu ile sterilizasyonu.....	43
Şekil 3.7. Tohum ekilmesi	43
Şekil 3.8. Ön kültür için eksplant hazırlama; a) Çimlenme ile oluşan kotiledon yaprakları; b) Kotiledon uçlarının çıkarılması; c) Eksplant yerleştirme yönteminin gösterimi; d) Ön kültür ortamına yerleştirilen eksplantlar.....	44
Şekil 3.9. Stoktan bakteri inokulasyonu temsili.....	46

Şekil 3.10. Transformasyona sağlamak için eksplantların <i>Agrobacterium</i> içeren solüsyonda inkübasyonu	46
Şekil 4.1. SL3.0 domates genom sürümünde <i>SlCCD8</i> geninin özellikleri	54
Şekil 4.2. Domates genomu üzerinde gRNA hedeflerinin konumlandırılması: <i>SlCCD8</i> genine ait gRNA hedef bölgesi.....	55
Şekil 4.3. Hizalanmış ve tasarlanan <i>SlCCD8</i> gRNA'larının kapsadığı bölgeler; a) <i>SlCCD8</i> -gRNA1; b) <i>SlCCD8</i> -gRNA2.....	56
Şekil 4.4. <i>SlCCD8</i> genlerine ait gRNA'ları taşıyan pTZ57R plazmitlerinin temsili haritaları; a) Sentetik olarak oluşturulmuş pTZ57R- <i>SlCCD8</i> -gRNA1 plazmit haritası; b) Sentetik olarak oluşturulmuş pTZ57R- <i>SlCCD8</i> -gRNA2 plazmit haritası.....	57
Şekil 4.5. pFGC-pcoCas9 (ADDGENE) ikili vektörü (13.330 bp)	58
Şekil 4.6. <i>E. coli</i> DH5α canlılık testi; a) Antibiyotiksiz ortamda çoğaltılmış <i>E. coli</i> DH5α suşuna ait hücreler; b) Ampisilin içeren ortamda çoğaltılmış <i>E. coli</i> DH5α suşuna ait hücreler	59
Şekil 4.7. AtU6-26p promotörü ve gRNA iskelet bölgesi baz alınarak, gRNA bölgelerine ortak şekilde tasarlanmış primer çifti	60
Şekil 4.8. Tasarlanan gRNAc/F-R primer çifti ile elde edilen PCR ürünleri: sırasıyla pTZ57R- <i>SlCCD8</i> -gRNA1 ve pTZ57R- <i>SlCCD8</i> -gRNA2 plazmidlerine ait 3 farklı miniprep örneğinden elde edilen bantlar (100 bp GeneRuler Ladder (Thermo Scientific), 100 V, 1 saatlik elektroforez sonrası)	60
Şekil 4.9. a) Kanamisin içeren seçici ortamda gelişen pFGC-pcoCas9 kolonileri; b) Ampisilin içeren kontrol ortamında gelişemeyen pFGC-pcoCas9 kolonileri	61
Şekil 4.10. EcoRI ve NcoI enzimleriyle kesilen pFGC-pcoCas9 (#52256) 1-2 numaralı plazmitlerinin kesim reaksiyonu sonucu elde edilen bant profili (1 kb GeneRuler Ladder (Thermo Scientific), 100 V, 1 saat sonra).....	61
Şekil 4.11. pTZ57R- <i>SlCCD8</i> -gRNA1 ve pTZ57R- <i>SlCCD8</i> -gRNA2 plazmitlerinin AclI ve PacI enzimleriyle sindirilmesi sonucu elde edilen bantların elektroforez profili (1 kb GeneRuler Ladder [Thermo Scientific], 100 V, 1 saat sonrası)	62
Şekil 4.12. pTZ57R plazmidinde yer alan <i>SlCCD8</i> -gRNA1 ve gRNA2'ye ait dizi bilgileri (kalın puntolu nükleotidler, AclI ve PacI enzimlerine ait restriksiyon bölgelerini göstermektedir)	63

- Şekil 4.13.** Plazmid pTZ57R'den kesilen sırasıyla SICCD8-gRNA1 ve SICCD8-gRNA2'ye ait bölgelerin, gRNAC-F / R primer çifti ile çoğaltılması sonucu elde edilen amplifikasyon ürünleri (1 kb GeneRuler Ladder (Thermo Scientific), 100 V, 1 saat)..... 64
- Şekil 4.14.** T4 ligaz enzimi kullanılarak SICCD8 genine ait gRNA1 ve gRNA2 dizilerinin pFGC-pcoCas9 vektörüne ligasyonu sonrasında elde edilmesi beklenen ürüne ait dizi bilgisi. Kalın harflerle gösterilen nükleotidler AclI ve PacI restriksiyon enzimlerine ait tanıma bölgelerini temsil etmektedir 65
- Şekil 4.15.** SICCD8 genine ait gRNA1 ve gRNA2 bölgelerinin pFGC-pcoCas9 (#52256) vektörüne ligasyonu sonrası yapılan klonlamaya ait, seçilen 5 koloniden elde edilen koloni PCR sonuçlarının elektroforez görüntüsü (1 kb GeneRuler Ladder, Thermo Scientific; 100 V, 1 saat) 66
- Şekil 4.16.** SICCD8 genine ait gRNA1 ve gRNA2 dizilerinin pFGC-pcoCas9 vektörüne ligasyonundan sonra oluşturulan temsili plazmid haritası ve gRNAC primerlerinin plazmid üzerindeki konumları 66
- Şekil 4.17.** SICCD8 genine özgü gRNA dizilerinin pFGC-pcoCas9 vektörü 67
- Şekil 4.18.** 40 µg/ml Rifampisin içeren besiyerinde büyüyen *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşuna ait koloniler 68
- Şekil 4.19.** *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşu ile yapılan transformasyon sonrası, 50 µg/ml Kanamisin + 25 µg/ml Rifampisin içeren seçici besiyerinde oluşan koloniler ve kontrol amaçlı boş EHA105 suşu ile hazırlanan ortamda gözlenen sonuçlar 68
- Şekil 4.20.** pFGC-pcoCas9 vektörü üzerinde yer alan gRNA primerlerinin temsili haritaları SICCD8 genine özgü gRNA1 ve gRNA2 bölgelerinin varlığını doğrulamak amacıyla, pFGC-pcoCas9-SICCD8-gRNA1+2 plazmid dizileri kullanılarak tasarlanan CCD8-gRNA ileri/geri primer çifti 69
- Şekil 4.21.** CCD8-gRNA F/R primer çifti ile gerçekleştirilen koloni PCR'sına ait görüntü (negatif kontrol olarak su, pozitif kontrol olarak ise ligasyon ürünlerinin miniprep stokları kullanılmıştır) (1 kb GeneRuler Ladder (Thermo Scientific), 100 V, 1 saat sonra görüntülenmiştir) 69
- Şekil 4.22.** Bitki transformasyonunun birincil jenerasyondan dış ortama alıştırılmasına kadar olan aşamalarından görüntüler..... 70
- Şekil 4.23.** Bitki transformasyonunda elde edilmiş bitkilerin SICCD8F/R primer seti kullanılarak PCR reaksiyonu taranmasının agaroz jel elektroforezi görüntüsü..... 71

Şekil 4.24. Sanger dizilemesi için gönderilen gRNA1 ve gRNA2 hedeflerini içine alan PCR ürünlerin agaroz jel deki görüntüleri.....	71
Şekil 4.25. D38 kodlu genotipin Sanger dizileme sonucunun SICCD8 geninin orijinal dizisi ile hizalanmış görüntüsü (gRNA1 bölgesi).....	72
Şekil 4.26. D38 kodlu genotipin Sanger dizileme sonucunun SICCD8 geninin orijinal dizisi ile hizalanmış görüntüsü (gRNA2 bölgesi).....	73
Şekil 4.27. D38 kodlu genotip ve WT genotipin SICCD8 geninin amino asit dizilerinin hizalanmış görüntüsü (gRNA1 bölgesi)	74
Şekil 4.28. D38 kodlu genotip ve WT genotipin SICCD8 geninin amino asit dizilerinin hizalanmış görüntüsü (gRNA2 bölgesi)	74
Şekil 4.29. CCD8 proteinin orijinal amino asit sekansına göre görsellştirilmiş 3 Boyutlu yapısı	75
Şekil 4.30. CCD8 proteinin D38 mutant genotipinin amino asit sekansına göre görsellştirilmiş 3 Boyutlu yapısı	75
Şekil 4.31. CCD8 proteinin D38 mutant genotipinin amino asit sekansında mutasyon ile kaybedilen protein alt biriminin görsellştirilmiş 3 Boyutlu yapısı	76
Şekil 4.32. T2 generasyonu bitkileri ile kurulmuş Hidroponik denemenin görüntüsü..	78
Şekil 4.33. Genotiplere göre tüberkül sayısı (T2 Generasyonu).....	79
Şekil 4.34. T3 generasyonu hidroponik denemesinden elde edilen görüntüleri; a) mutant D38 bitkisi; b) kontrol bitkisi.....	81
Şekil 4.35. Genotiplere göre tüberkül sayısı (T3 Generasyonu).....	81
Şekil 4.36. T2 generasyonu saksı denemesinden elde edilen görüntüleri; a) mutant D38 bitkisi; b) kontrol bitkisi.....	83
Şekil 4.37. Genotiplere göre Canavar otu yaş ağırlık (gr) (T2).....	85
Şekil 4.38. Genotiplere göre Canavar otu kuru ağırlık (gr) (T2).....	85
Şekil 4.39. Genotiplere göre domates kök yaş ağırlık (gr) (T2)	86
Şekil 4.40. Genotiplere göre domates kök kuru ağırlık (gr) (T2)	86
Şekil 4.41. Domates genotiplerinin <i>CCD7</i> , <i>CCD8</i> ve <i>MAX1</i> genlerinin ekspresyon değerleri (ΔCt).....	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Lycopersicon</i> Cinsinin Filogenetik Açıdan İki Temel Alt Gruba Ayırılması (Stevens and Rick 1986)	7
Çizelge 2.2. Türkiye’de yıllara göre domates üretimi (FAO, 2023).....	11
Çizelge 3.1. SLCCD8 genine yönelik tasarlanan gRNA1 ve gRNA2 primer çiftlerine ait yapısal özellikler	31
Çizelge 3.2. PCR amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları ..	32
Çizelge 3.3. DNA amplifikasyonunda kullanılan termal döngü protokolü	33
Çizelge 3.4. SLCCD8 genine yönelik ligasyon sonrası birleşmiş sgRNA1-gRNA2 yeni primer çiftlerine ait yapısal özellikler	38
Çizelge 3.5. Tohum çimlendirme ½ MSO	42
Çizelge 3.6. Sterilizasyon Solüsyonu.....	43
Çizelge 3.7. Ön kültür ortamı (2Z) (pH:5,8).....	44
Çizelge 3.8. Sıvı eş-kültür (Co-cultivation) ortamı %2 MSO pH: 5.8	45
Çizelge 3.9. Birincil rejenerasyon kültür ortamı (2Z) (pH:5,8).....	47
Çizelge 3.10. İkincil rejenerasyon kültür ortamı (1Z) (pH:5,8).....	48
Çizelge 3.11. Köklendirme kültür ortamı (pH:5.8).....	48
Çizelge 3.11’in devamı	49
Çizelge 3.12. SLCCD8 geni üzerinden tasarlanan gRNA1 ve gRNA2 hedef bölgelerini ayrı ayrı sipesifik olarak üreten dizileme primerleri	50
Çizelge 3.13. RT-PCR reaksiyon bileşenleri	53
Çizelge 4.1. SLCCD8 Geni İçin Akılcı Olarak Tasarlanan sgRNA Hedef Bilgileri	55
Çizelge 4.2. Hidroponik Sistem Denemelerindeki T1 generasyonu Genotiplerin gözlem verileri.....	76
Çizelge 4.2’nin devamı	77
Çizelge 4.3. Hidroponik Sistem Denemelerindeki T2 generasyonu Genotiplerin gözlem verileri.....	78
Çizelge 4.4. Hidroponik Sistem Denemelerindeki T3 generasyonu Genotiplerin gözlem verileri.....	80

Çizelge 4.5. Saksı Denemelerindeki T1 generasyonu Genotiplerin gözlem verileri	82
Çizelge 4.6. Saksı Denemelerindeki T2 generasyonu Genotiplerin gözlem verileri	83
Çizelge 4.6'nın devamı	84
Çizelge 4.7. Domates Genotiplerinin <i>CCD7</i> , <i>CCD8</i> ve <i>MAXI</i> genlerinin ekspresyon değerlerini (ΔCt).....	89



1. GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), $2n = 24$ kromozoma sahip bir diploid bitki türüdür. Bu tür, patates, patlıcan, tütün, biber ve petunya gibi ekonomik değeri yüksek birçok bitki türünün yanı sıra, 3000'den fazla tür barındıran *Solanaceae* familyasında yer almaktadır (Bergougnoux, 2014). *Solanum* cinsi, *Solanaceae* familyasının 1250-1700 arasında tür içeren en zengin cinsi olarak bilinmektedir (Frodin, 2004). *Solanum* cinsine ait türler, hem ılıman hem de tropikal bölgelerde yayılış gösterir ve sahip oldukları morfolojik ve ekolojik çeşitlilik ile öne çıkar. Ayrıca, *Solanum* cinsinin ekonomik açıdan en önemli cins olduğu ve en yaygın şekilde yetiştirilen türleri bünyesinde barındırdığı belirtilmektedir (Weese ve Bohs, 2007).

Anavatanı And Dağları olarak bilinen domates, 16. yüzyılda Avrupa'ya götürülmüştür (Gerszberg vd. 2015). Günümüzde dünya genelinde yaygın bir şekilde yetiştirilen bu bitki, ekonomik olarak değerli bir tarım ürünü konumundadır. Ayrıca domates, çift çenekli (dikotiledon) bitkilere agronomik açıdan önemli genlerin aktarılmasında model organizma olarak da kullanılmaktadır (Paduchuri vd. 2010). Domatesin yabani akrabalarının çeşitlilik merkezi Peru olarak kabul edilmektedir. Orta Amerika'da geniş bir yayılışa sahip olan *S. lycopersicum cerasiforme*, kültür domatesinin atası olarak gösterilmektedir (Bai ve Lindhout, 2007). Öte yandan, son dönemde yapılan kapsamlı genetik araştırmalar, domatesin en yakın akrabasının *Solanum pimpinellifolium* olduğunu ortaya koymuştur (Tomato Genome Consortium, 2012).

Domates, sahip olduğu zengin besin içeriği sayesinde koruyucu bir gıda olarak değerlendirilmektedir. Çünkü likopen, beta-karoten, flavonoidler, C vitamini ve hidroksisüsamik asit türevleri gibi birçok önemli besin ögesini bünyesinde barındırır. Özellikle likopenin antioksidan özelliklerinin ve kansere karşı koruyucu etkilerinin ortaya konmasıyla birlikte, domatese olan ilgi son yıllarda belirgin şekilde artmıştır (Wu vd. 2011; Raiola vd. 2014). Bu durum, domatesin üretim ve tüketim miktarlarının artmasına neden olmuştur. Domates yalnızca taze olarak tüketilmekle kalmayıp, gıda sanayisinde dondurulmuş ürün, salça, sos, ketçap, turşu, domates suyu, domates püresi, soyulmuş domates, dilimlenmiş veya küp doğranmış domates, kurutulmuş domates ve konserve gibi pek çok farklı şekilde kullanılmaktadır (Ertürk ve Çirka, 2015). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre, dünya genelinde 168 ülkede yaklaşık 4.9 milyon hektarlık alanda toplam 186 milyon ton domates üretilmektedir. Türkiye, 158 bin hektarlık üretim alanı ve 13 milyon tonluk üretim miktarıyla, dünya domates üretiminin yaklaşık %7'sini karşılamakta ve Çin ile Hindistan'ın ardından üçüncü sırada yer almaktadır (FAOSTAT, 2023). Türkiye'de domates üretimi hem açık alanda hem de örtü altında gerçekleştirilmektedir. Ülkenin iklim ve coğrafi özellikleri sayesinde tüm bölgelerde domates yetiştiriciliği yapılabilmektedir. Türkiye'de sanayi tipi ve sofralık tip olmak üzere iki farklı üretim şekli yaygındır. Ege ve Marmara bölgelerinin batı ve doğu kesimleri genelde sanayi tipi domates üretimine yönelirken, Akdeniz, Ege ve Karadeniz bölgeleri daha çok sofralık domates üretimine ağırlık vermektedir (Çiftçi ve Tapkı, 2023). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, ülkede üretilen toplam domatesin yaklaşık 9 milyon tonu açık alanda, 4 milyon tonu ise örtü altında yetiştirilmektedir. Antalya'da toplam örtü altı üretim alanı yaklaşık 249 bin dekar olup, bunun %62'sini oluşturan 155 bin dekar alanda yaklaşık 2.5 milyon ton

domates üretilmektedir (TÜİK, 2023). Türkiye, 2023 yılında yaklaşık 558 bin ton domates ihraç etmiş ve bu ihracattan yaklaşık 452 bin dolar gelir sağlamıştır. İhracatta en büyük payı %15 ile Suriye alırken, onu %14.3 ile Ukrayna ve %11.7 ile Romanya takip etmiştir (Demircan, 2023).

Dünyanın pek çok bölgesinde yetiştirilen önemli tarım ürünlerinde, verim ve kalite kayıplarına yol açan çeşitli hastalık, zararlı ve yabancı ot türleri bulunmaktadır (Bauske vd. 1998; Stall ve Gilreath, 2002). Yabancı otlar arasında özellikle tam parazit bitkiler, besin maddeleri ile suyu doğrudan kültür bitkisinden alarak verimi ciddi şekilde azaltırlar (Twyford, 2018). Kök paraziti bitkiler, *Orobanchaceae* familyasına ait zorunlu parazitler olup, özellikle *Striga*, *Orobanche* ve *Phelipanche* türleri tarımsal üretimde önemli kayıplara sebep olmaktadır (Parker, 2013). *Striga* cinsinden *Striga hermonthica* ve *Striga asiatica* türleri, Afrika ve Asya'da yaygın bir dağılıma sahip olup mısır (*Zea mays* L.), sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), darı, çim (*Pennisetum*, *Panicum*, *Eleusine*, *Digitaria* vb.), çeltik (*Oryza sativa* L.) ve şeker kamışı (*Saccharum officinarum* L.) gibi ürünlerde büyük zararlar meydana getirmektedir (Parker, 2012). Bunun aksine, *Striga gesnerioides* türü yalnızca geniş yapraklı bitkilerde zarara yol açmakta olup, özellikle börülce (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) üzerinde farklı virülens özelliklere sahip ırkları etkili olmaktadır (Ouédraogo vd. 2002). Domateste önemli ölçüde verim kaybına neden olan tam parazit bitkiler arasında en öne çıkanlar canavar otu türleri (*Orobanche* spp. / *Phelipanche* spp.)'dir (Mauromicale vd. 2008; Eizenberg ve Goldwasser, 2018).

Canavar otlarının yaşam döngüsü, preparazitik ve parazitik olmak üzere iki ana aşamadan oluşur. Preparazitik evre, konukçu bitki köklerinden salgılanan strigolaktonların (SL'ler) parazit bitki tarafından algılanması ve tohumların çimlenmesiyle başlar (Fernández-Aparicio vd. 2016). Strigolaktonlar, bitki gelişiminin yanı sıra konukçu bitki, arbusküler mikorizal (AM) mantarlar ve parazit yabancı otlar arasındaki etkileşimleri düzenleyen bitki hormonları olarak tanımlanmaktadır (Gomez-Roldan vd. 2008; Al-Babili ve Bouwmeester, 2015; Wang vd. 2020). Parazit bitkinin strigolaktonları algılaması, tohumlarda karrikin tepkilerini düzenleyen bir reseptörden türeyerek yeni bir işlev kazanmış olan KAI2d reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir (Nelson, 2021). Parazitik evrede ise, parazit bitki "haustorium" adı verilen özelleşmiş bir yapı geliştirerek konukçu bitkinin iletim demetlerine bağlanır böylece makro ve mikro moleküllerin akışı başlar (Yoshida vd. 2016). Parazit bitki konukçuya bağlandıktan sonra tüberkül adlı yapıyı oluşturur. Bu tüberküllerden çıkan sürgünler toprak yüzeyine ulaşır, çiçek açar ve tohum oluşturur (Rispaill vd. 2007). Canavar otları, konukçu bitkinin fizyolojik dengesinin bozulmasına (Alcántara vd. 2006) ve meyve kalitesinin düşmesine yol açmaktadır (Longo vd. 2010).

Canavar otu türleri, dünyanın farklı bölgelerinde geniş tarım alanlarını etkileyerek tarımsal üretimde ciddi kayıplara yol açmaktadır. Örneğin, boğumlu canavar otu (*O. cernua*), Güney Avrupa ve Afrika'daki geniş domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda ve Hindistan'daki tütün üretiminde büyük bir problem haline gelmiştir; tütünde neden olduğu zararın, parazitin ağırlığıyla doğru orantılı olduğu belirtilmiştir (Hibberd vd. 1999). *O. cernua*, Hindistan ve Pakistan'a ek olarak Ürdün, Etiyopya, Nepal ve Suudi Arabistan'da da tütün üretiminde önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Hindistan'ın Andhra Pradesh eyaletinde yaklaşık 40 bin hektarlık tütün

üretim alanının yarısının *O. cernua* tarafından istila edildiği, bu durumun verimde %25–50 arasında kayıplara ve kalite düşüşlerine neden olduğu rapor edilmiştir (Parker, 2013). Ayçiçeği canavar otu (*O. cumana*) ise İspanya, Macaristan, Romanya, Bulgaristan, Rusya, Ukrayna, Moldova, Türkiye, Suriye, İsrail ve Mısır'da ayçiçeği ekim alanlarında ciddi bir problem oluşturmakta; tahminlere göre Yunanistan'da 40 bin hektarda %60, Çin'de ise 20 bin hektarda %20–50 oranında kayıplara yol açmaktadır (Parker, 2013). Beyaz çiçekli canavar otu (*O. crenata*), Akdeniz çevresinde büyük önem taşımakta olup özellikle bakla, mercimek, nohut, burçak ve tarla bezelyesi gibi baklagil bitkilerine zarar vermektedir (Parker, 2013). İspanya, Portekiz, Suriye ve Fas'ta bakla ekim alanlarının %50'den fazlasının *O. crenata* tarafından istila edildiği, toplamda yaklaşık 180 bin hektarlık bir alanın etkilendiği tahmin edilmektedir (Sauerborn, 1991). Türkiye'nin bazı bölgelerinde de bakla ve mercimek tarlalarının yarısından fazlasının istilaya uğradığı bildirilmiştir (Bülbül vd. 2009). Küçük canavar otu (*O. minor*), yonca ve korunga bitkilerinde tohum üretiminde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Parker, 2013). *O. minor* istilasını sonucunda toplam konukçu ağırlığında %15–50 oranında azalma meydana geldiği ve bu azalmanın büyük kısmının çiçek yapısında olduğu ifade edilmiştir (Lins vd. 2007). Mavi çiçekli canavar otu (*P. ramosa*) ise, konukçu bitkiler üzerinde, kuru ağırlığından beklenenden daha fazla zarara neden olabilmektedir (Parker, 2013). Domates sürgünlerinin kuru ağırlığında %60–70 civarında bir azalma olduğu, bu azalmanın *P. ramosa*'nın ağırlığındaki artıştan orantısız şekilde daha fazla olduğu ve bu durumun bitkinin klorofil içeriği ile fotosentezde %50 civarındaki düşüşten kaynaklandığı ortaya konmuştur (Mauromicale vd. 2008). *P. ramosa*'nın domates ve tütünde verim kayıplarına genelde %30–50 oranında neden olduğu belirtilmektedir (Parker, 2013). Slovakya'da, bitki başına 10 ila 20 *P. ramosa* sürgününün %40–50 oranında verim kaybına yol açtığı bildirilmiştir (Cagán ve Tóth, 2003). Şili'de domates üretim alanlarında %80'e varan kayıplar olduğu tahmin edilmiştir (Díaz vd. 2006). İtalya'da, domates ve karnabaharda hektar başına 6–20 tonluk kayıplar rapor edilmiştir (Fracchiolla ve Boari, 2003). Sudan'da ise bu parazit nedeniyle bir domates suyu fabrikasının kapanmak zorunda kaldığı bildirilmiştir (Babiker vd. 1994). Bülbül vd. (2009), Türkiye'nin Doğu Akdeniz bölgesinde domatesin yoğun şekilde istilaya uğradığını rapor etmişlerdir. Mısırlı canavar otu (*P. aegyptiaca*)'nın konukçuya verdiği zararların *P. ramosa* ile benzer olduğu belirtilmektedir (Parker, 2013). İsrail'de yapılan, kilogram başına 100 tohum kullanılarak gerçekleştirilen yapay *P. aegyptiaca* enfeksiyonlarında, havuçta %30'dan fazla verim kaybı (Bernhard vd. 1998), İran'da patatesten %71, Rusya'da karpuzda %50, kavunda %15–30 ve domatesten %15 civarında kayıplar olduğu rapor edilmiştir (Parker ve Riches, 1993). Türkiye'de ise domatesten *P. ramosa* kaynaklı verim kaybının %24 olduğu bildirilmiştir (Aksoy ve Uygur, 2008).

Canavar otlarının yaşam döngülerinin büyük bölümünü toprak altında geçirmeleri, çok sayıda ve oldukça küçük tohum üretmeleri, bu tohumların toprakta uzun süre canlı kalabilmeleri ve ayrıca rüzgar, su, tarımsal ekipmanlar ve hayvanlar aracılığıyla kolayca temiz alanlara taşınabilmeleri, bu parazitlerle mücadeleyi son derece güçleştirmektedir (Goldwasser ve Rodenburg, 2013). Bu parazit bitkilere karşı kültürel, fiziksel, kimyasal ve biyolojik mücadele yöntemlerinin yanı sıra dayanıklı çeşit geliştirme stratejileri de kullanılmaktadır (Fernández-Aparicio vd. 2016; Eizenberg ve Goldwasser, 2018).

Mücadele yöntemlerinden biri olan elle yolma, canavar otları toprak yüzeyine çıktıktan sonra uygulanabilmektedir. Her ne kadar bu aşamada konukçu bitki zaten zarar görmüş olsa da, toprağa düşecek tohum miktarını azaltmak açısından etkili bir yöntemdir (Parker ve Riches, 1993). Fiziksel mücadele yöntemlerinden solarizasyon da, topraktaki canavar otu tohum rezervini azaltmak amacıyla yaygın şekilde kullanılan etkili bir tekniktir (Abu-Irmaileh, 1991; Sauerborn vd. 1989). Pek çok toprak kökenli hastalık ve zararlıların kontrolünde kullanılan kimyasal toprak fumigantları, canavar otlarıyla mücadelede de değerlendirilmektedir. Ancak bu kimyasalların ekonomik olmaması, hedef dışı organizmalar üzerinde toksik etkilere sahip olmaları, hava ve su kirliliğine sebep olmaları ve özel, maliyetli uygulama ekipmanları gerektirmeleri nedeniyle kullanımları sınırlıdır (Goldwasser ve Rodenburg, 2013). Canavar otlarının kontrolünde tuzak veya yakalayıcı bitkilerden de yararlanılmaktadır. Tuzak bitkiler, parazitin çimlenmesini uyarabilen ancak konukçu olmayan bitkilerdir. Tuzak bitkinin kök salgıları nedeniyle çimlenen parazit, konukçu bulamadığı için kısa sürede ölür (Parker ve Riches, 1993). Sorgum (*Sorghum bicolor*), arpa (*Hordeum vulgare*), mısır (*Zea mays*), bazı baklagiller (*Vicia villosa* ve *V. atropurpurea*), üçgül (*Trifolium* spp.), keten (*Linum usitatissimum*), kişniş (*Coriandrum sativum*), kenevir (*Cannabis sativa*), yeşil mercimek (*Phaseolus aureus*), fasulye (*Phaseolus vulgare*), yonca (*Medicago sativa*), soya fasulyesi (*Glycine max*) ve nohut (*Cicer arietinum*) gibi türler, topraktaki tohum rezervini azaltmada etkili tuzak bitkiler arasında sayılmaktadır (Kleifeld vd. 1994; Kebreab ve Murdoch, 2001; Rubiales vd. 2009; Acharya, 2012; Qasem, 2019; Ye vd. 2020). Yakalama bitkileri ise parazitin gerçek konukçusu olup, parazit bitki köke tutunduktan sonra yok edilerek topraktaki tohum rezervinin azaltılması sağlanmaktadır. Bakla (*Vicia faba*), kolza (*Brassica campestris*), beyaz hardal (*Sinapis alba*), mercimek (*Lens culinaris*) ve çemen otu (*Trigonella foenum-graecum*) yakalayıcı bitki olarak bildirilen türlerdir (Parker ve Riches, 1993). Canavar otlarıyla biyolojik mücadelede ise çeşitli fungus, bakteri ve böcek türleri üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Klein ve Kroschel, 2002; Boari ve Vurro, 2004; Zermane vd. 2007).

Günümüze kadar, konukçu bitkilere seçici olarak uygulanabilen ve canavar otlarına karşı etkili bulunan en önemli herbisit gruplarından biri ALS inhibitörleridir; bu gruptaki herbisitler, parazit yabancı otların kimyasal kontrolünde en etkili seçenek olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, ALS inhibitör grubundaki herbisitlerin kullanımı, canavar otlarında herbisit direncinin gelişmesine neden olabilmektedir (Kaundun vd. 2024).

Parazit bitkilere karşı yapılan kimyasal mücadelede, ALS grubu herbisitlerden yararlanılmaktadır. Ancak, parazit bitki tohumlarının toprakta farklı derinliklerde yer alması, bu herbisitlerin etkin şekilde uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Herbisitlerin toprak uygulamalarının yalnızca bitkinin kök yapısına değil, aynı zamanda parazit tohumlarının konumuna da uygun biçimde optimize edilmesi gerekmektedir (Eizenberg vd. 2007). Ayçiçeği canavar otu kontrolünde IMI toleranslı “Clearfield” ayçiçeği çeşitleri geliştirilmiş ve bu çeşitlerde IMI grubu herbisitler başarıyla kullanılmaktadır (Tan vd. 2005). Canavar otlarıyla kimyasal mücadele yapılabildiği durumlarda, çevre dostu uygulamalar için hassas tarım yöntemleri göz önünde bulundurulmalı, doğru zamanlama ve kesin konumda uygulanmasına özen gösterilmelidir (Eizenberg vd. 2013).

Kök paraziti yabancı otlarla mücadelede en etkili yöntemlerden biri dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesidir (Cubero, 1986). Dayanıklı çeşit kullanımının çevre ve insan sağlığına zarar vermemesi, özel ekipman gerektirmemesi ve sürdürülebilir olması gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Rubiales vd. 2003). Canavar otlarına karşı konukçu bitkilerde, parazit bitkinin konukçuya tutunmadan önce ve tutunduktan sonra olmak üzere iki farklı dayanıklılık mekanizması mevcuttur (Fishman ve Shirasu, 2021; Jhu ve Sinha, 2022). Parazit bitki konukçuya bağlanmadan önceki dayanıklılık, tohumların çimlenmesinin engellenmesine dayanır. Kök paraziti bitkilerde çimlenme, strigolakton (SL) adı verilen bitki hormonları tarafından uyarılmaktadır (Yoneyama vd. 2010). Konukçu bitkilerde SL sentezinin engellenmesi veya azaltılması, parazit tohumlarının çimlenmesini de azaltmakta ya da durdurmaktadır. Konukçu bitkilerde SL sentezinden sorumlu birçok gen ve parazit bitkilerin çimlenmesini teşvik eden farklı SL çeşitleri tespit edilmiştir (Gobena vd. 2017). Ayrıca, konukçu bitkiler tarafından salgılanan bazı toksik bileşikler de parazit bitkinin gelişimini durdurarak dayanıklılık sağlayabilmektedir. Örneğin, bazı dayanıklı ayçiçeği çeşitlerinin, canavar otunun gelişimini engelleyen toksik kumarin bileşikler salgıladığı bilinmektedir (Serghini vd. 2001). Parazit bitki konukçuya bağlandıktan sonraki dayanıklılık mekanizmaları ise hipersensitif (HR; aşırı duyarlılık) tepkiler, hormon temelli sinyal yolları, hücre duvarlarının kalınlaşması ve savunma amaçlı ikincil metabolit birikimi şeklinde gerçekleşmektedir (Fishman ve Shirasu, 2021; Jhu ve Sinha, 2022).

Nohut (Brahmi vd. 2016), bakla (Gutiérrez vd. 2013), bezelye (Rubiales vd. 2005) ve ayçiçeği (Kaya, 2014; Martín-Sanz vd. 2020) gibi kültür bitkilerinde canavar otuna karşı dayanıklılık geliştirmeye yönelik çalışmalar yürütülmektedir. Ancak, domateste dayanıklılık kaynağının bulunmaması, bu alandaki ıslah çalışmalarını kısıtlamaktadır. Daha önce yapılan araştırmalara bakıldığında, domateste dayanıklı çeşit ve hatların elde edilmesine yönelik denemelerin başarısız sonuçlandığı görülmektedir (Dalela ve Mathur, 1971; Abu-Gharbieh vd. 1978; Foy vd. 1988; Avdeyev vd. 2002). Doğu Avrupa’da dayanıklı olduğu bildirilen PZU-11 domates hattının, farklı lokasyonlarda gerçekleştirilen tarla denemelerinde aynı düzeyde dayanıklılık göstermediği belirlenmiştir (Foy vd. 1987; Hershenhorn vd. 2009). Genetik çeşitliliğin sınırlı olması, geleneksel ıslah yöntemleriyle dayanıklı çeşit geliştirilmesini zorlaştırmaktadır (Tester ve Langridge, 2010). Bu sınırlı genetik çeşitlilik, canavar otlarına karşı konukçu dayanıklılığını artırmak için yeni biyoteknolojik yaklaşımların önemini ortaya koymaktadır. Parazit bitkilere dayanıklılık kazandırmak amacıyla regülatör RNA molekülleri, CRISPR/Cas9 sistemi ve T-DNA eklemeleri gibi çeşitli biyoteknolojik yöntemlerin kullanıldığı çalışmalara rastlanmaktadır. Örneğin, Fast-neutron (FN) mutagenез yöntemiyle SL sentezinde görev alan SLCCD7 geninin düşük ekspresyonu ile tanımlanan SL-ORT1 domates genotipi geliştirilmiştir. Bu genotip, SL eksikliği nedeniyle *O. cernua*, *O. crenata*, *P. aegyptiaca* ve *P. ramosa*’ya karşı dayanıklılık göstermiştir (Dor vd. 2010; Koltai vd. 2010; Dor vd. 2011). Ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenез yöntemiyle, M2 generasyonunda *P. ramosa*’ya karşı dayanıklı altı farklı genotip elde edilmiştir (Kostov vd. 2007). “Targeting Induced Local Lesions in Genome” (TILLING) tekniğiyle, SL sentezinde meydana gelen değişiklikler sayesinde *P. ramosa*’ya karşı dayanıklı domates genotipleri geliştirilmiştir (Minoia vd. 2010; Disciglio vd. 2016). Ayrıca, iki Micro-Tom domates genotipinde CCD8 geninde tek nokta mutasyonu sonucu *P. aegyptiaca* ve *O. minor*’a karşı dayanıklılık sağlanmıştır (Hasegawa vd. 2018). Transgenesis yöntemiyle de *P. aegyptiaca*’ya dayanıklı domates

bitkileri elde edilmiştir (Aly vd. 2006). RNAi teknolojisi kullanılarak, mannitol birikiminde görevli önemli parazit genlerinden M6PR'nin konukçu bitki aracılığıyla susturulması sayesinde *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklılık geliştirilmiştir (Aly vd. 2009). Domateste, *P. ramosa*'ya karşı dayanıklılık CCD7 geninin (Vogel vd. 2010) ve CCD8 geninin (Kohlen vd. 2012) susturulması yoluyla sağlanmıştır. Ayrıca, *P. aegyptiaca*'nın konukçu bitkiyi parazitlemesinde rol oynayan PaACS, PaM6PR ve PaPrx1 genlerinin RNAi yöntemiyle susturulması sonucunda dayanıklı bitkiler geliştirilmiştir (Dubey vd. 2017).

Kümelenmiş düzenli aralıklarla kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) yöntemi, farklı organizmalarda başarıyla uygulanabilen güçlü bir genom mühendisliği aracı olarak öne çıkmıştır (Doudna ve Charpentier, 2014). Cas9 aracılığıyla gerçekleştirilen genom düzenleme teknolojisinin tarımsal alanda kullanımı, klasik yöntemlere kıyasla önemli avantajlar sunmaktadır. Bu teknoloji, belirli bir hedef dizide istenilen değişikliklerin doğrudan gerçekleştirilmesine olanak tanıyarak, geleneksel geri melezleme veya uzun süreli bitki ıslahı süreçlerine gerek kalmadan kültür bitkilerinde dayanıklılık sağlayan mutasyonların oluşturulmasını mümkün kılar (Ricroch vd. 2024). Parazit bitkilere karşı da CRISPR/Cas9 sistemiyle yeni dayanıklılık kaynakları geliştirmek mümkündür. Örneğin, CRISPR-Cas9 yöntemiyle, strigolakton biyosentezinde görev alan CCD7 geni (Bülbül, 2021), CCD8 geni (Bari vd. 2019), MAX1 geni (Bari vd. 2021), P450 ve CYP722C genleri (Wakabayashi vd. 2019) ile ATP-Binding (ABCG) genlerinin (Bari vd. 2021) manipüle edilmesi sonucu, canavar otlarına karşı farklı derecelerde dayanıklılık gösteren genotipler geliştirilmiştir.

Bu çalışmada, CRISPR/Cas9 gen düzenleme sistemi kullanılarak domates bitkisinde sadece CCD8 geni hedef alınmıştır. Gen düzenleme yoluyla elde edilen mutant bitkiler, saksı ve kök kabı denemelerinde fenotipik ve biyotik stres altındaki gelişim performansları yönünden değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, CCD8 geninin düzenlenmesi yoluyla canavar otuna dayanıklı domates hatlarının geliştirilme potansiyeli ortaya konmuştur. Aynı zamanda CRISPR/Cas9 sisteminin domates dayanıklılık ıslahında etkili ve uygulanabilir bir moleküler araç olabileceği de gösterilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmanın sonuçlarının, hem temel bilim hem de uygulamalı tarımsal biyoteknoloji açısından yeni bilgiler sağlayacağı; aynı zamanda ileriye dönük domates ıslah programlarında CRISPR/Cas9 gibi hassas gen düzenleme teknolojilerinin etkin kullanımının yaygınlaşmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Domatesin (*Solanum lycopersicum*) Sınıflandırılması, Yayılışı, Genetik ve Fizyolojik Özellikleri

Domates, bilimsel olarak *Solanum lycopersicum* adıyla tanımlanmakta olup, *Solanaceae* (patlıcangiller) familyasının *Solanum* cinsi içerisinde yer almaktadır. Bu familya, bitkiler aleminde 2500'den fazla türle temsil edilen ve "gece gölgesi" olarak da bilinen geniş bir gruba oluşturmaktadır. *Solanum* cinsi ise tek ve çok yıllık bitki türlerini barındıran, çiçekli bitkiler (Anthophyta) arasında en büyük kladlardan birini oluşturmaktadır (Frodin, 2004). Patates (*S. tuberosum*), patlıcan (*S. melongena*), çeşitli *Capsicum* türleri ve karaçalı türleri (*S. nigrum*, *S. dulcamara* gibi) familyanın diğer önemli temsilcileridir. Domates ilk olarak Miller tarafından 1754 yılında *Lycopersicon esculentum* olarak adlandırılmış; ancak 1990 yılında Child tarafından yapılan taksonomik düzenleme ile *Solanum lycopersicum* ismi benimsenmiştir (Diez ve Nuez, 2008).

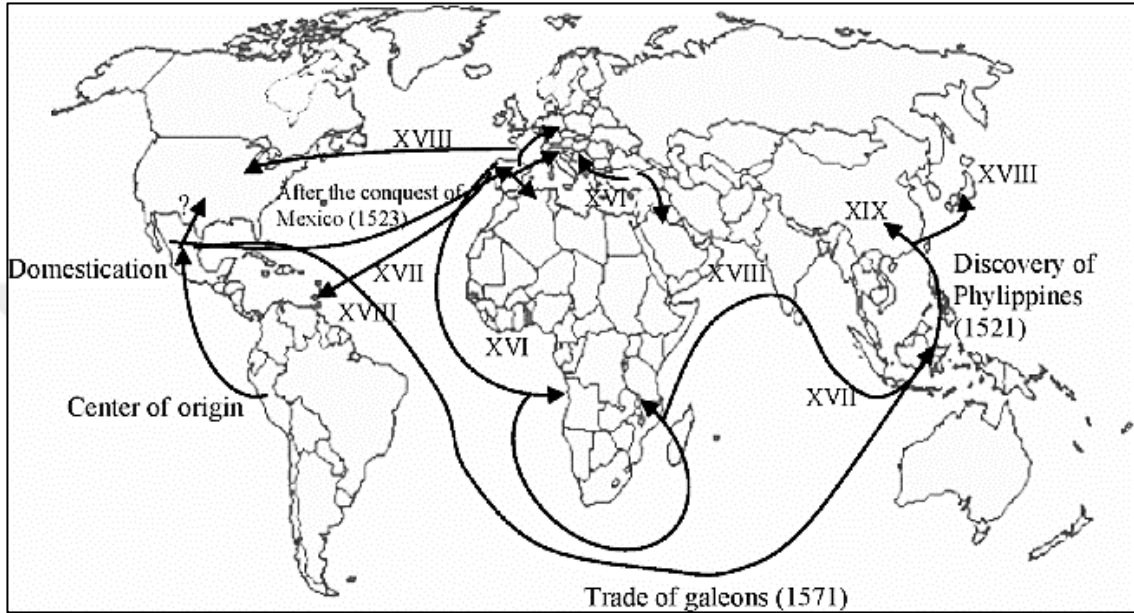
Filogenetik değerlendirmelere göre *Lycopersicon* cinsi iki ana gruba ayrılmaktadır: "*L. hirsutum*-benzeri" ve "*L. peruvianum* ile *L. chilense*-benzeri" gruplar (Hobson ve Grierson, 1993).

Çizelge 2.1. *Lycopersicon* Cinsinin Filogenetik Açından İki Temel Alt Gruba Ayrılması (Stevens and Rick 1986)

1) <i>L. hirsutum</i> -benzeri	2) <i>L. peruvianum</i> and <i>L. chilense</i> -benzeri
<i>L. hirsutum</i> and <i>L. hirsutum</i> var <i>glabratum</i> .	<i>L. peruvianum</i>
<i>L. pennellii</i>	<i>L. peruvianum</i> var <i>humifusum</i>
<i>L. esculentum</i>	<i>L. chilense</i>
<i>L. esculentum</i> var <i>cerasiforme</i>	
<i>L. cheesmanii</i>	
<i>L. pimpinellifolium</i>	
<i>L. parviflorum</i>	
<i>L. chmielewskii</i>	
<i>Solanum lycopersicoides</i>	

Domatesin kültürel ve tarımsal yolculuğu, Güney Amerika'da Aztek uygarlığı tarafından tüketilmesiyle başlamış olup, bitkinin genetik kökenlerinin Kolombiya, Şili, Ekvador, Bolivya ve Peru'yu kapsayan And bölgesine dayandığı bilinmektedir. Bu coğrafyada bulunan yabani domates türleri, modern kültür domatesiyle genetik

akrabalık göstermektedir. Avrupa'nın domates ile tanışmasına ilişkin farklı teoriler öne sürülmüştür. En yaygın kabul gören görüş, Kristof Kolomb'un Amerika kıtasını keşfetmesinden sonra domatesin gemiler aracılığıyla Avrupa'ya taşındığı yönündedir (Rick, 1951). Alternatif bir görüşe göre ise, İspanyol denizci Hernán Cortés'in 16. yüzyılda Meksika'yı istila ettiği sırada domates tohumlarıyla karşılaştığı ve bu tohumların 19. yüzyılın başlarında Avrupa'ya getirildiği, ardından tüm dünyaya yayıldığı belirtilmektedir (Esquinas-Alcázar & Nuez, 1995) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. 16. yüzyılda domatesin olası yayılım rotası (Esquinas-Alcázar ve Nuez, 1995)

Domates (*Solanum lycopersicum*), çift çenekli (embriyolarında iki kotiledon bulunan) ve esas olarak kendine döllen (otokagami) bir bitki türüdür. Açık alanlarda veya örtü altı koşullarda yetiştirilen bu türde, stigmaların ve anterlerin boy farkı gösterdiği durumlarda %1–5 oranında yabancı döllenme (allogami) de görülebilmektedir. Tipik bir domates çiçeği; bir dişi organ (pistil), beş çanak yaprak (sepal), taç yaprak (petal) ve erkek organlardan (anter) oluşur. Sarı renkli çiçeklere sahip olan domates bitkisi hermafrodit olup hem dişi hem de erkek üreme organlarını aynı çiçekte taşır. Domates bitkisi yaklaşık 5 metreye kadar derinleşebilen güçlü bir kök sistemine sahiptir (da Silva Costa vd. 2017) ve toprak üstü kısmı yaklaşık 180 cm'ye kadar uzayabilir. Etli meyve tipinde sınıflandırılan domates meyvesi, içerdiği likopen miktarına bağlı olarak farklı kırmızı tonlarında olabilir (Şekil 2.2). İnsan sağlığı açısından önemli faydalar sağlayan domates meyvesi; karotenoidler (likopen, β -karoten ve lutein), fenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asitler ve tanenler) ve çeşitli vitaminler (C, E ve B grubu) bakımından zengindir (İlahy vd. 2011).

Domates, pH değeri 5,0–7,0 arasında olan, hafif ve tınlı yapıda topraklarda en iyi gelişimi gösterir. Ortalama gündüz sıcaklığının 18–25 °C, gece sıcaklığının ise 10–20 °C arasında olduğu koşullarda 90–150 gün arasında değişen optimal büyüme süresi ile hızlı gelişen bir üründür (FAO, 2008).

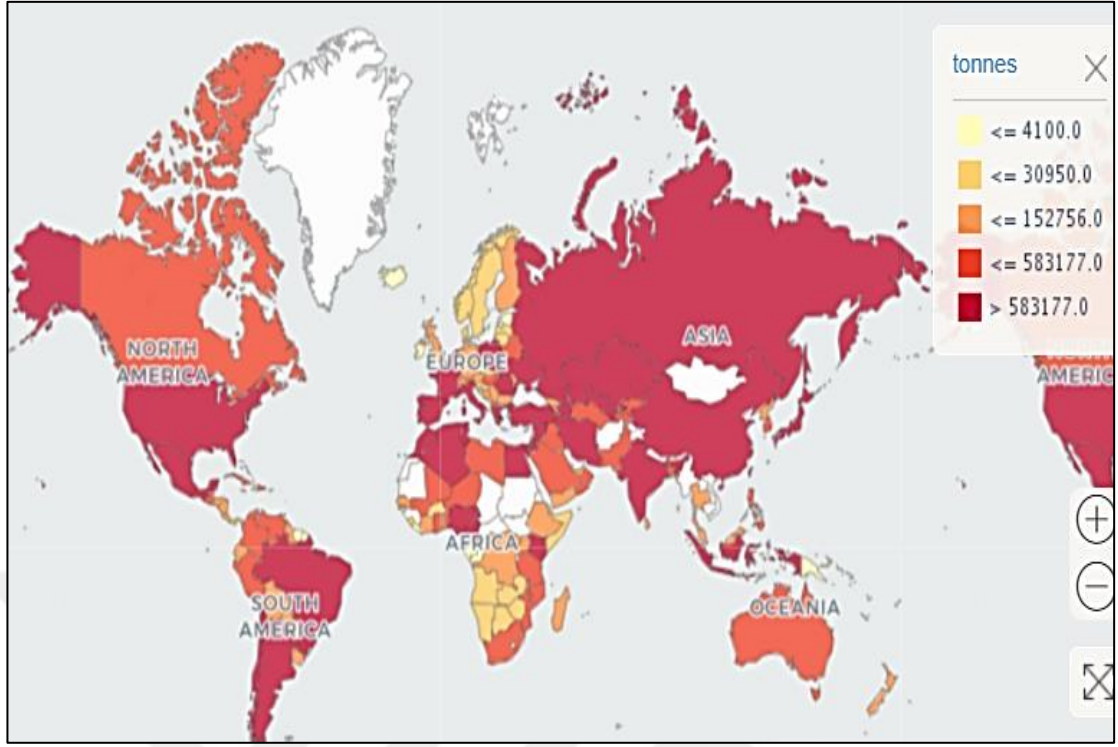


Şekil 2.2. farklı kırmızı tonlarında renklenme gösteren domates meyveleri (Bülbül 2021)

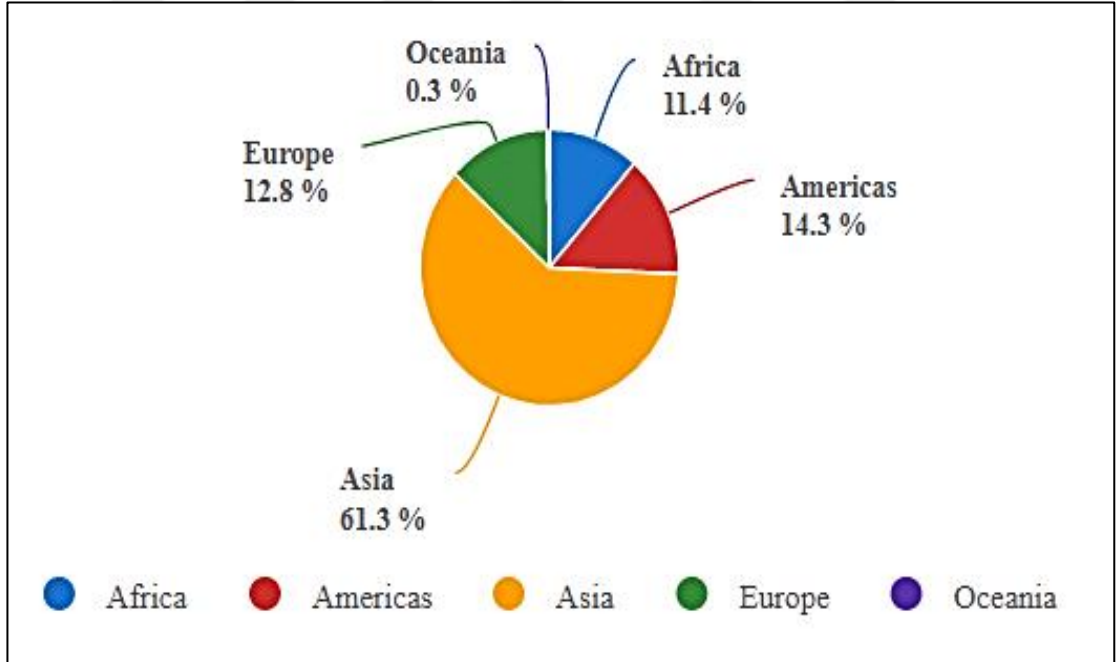
Domates, taze tüketiminin yanı sıra gıda endüstrisinde de farklı şekillerde değerlendirilmektedir. Özellikle yüksek kuru madde içeriği, renk, tat ve aroma gibi özelliklerinden dolayı belirli domates çeşitleri işlenmeye uygun bulunmakta; salça, sos, püre, ketçap, domates suyu, doğranmış veya soyulmuş halde hem iç hem de dış pazarlarda değerlendirilmek üzere tercih edilmektedir (Costa ve Heuvelink, 2018). Türkiye, sanayi tipi domates üretimini değerlendirme açısından yaklaşık 2.100.000 tonluk üretimle dünyada 5. sırada yer almaktadır (Duman ve Düzyaman, 2017).

Genetik özellikleri açısından değerlendirildiğinde, $2n = 24$ kromozoma sahip olan domates bitkisi, zaman içinde daha az sayıda özellik (karakter) üzerinden yapılan seleksiyonlar nedeniyle diğer bazı bitkilere göre daha düşük genetik çeşitliliğe sahiptir (özellikle 1940 öncesi kültüre alınan türlerde) (Poczai vd. 2018). Uluslararası Domates Genom Dizileme Konsorsiyumu tarafından “Sanger Dizileme Yöntemi” ile yapılan çalışmada, 12 kromozomda yaklaşık 35.000 genin bulunduğu ve domatesin toplam DNA uzunluğunun 950 megabaz çift olduğu belirlenmiştir. Bu genomun %75’inden fazlasının heterokromatin bölgelerden oluştuğu tespit edilmiştir (Díez ve Nuez, 2008).

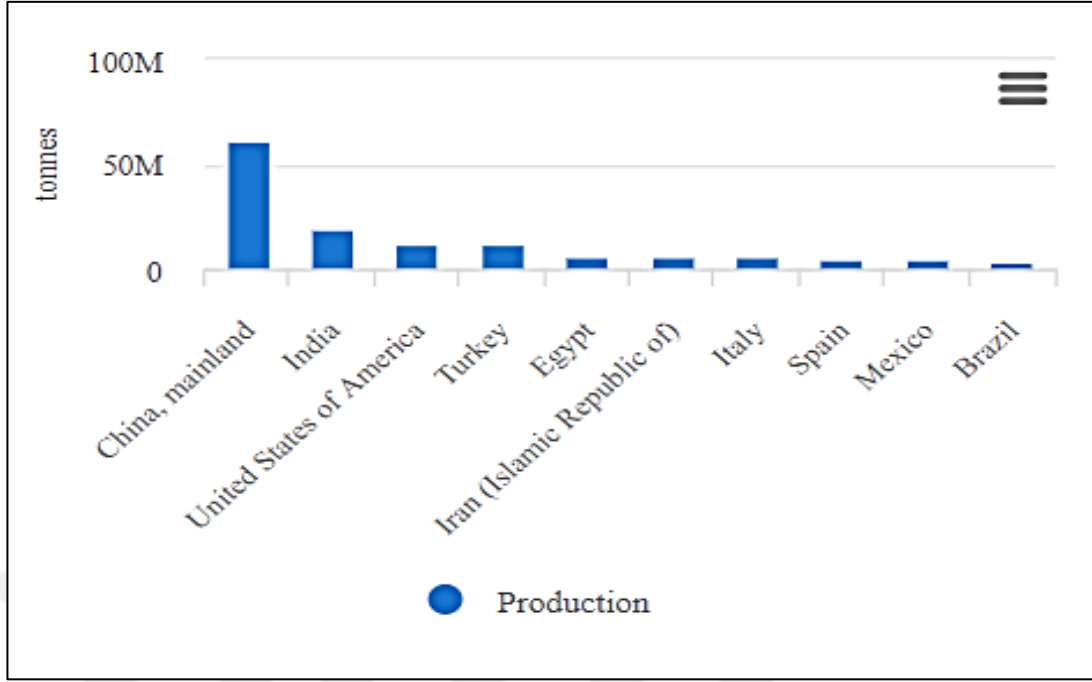
Domates, dünya genelinde hem üretimi yapılan hem de ithalat ve ihracatı yapılan önemli bir tarım ürünüdür (Şekil 2.3). Dünya domates üretiminin %61,3’lük kısmı Asya kıtasında gerçekleşmektedir (Şekil 2.4) ve domatese dayalı ürünlerin küresel üretimi her geçen gün artmaktadır. Büyük bir bölümü Asya kıtasında yer alan Türkiye, Çin, Hindistan ve Amerika Birleşik Devletleri’nden sonra dünyanın üçüncü büyük domates üreticisi konumundadır (Şekil 2.5) (FAO, 2023).



Şekil 2.3. Domatesin Dünya Genelindeki Üretim Alanları (FAO 2023)



Şekil 2.4. Domates üretiminin kıtalara göre dağılımı (FAO, 2023)



Şekil 2.5. Domates üretiminde önde gelen ülkelerin sıralaması (FAO, 2023)

Türkiye'nin toplam 78.350.000 hektarlık yüzölçümünün yaklaşık %49'una karşılık gelen 38.500.000 hektarında tarımsal üretim gerçekleştirilmektedir. Bu üretim alanlarında yaklaşık 13,3 milyon ton domates üretilmekte olup, ülkemizdeki domates üretim miktarı her geçen yıl artış göstermektedir (FAO, 2023) (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Türkiye'de yıllara göre domates üretimi (FAO, 2023)

Yıllar	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Domates Üretim Miktarı (1000 Ton)	9.440	9.854	10.985	10.052	11.350	12.615	12.600	12.842	13.350

Türkiye'nin sahip olduğu yüksek domates üretim kapasitesi, yıllar içerisinde artan ihracat hacmi ile birlikte değerlendirildiğinde, bu ürün grubunun ülke ekonomisine sağladığı katkı oldukça önemlidir. (FAO, 2023).

2.2. Canavar Otunun (*Orobanch* spp. ve *Phelipanche* spp.) Biyolojisi

Parazit bitkiler, gelişimlerinin özellikle erken evrelerinde diğer bitkilere kıyasla konukçu bitkiye tamamen bağımlı yaşayan organizmalardır (Sürmen vd. 2014). Fotosentetik aktiviteye ve fonksiyonel kloroplastların varlığına göre parazit bitkiler iki ana gruba ayrılır: hemiparazitler (yarı parazit) ve holoparazitler (tam parazit). *Orobanch* türleri, su ve mineral madde ihtiyacını tamamen konukçu bitkiden karşılayan holoparazit otsu bitkiler sınıfına girer (Young ve dePamphilis, 2000).

Bu türlerde klorofilin bulunmaması nedeniyle yeşil renk gelişimi gerçekleşmez; bunun yerine dokularda antosiyanin birikiminin daha belirgin olması bitkilere özgün bir renk kazandırır (Wheldale, 1916). Canavar otu olarak da bilinen Broomrape türleri tohumla çoğalan tek yıllık parazit bitkilerdir ve yaşam döngüleri üç temel evreden oluşur: tohum yayılımı, çimlenme ve parazit yaşam evresi (Dhanapal vd. 1996). Toprak üstünde görülebilen çiçekli sürgünlerin gelişimiyle birlikte, bu bitkiler çevreye toz büyüklüğünde, binlerce tohum içeren çiçek salkımları üretir (Joel vd. 2007).

Bu parazit bitkilerin yaşam sürelerinin büyük bir bölümünü toprak altında geçirdiklerinden, tarım alanlarında erken dönemde tespit edilmeleri oldukça zordur (Eizenberg vd. 2012). *Orobanch* türleri, yeryüzü florasında bilinen en küçük tohumlara sahip bitkiler arasında yer almakta olup, tohum uzunlukları 1 mm'den küçüktür (Piwowarczyk ve Jankowska-Błaszczuk, 2014). Tür ayrımında önemli bir morfolojik özellik olarak tohum yüzeyi morfolojisi, *Orobanch* ile *Phelipanche* cinslerinin birbirinden ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (Deif vd. 2000). Elektron mikroskobu ile yapılan analizler sonucunda *Orobanch* tohumlarının lif içermeyen, düzgün ve granüler yapıda periklinal yüzeylere sahip olduğu belirlenmiştir (Krupp vd. 2015).

Orobanch türleri hermafrodit çiçeklere sahip olup, kendine tozlaşma veya kontrollü melezleme yoluyla tohum oluşturabilir (Ephrath ve Eizenberg 2010). Kahverengi ve oval yapıda olan tohumlar oldukça küçüktür ve bu nedenle rüzgar, su veya diğer çevresel etkenlerle kolayca yayılabilir (Dhanapal vd. 1996). Bu bitkiler, 50.000 ile 500.000 arasında tohum üretebilmekte ve bu tohumlar toprakta 10 yıldan fazla canlı kalabilmektedir (Gevezova vd. 2012).

Toprak altı parazitleri olarak tanımlanan *Orobanch* türleri, dünya genelinde tarımsal üretimde önemli kayıplara neden olmaktadır. Çimlenen tohumlar, birkaç gün içinde konak bitki köklerine tutunamazlarsa canlılıklarını kaybederler (Kohlen 2011). Bu tohumlar, genellikle toprakta dormant (uyku halinde) olarak bulunur ve yalnızca uygun iklim ve toprak koşullarında, konak bitki köklerinden salınan uyarıcı bileşikler ile çimlenebilirler (Brown vd. 1949). Strigolakton adı verilen bu bileşikler, çimlenmeyi tetikleyen en güçlü uyarıcılardır (Cook vd. 1966). Uyarıcıların etkisiyle önce radikül (çimlenme borusu) gelişir ve ardından haustorium oluşumu gerçekleşir; bu yapı sayesinde konak bitki köklerine bağlanma ve vasküler dokuya penetrasyon sağlanır (Musselman 1980). Bu süreçte radikül, konak kökün kimyasal sinyallerine yanıt olarak "appressorium" adı verilen tutunma yapısını oluşturur (Frank 1883).

Çimlenmenin ardından konak köküne bağlanan embriyonik bitki, haustorium adı verilen özel bir beslenme yapısı geliştirerek konağa bağlanır (Habimana vd. 2014). Haustorium, parazit anjiyospermiler için özgü bir yapı olup üç temel işlevi yerine getirir:

konak köküne tutunma, konağa penetrasyon ve çözünür maddelerin emilimi (Visser ve Dorr 1987). *Orobanch* bitkilerinde haustorium, konak köküyle ilk teması sağlayan primer haustorium ve konukçu ile daha yoğun temas kuran sekonder haustorium olmak üzere ikiye ayrılır (Rajanna vd. 2005). Bu yapı, mitokondri, ribozom ve endoplazmik retikulum gibi organeller içeren parenkimatik hücrelerden oluşur (Visser ve Dorr 1984). Haustorium, konukçu bitki köküyle temas ettiğinde, konukçu hücreleri enzimatik aktivitelerle çürütülür ve bu sayede parazit bitki konak vasküler sistemine bağlanır (Stewart ve Press 1990).

Parazitin konağa tutunmasından sonraki 1–2 hafta içerisinde, kök yüzeyinde 5–20 mm çapında, daha sonra çiçek oluşturacak sürgün tomurcuğu içeren yumru (tüberkül) yapısı gelişir (Hassan vd. 2004). Tüberküller, fotosentez ürünlerinin büyük kısmını depolayarak konak bitkinin gelişimini ve verimini ciddi ölçüde düşürür (Surov vd. 1998). Ayrıca, tüberkül üzerindeki sekonder kökler sayesinde konak kökün farklı kısımlarıyla da temas kurabilen parazit, birkaç hafta içinde toprak yüzeyine çıkarak çiçeklenme kabiliyetine sahip sürgün oluşturur (Díaz vd. 2006). Bu süreç, yüz binlerce küçük tohum içeren kapsüllü çiçeklerin hızla gelişmesine neden olur (Foy vd. 1989).

Genetik kontrol stratejilerinde hedef alınabilecek ilk aşamalardan biri, oldukça karmaşık bir biyolojik süreç olan parazit yabancı ot tohumların çimlenme aşamasıdır (Goldwasser ve Yoder 2001). Literatürde strigolaktonların ≤ 10 pM konsantrasyonda dahi çimlenmeyi uyaran en güçlü kimyasal sinyal olduğu bildirilmektedir (Kim vd. 2010).

2.3. Canavar Otunun Domates Üretimindeki Etkileri ve Mücadelesi

Akdeniz ikliminin yaygın olduğu coğrafyalarda ve özellikle Türkiye, İtalya, İspanya ve Fas gibi ülkelerde, *Orobanch* türleri; domates, patlıcan, tütün, ayçiçeği, bakla ve mercimek gibi ekonomik değeri yüksek kültür bitkilerinde önemli verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır (Aksoy ve Pekcan, 2014). Özellikle *Orobanch ramosa* ve *O. aegyptiaca* türleri, *Solanaceae* familyasına ait domates, patlıcan ve patates gibi ürünlerde, ayrıca *Fabaceae* familyasından bakla ve mercimekte ciddi zararlara yol açarken; *Orobanch crenata*, daha çok baklagilleri; *Orobanch cumana* ise ayçiçeğini hedef alır (Kadıoğlu, 2009).

Ülkemizde yaygın olarak görülen dört temel *Orobanch* türü (*O. aegyptiaca*, *O. ramosa*, *O. crenata* ve *O. cernua/cumana*), başta domates olmak üzere, ayçiçeği, mercimek, bakla, patlıcan ve tütün gibi önemli tarım ürünlerinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Bülbül vd. 2009). Bu türlerin neden olduğu ortalama verim kaybının, tarımsal üretimi sınırlandıran tüm faktörler içerisindeki payı yaklaşık %30 olarak bildirilmektedir (Hershenhorn vd. 2009). Özellikle *O. ramosa*, domates üretim bölgelerinde en tehlikeli türlerden biri olarak kabul edilmekte ve dünya genelinde %50'ye varan verim kayıpları ile ilişkilendirilmektedir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda *O. ramosa*'nın domateste ortalama %24, *O. crenata*'nın ise baklada %82'ye varan kayıplara neden olduğu saptanmıştır (Aksoy ve Uygur, 2008).

Genel olarak, yabancı ot kontrolü yapılmadığında küresel düzeyde ürün veriminde %43'e varan kayıplar yaşanabileceği belirtilmektedir (Oerke, 2006). *Orobanch* türlerinin neden olduğu verim kayıpları %5 ile %100 arasında değişmekte

olup, ortalama %34 düzeyindedir (Linke vd. 1989). Parazit bitkiler, konukçu bitkiden su, mineral ve organik bileşenleri emerek büyümesini engeller; yoğun istila durumlarında ürün verimi tamamen kaybedilebilir (Sauerborn, 1991).

Mücadele yöntemlerinden biri olan elle yolma, canavar otları toprak yüzeyine çıktıktan sonra uygulanabilmektedir. Her ne kadar bu aşamada konukçu bitki zaten zarar görmüş olsa da, toprağa düşecek tohum miktarını azaltmak açısından etkili bir yöntemdir (Parker ve Riches, 1993). Fiziksel mücadele yöntemlerinden solarizasyon da, topraktaki canavar otu tohum bankasını azaltmak amacıyla yaygın şekilde kullanılan etkili bir tekniktir (Abu-Irmaileh, 1991; Sauerborn vd. 1989). Pek çok toprak kökenli hastalık ve zararlıların kontrolünde kullanılan kimyasal toprak fumigantları, canavar otlarıyla mücadelede de değerlendirilmektedir. Ancak bu kimyasalların ekonomik olmaması, hedef dışı organizmalar üzerinde toksik etkilere sahip olmaları, hava ve su kirliliğine sebep olmaları ve özel, maliyetli uygulama ekipmanları gerektirmeleri nedeniyle kullanımları sınırlıdır (Goldwasser ve Rodenburg, 2013). Canavar otlarının kontrolünde tuzak veya yakalayıcı bitkilerden de yararlanılmaktadır. Tuzak bitkiler, parazitin çimlenmesini uyarabilen ancak konukçu olmayan bitkilerdir. Tuzak bitkinin kök salgıları nedeniyle çimlenen parazit, konukçu bulamadığı için kısa sürede ölür (Parker ve Riches, 1993). Sorgum (*Sorghum bicolor*), arpa (*Hordeum vulgare*), mısır (*Zea mays*), bazı baklagiller (*Vicia villosa* ve *V. atropurpurea*), üçgül (*Trifolium* spp.), keten (*Linum usitatissimum*), kişniş (*Coriandrum sativum*), kenevir (*Cannabis sativa*), yeşil mercimek (*Phaseolus aureus*), fasulye (*Phaseolus vulgare*), yonca (*Medicago sativa*), soya fasulyesi (*Glycine max*) ve nohut (*Cicer arietinum*) gibi türler, topraktaki tohum rezervini azaltmada etkili tuzak bitkiler arasında sayılmaktadır (Kleifeld vd. 1994; Kebreab ve Murdoch, 2001; D Rubiales vd. 2009; Acharya, 2012; Qasem, 2019; Ye vd. 2020). Yakalama bitkileri ise parazitin gerçek konukçusu olup, parazit bitki köke tutunduktan sonra yok edilerek topraktaki tohum bankasının azaltılması sağlanmaktadır. Bakla (*Vicia faba*), kolza (*Brassica campestris*), beyaz hardal (*Sinapis alba*), mercimek (*Lens culinaris*) ve çemen otu (*Trigonella foenum-graecum*) yakalayıcı bitki olarak bildirilen türlerdir (Parker ve Riches, 1993). Canavar otlarıyla biyolojik mücadelede ise çeşitli fungus, bakteri ve böcek türleri üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Klein ve Kroschel, 2002; Boari ve Vurro, 2004; Zermane vd. 2007).

Parazit bitkilere karşı yapılan kimyasal mücadelede, ALS grubu herbisitlerden yararlanılmaktadır. Ancak, parazit bitki tohumlarının toprakta farklı derinliklerde yer alması, bu herbisitlerin etkin şekilde uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Herbisitlerin toprak uygulamalarının yalnızca bitkinin kök yapısına değil, aynı zamanda parazit tohumlarının konumuna da uygun biçimde optimize edilmesi gerekmektedir (Eizenberg vd. 2007). Ayçiçeği canavar otu kontrolünde IMI toleranslı "Clearfield" ayçiçeği çeşitleri geliştirilmiş ve bu çeşitlerde IMI grubu herbisitler başarıyla kullanılmaktadır (Tan vd. 2005). Canavar otlarıyla kimyasal mücadele yapılabildiği durumlarda, çevre dostu uygulamalar için hassas tarım yöntemleri göz önünde bulundurulmalı, doğru zamanlama ve kesin konumda uygulanmasına özen gösterilmelidir (Eizenberg vd. 2013). Bununla birlikte, ALS inhibitör grubundaki herbisitlerin kullanımı, canavar otlarında herbisit direncinin gelişmesine neden olabilmektedir (Kaundun vd. 2024).

2.4. Strigolaktonların Biyosentezi ve Fonksiyonları

Bitkiler tarafından üretilen ve fotosentez ürünleri olmayan, fizyolojik süreçler sonucu sentezlenen “sekonder metabolitler” (doğal ürünler), fotosentez veya solunum gibi yaşamsal olaylar için doğrudan gerekli olmayan bileşiklerdir (Thesis ve Lerdau 2003). Bu bileşikler; tozlaşmada rol oynayan hayvanları çekme, patojenlere karşı koruma sağlama veya alelopati yoluyla diğer organizmaların çimlenmesini, büyümesini, hayatta kalmasını ve üremesini etkileme gibi çeşitli işlevlerde yer alırlar (Croteau et al. 2000).

Canavar otu tohumları da yalnızca konak bitkinin kökleri tarafından uygun iklim ve toprak koşullarında sentezlenen ve rizosfer bölgesine salınan bu sekonder metabolitlere tepki olarak toprakta çimlenirler (Graves 1995). Birçok sekonder metabolit, primer metabolitler temel alınarak sentezlenir ve ksilem, floem veya apoplast aracılığıyla bitki içerisinde taşınabilir (Akula ve Ravishankar 2011).

Sekonder metabolitler için sabit bir sınıflandırma yöntemi bulunmamakla birlikte, genellikle biyosentetik kökenlerine göre üç ana gruba ayrılır: (I) Terpenoidler (terpenler), (II) Flavonoidler ve bunlarla ilişkili fenolik/polifenolik bileşikler, (III) Azot içeren alkaloidler ve kükürt içeren bileşikler (Crozier et al. 2006). Terpenler, bitki gelişimi ve büyümesinde (fitohormon olarak) önemli rol oynamanın yanı sıra, bitki ile çevresi arasındaki etkileşimlerde de görev alır. Terpenoidler, hemen tüm organizmalarda bulunan ve yapısal (ör. kolesterol) ya da işlevsel (ör. karotenoidler) önemli fonksiyonları olan izoprenoid türevli sekonder metabolitlerdir (Tholl 2006).

Bitkisel terpenoidler; sitozol, plastit ve mitokondride sentezlenir ve temel olarak izopentenil difosfat (IPP) ve onun izomeri olan dimetilalil difosfat (DMAPP) türevlerinden (C₅H₈)_n izopren birimlerinin farklı şekilde bağlanması ile oluşurlar (Mander ve Liu 2010). DMAPP'nin bir veya daha fazla IPP ile bağlanması sonucu geranil difosfat (GPP, C₁₀), farnezil difosfat (FPP, C₁₅) veya geranilgeranil difosfat (GGPP, C₂₀) gibi moleküller sentezlenir. Bu yapılar, aynı zamanda beta-karoten gibi karotenoid öncüllerinin oluşmasında da görev alır (Liang et al. 2002).

Karotenoidler, 40 karbonlu yapıya sahip tetraterpen sınıfına girer ve temel olarak mevalonat yolaklarından sentezlenir. İzoprenoid türevi olan fitoten, karotenoidlerin öncülüdür (Seigler 1998). DMAPP'nin asetil-CoA ya da pirüvik asitten türetilmesiyle GPP ve GGPP yapıları oluşturulur; ardından fitoten desatüراز enzimi yardımıyla fitoten, likopene dönüşür ve likopen siklaz enzimi aracılığıyla α-karoten ve β-karoten gibi karotenoidler sentezlenir (Maoka 2019).

Bugün bilinen yaklaşık 500 karotenoidden yalnızca dörtte biri bitkilerde bulunmakta olup, karotenoidler bitki kloroplast ve kromoplastlarında bulunur ve abisik asit gibi bitki hormonlarının sentezinde rol oynar (Britton 1983). Tetraterpenler arasında doğada en yaygın olanlar; likopen, α-, β- ve γ-karotendir. Bu grupta en bilinen bileşik olan β-karoten, A vitamini öncülüdür (Weeks 1986).

β-Karoten (all-trans-β-karoten), 1831 yılında havuç köklerinden izole edilmiştir. Planar yapıda, her iki ucunda β-iyonon halkası bulunan, 11 konjuge çift bağa sahip hidrokarbon yapısında ve C₄₀H₅₆ moleküler formülüne sahiptir (Zabodalova 2009).

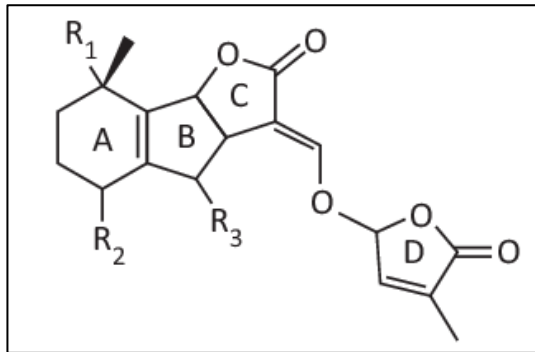
Rizosferde pek çok bitki tarafından sentezlenen sekonder metabolitler, kimyasal sinyaller olarak görev yapabilir. Bunlardan biri olan strigolaktonlar (SL'ler), hem endojen (fitohormon) hem de eksojen (sinyal molekülü) olarak işlev görürler ve en önemli karotenoid türevleridir (Waldie et al. 2014).

Strigolaktonlar, seskiterpen laktonlar (terpenoid laktonlar) sınıfına girer. Terpenlerin halka yapısına dönüşmesi ve lakton oluşturması gibi kimyasal değişiklikler, strigolaktonların yapısını etkiler. Karotenoid türevi olan strigolaktonlar ile abisik asit arasında yapısal benzerlikler mevcuttur (Parry ve Horgan 1992).

Strigolaktonlar, enol eter bağı ile birbirine bağlı üç halkalı lakton (ABC halkası) ve hidroksimetil butenolid (HMB, D halkası) yapılarından oluşur (Şekil 2.6). Tüm doğal SL'lerde ortak olan D halkası, biyolojik aktivitenin temel belirleyicisi olarak kabul edilir. D halkasında yapılan değişiklikler SL'nin biyolojik aktivitesini azaltırken, ABC halkası üzerinde bazı kimyasal modifikasyonlar mümkündür (Umehara et al. 2015).

Doğal SL'ler, A halkasında bir veya iki metil grubu; A ve B halkalarında ise hidroksil, asetiloksil veya metoksil grupları içerebilir (epoksi ve okso grupları da dahil). C ve D halkaları genellikle korunaklı yapıya sahipken, A ve B halkaları çeşitlilik gösterir (Xie et al. 2010).

GR24, GR7 ve GR5 gibi sentetik SL analogları, strigolakton eksikliği gösteren çeltik mutanı (d10) kullanılarak geliştirilmiş ve çimlenme deneylerinde yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak, tüm doğal strigolaktonlarda D halkasındaki 2'R konfigürasyonu (C-2' pozisyonunda) ve doymamış lakton yapısı, *Orobanch* tohumlarının çimlenmesi ve AM fungusu dallanma faktörlerinin etkilenmesi için gereklidir (Zwanenburg et al. 2016).

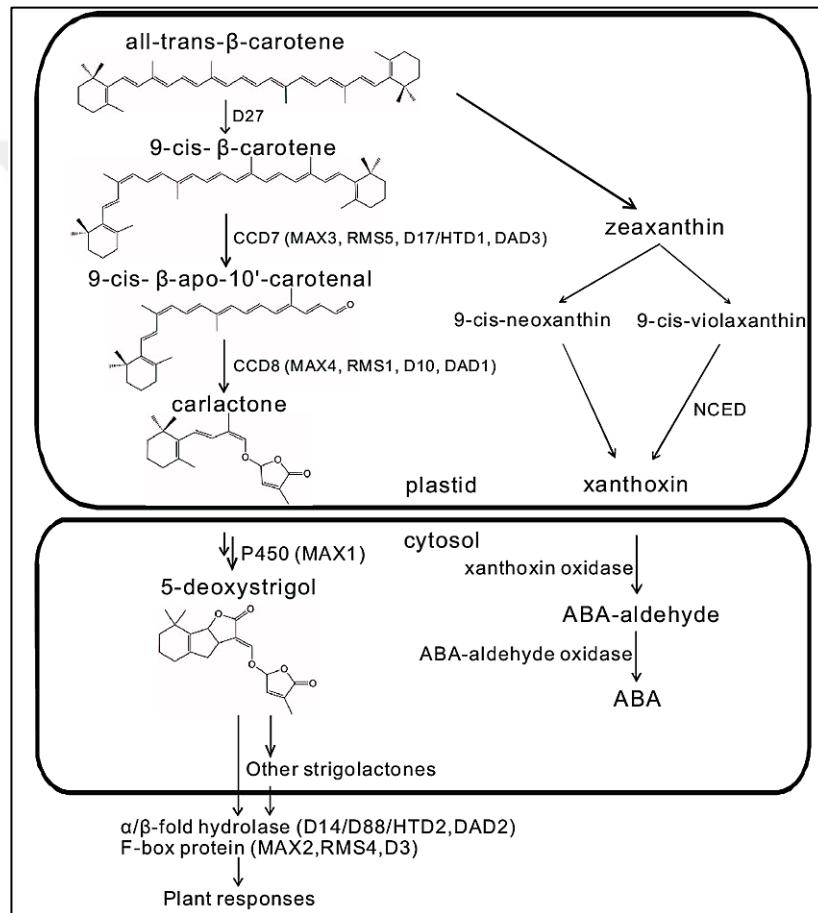


Şekil 2.6. Strigolakton yapısı (Ruyter-Spira vd. 2013)

Strigolaktonların (SL'ler), karotenoid kökenli bir öncül bileşikten türediği ilk kez absisik asit (ABA) eksikliği bulunan mısır mutantları kullanılarak belirlenmiştir (Matusova vd. 2005).

SL biyosentez yollarında dört temel enzim görev almaktadır: D27, CCD7, CCD8 ve sitokrom P450. Bu enzimlerden üçü (CCD7, CCD8 ve P450) *Arabidopsis thaliana* bitkisinde tanımlanmıştır. Strigolakton üretimi, plastid yapısına sahip tüm bitkilerde gerçekleşebilmektedir ve biyosentez yolunun başlangıcı, plastitte bulunan all-

trans- β -karotenin, Dwarf27 (D27) geni tarafından kodlanan β -karoten izomeraz enzimi aracılığıyla 9-cis- β -karotene izomerize edilmesiyle başlar. Bitkilerde SL sentezinin başlıca merkezi kök dokusudur. İlk aşamada, D27 proteini tarafından katalizlenen bu tepkime, all-trans- β -karotenin C-9 pozisyonundaki izomerizasyonunu sağlayarak 9-cis- β -karotenin oluşumunu sağlar. Ardından, 9-cis- β -karotenden, Karotenoid Ayrım Dioksijenazı 7 (CCD7) enzimi aracılığıyla 9-cis- β -apo-10'-karotenal oluşur; bunu takiben, Karotenoid Ayrım Dioksijenazı 8 (CCD8) enzimi ile “karlakton” (carlactone) sentezlenir. Bu genlerin aktiviteleri, SL biyosentezinde yer alan “çekirdek yolak” (core pathway) olarak kabul edilmektedir. Son aşamada ise, SL’lerin biyolojik olarak aktif çeşitli formları, karlakton öncül molekülünden sitokrom P450 enzim ailesine ait üyelerin katalitik etkisiyle sentezlenmektedir (Zhang vd. 2015) (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Strigolakton biyosentez yolağı (Cheng vd. 2013)

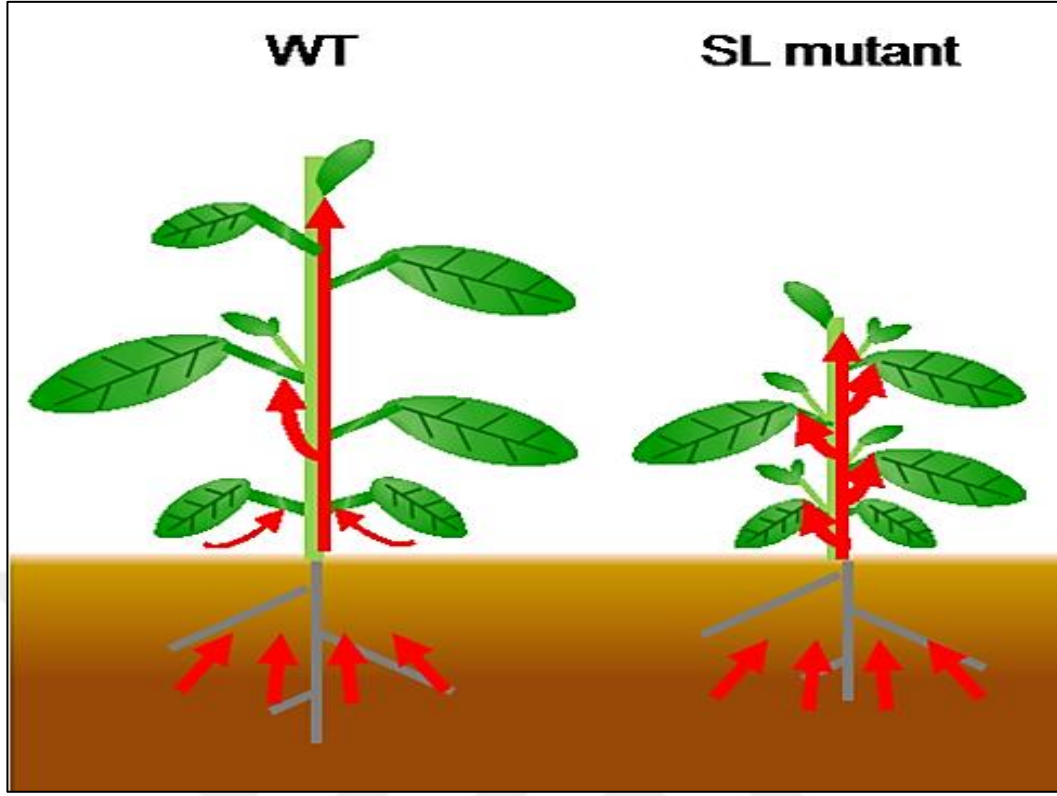
Strigolaktonlar (SL'ler), başlangıçta parazit yabancı otların çimlenmesini tetikleyen bileşikler olarak olumsuz bir ün kazanmış olsalar da, zamanla bitki gelişimi ve fizyolojisi açısından önemli bir fitohormon oldukları anlaşılmıştır. SL'lerin rizosferdeki iletişimde ve bitki gelişiminde, özellikle de arbusküler mikoriza (AM) mantarlarıyla kurulan simbiyotik ilişkilerde, kök kolonizasyonunu desteklemeleri ve koltuk sürgün dallanmasını baskılamaları gibi birçok yararlı işleve sahip oldukları ortaya konmuştur (Xie et al., 2010).

Sentetik SL analogu olan GR24 ile yapılan bir çalışmada, SL'lerin konak bitkide arbusküler mikoriza oluşturan mantar simbiyontlarında hif dallanmasını teşvik ettiği bulunmuştur. Buna karşılık, SL yetersizliği bulunan mutant bitkilerde AM oluşumunun azaldığı gözlemlenmiştir. Arbusküller, bitki köklerinde kortikal hücreler içerisinde oluşan karmaşık yapılardır ve SL'lerin tetiklediği hif gelişimi sayesinde mantarın konak bitki köküne kolonize olarak arbuskülleri oluşturduğu düşünülmektedir. Bu simbiyotik ilişki aracılığıyla mantar hifleri toprağa (rizosfere) yayılır ve çözünmüş mineral besin maddelerine (özellikle fosfat ve nitrat) ulaşarak bitkinin bu elementleri daha etkili bir şekilde almasını sağlar. Buna karşılık mantar, bitkiden elde ettiği karbon ve azotlu metabolitleri enerji ve amino asit kaynağı olarak kullanır. Her ne kadar bu simbiyotik ilişkinin başlatılmasındaki moleküler mekanizma tam olarak aydınlatılamamış olsa da, mantarlarda SL sinyal yollarında görev alan D14 tipi proteinlerin bulunmadığı bilinmektedir (Smith, 2014).

Strigolaktonlar yalnızca rizosferdeki rollerinden dolayı değil, aynı zamanda bitkilerde koltuk sürgün dallanmasını engelleme fonksiyonları açısından da büyük öneme sahiptir (Gomez-Roldan et al., 2008). SL yetersizliği gösteren mutantların aşırı dallanmış fenotip sergilemesi, SL'lerin koltuk sürgün dallanmasını negatif yönde düzenleyen bileşikler olduğu yönünde bir hipotezin ortaya atılmasına neden olmuştur (Şekil 2.8.). Bu bağlamda, iki temel mekanizmanın olası olduğu düşünülmektedir:

(I) Bu mekanizmalardan ilki, SL'lerin TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA ve PROLIFERATING CELL FACTORS 1-2 (TCP) gen ailesine ait bazı genlerin tomurcuklarda transkripsiyonel düzeyde düzenlenmesini sağlamasıdır. *Arabidopsis* ve bezelye bitkisinde yalnızca tomurcuklarda ifade edilen Branched1 (BRC1) geni, tomurcuk büyümesinin baskılanmasıyla doğrudan ilişkilidir. Gövdede etkili olan auksin hormonunun, sitokinin düzeylerini baskıladığı, böylece strigolakton biyosentezinden sorumlu genlerin ekspresyonunu artırdığı ve BRC1 geninin SL'ler tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. BRC1, dallanmanın engellenmesi için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür. Öte yandan sitokininler, SL'lere antagonistik etki göstererek BRC1 ifadesini baskılamak suretiyle tomurcuk gelişimini teşvik eder. brc1 mutantlarıyla yapılan çalışmalarda, aşırı dallanma fenotipinin görülmesi de bu mekanizmayı desteklemektedir.

(II) İkinci mekanizma ise, SL'lerin hücre zarında bulunan PIN-FORMED (PIN) ailesine ait oksin taşıyıcı proteinlerin plazma zarından sistematik olarak uzaklaştırılmasını tetikleyerek oksin taşınımını düzenlemesidir. PIN proteinleri, hücre içi oksin akışının ana bileşenleri olup, strigolaktonlar bu proteinlerin zar lokalizasyonunu değiştirerek apikal meristemden gövdeye olan oksin taşınımını engeller. Böylece, sürgün tomurcuğunun büyümesi için gerekli olan oksin yeterli düzeyde sağlanamaz ve koltuk sürgün tomurcuklarından oksin çıkışı engellenerek dallanma baskılanır. Bu durum, SL varlığında koltuksürgünler arasında oksin taşınımı rekabetinin artmasına neden olur (Koltai, 2014; Waldie vd. 2014; Brewer vd. 2015).



Şekil 2.8. Strigolaktonlar ve sürgün dallanması (Yamada ve Umehara 2015)

Rizosferde meydana gelen fosfat eksikliği (Pi yetersizliği) durumunda, strigolakton (SL) biyosentezi artmakta ve arbusküler mikoriza (AM) mantarlarıyla olan etkileşim güçlenmektedir. Bu nedenle fosfat eksikliğinde kök/gövde oranı azalmakta ve sürgün dallanmasının baskılanması gözlenmektedir. Öte yandan, Pi açısından yeterli koşullarda, SL yetersizliği olan veya SL'ye duyarsız mutantlarla yapılan değerlendirmelerde, yabancı tipe göre daha fazla yan kök yoğunluğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, SL'lerin esas kök gelişimini, yan kök ve adventif kök oluşumunu olumsuz etkilediği, ancak kök tüylerinin düzenlenmesini desteklediği ve kök mimarisini düzenleyen oksin ve etilen gibi diğer bitki hormonları ile denge kurduğu belirlenmiştir.

Bunlara ek olarak, SL'lerin yaprak yaşlanmasını (senesens) pozitif yönde düzenleyen bir faktör olduğu gösterilmiştir. Yaprak yaşlanması süreci sayesinde, besin maddeleri ihtiyaç duymayan yaşlı dokulardan genç dokulara yeniden taşınmaktadır. Bu nedenle, Pi yetersizliği koşullarında, SL'ler bitkilerin bu eksikliğe karşı fizyolojik adaptasyon geliştirmelerine yardımcı olan sinyal molekülleri olarak görev yapar. *Arabidopsis*'te yapılan çalışmalarda, oresara9 (ore9) mutantlarında yaprak yaşlanması gözlemlenmiş ve bu genin haritalandırılması sonucunda ORE9'un, SL sinyal yollarında görev alan MAX2 ile aynı translayona sahip olduğu ve tek bir baz çifti değişikliği nedeniyle erken translayon sonlanmasıyla yaprak yaşlanmasının bu genle ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Benzer şekilde, çeltikte yer alan DWARF3 (D3) geninin MAX2/ORE9'un bir ortoloğu olduğu belirlenmiş ve bu genin mutasyonu, karanlık koşullarda yaprak yaşlanmasında gecikmeye neden olmuştur (Czarnecki et al. 2013).

2.5. Strigolakton Biyosentezinde Görev Alan Genler

Strigolaktonların (SL'ler) biyosentezinde MAX1, MAX3/RMS5/D17 ve MAX4/RMS1/D10 genlerinin, sinyal iletim mekanizmasında ise MAX2/RMS4/D3 genlerinin işlev gördüğü ve bu genetik düzenin “MAX/RMS/D yolak” olarak adlandırıldığı belirlenmiştir (Gomez-Roldan vd. 2008). Pirinç bitkisi üzerinde yapılan daha sonraki bir çalışmada, d27 mutantlarında kök salgılarında 2'-epi-5-deoksistrigol adlı bir SL bileşiğinin azalması ve sürgün tomurcuklarında aşırı büyümenin gözlenmesi, D27 geninin SL biyosentezinin erken basamaklarında görev aldığını ortaya koymuştur (Lin vd. 2009).

Çeltikte tanımlanan OsD27 geninin, all-trans- β -karoteni (C40) 9-cis- β -karotene dönüştüren bir β -karoten izomerazı olduğu anlaşılmıştır. DWARF27 (D27) olarak bilinen bu demir içeren polipeptit, strigolakton üretimi için zorunludur. Ayrıca bu izomerazın stereo ve çift bağlara karşı özgüllük gösterdiği, en az bir serbest β -iyonon halkası taşıyan bisiklik karotenoidleri izomerleştirebildiği belirlenmiştir. OsD27'nin α -karotenin izomerleşmesini sağlayarak α -karoten türevi strigolakton benzeri bileşiklerin sentezine katkı sağlayabileceği de ifade edilmiştir (Bruno & Al-Babili, 2016).

Arabidopsis'te D27 ortoloğu olan AtD27 geni ile yapılan bir çalışmada, bu genin all-trans- β -karoteni 9-cis- β -karotene izomerize edebildiği; ancak 13-cis veya 15-cis β -karotenleri dönüştüremediği ortaya konmuştur. Bu durum, β -karoten izomerazın all-trans- β -karotenin 9-cis formuna özgül ve geri dönüşümlü bir şekilde kataliz sağladığını ve özellikle C9-C10 çift bağına karşı seçici olduğunu göstermektedir. Ayrıca AtD27'nin fosfat eksikliğine ve farklı bitki hormonlarına karşı yanıt mekanizmalarında işlev gösterdiği, ABA (absisik asit) biyosentezine katkıda bulunduğu ve gen ekspresyonunun oksin ve ABA hormonları tarafından düzenlendiği bildirilmiştir (Abauf vd. 2018).

All-trans- β -karoten hem strigolakton hem de ABA biyosentezi için ortak bir öncü moleküldür. Bu bileşik epoksidasyon ve hidroksilasyon reaksiyonlarıyla all-trans-violaksantin ve all-trans-neoksantin gibi epoksikarotenoidlere dönüşür. Epoksikarotenoidler ile β -karoten arasındaki yapısal benzerlik nedeniyle, D27 gen ürününün ABA biyosentezine dolaylı olarak katkı sağladığı düşünülmektedir. Arpa (*Hordeum vulgare*) bitkisinde yapılan bir çalışmada, HvD27 gen ekspresyonunun düşürülmesinin ABA üretimini artırdığı ve SL sentezini baskıladığı belirlenmiştir. Bu bulgu, iki olasılığı gündeme getirmiştir: (I) ABA, HvD27 üzerinden SL biyosentezini doğrudan baskılamaktadır; (II) D27 izomerazının geri dönüşümlü özelliği nedeniyle daha fazla öncül molekülün ABA yoluna aktarılması ile dolaylı bir düzenleme söz konusudur (Zhang, 2014; Wang vd. 2018). Ayrıca, azot veya fosfat yetersizliğinde olduğu gibi, kükürt eksikliği durumunda da SL sentezinin arttığı ve bu artışın D27 gen ekspresyonundaki yükselmeye bağlı olduğu rapor edilmiştir (Shindo vd. 2018).

Karotenoidlerin apokarotenoidlere dönüşümünü sağlayan gen ailesi CCO (Carotenoid Cleavage Oxygenase) genleridir. Bu ailede iki temel enzim sınıfı yer alır: 9-cis-epoksikarotenoid dioksijenazlar (NCED'ler) ve karotenoid ayrılma dioksijenazlar (CCD'ler). CCD ailesi hem içermeyen bir demir enzimi olup, C-C çift bağlarını keserken aynı zamanda dioksijen kullanarak karbonil türevlerinin oluşmasını sağlar. NCED enzimleri ise ABA biyosentezinin ilk basamağında 9-cis-violaksantin veya 9-cis-neoksantini parçalayan katalizörlerdir. Arabidopsis'te yapılan çalışmalarda bu aileye ait

beş NCED ve dört CCD (CCD1, CCD4, CCD7, CCD8) üyesi tanımlanmıştır (Priya ve Siva, 2014). CCD1 ve CCD4 enzimleri ise çiçeklerde veya çeşitli besinlerde aroma ve pigment oluşumunda görev alır (Gonzalez-Jorge vd. 2013).

Strigolakton yolakta görev yapan CCD7 ve CCD8 proteinleri plastid lokalizasyonlu, korunmuş genlerdir. CCD7 geninde 6-9 arası ekzon bulunurken, CCD8 geninin dikotil bitkilerde 5-6, monokotillerde ise 3-5 ekzon içerdiği bildirilmiştir. Ayrıca, CCD7 ve CCD8 genleri sırasıyla Arabidopsis (MAX3/AtCCD7), bezelye (RMS5), petunya (HTD1/D17), Arabidopsis (MAX4/AtCCD8), bezelye (RMS1), pirinç (D10) ve petunyada (DAD1) tanımlanmıştır (Wang vd. 2011). D27 tarafından sentezlenen 9-cis- β -karoten, önce CCD7 enzimi ile 9-cis-konfigürasyonda bir aldehite dönüştürülür. CCD7 enzimi, 9-cis- β -karotenin C9'-C10' çift bağını kırarak 9-cis- β -apo-10'-karotenal (C27) ve β -iyonon (C13) üretir. Takiben CCD8 enzimi, 9-cis- β -apo-10'-karotenalin C13'-C14' bağını keserek kök büyümesini destekleyen β -apo-13-karotenon (C18 keton) sentezler. Bununla birlikte, bu süreçten çok daha hızlı gerçekleşen ve strigolaktonların biyolojik aktivitesine sahip olan "karlakton (CL)" adlı bir öncü molekül de oluşabilir (Alder vd. 2012).

Domates genom verilerinin kullanıldığı bir çalışmada (SGN: <http://solgenomics.net/>), Arabidopsis ile homoloji karşılaştırması yapılarak SLCCD8 geni belirlenmiştir. SLCCD8 (Solyc08g066650) 8. kromozomda 3075 bp uzunluğunda ve 6 ekzona sahiptir. SLCCD8'de bu sinyal peptidi tespit edilmemiştir. SLCCD8'in en fazla kök dokusunda, ardından gövde ve yaşlı yapraklarda ifade edildiği rapor edilmiştir (Wei vd. 2016).

Phelipanche ramosa gibi parazit türlerde de CCD7 geninin varlığı belirlenmiş, *Phelipanche aegyptiaca*'da VIGS (virüs aracılı gen susturma) yöntemiyle PaCCD7 ve PaCCD8 genlerinin varlığı ortaya konmuştur (Aly vd. 2014). PaCCD7 proteini, *Nicotiana tabacum* ve *Petunia x hybrida*'daki CCD7 ile %69, domatesteki SLCCD7 ile %65 ve Arabidopsis'teki AtCCD7 ile %59 benzerlik göstermektedir. PaCCD8 proteini ise Petunya'daki Dad1/CCD8 ile %85, domatesteki SLCCD8 ile %84, tütün bitkisindeki NtCCD8 ile %84 ve Arabidopsis'teki AtCCD8 ile %66 oranında benzerlik göstermektedir (Aly vd. 2014).

Strigolakton çeşitlerinin karlaktondan (CL) türetilmesinde görev alan Sitokrom P450 (CYP) genleri, sitozolde yerleşik mono-oksijenaz enzimlerdir. Bu enzimlerden CYP711A1 kladı (özellikle Arabidopsis'te MAX1 geni tarafından kodlanan) SL biyosentezinde doğrudan görev alır (Koltaj & Prandi, 2019). Karlaktonun sitozole taşınmasının ardından, MAX1 enzimi tarafından oksidasyon ve B-C halkası kapanmaları gibi reaksiyonlara tabi tutulur. Böylece karlakton, strigolaktonlarda yer alan A ve D halkalarını ve enol eter köprüsünü taşımasına rağmen, ek olarak B ve C halkalarının da eklenmesiyle strigolaktonlara dönüşür. Bu süreçte 5-DS (5-deoksistrigol) ve/veya ent-2'-epi-5-DS (4-deoksiorobanchol, 4-DO) gibi öncüller oluşturulur (Seto vd. 2014). Ancak bazı bitkilerde bu öncüller her zaman kullanılmaz; örneğin ayçekirdeği asması (Moonseed) bitkisinde CLA'dan strigola dönüşümde 5-DS oluşmazken, börülce'de 4-DO orobanchol öncülü değildir (Iseki vd. 2018). Tütün bitkisinde hem orobanchol hem de strigol tipinde SL'lerin bulunduğu ve bunların her ikisinin de 5-DS'den türediği bildirilmiştir (Xie vd. 2013).

Arabidopsis, çeltik, mısır ve domateste yapılan çalışmalar MAX1 enziminin CL'den CLA'ya dönüşümünü gerçekleştirdiğini ve bu reaksiyonun yaygın olduğunu göstermiştir. MAX1 enzimleri üç sınıfa ayrılmıştır: (A1) CL → CLA; (A2) CL → 4-DO (CLA aracılığıyla); (A3) CL → CLA ve ardından 4-DO → orobanchol dönüşümü (Yoneyama vd. 2018). Arabidopsis'te CLA ayrıca metillenerek MeCLA'ya da dönüşebilirken, çeltikte Os900 (CYP711A2) karlaktonu CLA ve 4-DO'ya; Os1400 (CYP711A3) ise 4-DO'yu orobanchole dönüştürerek aktif SL üretimini sağlar (Zhang vd. 2014).

2.6. CRISPR/Cas9 Gen Düzenleme Teknolojisi

Son yıllarda genom düzenleme teknolojilerindeki gelişmeler sayesinde ökaryotik hücrelerin genomlarında kesin ve kontrollü değişiklikler yapmak mümkün hâle gelmiştir. Genom düzenleme amacıyla başlangıçta rastgele mutagenез, meganükleazlar, transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALENs) ve çinko parmak nükleazları (ZFNs) gibi yöntemler kullanılmış; ancak bu tekniklerin hedef dışı bölgelerde değişiklik yapma olasılığı yüksek olduğundan, zamanla daha hassas ve güvenilir yöntemlerle yer değiştirmiştir. Takiben, genom düzenleme stratejileri, mikroRNA (miRNA) ve küçük düzenleyici RNA (siRNA) gibi küçük RNA türlerini hedef alan mekanizmalara yönelmiştir (Khan 2019).

ZFN'ler yüksek maliyetli ve zaman alıcı yöntemlerdir, çünkü kapsamlı optimizasyon ve karmaşık hedef seçim süreçleri gerektirir (Chandrasegaran 2017).

TALEN sisteminde ise her yeni hedef bölge için yeni bir TALEN dimeri tasarlanması gerektiğinden, ayrıca büyük ve tekrar eden protein dizileri nedeniyle hücreye aktarımı zor olduğundan kullanımda zorluklar yaşanmaktadır (Gersbach vd. 2014).

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) adlı yeni bir gen düzenleme sisteminin keşfiyle birlikte, üç temel problem (boyut, sipesifiklik, maliyet) çözüme kavuşmuştur. Bu sistemde kullanılan rehber RNA'lar proteinlerden çok daha küçük yapıdır, DNA hedef bölgesine yüksek özgüllükle bağlanabilir ve üretimi daha ekonomiktir (Hostiuc 2018).

1987 yılında Osaka Üniversitesi'nde Yoshizumi Ishino ve arkadaşları tarafından *E. coli* genomunda tesadüfen CRISPR dizisine ait bir bölümün klonlanması (iap genine ait) bu sistemin ilk keşfini oluşturmuştur (Ishino vd. 1987).

2002 yılında Jansen ve arkadaşları, prokaryotlarda görülen ve ökaryotlar ile virüslerde bulunmayan bu tekrar eden DNA dizilerini "CRISPR" olarak tanımlamış ve CRISPR'a eşlik eden "Cas" (CRISPR-associated) proteinlerinin bu sistemin fonksiyonel bileşenleri olduğunu ortaya koymuştur (Jansen vd. 2002).

2005 yılına gelindiğinde farklı araştırma grupları, CRISPR dizilerindeki bazı aralayıcı (spacer) bölgelerinin bakteriyofaj ya da plazmid gibi yabancı DNA'lardan türediğini göstermiştir (Pourcel vd. 2005; Mojica vd. 2005; Bolotin vd. 2005). Böylece, 2007 yılında CRISPR sisteminin bakterilerin virüslere karşı savunmasında cas genleri aracılığıyla aktif rol oynadığı net olarak ortaya konmuştur (Barrangou vd. 2007).

CRISPR-Cas immün sistemi, bakteriyel hücelere giren yabancı DNA'yı hedef olarak hızlı şekilde kesebilen, çift sarmallı DNA'yı protospacer bölgesinden ayırabilen ve spacer dizileri aracılığıyla Cas proteinlerini hedef DNA'ya yönlendirebilen bir mekanizmadır (Garneau vd. 2010).

Bu sistemde, tracrRNA, crRNA'ların olgunlaşmasını Cas proteinleriyle birlikte RNase III enzimi aracılığıyla düzenleyerek bakterilerde RNA'ya dayalı savunma mekanizmasının (ökaryotlardaki RNA interferansına benzer şekilde) temelini oluşturur (Deltcheva vd. 2011).

CRISPR-Cas sistemleri 3 ana tipe (Tip 1-3) ve 11 alt tipe (1-A'dan F'ye, 2-A'dan C'ye ve 3-A ve B) ayrılmaktadır. Tip 1 sistemlerinde Cas3, Tip 2 sistemlerinde Cas9 ve Tip 3 sistemlerinde Cas10 proteinleri özgün belirteçler olup, Cas1 ve Cas2 proteinleri ise tüm tiplerde ortaktır (Shabbir vd. 2016).

Tip 2 sistemlerinde Cas9 ve Cpf1 gibi tek proteinli efektörler yer alırken, Tip 1 ve Tip 3 sistemlerinde çok alt birimli efektör kompleksleri kullanılır (Shmakov vd. 2015).

Tip 1 ve 3 sistemlerinde öncül crRNA'lar özel Cas endonükleazlarıyla işlenirken, Tip 2 sisteminde bu işlem farklı bir yolla gerçekleşir: tracrRNA, pre-crRNA dizilerine bağlanarak RNase III enzimi aracılığıyla olgun crRNA'ların oluşumunu başlatır. Bu sayede Cas9, olgun crRNA ile hedef DNA'yı kesebilir (Conway vd. 2018).

Günümüzde sistemler iki ana sınıfa ayrılmaktadır: Sınıf 1 (Tip 1, Tip 3, Tip 4) ve Sınıf 2 (Tip 2, Tip 5, Tip 6) (Makarova vd. 2015).

RNA'ya dayalı savunma sistemlerinde (RNA interferans ve CRISPR gibi), RNA transkriptleri endonükleazlar tarafından kısa rehber RNA'lara (gRNA) işlenir ve bu rehberler hedef istilacı DNA'yı tanıır (Gottesman 2011).

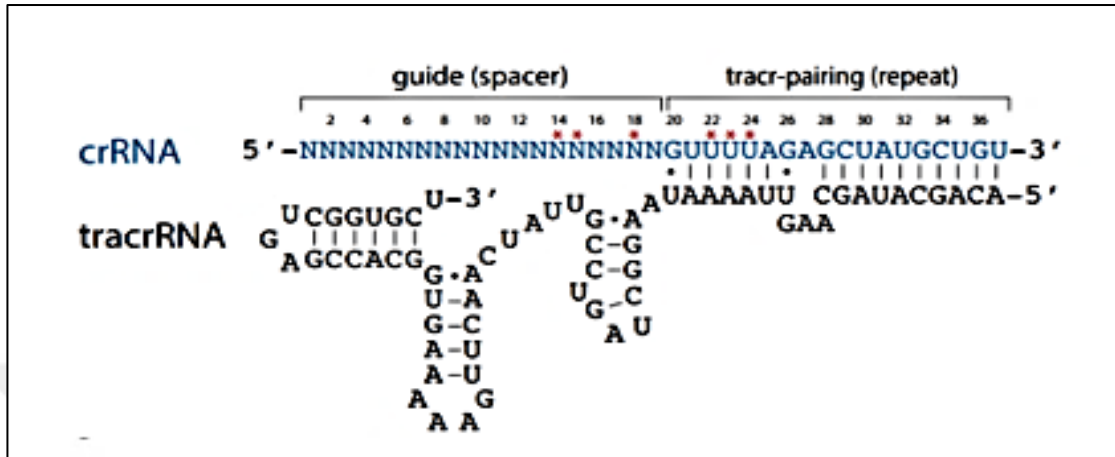
CRISPR dizileri, tekrar ve aralayıcı bölgelerinin düzenli aralıklarla bulunduğu dizilimler olup Arke ve Bakteri genomlarında yaygın biçimde yer alır ve istilacı DNA'ya karşı RNA benzeri savunma mekanizması sağlar. Spacer dizileri 26–72 bp arasında değişirken, tekrar dizileri 24–47 bp arasında olabilir; tekrarlardaki bu düzen, CRISPR lokusları arasında türler arası benzerlik ve ayrımı sağlar (Grissa vd. 2007).

CRISPR-Cas9 mekanizması üç ana aşamadan oluşur: edinim (acquisition), ifade (expression) ve müdahale (interference) (Makarova vd. 2011).

Edinim aşamasında, enfeksiyona neden olan yabancı DNA'ya ait protospacer parçaları Cas1-Cas2 kompleksince tanınarak CRISPR lokusuna eklenir. Tip 1 ve Tip 2 sistemlerinde PAM (protospacer adjacent motif) dizileri, hedef DNA seçimini kolaylaştırır. İfade aşamasında, CRISPR tekrar-spacer dizileri uzun bir pre-crRNA'ya transkribe edilir. Tip 2 sistemlerinin ayırt edici özelliği olan tracrRNA, pre-crRNA'ya bağlanarak RNase III ile birlikte bu uzun öncül RNA'yı olgun crRNA'lara dönüştürür. TracrRNA, CRISPR lokusunun karşıt ipliğinde yer alır ve pre-crRNA'nın tekrar dizilerine kısmen tamamlayıcıdır. TracrRNA ve pre-crRNA arasındaki çift sarmal yapı,

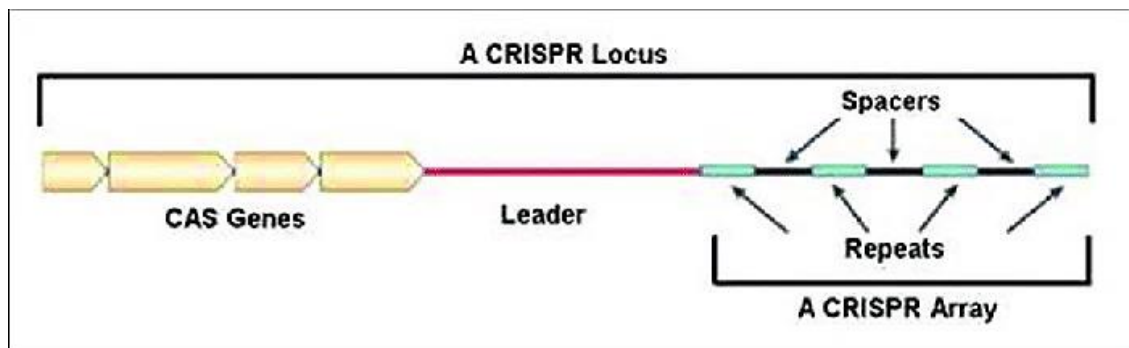
Cas9 proteiniyle birleşerek hedef DNA'ya özgü 20 nükleotitlik bir rehber bölge oluşturur (Deltcheva vd. 2011; Chylinski vd. 2013).

Jinek ve arkadaşlarının (2012) gösterdiği gibi bu ikincil yapı, Cas9 proteiniyle kompleks oluşturarak özgül DNA bağlanması ve kesilmesini mümkün kılar (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. crRNA ve tracrRNA baz eşleşmesi (O'Reilly vd. 2019)

CRISPR sisteminin doğru şekilde işleyebilmesi için CRISPR lokusunda yer alan bazı diğer bileşenler de gereklidir. CRISPR dizisinin hemen önünde yer alan lider bölge (100–500 baz çifti uzunluğunda), Adenin-Timin (AT) açısından zengin bir dizilim olup, aynı zamanda bir promotör bölgesini de içermektedir. Bu lider bölge, CRISPR dizisinin transkripsiyonunun başlatılmasında kritik rol oynar. Bununla birlikte, CRISPR dizisine yakın konumlanmış olan cas genleri (cas gen lokusu), hücre savunması ve bağışıklık sisteminin farklı evrelerinde görev alan Cas proteinlerini kodlamaktadır (Sternberg vd. 2016) (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. CRISPR lokusu (Anonymous 2016)

2.7. Cas Proteinleri

CRISPR lokusundan sentezlenen transkriptlerin işlenmesi, hedef DNA/RNA'nın kesilmesi ve yeni spacer'ların entegrasyonu gibi işlevlerde görev alan cas genleri,

CRISPR dizisine yakın konumda yer alır; bu da aralarında güçlü bir işlevsel ilişki olduğunu göstermektedir. Yapılan ilk çalışmalar, yalnızca CRISPR pozitif prokaryotlarda bulunan ve aralarında benzerlik gösteren dört genin (Cas1, Cas2, Cas3 ve Cas4) varlığını ortaya koymuştur. Ancak bu dört gen her CRISPR lokusunda bulunmamakta, yakın akraba türlerdeki Cas proteinleri ise uzak akrabalara kıyasla daha fazla amino asit benzerliği göstermektedir. Ayrıca Cas3 proteininin süper aile 2 helikazlarıyla, Cas4'ün ise RecB ailesi ekzonükleazlarıyla yapısal benzerlik taşıdığı ve bu genlerin DNA metabolizması ile gen ekspresyonunda rol aldığı düşünülmektedir (Jansen vd. 2002).

Bağışıklık mekanizmasında Cas1 ve Cas2 proteinleri, spacer entegrasyonunu sağlayan kompleks bir yapı oluşturarak görev yapar; Cas1'in endonükleaz aktivitesi bu süreç için gereklidir, Cas2 ise enzimatik olmayan bir destek fonksiyonu üstlenir (Nuñez vd. 2014).

Özellikle adaptasyon evresinde bilgi işleme süreçlerinde yer alan koruyucu Cas1 ve Cas2 proteinleri, ekspresyon ve müdahale aşamalarında görev yapan diğer cas proteinlerinden organizmalar arası önemli farklılıklar göstermektedir (Makarova vd. 2011).

Daha sonra keşfedilen Cas5 ve Cas6 proteinleriyle birlikte, toplamda altı adet korunmuş (çekirdek) cas geninin varlığı belirlenmiş ve Cas6'nın hem bakterilerde hem de arkelerde bulunduğu ortaya konmuştur. Tüm cas çekirdek genleri her CRISPR lokusunda yer almamakla birlikte, hepsi çok sayıda alt türe sahiptir. Bu alt türe özgü genler genellikle çekirdek genlerle birlikte korunur. *E. coli* (cse), Ypest (csy), Dvulg (csd), Nmeni (csn), Tneap (cst), Hmar (csh), Apern (csa), Mtube (csm) ve bir adet RAMP (onarım ile ilişkili gizemli protein) modülüne (cmr) sahip toplam sekiz alt tip tanımlanmış olup, her biri 2 ila 6 arasında alt tip-spesifik cas genini içerir. Bu alt tiplerdeki CRISPR ilişkili proteinler, RAMP süper ailesine aittir (Haft vd. 2005).

Streptococcus pyogenes genomunda tanımlanan Tip 2 CRISPR-Cas sistemi; Cas1 ve Cas2 (tüm CRISPR tiplerinde spacer kazanımında görevli temel proteinler), Csn2, Cas4 (adaptasyon evresinde yer alır) ve Cas9 (eski adıyla Csn1) genlerini içerir (Wiedenheft vd. 2012).

Bu sistemler literatürde "HNH sistemleri", *Streptococcus*-benzeri ya da N alt birimi, alt tipleri olarak da anılmaktadır. Tip 2 sistemlerin ayırt edici geni Cas9'dur ve bu sistemlerde Cas9'a ek olarak evrensel Cas1 ve Cas2 genleri de bulunur. Yaklaşık 800-1400 amino asitten oluşan Cas9 proteini, hedef DNA'daki eşleşen (HNH) ve eşleşmeyen (RuvC-benzeri) zincirleri kesmekle görevli iki nükleaz alt birimine sahiptir (Makarova ve Koonin 2015).

Cas9'dan farklı olarak, Cpf1 olarak bilinen Tip V (Sınıf II) etkileyici protein, hedef DNA'yı kesmek için ek bir tracrRNA'ya ihtiyaç duymaz ve farklı bir PAM dizisi tanır (Koonin vd. 2017).

Cas9'un yaklaşık 75 ortologu bulunmasına rağmen bu proteinler yalnızca birkaç ortak amino asit içerir; sekanslarının büyük kısmı, özellikle ara bölgelerin uzunluğu

açısından farklılık gösterir. Ayrıca Cas9 ortologlarının sekansları, CRISPR tekrar uzunluğundaki varyasyonlarla ilişkilidir (Chylinski vd. 2013).

Cas9 proteini iki ana bölgeden oluşur: tanıma (REC) ve nükleaz (NUC) lobları. REC lobunda köprü helix, REC1 ve REC2 alanları; NUC lobunda ise RuvC ve HNH nükleaz alt birimleri ile birlikte PAM etkileşiminden sorumlu olan C-terminal alt birimi (CTD) yer alır. Cas9'un RuvC alt birimindeki korunan RNaz H kıvrımı, rehber: hedef heterodupleksi ve PI alt birimi ile etkileşim için gereklidir. REC ve PI alanları Cas9'a özgü işlevsel alanlardır. REC1 alt biriminin tracrRNA:crRNA ikilisini tanıması, Cas9 proteininin işlevi açısından önemlidir (Nishimasu vd. 2014).

Adaptasyon evresinde, hedef DNA üzerindeki protospacer dizisinin yanı sıra, ona bitişik olan PAM (protospacer adjacent motif) dizisinin de tanınması gerekir. PAM dizisi crRNA dizisinde bulunmaz; böylece konak genomunun otoimmüniteye karşı korunması sağlanır. Cas9, tracrRNA-crRNA kompleksi aracılığıyla hedef DNA'ya yönelse de, hedef DNA'nın 3' ucunda uygun bir PAM dizisi yoksa, protospacer dizisini kesemez. Bu nedenle, PAM ve protospacer dizileri Cas9-crRNA kompleksinin çift sarmallı DNA'yı kesebilmesi için birlikte gereklidir (Gasiunas vd. 2012).

Cas9 tarafından tanınan PAM dizileri korunmuş yapılardır, fakat bu dizilerin CRISPR tekrarlarıyla gösterdiği uyum, CRISPR gruplarının sınıflandırılmasında da kullanılmaktadır (Kunin vd. 2007).

PAM seçimi, spacer edinim protein kompleksi tarafından motif tanıma ve protospacer seçimi olmak üzere iki temel moleküler sürece bağlıdır (Shah vd. 2013).

Tip 1 sistemlerde PAM dizisi protospacer dizisinin yukarısında, Tip 2 sistemlerde ise aşağısında yer alır; Tip 3 sistemlerde PAM dizisine ihtiyaç yoktur (Makarova vd. 2011).

Cas9'un tanıdığı PAM dizileri genoma göre değişiklik gösterse de, örneğin *Streptococcus pyogenes*'in Tip 2 sisteminde bu dizi genellikle NGG (daha nadiren NAG) şeklindedir (Shah vd. 2013).

Cas9 aracılı DNA kesimi, hedef olmayan DNA zincirinde 5'-NGG-3' dizisinin varlığını gerektirir; hedef zincirde bulunmasına gerek yoktur. Hedef olmayan zincirle doğrudan etkileşim olmadığı için, bu zincirdeki GG dinükleotidinin varlığı durumunda PAM'daki bazı uyumsuzluklar tolere edilebilir. Cas9 proteini içerisindeki arginin kalıntıları, PAM ve hedef olmayan zincirin tanınmasında önemli bir rol oynar; Arg1333 ve Arg1335 (R1333, R1335) kalıntıları, guanin bazları ile özgül hidrojen bağları kurar. Aynı zamanda, PI alt birimindeki bir lizin kalıntısı da minör oluk ile etkileşim sağlar. Tamamlayıcı zincirdeki lizin ve serin kalıntıları ise, PAM dizisinin +1 konumundaki fosfat grubuyla etkileşime girerek fosfat kilidi (K1107:S1109) oluşturur. Bu kilit yapısı, DNA'nın açılarak RNA rehber bölgesiyle eşleşmesini ve heterodupleks yapının oluşmasını sağlar (Anders vd. 2014).

Müdahale evresinde, Cas proteinlerinin tanıdığı PAM dizisi sayesinde hedef çift sarmallı DNA'nın çözülmesi başlar. Bu olay, Cas9-RNA heterodupleks yapısının destabilizasyonu ve crRNA rehber dizisiyle hedef DNA arasında baz eşleşmesinin

sağlanması için gereklidir. Açılan DNA, üçlü sarmal bir R-loop (RNA–DNA hibriti) yapısı oluşturur ve crRNA ile eşleşmeyi mümkün kılar (Gleditsch vd. 2019).

Bu R-loop yapısı, iki antiparalel DNA zinciri ve bir RNA zincirinden oluşur; RNA, çift sarmallı DNA'nın bir zinciriyle baz eşleşmesi yaparken diğer zinciri tek sarmallı hâle getirir (Lieber ve Chedin 2001).

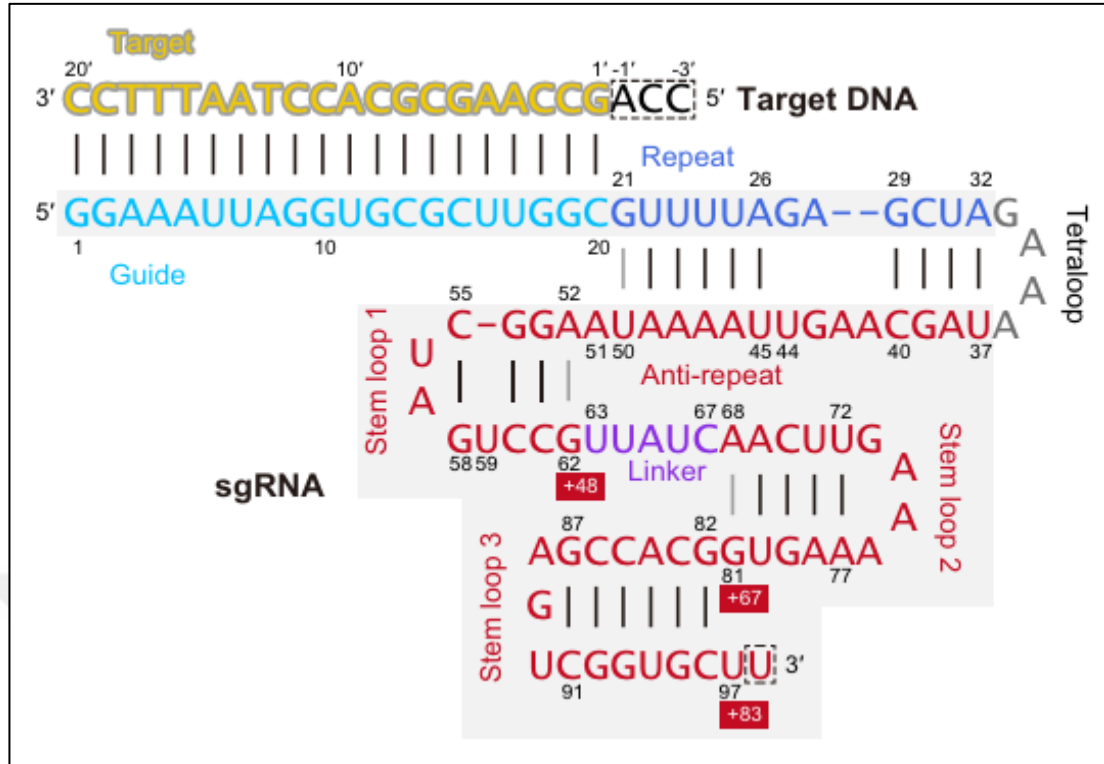
PAM tanınması, ATP'ye bağımlı helikaz aktivitesi olmaksızın R-loop oluşumunu tetikler ve Cas9, açılmış DNA'nın uçlarıyla etkileşerek yapısal bozulma için gerekli olan 30°'lik sarmal açısını sağlar (Jiang vd. 2015).

PAM ile etkileşim, Cas9'un katalitik aktivitesini tetikler ve kılavuz RNA'nın hedef çift sarmallı DNA ile baz eşleşmesi (20 nt) sonucunda, HNH ve RuvC nükleaz alanları aracılığıyla PAM'ın yukarısındaki 3. ve 4. nükleotit arasında çift zincirli kesim (Double-Strand Break) gerçekleştirilir (Sternberg vd. 2014).

HNH domaini hedef zinciri, RuvC domaini ise karşı zinciri keser (Gasiunas vd. 2012).

Cas9, RNA ile yönlendirilmiş bir DNA bağlanma platformu olarak görev yapabilir ve hedef DNA dizilerinin transkripsiyonel düzenlemesi sağlanabilir. crRNA ve tracrRNA birlikte kullanıldığında bu sistem, Cas9 ile birlikte kullanılan tekli kılavuz RNA (single-guide RNA, sgRNA) sayesinde kolaylaştırılır ve hedef DNA'nın bağlanması ve kesilmesi için bu yapının yeterli olduğu gösterilmiştir. sgRNA, Cas9'a bağlanan ve hedef tanıma sekansını taşıyan saç tokası benzeri bir yapı oluşturarak programlanabilir hâle gelir. Bu yapı, crRNA'nın 3' ucu ile tracrRNA'nın 5' ucunu birleştirerek Cas9'un bölgeye özgü DNA kesimini gerçekleştirebilmesini sağlayan crRNA:tracrRNA yapısını taklit eder (Jinek vd. 2012).

Yapay bir tetraloop olan sgRNA, bazı bölümlerden oluşur: hedef DNA ile eşleşen crRNA dizisi rehber (17–20 nt; 12 nt'lik daha hassas seed bölgesi ve 8 nt'lik non-seed bölgesi) ve tekrar (12 nt) bölgelerine; Cas nükleazına bağlanmayı sağlayan tracrRNA dizisi ise anti-tekrar (14 nt) ve üç saç tokası bölgesine ayrılır. Rehber ve hedef DNA, 20 nükleotidlik Watson-Crick baz eşleşmesi ile bir rehber:hedef heterodupleks oluşturur. sgRNA, hedef DNA'ya bağlanarak rehber:hedef heterodupleks, tekrar:anti-tekrar ikilisi ve saç tokaları 1–3'ten oluşan T-şeklinde bir yapı meydana getirir (Şekil 2.11). Saç tokası 1, işlevsel Cas9-sgRNA kompleksinin oluşumu için gerekli olup; saç tokası 2 ve 3 ise yapının stabilitesini artırır. sgRNA'nın ikincil yapısının Cas9 ile olan etkileşimi, düzenleme etkinliğini de doğrudan etkiler.



Şekil 2.11. sgRNA yapısı (Nishimasu vd. 2014)

Cas9 proteini, sgRNA'nın PAM'a yakın kılavuz bölgesi ile tekrar:anti-tekrar heterodupleksini tanıır ve 20 baz çifti uzunluğundaki kılavuz bölge öncelikli olarak REC lobi tarafından tanınır. Hedef DNA'nın omurgasındaki fosfat grupları REC1, RuvC ve PI (PAM ile etkileşen) bölgeleriyle etkileşir ve aynı zamanda PI bölgesi, tamamlayıcı olmayan DNA ipliğindeki PAM dizisini tanıır. gRNA, REC ve NUC (nükleaz) lobları arasındaki pozitif yüklü bölgede yer alır ve hedef DNA'nın fosfat grubunu, HNH domeni tarafından kesilmek üzere konumlandırır. Son aşamada Cas9 proteininin HNH domeni, kılavuz:hedef heterodupleksinde yer alan tamamlayıcı DNA ipliğini 17. ve 18. bazlar arasında küt bir şekilde keserken; RuvC domeni ise tamamlayıcı olmayan ipliği keser (Nishimasu vd. 2014).

2.8. CRISPR/Cas9 Sisteminin Bitki Islahında Kullanımı

Literatürde, CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak yapılan çalışmalar kapsamında strigolaktonlarla (SL) ilişkili araştırmaların *Solanum lycopersicum* (Bari vd. 2019a; Bari vd. 2019b), *Oryza sativa* (Yang vd. 2017; Butt vd. 2018) ve *Nicotiana benthamiana* (Gao vd. 2018) türlerinde gerçekleştirildiği bildirilmektedir.

Yang vd. (2017) tarafından yürütülen bir çalışmada, çeltik (*Oryza sativa*) bitkisinde bulunan beş karotenoid kesim geninde (OsCYP97A4, OsDSM2, OsCCD4a, OsCCD4b ve OsCCD7) CRISPR/Cas9 yöntemiyle gen susturma (knockout) yapılmıştır. Bu çalışmada esas hedef, çeltik endosperminde β -karoten birikimini artırmak olsa da, bu beş genin monoallel/biallelik mutasyonları sonucunda karotenoid birikimi gözlemlenmemiştir. Ancak, mutasyonun OsCCD7 geninde gerçekleştiği mutant

hatlarda, strigolakton eksikliği (SL-deficient) fenotipi ile benzerlik gösteren bir görünüm ortaya çıkmıştır.

Butt vd. (2018) tarafından yapılan benzer bir çalışmada da, OsCCD7 genine CRISPR/Cas9 aracılığıyla mutasyon uygulanarak strigolakton eksikliği gösteren mutantlar elde edilmiştir. Bu mutantların kök ekstraktlarında yapılan sıvı kromatografi/kütle spektrometrisi (LC/MS) analizleri sonucunda SL düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. Önceki çalışmalarla tutarlı olarak, bu mutantlarda kardeşlenme (tillering) artışı ve bitki boyunda kısalma gibi özellikler gözlenmiş, bu özelliklerin sentetik SL analogu GR24 uygulamasıyla geri döndürülebildiği de belirlenmiştir.

Gao vd. (2018) tarafından tütün bitkisi (*Nicotiana tabacum* L.) üzerinde yürütülen çalışmada, CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak CCD8 genine ait iki homoloğa (NtCCD8A ve NtCCD8B) mutasyon uygulanmıştır. ntccd8a mutant alelinde üç nükleotidin silinmesi ve ntccd8b mutant alelinde bir nükleotidin eklenmesiyle erken durdurma kodonlarının oluşması sonucunda, strigolakton (SL) eksikliği gösteren mutant bitkiler elde edilmiştir. Bu mutant bitkilerde, SL eksikliği fenotipiyle tutarlı olarak, yabani tipe kıyasla daha fazla sürgün dallanması, azalmış bitki boyu, artmış yaprak ve boğum sayısı, azalmış toplam bitki biyokütlesi, daha kısa primer kök ve daha fazla yan kök oluşumu gözlemlenmiştir.

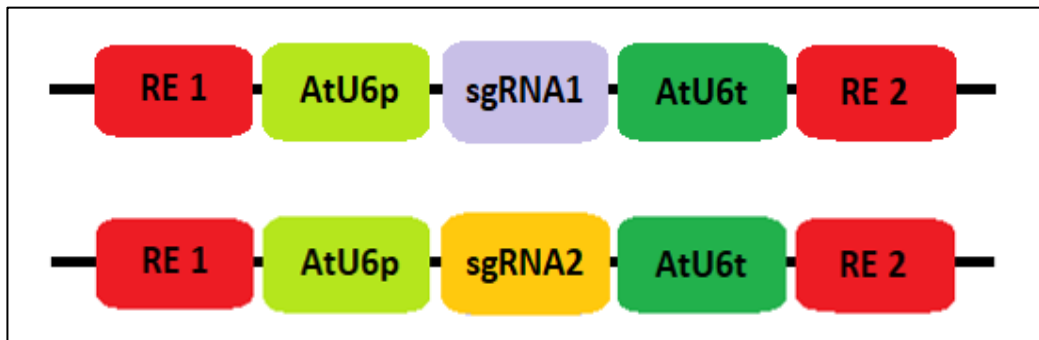
Bari vd. (2019a) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise, domates bitkisinde (Soly08g067610 ve Soly08g067620) ATP-bağlayıcı kaset (ABC) proteinine ait iki homolog gen CRISPR/Cas9 sistemiyle hedeflenerek mutasyona uğratılmış ve *Phelipanche aegyptiaca* tohumlarının çimlenmesinde anlamlı bir azalma sağlanmıştır. T1 bitkilerinin genotip analizi sonucunda bu mutasyonun kalıtsal olduğu belirlenmiştir. Mutant bitkilerde SL eksikliğiyle uyumlu fenotipler gözlemlenmiş ve CCD8 ile MAX1 genlerinin ekspresyon seviyelerinde düşüş tespit edilmiştir. Ancak, mutant bitkilerin kök ekstraktlarında orobanchol seviyesinin değişmediği belirlenmiştir. Bu çalışmayla birlikte, ABC protein homologlarının parazit yabancı ot çimlenmesini azaltmak için etkili bir yöntem geliştirme potansiyeline sahip olduğu ortaya konmuştur.

Bari vd. (2019b) tarafından yürütülen başka bir çalışmada ise, domates bitkisinde (*Solanum lycopersicum*) SlCCD8 geninin tek bir ekzon bölgesi, CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak tek bir gRNA aracılığıyla hedeflenmiş ve bu gen susturulmuştur. Sonuç olarak, SlCCD8-mutant hattının *P. aegyptiaca*'ya karşı dirençli olduğu ve T1 jenerasyonunda bu mutasyonun kalıtıldığı belirlenmiştir. Mutant hattın bodur, aşırı sürgün dallanması ve adventif kök gelişimi gibi fenotipik özellikler sergilediği tespit edilmiş; ayrıca mutant bitkilerde orobanchol düzeyinde ve parazit bulaşmasında anlamlı bir azalma olduğu da gösterilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Biyoinformatik Çalışmalar

SlCCD8 gen bölgesine ait dizilim bilgisi, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nin (NCBI, 1988) "Gene" veri tabanından elde edilmiş ve SL3.0 versiyonu temel alınmıştır. Bu genom versiyonu, Uluslararası Domates Genom Dizileme Konsorsiyumu tarafından oluşturulmuştur. Elde edilen genetik veriler ayrıntılı şekilde incelenmiş, ekzon (protein kodlayan) ve intron (kodlamayan) bölgeler ayırt edilmiştir. CRISPR-Cas9 sistemine yönelik hedefli mutasyon oluşturmak amacıyla gerekli sgRNA'lar, CRISPRDirect yazılımı (Naito vd. 2015) kullanılarak tasarlanmıştır. Bu yazılım, hem PAM dizilerine (NGG) göre özgül gRNA dizilerini belirleyebilmekte hem de detaylı off-target analizlerini gerçekleştirebilmektedir. CRISPRDirect'in tercih edilme nedenleri arasında tüm gRNA sekanslarını eksiksiz olarak sunması, %40'ın üzerindeki GC oranlarını belirtmesi ve hedef bölgedeki restriksiyon enzimlerini ayrıntılı şekilde göstermesi yer almaktadır. SlCCD8 geninin birinci ve ikinci ekzon bölgeleri, CRISPR-Cas9 sistemiyle hedeflenmiş; böylece bu proteini kodlayan bölgelerde etkili mutasyonlar oluşturularak gen susturmasının başarı oranı artırılmak istenmiştir. Bu amaçla SlCCD8 geninin iki farklı ekzonuna karşılık gelen iki sgRNA dizayn edilmiştir. Gen dizileri, ExpASy/Translate aracı (Gasteiger vd. 2003) kullanılarak mRNA dizilerine çevrilmiş, intronlar elenmiş ve oluşacak protein dizisi hesaplanmıştır. Elde edilen amino asit dizisi, literatürde kayıtlı referans bilgilerle karşılaştırılarak Sol Genomics Network veritabanı (Fernandez-Pozo vd. 2015) aracılığıyla doğrulanmıştır. gRNA'ların hedef dışı etkileri ayrıntılı biçimde analiz edilmiş; seçilen dizilerin hedef bölge dışındaki dizilerle eşleşmediği saptanmıştır. CRISPRDirect yazılımı, SL3.0 dahil olmak üzere 200'den fazla genom verisi üzerinden karşılaştırmalı analiz gerçekleştirebilmektedir. Off-target değerlendirmeleri yalnızca 20 bazlık hedef diziler için değil, 12 bazlık çekirdek sekanslar üzerinden de yapılmıştır. Seçilen gRNA dizilerine evrensel sgRNA iskelet dizisi (76 bp), ayrıca kodon optimizasyonu yapılmış *Arabidopsis thaliana* kaynaklı AtU6-26p promotörü (424 bp) ve AtU6-26t terminatörü (192 bp) eklenmiştir. SlCCD8 genine yönelik olarak tasarlanan gRNA1 ve gRNA2 dizileri, uygun restriksiyon bölgeleriyle birleştirilerek tek bir kaset hâline getirilmiş, klonlama amacıyla vektöre entegre edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Oluşturulan sgRNA1 ve sgRNA2 kasetlerine ait temsili görsel (RE 1: PacI (5'...TTAAT/TAA...3'), RE 2: AclI (5'...AA/CGTT...3'))

elektroforeze tabi tutulmuştur. Jel görüntülemeleri UV altında DNR MiniLumi sistemi ile yapılmıştır.

1X TBE tampon çözeltisi hazırlığı için 108 g Tris-baz (890 mM), 55 g Borik asit (890 mM) ve 40 ml 0.5 M EDTA, 1 litre saf suya eklenerek pH 8.0'e ayarlanmıştır. Elde edilen 10X TBE stok çözeltisi 1:9 oranında su ile seyreltilerek 1X TBE hazırlanmıştır. Jel hazırlanışı sırasında, 1 g agaroz (Invitrogen) 100 ml 1X TBE içerisinde mikrodalga fırında yaklaşık 3 dakika çözülmüş; karışımın soğumasıyla birlikte 5 µl Etidyum Bromür (EtBr – Sigma-Aldrich) eklenmiştir. Jel tamamen katılaştıktan sonra PCR ürünleri elektroforezle analiz edilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları

İçerik	Miktar	Üretici firma
DNA Template	2 µl	
ddH ₂ O	9 µl	
10X Taq Buffer ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-MgCl}_2$)	1,5 µl	Thermo Fisher Scientific
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µl	Thermo Fisher Scientific
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl	Thermo Fisher Scientific
dNTP (10 mM each)	0,25 µl	abm
Primer-Forward (10 µM)	0,25 µl	Sentegen
Primer-Reverse (10 µM)	0,25 µl	Sentegen
Toplam	15 µl	

Çizelge 3.3. DNA amplifikasyonunda kullanılan termal döngü protokolü

95°C	5 dk	1 döngü	Denaturasyon (I)
95°C	45 s	35 döngü	Denaturasyon (II)
55-57°C	45 s	35 döngü	Bağlanma
72°C	1 dk	35 döngü	Uzatma (I)
72°C	10 dk	1 döngü	Uzatma (II)

Elektroforez analizi sonucunda, SICCD8 genine ait gRNA1 için 594 bp ve gRNA2 için 483 bp uzunluğunda belirgin ve tekil DNA bantlarının elde edilmesi öngörülmüştür. Bu bantlar, düşük ışık yoğunluğuna sahip UV transillüminatör cihazı (UVP) kullanılarak hassas biçimde kesilmiştir. Kesilen DNA fragmanlarının agaroz jelden saflaştırılması amacıyla Thermo Fisher Scientific firmasına ait GeneJet Gel Extraction Kit uygulanmıştır. Elde edilen DNA ürünleri 20 µl elüsyon hacminde çözündürülerek, dizi doğrulama (Sanger sekanslama) analizi yapılmak üzere BMLabosis (Ankara) firmasına iletilmiştir.

3.1.2. Klonlama Vektörünün Tasarımı

Bu tez kapsamında yürütülen SICCD8 genine yönelik genetik müdahale çalışmaları için en uygun klonlama vektörü olarak pFGC-pcoCas9 (Addgene, plasmid #52256) ikili vektörü tercih edilmiştir. CRISPR sisteminin temel yapı taşlarından biri olan bu vektör, içinde optimize edilmiş Cas9 genini (pcoCas9) barındırmakta ve gRNA kasetlerinin kolay entegrasyonuna olanak tanıyan çoklu klonlama bölgesine (MCS) sahiptir. Sistemin etkili çalışabilmesi için, vektörde 35PPDK promotörü (karnabahar mozaik virüsü 35S güçlendirici dizisi ile mısır C4PPDK promotörünün birleşiminden oluşan hibrit yapı; Yoo vd. 2007) ile NOS terminatörü yer almaktadır.

İkili (binary) yapıda olması nedeniyle, hem *Agrobacterium tumefaciens* hem de *Escherichia coli* gibi bakterilerde replike olabilmektedir. Bu amaçla vektör, *Agrobacterium* için pVS1 (Heeb vd. 2000) ve *E. coli* için pBR322 replikasyon orijinlerini içermektedir. Ayrıca, vektör üzerinde yer alan aphA3 geni aracılığıyla sağlanan kanamisin direnci, uygun antibiyotik ortamında (örneğin LB + kanamisin) transformant kolonilerin seçilmesini mümkün kılmaktadır. *E. coli* (DH5α gibi) vektör çoğaltımı için kullanılırken, bitki transformasyonları için *Agrobacterium* suşları tercih edilebilir. Vektör ayrıca bar genini taşıdığı için, bitki seçiminde fosfonitrisin (Glufosinat Amonyum) uygulaması ile transformant bitkilerin seçilmesine olanak sağlamaktadır.

3.2. SICCD8 gRNA Dizilerini ve pFGC-pcoCas9 Vektörünü İçeren Plazmidlerin Klonlanması

SICCD8 genine özgü olarak tasarlanan gRNA dizilerini taşıyan plazmidler, 2887 bp uzunluğunda pTZ57R omurgasına sahip olacak şekilde teslim alınmıştır. Plazmidler analiz öncesinde 4 °C’de, 6000 × g’de 1 dakika santrifüjlenmiş ve ardından 100 µl DNaz/RNaz içermeyen saf su (dH₂O) ilave edilerek çözelti konsantrasyonları optimize edilmiştir. Hazırlanan plazmidler 2 ml’lik steril mikrotüplere alınarak –20 °C’de saklanmıştır. İlerleyen moleküler analizlerde kullanılmak üzere yeterli miktarda DNA elde edilebilmesi amacıyla bu plazmidler, öncelikle *Escherichia coli* hücrelerine transformasyona tabi tutulmuştur.

3.2.1. Bakteriyel Kültür Ortamlarının Hazırlanması

SICCD8 genine yönelik klonlama çalışmalarında kullanılacak bakteriyel kültür ortamlarının hazırlanması amacıyla, 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl ve 5 g/L maya ekstresi içeren toplam 25 g LB Broth Miller (Sigma-Aldrich) tartılarak 1 litrelik steril cam şişeye alınmıştır. Üzerine 1 litre distile su (ddH₂O) ve 15 g agar (Sigma-Aldrich) eklenmiş; karışımın pH’ı 25 °C’de 7.0 ± 0.2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Farklı antibiyotik içeriklerine sahip üç farklı ortam hazırlanabilmesi için bu karışımdan üç ayrı besiyeri hazırlanmış, tüm karışımlar 121 °C’de 30 dakika süreyle otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Jel formasyonunun kolaylaştırılması için ortamlar 55 °C’ye kadar soğutulmuştur. Ayrıca, aynı bileşenlerle agarsız (sıvı) versiyonu da antibiyotiksiz olarak hazırlanmıştır. İlk ortama, Sentebiolab Biyoteknoloji tarafından sentezlenen gRNA kasetlerini taşıyan plazmidlerin seçilimi için, stok konsantrasyonu 100 mg/ml olan ampisilinden 100 µg/ml son konsantrasyon elde edecek şekilde antibiyotik eklenmiştir. İkinci karışıma, Addgene’den temin edilen pFGC-pcoCas9 (#52256) vektörünün seçilimi için, stok konsantrasyonu 50 mg/ml olan kanamisin 50 µg/ml son konsantrasyona ulaşacak şekilde antibiyotik ilavesi yapılmıştır. Üçüncü karışım ise antibiyotik içermeyecek şekilde 25 ml’lik hacimlerde bölünmüştür. Petri kutularında agarın katılaşmasının ardından, plaklar parafilm ile kaplanarak 4 °C’de saklanmıştır.

3.2.2. *E. coli* DH5α Kompetent Hücrelerinin Hazırlanması

SICCD8 genine ait gRNA kasetlerini taşıyan plazmidlerin başarıyla transformasyonu için, uygun koşullarda yetkin hale getirilmiş *E. coli* DH5α hücrelerine ihtiyaç duyulmuştur. Kompetent hücre üretimi için klasik CaCl₂-ısı şok protokolü uygulanmıştır. Bu işlemde, hücre zarlarında gözeneklerin oluşması sağlanarak Plazmit alımı kolaylaştırılmıştır.

İlk olarak, –80 °C’de saklanan stok *E. coli* DH5α kültürü antibiyotiksiz LB agar plaklarına ekilmiş ve gece boyunca 37 °C’de inkübe edilerek canlı koloniler elde edilmiştir. Bu kolonilerden üçü seçilerek 10 ml agarsız LB Broth Miller içeren tüplere aktarılmış ve 18 saat boyunca çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün hücre yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve başlangıç OD değeri 0.78 olarak kaydedilmiştir. Ardından 100 kat seyreltme ile hazırlanan kültür, taze 100 ml sıvı ortama aktarılmış ve OD 0.5 değerine ulaşana kadar belirli aralıklarla ölçümler yapılmıştır (en son 170. dakikada OD = 0.509).

Hedef yoğunluğa ulaşan hücreler, buzda bekletilmiş iki tüpe bölünmüş ve 10 dakika inkübe edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış, pellete soğuk 0.1 M CaCl₂ eklenerek dikkatlice çözölmüş ve buzda 30 dakika bekletilmiştir. Tekrar santrifüjleme sonrası hücreler bu kez %15 gliserol içeren CaCl₂ çözeltisi ile süspanse edilmiştir. Elde edilen toplam 5 ml kompetent hücre, 100 µl'lik steril tüplere dağıtıldıktan sonra bu tüpler -80 °C'de saklanmıştır. Hücrelerin sterillliğini kontrol etmek amacıyla ampisilin içeren seçici ortamlara ekim yapılmıştır.

3.2.3. SICCD8-gRNA1/2 Dizilerini Taşıyan pTZ57R Plazmidlerinin Transformasyonu ve İzolasyonu

SICCD8 genine özgü olarak tasarlanan gRNA1 ve gRNA2 dizilerini içeren pTZ57R plazmidlerinin *E. coli* DH5α kompetent hücrelerine aktarımı, ısı-şok temelli klasik transformasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasında CaCl₂'nin sağladığı iyonik ortam sayesinde hücre zarında geçici porlar oluşmakta ve plazmid DNA, hücre içerisine alınabilmektedir.

Transformasyon işlemi için -80 °C'de saklanan kompetent hücreler buzda çözdürülmüş ve her reaksiyon için 100 µl hücre ile 3 µl plazmid DNA birleştirilmiştir. Karışımlar 30 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra, 42 °C'de 2 dakika ısı şoka maruz bırakılmış, ardından tekrar buz üzerine alınarak 2 dakika daha inkübe edilmiştir. Daha sonra her tüpe 900 µl antibiyotiksiz LB Broth eklenmiş ve 37 °C'de 225 rpm'de 1 saat çalkalanarak hücrelerin antibiyotik baskısı olmadan bölünmelerine imkân tanınmıştır.

İnkübasyon sonunda, transformasyon karışımları ampisilin içeren besiyeri plakalarına ekilmiş ve gece boyunca 37 °C'de ters çevrilmiş olarak inkübe edilmiştir. Ertesi gün oluşan kolonilerden üçü seçilerek 5 ml antibiyotikli sıvı ortama aktarılacak şekilde gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bakteriyel kültürler ertesi gün santrifüjlenmiş ve çöken hücrelerden GeneJET Plazmid Miniprep Kiti aracılığıyla üretici talimatlarına uygun biçimde plazmid izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmidler, %1 agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmış ve geri kalan kısımları -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. SICCD8-gRNA1/2 Plazmidlerinin Doğruluk Analizi

SICCD8 genine yönelik olarak oluşturulan pTZ57R-gRNA1/2 plazmidlerinin doğruluğunu teyit etmek amacıyla, ilgili vektör yapısına özgü bölgelerden primer tasarımı yapılmıştır. Bu kapsamda, ileri yönlü primer (gRNAc/F: 5'-AGAAGAGAAGCAGGCCATT-3') pTZ57R vektöründe yer alan AtU6-26p promotör bölgesine, geri yönlü primer (gRNAc/R: 5'-CGGTGCCACTTTTCAAGTT-3') ise gRNA iskelet bölgesine karşılık gelecek şekilde Primer3Plus yazılımı ile tasarlanmış ve Sentebiolab Biyoteknoloji tarafından sentezlenmiştir.

Her iki primer çifti kullanılarak, üç farklı saflaştırılmış pTZ57R-gRNA1/2 plazmid DNA örneği şablon olarak alınmış ve PCR amplifikasyonları, daha önce belirtilen reaksiyon bileşenleri (Çizelge 3.2) ve döngü protokolü (Çizelge 3.3) uyarınca, 57 °C'lik erime sıcaklığı (T_m) koşulunda gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. pFGC-pcoCas9 Vektörünün Hazırlanması ve Moleküler Doğrulaması

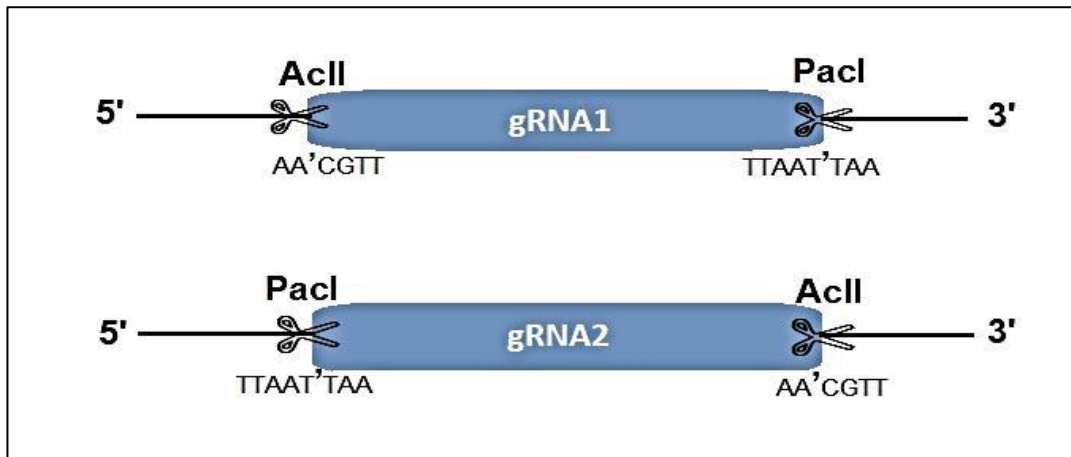
CRISPR/Cas9 sisteminde SICCD8 genine özgü gRNA dizilerinin taşınması amacıyla kullanılan pFGC-pcoCas9 vektörü, Addgene aracılığıyla sıvı bakteri kültürü formunda temin edilmiştir. Seleksiyon amacıyla Kanamisin içeren agar ortama çizilen kültürler inkübe edilerek koloni gelişimi sağlanmıştır. Oluşan beş farklı koloni sıvı LB ortamına alınarak antibiyotik (50 µg/ml Kanamisin) eklenmiş ve gece boyunca 37 °C’de çalkalanarak kültür büyütülmüştür. Elde edilen hücrelerden plazmid izolasyonu GeneJET Miniprep Kiti ile yapılmıştır.

Transformasyon aşamasında, 100 µl kompotent *E. coli* DH5α hücresi ile 3 µl izole plazmid kullanılarak ısı-şok yöntemi uygulanmış ve böylece hem plazmidin hücreye aktarılabilirliği hem de çoğaltılabilirliği değerlendirilmiştir. Transformasyonun ardından Kanamisin içeren agar ortama transfer edilen kültürler, ertesi gün koloni oluşumu açısından kontrol edilmiş ve seçilen iki koloni, tekrar antibiyotikli sıvı ortama alınarak çoğaltılmıştır. İkinci izolasyon işleminden sonra plazmidler –20 °C’de saklanmıştır.

Plazmidlerin doğruluğunu test etmek amacıyla, pFGC-pcoCas9 harita bilgisine uygun şekilde EcoRI ve NcoI restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 20 µl’lik reaksiyon karışımı hazırlanarak 37 °C’de 2.5 saat inkübe edilmiştir. Kesim ürünleri %1.5 agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılmış ve UV altında görüntülenmiştir. Beklenen doğrulama, 4931 bp ve 8399 bp boyutlarında iki spesifik bant elde edilmesiyle sağlanmıştır.

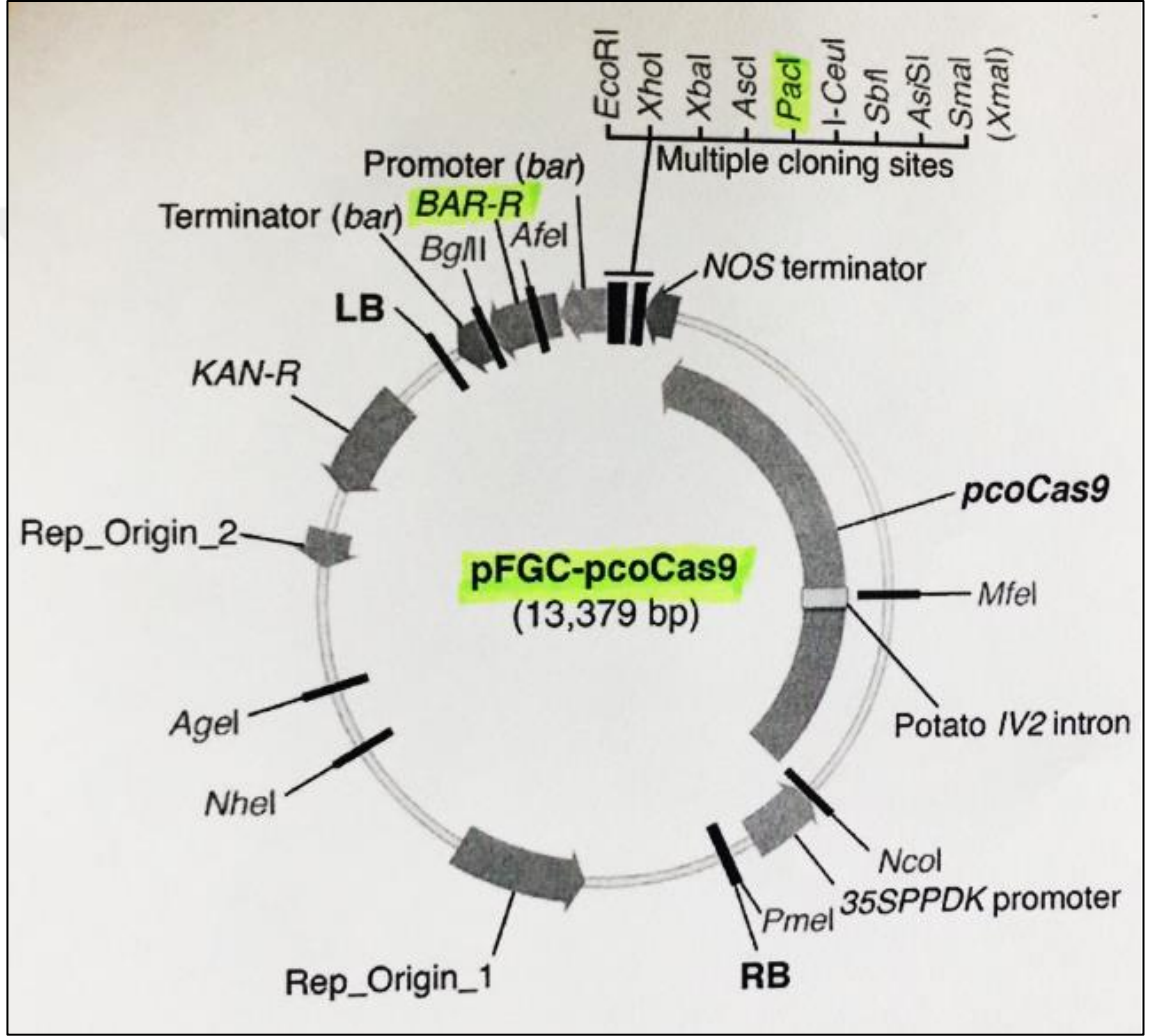
3.3. SICCD8’e ait sgRNA1 ve sgRNA2 Fragmanlarının Birleştirilmesi ve pFGC-pcoCas9 Vektörüne Ligasyonu

SICCD8 genine ait sgRNA1 ve sgRNA2 dizilerini taşıyan pTZ57R omurgalı plazmitler (pTZ57R-SICCD8-gRNA1, pTZ57R-SICCD8-gRNA2), uzun dizileri nedeniyle ayrı ayrı sentezlenmiştir. Bu plazmitlerin her iki ucuna eklenen restriksiyon enzim bölgeleri (Şekil 3.3), istenilen sgRNA fragmanlarının vektör omurgasından ayrılmasında kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Plazmitlerin her iki ucuna eklenen restriksiyon enzim bölgeleri

Bu doğrultuda, her bir pTZ57R plazmidinden 5 µl alınarak, 37 °C’de 2 saat süreyle 1X AclI, 1X PacI (NEB) ve 1X CutSmart Buffer (NEB) içeren kesim reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Harita verilerine göre, kesim sonucunda SICCD8-gRNA1 için 726 bp, SICCD8-gRNA2 için 721 bp uzunluğunda DNA bantları elde edilmesi beklenmiştir. Ürünler %0.8 agaroz jel ile 75 V’de 4 saat elektroforeze tabi tutulmuş; yeterli ayrışma gözlemlendiğinde, doğru boyuttaki bantlar UV transillüminatör yardımıyla kesilmiş ve saflaştırılmıştır. Kesim reaksiyonlarının doğruluğunun teyidi amacıyla, saflaştırılan fragmanlar ve gRNAC-F/R primer çifti kullanılarak, Çizelge 3.2 ve 3.3’te tanımlanan PCR koşullarında termal döngü uygulanmıştır.



Şekil 3.4. pFGC-pcoCas9 vektörüne ait temsili plazmit haritası

SICCD8 sgRNA dizilerinin aktarılacağı pFGC-pcoCas9 (#52256) plazmidi, tek bir noktada (baz pozisyonu 78) PacI enzimi ile lineer hale getirilmiştir (Şekil 3.4). Bu amaçla, 2 µl vektör DNA’sı kullanılarak, 20 µl toplam hacimde 1X PacI-Fast Digest (Thermo Fisher Scientific) ve 2X Fast Digest Buffer içeren sindirim reaksiyonu hazırlanmış ve 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Enzim inaktivasyonu için 65 °C’de 10 dakika inkübasyon uygulanmıştır. Sindirim sonrası ürünler, %0.8 agaroz jel ile 75 V’de

3 saat elektroforez edilerek, 13.330 bp'lik bant (lineer vektör) UV altında kesilmiş ve saflaştırılmıştır.

Vektörün kendine ligasyonunu önlemek amacıyla, rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, NEB) enzimi ile muamele edilmiştir. Bu işlemde, 1X Cut Smart Buffer, 1X rSAP enzimi ve 8X saflaştırılmış pFGC-pcoCas9 ürünü ile 10 µl'lik reaksiyon hazırlanarak 37 °C'de 2.5 saat inkübe edilmiştir; ardından enzim inaktivasyonu için 65 °C'de 5 dakika bekletilmiştir.

T4 Ligaz enzimi (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak, SI CCD8'e ait ayrı ayrı saflaştırılmış gRNA1 ve gRNA2 dizileri pFGC-pcoCas9 vektörüne ligasyon yapılmıştır. Toplam 10 µl'lik ligasyon reaksiyonu; 1X rSAP ile muamele edilmiş pFGC-pcoCas9, 1X T4 Ligase Buffer, 1X T4 Ligase Enzimi, 3X gRNA1 ve 3X gRNA2 içererek hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı, 16 °C'de gece boyunca (yaklaşık 18 saat) inkübe edilmiş ve ardından enzim inaktivasyonu için 65 °C'de 10 dakika bekletilmiştir.

Ligasyon ürünlerinden 8 µl, 100 µl *E. coli* DH5α kompetent hücresi ile ısı-şok yöntemi kullanılarak transformasyona tabi tutulmuştur. Transformasyon sonrası hücreler, 50 µg/ml Kanamisin içeren LB agar ortama alınmış ve 37 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün beş koloni seçilerek, antibiyotikli sıvı ortama (50 µg/ml) aktarılmış ve doğrulama amacıyla her biri için koloni PCR uygulaması yapılmıştır. Doğrulanmış plazmitler saflaştırılmış ve dizileme (Sanger sekanslama) için Sentegen firmasına gönderilmiştir.

Aynı zamanda, SI CCD8 genine özgü olarak ligasyon sonrası birleşmiş sgRNA1-gRNA2 dizilerini kapsayacak şekilde Primer3Plus programı ile yeni bir primer çifti tasarlanmıştır (Çizelge 3.4). DNA amplifikasyonu sonucunda SI CCD8 için 755 bp büyüklüğünde ürün beklenmiştir.

Çizelge 3.4. SI CCD8 genine yönelik ligasyon sonrası birleşmiş sgRNA1-gRNA2 yeni primer çiftlerine ait yapısal özellikler

Primer Adı	Sekansı (5'→3')	Uzunluğu (bp)	Tm (°C)
SI CCD8/F	CAACGACGAGTTCTCCTTCA	20	58,3
SI CCD8/R	GTAGTGATTATTCTCACCACCGTA	24	58,9

3.4. SICCD8-gRNA1+2 Yapılarını Taşıyan pFGC-pcoCas9 Plazmitlerinin *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 Suşuna Transformasyonu

Bitki transformasyonunun bir sonraki aşamasında kilit rol oynayan *Agrobacterium tumefaciens* suşu, literatürdeki başarılı uygulamalar göz önünde bulundurularak seçilmiş olup, bu amaçla yüksek transformasyon verimine sahip olan EHA105 suşu tercih edilmiştir.

3.4.1. *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 Suşuna Ait Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Tıpkı *E.coli* hücrelerinde olduğu gibi, *Agrobacterium tumefaciens* için de transformasyon yöntemine uygun şekilde kompetent hücre hazırlığı yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılacak transformasyon yöntemi elektroporasyon olduğundan, elektrik alanı aracılığıyla hücre zarında oluşacak gözeneklerden plazmidin geçişi sağlanmaktadır. Bu nedenle, elektrik alanındaki aksaklıkların önlenmesi için, ortamdaki yüklü iyonların uzaklaştırılması ve hücrelerin saflaştırılması gereklidir. Hazırlık aşamaları şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

- i. EHA105 suşu (Doç. Dr. Amit MITRA, University of Nebraska-Lincoln'den temin edilmiştir), 40 µg/ml Rifampisin (AppliChem) içeren agar ortamına çizilerek 28 °C'de, yani *Agrobacterium* için optimum gelişme sıcaklığında 2 gün inkübe edilmiştir. Rifampisin direnci, *Agrobacterium* genomundaki mutasyonlardan kaynaklanmakta olup, kontaminasyonlara karşı doğru kolonilerin seçilmesinde kullanılmıştır.
- ii. İki gün sonunda, petride gözlemlenen kolonilerden biri seçilerek, son konsantrasyonu 25 µg/ml olacak şekilde Rifampisin içeren 100 ml sıvı YEP ortamına (10 g Bacto-pepton, 5 g NaCl, 10 g Maya ekstraktı, 15 g agar) aktarılmıştır. Kültür, 28 °C'de gece boyunca çalkalanarak inkübe edilmiştir.
- iii. Ertesi gün, kompetent hücre hazırlığı için sıvı kültürden alınan örneklerin OD₆₀₀ (Optik Yoğunluk) değeri 0.5 olacak şekilde spektrofotometrik ölçümü yapılmıştır. Bu aşamadan sonraki işlemler buz üzerinde yürütülmüştür.
- iv. Uygun OD değerine ulaşıldığında, kültür 50 ml'lik Falcon tüplerine bölünerek 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- v. Oluşan çökelti (pellet) 50 ml soğuk ve steril ddH₂O ile çözülmüş ve aynı koşullarda tekrar santrifüj edilmiştir.
- vi. İşlem sırasıyla 25 ml, 12.5 ml ve 10 ml soğuk steril ddH₂O kullanılarak tekrarlanmıştır. Her adımda santrifüjleme 5000 rpm'de 15 dakika sürmüştür.
- vii. Son olarak, 5 ml soğuk steril %10 gliserol ile çözülen çökelti yeniden santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
- viii. Elde edilen son pellet, 1 ml soğuk steril %10 gliserol ile çözülmüş ve mikro tüplere bölünerek -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.2. SICCD8-gRNA1+2 Dizilerini Taşıyan pFGC-pcoCas9 Plazmitlerinin *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 Suşuna Transformasyonu

Agrobacterium tumefaciens kompetent hücreleriyle yapılan bakteriyel transformasyonda en etkili yöntemlerden biri olan elektroporasyon yöntemi bu çalışmada tercih edilmiştir. Bu yöntem, SICCD8 genine ait gRNA1 ve gRNA2 dizilerini içeren ve ligasyon işlemi tamamlanmış pFGC-pcoCas9 plazmitlerinin *A. tumefaciens* EHA105 suşuna aktarılması amacıyla kullanılmıştır. Elektroporasyon işlemi, yüksek voltajlı bir elektrik alan oluşturarak hücre zarında geçici porlar açılmasını sağlar ve plazmid DNA'sının hücre içerisine alınmasına imkân tanır. Bu işlem, özel bir elektroporasyon cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. *Agrobacterium* kompetent hücreleriyle yapılan transformasyon işlemlerinde kullanılan elektroporasyon cihazı

Deneysel Uygulama Aşamaları:

i. pFGC-pcoCas9 plazmitlerinin konsantrasyonu maksimum 80 ng/μl olacak şekilde optimize edildikten sonra, her biri için 1 μl alınarak buz üzerinde 100 μl EHA105 elektro-kompetent hücresi ile yavaşça karıştırıldı.

ii. Hazırlanan karışım, 0,2 cm boyutundaki buz gibi soğuk elektroporasyon küvetlerine aktarıldı ve küvetin dış yüzeyindeki su damlacıkları dikkatlice temizlendi.

iii. Küvetler, elektrik akımının verileceği elektroporasyon cihazına yerleştirildi ve 2,5 kV elektrik akımı uygulanarak plazmidler kompetent hücre içerisine aktarıldı. Ardından hemen 1 ml sıvı LB besiyeri ilave edilerek hücrelerin yaşaması sağlandı. Hücre süspansiyonu mikro santrifüj tüplerine alınarak, antibiyotik içermeyen ortamda 28 °C’de 2 saat inkübe edildi.

iv. Hücre yoğunluğu artan süspansiyondan 100 µl alınarak 50 µg/ml Kanamisin (plazmit seçimi için) + 25 µg/ml Rifampisin (kontaminasyon önleme) içeren YEP agar ortamına yayıldı. Kontrollü olarak, boş EHA105 kompetent hücreleri de aynı antibiyotikli ortama ekildi. Kontrollü suşun, seçici ortamda gelişim göstermemesi beklenmektedir.

v. 2 günlük inkübasyonun ardından petri kutularında gözlenen kolonilerden 5 tanesi seçildi ve 50 µg/ml Kanamisin + 25 µg/ml Rifampisin içeren sıvı LB ortamına aktarıldı. Gece boyunca (O/N) 28 °C’de çalkalamalı inkübasyon gerçekleştirildi. Aynı zamanda seçilen kolonilere özgü koloni PCR testi yapıldı. Bu işlem, optimize edilmiş koşullarda (Tm: 53 °C) gerçekleştirildi (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3), pozitif kontrol olarak kullanılan ligasyon ürünlerinin miniprep stokları ve negatif kontrol olarak saf su ile desteklendi. Elde edilen PCR ürünleri %1,5 agaroz jel üzerinde çalıştırıldı ve UV altında görüntülendi.

vi. Doğrulanmış kolonileri içeren hücre kültürleri, %80 steril gliserol ile 1:1 oranında karıştırılarak stoklama için hazırlanmış ve -80 °C’de saklanmıştır.

3.5. Bitki Transformasyonu

Hazırlanan CRISPR yapısının *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşu aracılığıyla domates bitkisine aktarılması süreci, bitki transformasyonu olarak adlandırılır. Literatürde de belirtildiği üzere, bu yöntem sayesinde, ikili yapıya sahip pFGC-pcoCas9SICCD8-gRNA1+2 vektöründe yer alan bitki selektif markör geni, gRNA dizileri ve Cas9 gen bölgesi, vektörün sağ ve sol sınırları (right and left border) arasında yer alan kısım olarak, *A. tumefaciens*’in sahip olduğu Vir genlerinin yardımıyla bitki genomuna entegre edilir.

3.5.1. Bitki Doku Kültürü - *Agrobacterium* Aracılı Transformasyonu

Bitki genetik transformasyon çalışmalarında başarı, yalnızca doğru vektör tasarımına değil, aynı zamanda steril koşullar altında yürütülen hassas laboratuvar uygulamalarına da bağlıdır. Bu çalışmada, domates bitkisine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla transformasyonu amacıyla kullanılan protokol, her aşamada dikkatli sterilizasyon ve teknik uygulama gerektirmiştir. Özellikle tohumların aseptik koşullarda çimlendirilmesi, eksplantların hazırlanması, ko-kültivasyon süreci ve rejenerasyon aşamaları gibi kritik basamaklar, transformasyon verimliliğini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, bitki dokularının başarılı bir şekilde genetik olarak transforme edilebilmesi için Van Eck ve arkadaşları (2019) tarafından tanımlanan protokol esas alınarak uygun modifikasyonlarla uygulanmıştır.

3.5.2. Tohumların çimlendirme ortamına hazırlanması

Çimlendirme ortamı MS tuzları, myo-inositol (büyüme arttırıcı olarak görev yapar ve hücre duvarı oluşumunu destekler), tiamin (karbonhidrat metabolizmasında önemli bir rol oynar), nikotinik asit (enerji üretimi ve genel metabolik fonksiyonlar için), sükroz (enerji sağlar ve ozmotik dengeyi korur) ve agar içeren katı Murashige ve Skoog Besi Ortamı (MSO) 5.8 pH'a ayarladıktan sonra otoklavlayarak (121°C, 20 dakika) steril hale getirildi (Çizelge 3.5). Besi ortamı hazırlandıktan sonra petrilere dökülmeden önce çok sıcak olmamasına özen gösterilmiştir. Ortam henüz çok sıcak olmadan, ancak sıvı haldeyken kaplara dikkatlice dökülmüştür. Steril kabin içinde ortam döküldükten sonra kapakları açık bırakılarak oda sıcaklığında soğuması beklenmiş ve soğuma tamamlandıktan sonra kapaklar kapatılmıştır (bu arada ortamın üst yüzeyinde yoğunlaşma oluşmaması için dikkat edilmiştir).

Çizelge 3.5. Tohum çimlendirme ½ MSO

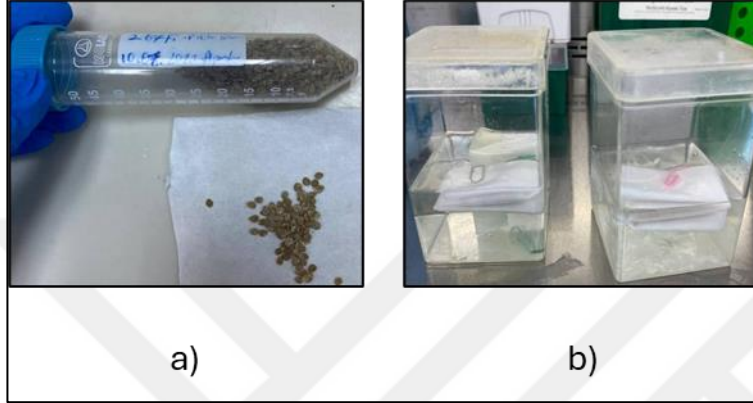
Ortam İçeriği	Miktarı
MS tuzu	2,15 g
Myoinositol	100 mg
Tiamin HCl (1 mg/ml)	2 ml
Nikotinik asit (0,5 mg/ml)	1 ml
Sükroz	10g
pH: 5,8	
Agar	8 g

3.5.3. Tohumların sayımı ve sterilizasyonu

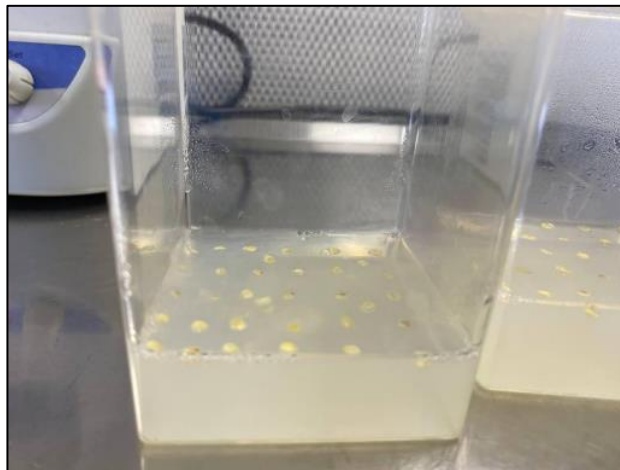
Önce 267 F1 domates genotipine ait tohumları bir filtre kağıdı üzerinde sayılmıştır. Sonra tohumlar sterilizasyon işlemi için steril kabin içerisine alınmıştır. Üzerlerine önceden hazırlanan sterilizasyon solüsyonu (Çizelge 3.6) eklenmiştir ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre boyunca tohumlar belirli aralıklarla hafifçe çalkalanmıştır (Şekil 3.6). Tohum içindeki embriyo görünür hale gelene kadar bu işleme devam edilmiştir. Ardından sterilizasyon solüsyonu dikkatlice dökülmüş ve tohumlar steril saf su ile toplamda 6 kez yıkanmıştır. Her yıkamada üzerlerinde kalan köpüklerin tamamen temizlenmesine özen gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Sterilizasyon Solüsyonu

Ortam İçeriği	500 ml Ortam İçin
Sodyum Hipoklorit	250 ml
Steril Saf Su	250 ml

**Şekil 3.6.** Tohum sayımı ve sterilizasyon **a)** 267 F1 tohumunun sayımı; **b)** Sterilizasyon solüsyonu ile sterilizasyonu**3.5.4. Tohumların çimlendirme ortamına ekilmesi**

Steril hale getirilen tohumlar, soğumuş 1/2 MSO içeriğine sahip çimlendirme ortamına ekilmiştir (Şekil 3.7). Tohumlar, iklim odasında 7-8 gün süreyle, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında 25°C'de inkübasyona alınmıştır.

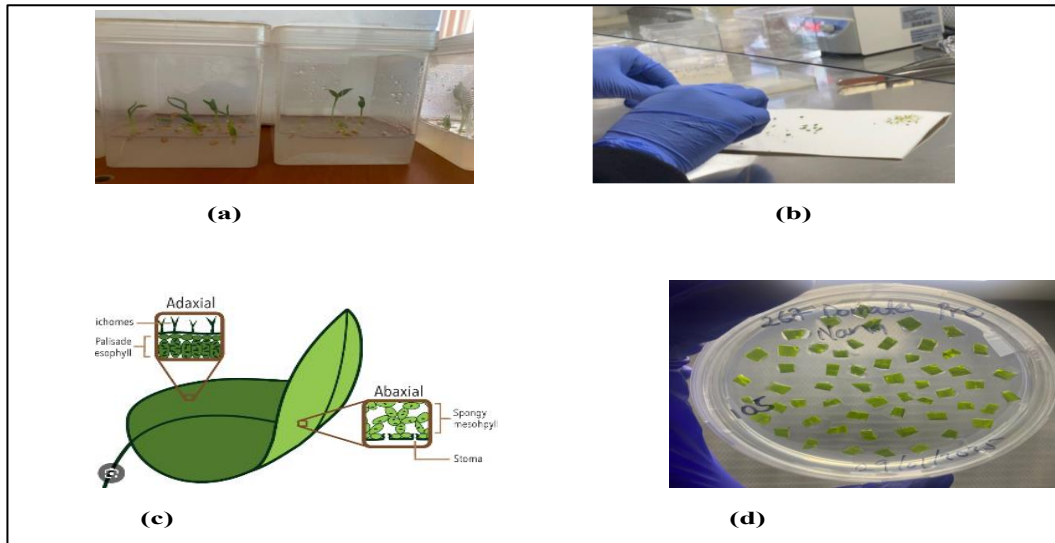
**Şekil 3.7.** Tohum ekilmesi

3.5.5. Kotiledon yapraklarının kesimi ve ön kültür ortamına aktarılması

Çimlenen tohumlardan kotiledon yapraklar steril kabin içinde dikkatlice kesilmiştir. Kesim sırasında yaprak dokusuna zarar vermemeye özen gösterilmiştir. Yapraklar büyükse ikiye kesilmiştir; küçükse bütün halde sadece kenarları kesilerek kare şeklinde bırakılmıştır. Kesilen yaprakların adaksiyal yüzeyi alta gelecek şekilde, ön kültür (Çizelge 3.7) olarak adlandırılan ortama aktarılmıştır (Şekil 3.8). Yerleştirme için pensin ucu hafif nemlendirilerek kullanılmıştır. Petri kapları 25°C'de, 16/8 saat fotoperiyot şartlarında iklim odasında 1 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.7. Ön kültür ortamı (2Z) (pH:5,8)

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



Şekil 3.8. Ön kültür için eksplant hazırlama; **a)** Çimlenme ile oluşan kotiledon yaprakları; **b)** Kotiledon uçlarının çıkarılması; **c)** Eksplant yerleştirme yönteminin gösterimi; **d)** Ön kültür ortamına yerleştirilen eksplantlar

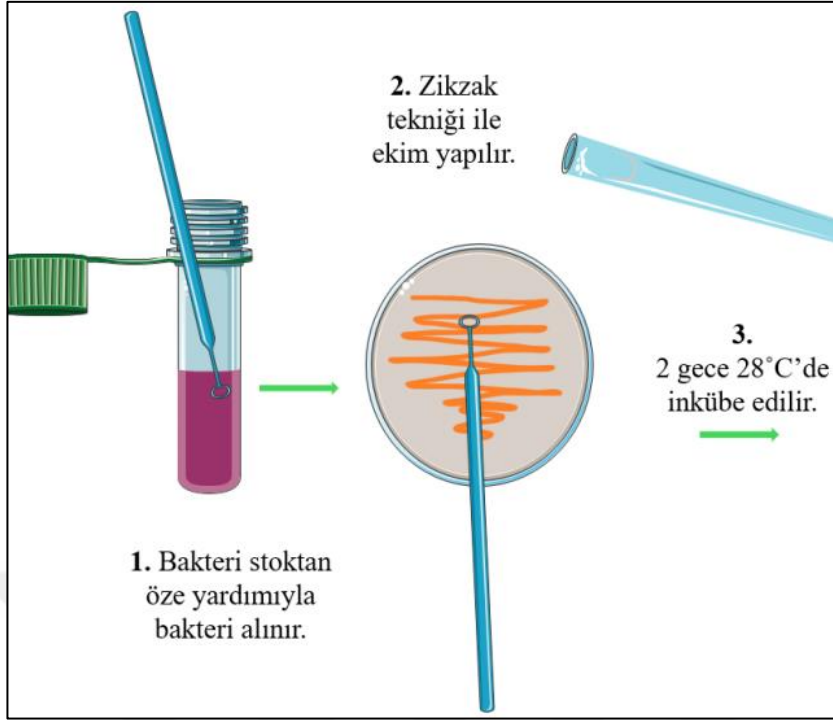
3.5.6. *Agrobacterium* solüsyonunun hazırlanması, OD ölçümü ve hazırlık, transformasyon

Aynı gün, transformasyon için EHA105 suşu içeren *Agrobacterium* stoklarından öze yardımıyla alınarak, antibiyotik içeren seçici besi ortamına (kanamisin ve rifampisin içeren) inokulasyonu yapılmıştır. Petriler 28°C'de 2 gece inkübasyona alınmış ve (Şekil 3.9). koloni oluşumu gözlenen petrilerden tekrar öze ile alınan bakteriler, 5 mL veya 20 mL sıvı ortamlara aktarılıp ve 28°C, 225 rpm şartlarında gece boyu çalkalamalı inkübasyona alınmıştır.

Ertesi gün, sıvı ortamda üretilen *Agrobacterium* içeren sıvı kültürleri OD600 nm değeri 1:10 oranında seyreltilerek spektrofotometre ile ölçülmüştür. OD 1.0 değeri elde edildiğinde, bakteriler 4°C'de, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan pelet, 2 mL sıvı eş-kültür ortamında (Çizelge 3.8) çözündürülüp ve toplam hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır.

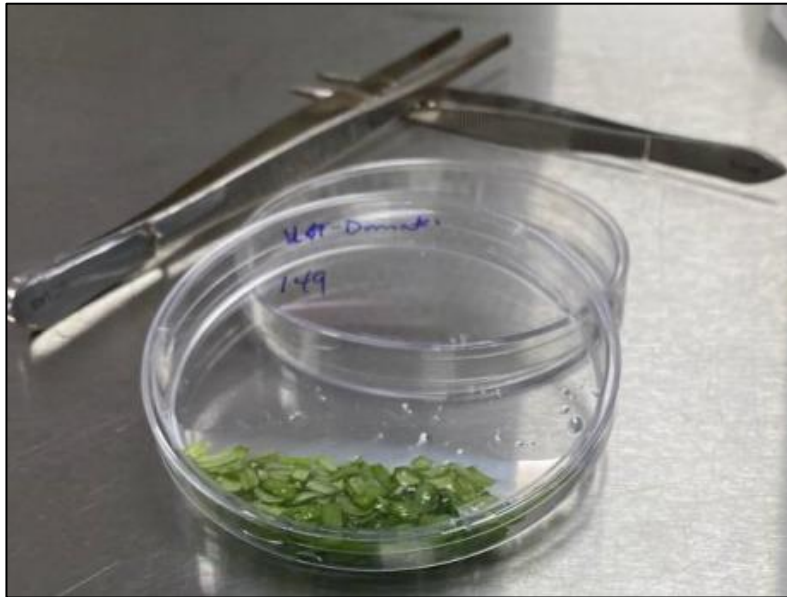
Çizelge 3.8. Sıvı eş-kültür (Co-cultivation) ortamı %2 MSO pH: 5.8

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



Şekil 3.9. Stoktan bakteri inokulasyonu temsili

Ön kültür ortamındaki kotiledon yapraklar, hazırlanan *Agrobacterium* sıvısı ile 1 saat süreyle karanlıkta inkübasyona alınmış (Şekil 3.10). Bu sürenin sonunda yapraklar tekrar ön-kültür ortamında da kullanılan besi ortamına alınıp karanlık koşullarda iklim odasında 2 gün süreyle eş-kültür ortamına aktarılmıştır.



Şekil 3.10. Transformasyona sağlamak için eksplantların *Agrobacterium* içeren solüsyonda inkübasyonu

3.5.7. Birincil rejenerasyon ortamına aktarılma

Karanlık ortamdaki inkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra kotiledon yapraklar seleksiyon ajanı olarak kullanılan ve uygun konsantrasyonlardaki kimyasalları içeren birincil rejenerasyon ortamına (Çizelge 3.9) transfer edilmiştir (bu arada yapraklar petri kaplarına abaksiyal yüzeyleri besi ortamına temas edecek şekilde yerleştirilmiştir). Bu ortamlarda bitkiler 10-15 gün süreyle 25°C'de ve 16/8 saat fotoperiyot şartlarında inkübasyona alınmıştır. Burada, başarılı bir şekilde gen transformasyonu gerçekleşmemiş eksplantların fosfonitrisin varlığında kahverengileşmeye ve ölmeye başladığı görülmüş öte yandan başarılı olanların ise yeşil kalıp gelişmeye devam ettiği bir görünüm ortaya çıkmıştır (kotiledonun kesilen kısımlarında kallus oluşumu bu aşamada başlamaktadır).

Çizelge 3.9. Birincil rejenerasyon kültür ortamı (2Z) (pH:5,8)

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

3.5.8. İkincil rejenerasyon ortamına aktarılma

Birincil rejenerasyon ortamında gelişen dokular, 10-15 gün sonra ikincil rejenerasyon ortamına (Çizelge 3.10) alınmıştır. Bu ortamlar 10-15 günde bir yenilenmiştir. Bu aşamada, eksplantlar eski bir besiyerinden yeni bir besiyerine aktarılması sırasında, kahverengileşen ve ölen eksplantlar aktarılmamıştır. İkincil rejenerasyon aşamasında kallus büyümekte ve bu kallustan sürgünler oluşmaya başlamaktadır. Bu sürgünlerden transformasyonu başarılı olanlar büyümeye devam etmektedir. Ayrıca, sağlıklı gelişim gösteremeyen sürgünlerden kurtulmak için sürgünlerin taze dokuları kalacak şekilde periyodik olarak kesilmiştir ve köklendirme ortamına aktarılacak kadar büyüdüğünde sadece bir sürgünün mevcut olduğundan emin olunmuştur.

Çizelge 3.10. İkincil rejenerasyon kültür ortamı (1Z) (pH:5,8)

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

3.5.9. Köklendirme ortamına transfer

İkincil rejenerasyon ortamında yaklaşık 6-7 cm boya ulaşan bitkiler, köklendirme ortamına (Çizelge 3.11) transfer edilmiştir. En sağlıklı şekilde gelişen sürgünler kallustan dikkatlice ayrılmış. Ayrılan her bir sürgün tek başına köklendirme ortamına yerleştirilmiştir ve kök oluşumu gözlemlenene kadar köklendirme ortamından tutulmuştur. Sürgünlerde yeterli kök oluşumu görülene kadar başka bir alt kültüre alınmadan bu ortamda tutulmuştur.

Çizelge 3.11. Köklendirme kültür ortamı (pH:5.8)

Ortam İçeriği	1 Litre ortam için
MS tuzu	4,3 gram
Modified Nitsch Vitamini (Stok 1000X)	1 ml
Sükroz	30 gram
(pH: 5.8)	
Agar	8 gram

(Devamı Arkada)

Çizelge 3.12'in devamı

Fosfinotrisin (otoklavdan sonra eklenilir) (Stok 10 mg/mL)	100 µL
Timentin (otoklavdan sonra eklenilir) (Stok 100 mg/mL)	1,25 mL
IAA (otoklavdan sonra eklenilir) (Stok 1mg/mL)	100 µL
IBA (otoklavdan sonra eklenilir) (Stok 1mg/mL)	100 µL

3.6. Bitkilerin Dış Ortama Alışma (Aklimatizasyon) Süreci

In vitro koşullarda yüksek nem ve düşük ışık altında gelişen bitkilerin, dış ortamın düşük nemli, doğal ışıklı ve steril olmayan koşullarına kademeli olarak alıştırılması için kökleri yaklaşık 1–3 cm, gövdeleri 5–7 cm boyuna ulaştıkça kademeli olarak yapılmıştır. Bitkiler pens ile dikkatlice çıkarılmış ve köklerinde kalan agar kalıntıları su ile nazıkçe yıkanarak temizlenmiştir. Sonrasında bitkiler önceden sterilize edilmiş nemli bir perlit:torf:vermikülit (1:1:1) karışımına sahip 6–8 cm çapındaki saksılara dikilmiştir.

Her bir bitki, şeffaf plastik bardaklarla kapatılarak büyüme odasına yerleştirilmiş ve bu sayede yaklaşık %90–100 bağıl nem sağlanmıştır. Bitkiler, 23–25 °C sıcaklık ve ışık koşullarında tutulmuştur. Toprak ortamına transfer edilen bitkilerin, doku kültürü ortamındaki şartlara benzer bir adaptasyon süreci geçirmesi amacıyla, ilk üç gün boyunca bitkilerin üzeri tamamen kapatılmıştır. Üçüncü günden itibaren beş gün süresince kapaklar kademeli olarak yarıya kadar açılarak, bitkilerin çevresel koşullara uyum sağlaması gerçekleştirilmiştir. Beş günlük bu geçiş sürecinin sonunda kapaklar tamamen kaldırılmış ve düzenli sulama programı uygulanmaya başlanmıştır.

Yaklaşık 2–3 haftalık adaptasyon sürecinin ardından bitkiler, daha geniş hacimli saksılara (10–12 cm) şaşırtılıp başlangıçta bitkiler gölgeli bir serada tutulmuş, ardından 1–2 haftalık süreç sonunda kademeli olarak tam güneş ışığına alıştırılmıştır. İlk haftalarda besin ihtiyacını karşılamak amacıyla Hoagland çözeltisi uygulanmıştır. Ayrıca, beyaz sinek ve diğer zararlılara karşı gerek görüldüğünde koruyucu ilaçlamalar yapılmıştır. Bu adaptasyon ve yetiştirme protokolleri, elde edilen CCD8 mutantlarının sağlıklı gelişimini ve ileri ıslah çalışmaları için uygun materyal olarak devam ettirilmelerini sağlamak amacıyla titizlikle yürütülmüştür.

3.7. Transgenik ve Mutant Hatların Belirlenmesi

Bu çalışmada, T0 generasyonu bitkilerinin transgenik olanlarının ve CCD8 geninde gerçekleştirilen düzenlemelerin tespiti için, fide dönemindeki bitkilerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Doyle (1991) tarafından geliştirilen CTAB tabanlı total DNA izolasyon protokolü, çalışma ihtiyaçlarına göre modifiye edilerek kullanılmıştır. Her örnekten ortalama 300 miligram taze yaprak alınmış, CTAB tampon çözeltisiyle muamele edilerek hücre duvarı parçalanmış ve nükleik asitlerin saflaştırılması

sağlanmıştır. İzolasyon aşamasında kloroform-izoamil alkol karışımı ve izopropanol çöktürme adımları uygulanmış, ardından etanol yıkaması gerçekleştirilerek DNA saflığı artırılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri, +4 °C’de bir gece çözündürülerek PCR analizlerine hazır hale getirilmiştir.

Literatüre göre, *Agrobacterium*-aracılı transformasyon sırasında vektör üzerindeki sağ ve sol sınır bölgeleri (RB-LB) arasında kalan genetik materyalin bitki genomuna aktarıldığı bilinmektedir. Bu doğrultuda, T0 generasyonunda fosfinotrisin seleksiyonu altında elde edilen bitkilerin transgenik olup olmadığını kontrol etmek amacıyla pFGC-pcoCas9 vektöründe yer alan SlCCD8 genine özgü primerler kullanılmıştır. PCR amplifikasyonları, optimize edilmiş koşullar altında gerçekleştirilmiş ve elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır. Sonrasında transgenik bitkiler T1 ve T2 generasyonunda saksı denemeleri ile canavar otuna karşı dayanıklılık durumları belirlenerek en dayanıklı 1 adet T2 generasyonu bitkisinin (D38) mutasyonunun karakterizasyonu için, SlCCD8 geni üzerinden tasarlanan gRNA1 ve gRNA2 hedef bölgelerini ayrı ayrı spesifik olarak üreten primerler ile PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen ürünler sanger dizilemesi ile mutasyon profili tespit edilmiştir (Çizelge 3.12).

Sonrasında dizileme sonuçlarına dayalı olarak belirlenen orijinal ve mutant amino asit dizilerinin oluşturacağı protein yapıları, Meta tarafından geliştirilen ESMFold algoritması aracılığıyla tahmin edilmiştir. Bu tahminler sonucunda elde edilen üç boyutlu protein modelleri görselleştirilmiş ve yapısal farklılıkların değerlendirilmesinde kullanılmıştır..

Çizelge 3.13. SlCCD8 geni üzerinden tasarlanan gRNA1 ve gRNA2 hedef bölgelerini ayrı ayrı spesifik olarak üreten dizileme primerleri

Primer Adı	Sekansı (5'→3')	Uzunluğu (bp)	% GC	Tm (°C)
New-CCD8- tomato-Seq1F	GCCAATTGCCTGTAATAGT TCC	20	52,4	58,3
New-CCD8- tomato-Seq1R	TTCATAAACCTTTGTTTTTC AATATGT	24	39,1	58,9
New-CCD8- tomato-Seq2F	TTTTCAGAAGTACCTAAAG CAGACAA	26	34,6	58
New-CCD8- tomato-Seq2R	GAAAGGAATGACTTACAA TGTTGC	24	37,5	56

3.8. Hidroponik sistem denemeleri ile genotiplerin canavar otuna karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi

CRISPR/Cas9 gen kasedini içeren T0 bitkilerinin kendilemelerinden elde edilen bitkilerinin içindeki homozigot mutant olup fenotipinde de canavar otuna karşı dayanıklı olanların varlığının ve dayanıklılık seviyelerinin tespiti için yapay olarak canavar otu bulaştırılmış ortamda yetiştirilen domates köklerinde oluşan tüberküller değerlendirilmiştir. Bu amaçla *P. aegyptiaca* tohumlarının yüzey sterilizasyonu %1'lik sodyum hipoklorit (NaOCI) ve %0.01 Tween 20 içinde 5 dakika bekletilip ve altı kez steril su ile iyice durulanarak yapılmıştır. *P. aegyptiaca* tohumları, karanlıkta 20°C'de yedi gün ön kondisyona alınmıştır. Otoklavlanmış yaklaşık 150 ml vermikulit içeren 120x120 mm ebatlarında kare plastik kök kaplarına birer adet domates fidesi filtre kâğıdı üzerine yerleştirilmiştir. Daha önce ön alıştırırmaya alınan *P. aegyptiaca* tohumlarından 10 mg alınarak filtre kâğıdı üzerindeki domates fidesinin köklerine bulaştırılmıştır. Kök kapları 24°C'de 14 saatlik bir foto periyotta kontrollü iklim odasına alınmıştır. Kök kapları haftada 3 kez %1'lik Hoagland solüsyonu ile sulanmıştır. İnokülasyondan sonraki 20 ve 30. günlerde kök kabında gelişen tüberküller binoküler mikroskopta (Leica EZ4) sayılmış ve denemenin sonunda tüberkül büyüklükleri milimetrik kâğıt üzerinde ölçülerek fotoğraflanmıştır. Hidroponik denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre her generasyonda farklı tekerrür sayılarında ve iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.9. Saksı denemeleri ile genotiplerin canavar otuna karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi

CRISPR/Cas9 gen kasedini içeren T0 bitkilerinin kendilemelerinden elde edilen bitkilerinin içindeki homozigot mutant olup fenotipinde de canavar otuna karşı dayanıklı olanların tespitinin ve dayanıklılık seviyelerinin tespiti için T1 ve T2 generasyonu bitkilerinin genotipleri kullanılmıştır. Saksı denemeleri için fide harcı olarak 1:1:1 oranında hazırlanmış olan toprak + kum + torf karışımı otoklav edildikten sonra kullanılmıştır. Fide dikimlerinden önce saksılar 100 mg *P. aegyptiaca* tohumları ile bulaştırılmıştır. Saksı denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre her generasyonda farklı tekerrür sayılarında kurulmuştur. İlk denemede T1 generasyonundaki genotipler ve 267 F1(kontrol) çeşidi, ikinci denemede ise T2 generasyonundaki genotipler ile yine 267 F1(kontrol) çeşidi kullanılmıştır. Birinci ve ikinci denemede bitki transformasyonunda kullanılan çeşit 267 F1 çeşidi olduğu için bu çeşit her denemede kontrol olarak kullanılmıştır.

Fidelikte geliştirilen en az bir aylık domates fideleri her saksıya bir adet olmak üzere dikilmiştir. Bitkiler doğal ışık altında serada büyütülmüş, ihtiyaç duyduğu kadarıyla sulanarak gübrelemeleri yapılmıştır. Gerekli görüldüğü taktirde hastalık ve zararlı mücadelesi her saksı için eşit olarak yapılmıştır. Her saksıda canavar otunun yaş ve kuru ağırlık verileri kaydedilmiştir. Canavar otunun çıkış durumu göz önünde bulundurularak saksı denemelerinde her saksıda canavar otunun yaş ve kuru ağırlık verileri ile konukçu domateslerin kök ile gövdelerinin yaş ve kuru ağırlık verileri kaydedilmiştir. Hem canavar otu için hem de domates kökleri için kurutma işlemi etüvde 65°C'de 72 saat gerçekleştirilmiştir.

3.10. Dayanıklı Mutant Genotipin Gen Ekspresyon Analizleri

3.10.1. RNA izolasyonu

D38 kodlu mutant genotip ve bu genotipin Transformasyon işlemine tabi tutulmamış yabanıl tip (wild type) bitkisi olan 267 F₁ genotipinde RNA izolasyonları yapılmıştır. RNA izolasyonu Omega Bio-Tek E.Z.N.A Plant RNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır. RNA izolasyonu için tohumlar siterilize edilip çimlendirme ortamına steril kabinde ekilmiş olup çimlenmeleri tamamlandıktan 15 gün sonra fidelerin kökleri agarlı besi ortamından çıkarılıp dikkatlice yıkanıp kullanılmıştır. Her genotip için üç teknik ve üç biyolojik tekrar yapılmıştır. RNA izolasyonunun aşamaları kitte belirtildiği şekilde yapılmıştır: Bitkilerden tüm kökleri bistüri ile kesilip RB Buffer (500 µl) +B-ME kimyasal karışımı içine koyulduktan sonra steril pestelle ezilmiştir. Sonrasında bitki dokularını içeren sıvılar 2 ml'lik koleksiyon tüplerine alınmıştır. Vortex sonrasında oluşan lizat kolona aktarılmıştır ve 14.000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. 1:1 hacminde %70 etanol eklenmiş, 20 saniye vortex yapılmıştır. Kite ait 2 ml'lik koleksiyon tüpüne konulmuştur. 700 µl örnek kolona yüklenmiştir. 12.000 g de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kalan örnekte kolona yüklenmiştir ve santrifüj edilmiştir. 500 µl 'RNA Yıkama Tamponu I' eklenmiştir ve 10.000 g de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolon yeni tüpe aktarılmıştır. 700 µl 'RNA Yıkama Tamponu II' eklenmiştir. 10.000 g de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolon yeni tüpe aktarılmıştır. Yine 500 µl 'RNA Yıkama Tamponu II' eklenmiştir. 10.000 g de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolon boş olarak 2 dakika maksimum hızda santrifüjlenmiştir. Kolon yeni tüpe alınmış ve 100 µl nükleaz içermeyen siteril saf su eklenmiştir. Ardından maksimum hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir.

3.10.2. RT-qPCR işlemleri

Hedeflenen *CCD7*, *CCD8* ve *Max1* genlerinin domates köklerindeki gen ifade seviyesini ölçmek için kantitatif PCR (qPCR) kullanılmıştır. Gen-spesifik primerler kullanılarak, her bir örneğin qRT-PCR'ı iki teknik ve üç biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. PCR analiz işlemleri için Luna Universal One Step RT qPCR kiti kullanılmıştır. Bu çalışmada referans (housekeeping) gen olarak Actin geni kullanılmıştır. Genotiplerin *CCD7*, *CCD8* ve *Max1* genlerinin ekspresyon seviyeleri kit protokolünde yer alan reaksiyon koşullarına göre hazırlanan reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.13'te verilmiştir.

Çizelge 3.14. RT-PCR reaksiyon bileşenleri

İçerik	Miktar
RNA	0.5 µl
ddH ₂ O	6.9 µl
RT enzim (20x)	1 µl
Primer-Forward (10 µM)	0.8 µl
Primer-Reverse (10 µM)	0.8 µl
Reaksiyon karışımı (2x)	10 µl
Toplam	20 µl

PCR döngüsü, 95°C’de 6 dakika ön denatürasyon ile başlayıp, 95°C’de 60 saniye ilk denatürasyon, ardından 95°C’de 10 saniye ve 59°C’de 30 saniye olmak üzere 2 aşamalı amplifikasyon ile devam etmiştir. Son aşamada 95°C’de 10 saniye, 65°C’de 60 saniye ve 97°C’de 1 saniye olmak üzere erime adımı uygulanmıştır. Hedef genlerin ifadelerini kantitatif olarak ölçmek için 2- $\Delta\Delta C_t$ yöntemi kullanılmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

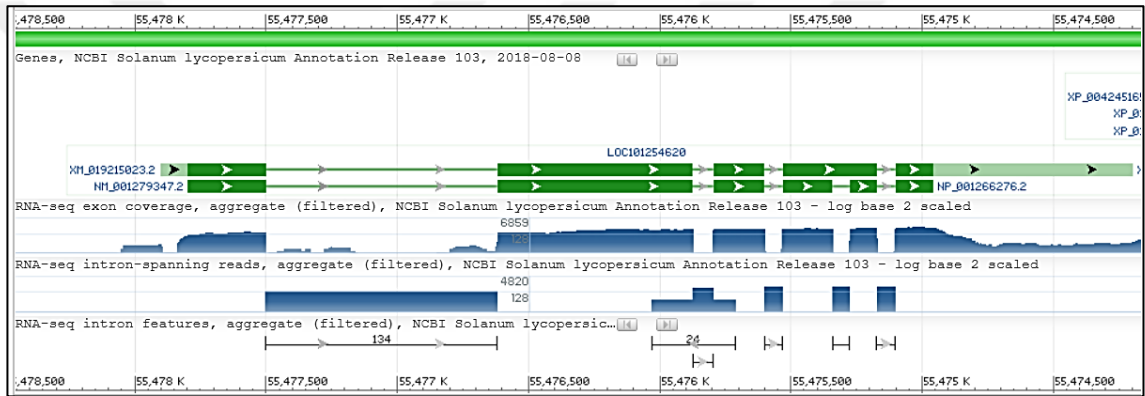
3.11. İstatistik Analiz

Tüm istatistiksel analizler SAS 9.0 (2002, SAS Institute, Cary, NC, ABD) istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Petri kabı denemelerinde elde edilen % çimlenme oranı değerlerine açılı transformasyonu yapılmıştır. Hidroponik ve saksı denemesi verilerinde sıfır değerleri olduğu için $\log = \log (X + 1)$ transformasyonu yapılmıştır. Varyans analizinde (ANOVA) PROC GLM prosedürü kullanılmış, ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD karşılaştırma testi ile %95 önem düzeyinde karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Biyoinformatik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

SLCCD8 genine ait dizi bilgileri, SL3.0 sürümüne ait Domates Genom veritabanı (Tomato Genome version SL3.0) kullanılarak NCBI/Gene veri tabanından elde edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, genin ayrıntılı yapısı—ekzon, intron ve kromozom üzerindeki konumu da dâhil olmak üzere—belirlenmiştir. SLCCD8 (Gen ID: 101254620) geni, domates genomunun 8. kromozomu üzerinde yer almakta olup toplamda altı ekzon ve beş introndan oluşmaktadır. SL3.0 genom sürümüne göre bu gen, 55.474.797 ile 55.477.956 nükleotid (nt) pozisyonları arasında konumlanmakta ve toplamda 2842 nt uzunluğundadır. Kodlayan dizisi (CDS) 1674 nükleotidden oluşmakta ve bu da 557 amino asitlik bir proteine karşılık gelmektedir. Bu yapısal bilgiler, hedef bölgelerin belirlenmesi ve CRISPR-Cas9 ile yapılacak olan gen düzenleme çalışmaları için temel teşkil etmektedir (Şekil 4.1).



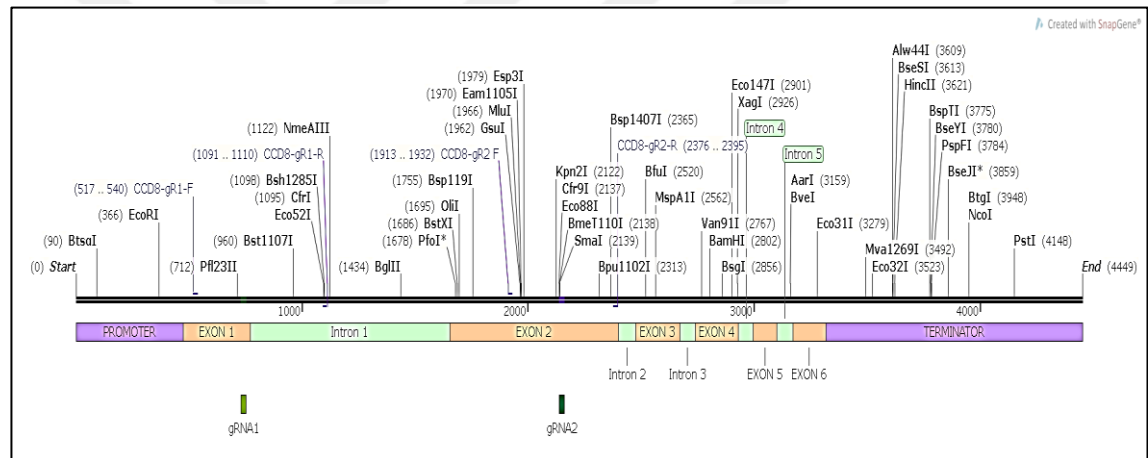
Şekil 4.1. SL3.0 domates genom sürümünde *SLCCD8* geninin özellikleri

SLCCD8 geninin yapısal doğruluğunu teyit etmek amacıyla, genden çıkarılan intron bölgeleri temizlenmiş diziler ExPASy / Translate programı kullanılarak protein dizilerine çevrilmiştir. Elde edilen protein dizileri Sol Genomics veritabanında taranarak, eşleşen sonuçların CCD protein ailesine ait olduğu doğrulanmıştır. CRISPR-Cas9 sisteminde hedeflenen mutagenез süreci için gerekli olan kılavuz RNA'lar (gRNA) CRISPRDirect programı kullanılarak tasarlanmıştır. gRNA dizileri, domates genomu (SL3.0) üzerinde tarandığında hedef dışı (off-target) eşleşme göstermeyen, %40'ın üzerinde GC içeriğine sahip ve uygun PAM dizisi (NGG) taşıyan bölgelerden seçilmiştir. SLCCD8 geninin birinci ve ikinci ekzonlarını hedefleyen iki farklı gRNA belirlenmiş ve bu gRNA'ların aynı anda kullanımı, gen düzenlemenin başarısını artırmak ve hedef genin fonksiyon kaybını (knockout) sağlamak amacıyla tercih edilmiştir. Seçilen gRNA dizileri ve karşılık gelen PAM bölgeleri (kalın olarak gösterilmiştir) Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. SlCCD8 Geni İçin Akılcı Olarak Tasarlanan sgRNA Hedef Bilgileri

Gen	Sekansı (5'→3')	Konum (nt)	Boyut (nt)	GC %	gRNA adı	Ekzon numarası
SlCCD8	CCTTCAACGA CGAGTTCTCCT TC	55,477,520– 55,477,542	23	50	gRNA1	1
SlCCD8	ATTCTCACCAC CGTATATCCG G	55,476,113– 55,476,135	23	45	gRNA2	2

İlgili gen bölgelerini hedefleyen gRNA'ların belirlenmesinin ardından, elde edilen veriler SnapGene Viewer 5.1.4.1 (GSL Biotech, 2020) programı kullanılarak görselleştirilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Domates genomu üzerinde gRNA hedeflerinin konumlandırılması: SICCD8 genine ait gRNA hedef bölgesi

SICCD8 genine özgü gRNA hedeflerine yönelik primerler Primer3Plus programı kullanılarak tasarlanmıştır. Bu primerlerle PCR ile çoğaltılan bölgenin dizilenmesi sonucunda, SICCD8 genine ait gRNA'ların hedef bölgeleri doğru şekilde tanımlandığı doğrulanmıştır. Hem *in silico* olarak belirlenen hem de deneysel olarak dizilenen sekanslar, “Clustal Omega çoklu dizi hizalama programı” kullanılarak hizalanmış ve tasarlanan SICCD8 gRNA'larının kapsadığı bölgeler mavi renkle gösterilmiştir (Şekil 4.3a, b). Bu analiz sayesinde gRNA'ların hedef diziler üzerindeki kesin yerleşimleri doğrulanmış ve seçilen gRNA'ların CRISPR-Cas9 sistemiyle düzenleme yapmak üzere uygun olduğu teyit edilmiştir.

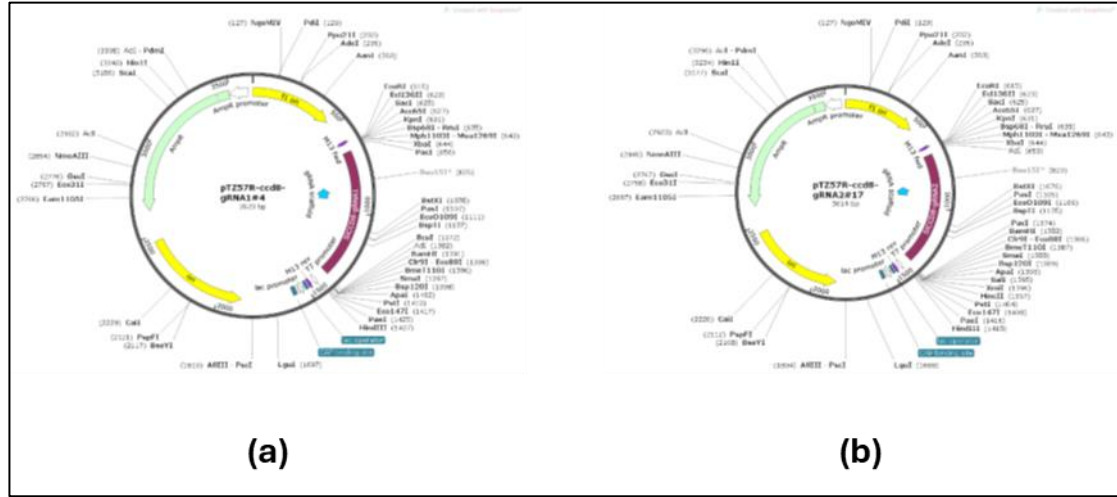


Şekil 4.3. Hizalanmış ve tasarlanan SICCD8 gRNA'larının kapsadığı bölgeler; **a)** SICCD8-gRNA1; **b)** SICCD8-gRNA2

Hedef dizilerle yapılan hizalama sonuçları, SICCD8-gRNA2'nin hedef bölgeyle tam uyum sağladığını göstermiştir. Diğer gRNA dizi ise (SICCD8-gRNA1 ilgili olan) ise hedef bölgeleriyle tek bazlık uyumsuzluk göstermektedir. Ancak bu tek nükleotidlik farkın CRISPR-Cas9 sisteminin işleyişini ne ölçüde etkilediği ilerleyen aşamalarda değerlendirilecektir. Yine de, söz konusu uyumsuzluğun PAM bölgesinde yer almaması nedeniyle sistemin etkinliğini büyük ölçüde olumsuz etkilemesinin beklenmediği düşünülmektedir.

Bir kaset, gRNA dizilerine evrensel sgRNA iskelet dizisi, kodon optimizasyonu yapılmış *Arabidopsis thaliana*'ya ait AtU6-26p RNA polimeraz III promotörü, AtU6-26t terminatörü ve uygun restriksiyon enzim bölgeleri (dizileri) eklenerek oluşturulmuştur. Bu kapsamda, gRNA1 ve gRNA2'nin birleştirilmesini sağlayan AclI (Psp1406I) (5'...AA/CGTT...3') ve klonlama vektörüne ligasyon yapılmasını mümkün kılan PacI (5'...TTAAT/TAA...3') enzim tanıma bölgeleri eklenmiştir. Bu sgRNA kasetleri, Sentebiolab Biyoteknoloji firması tarafından sentezlenmiş ve pTZ57R vektörüne klonlanmıştır. Ancak firma tarafından belirlenen dizi uzunluğu sınırlamaları nedeniyle her bir gRNA dizisi iki ayrı parça (örneğin, SICCD8-gRNA1 ve SICCD8-gRNA2) şeklinde sentezlenmiştir (Şekil 4.4a, b).

Her bir sgRNA için ayrı ayrı sentezlenen AtU6-26p:gRNA:AtU6-26t kasetleri; 20 baz çifti uzunluğundaki gRNA hedef dizisi, 76 bp'lik gRNA iskelet dizisi, 424 bp uzunluğundaki promotör ve 192 bp uzunluğundaki terminatör olmak üzere toplamda 712 bp'den oluşmaktadır. Plazmid içerisinde bulunan bla (AmpR) geni sayesinde, bakteriyel seçimde β -laktamaz enzim ürünü aracılığıyla Ampisilin, Karbenisilin ve benzeri antibiyotiklere karşı direnç sağlanmaktadır.



Şekil 4.4. SICCD8 genlerine ait gRNA'ları taşıyan pTZ57R plazmitlerinin temsili haritaları; **a)** Sentetik olarak oluşturulmuş pTZ57R-SICCD8-gRNA1 plazmit haritası; **b)** Sentetik olarak oluşturulmuş pTZ57R-SICCD8-gRNA2 plazmit haritası

4.1.1. İkili Vektörün Belirlenmesi

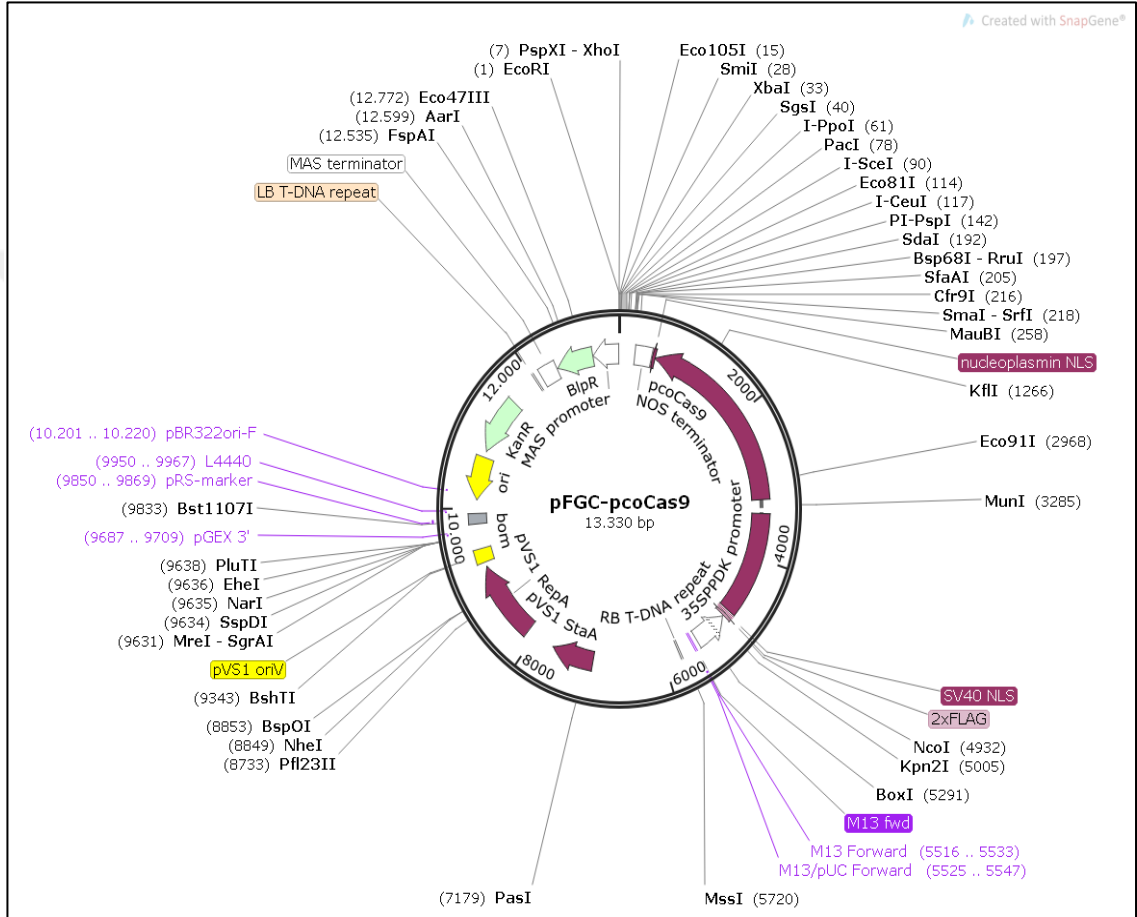
Bu çalışma için en uygun vektör olarak, pFGC-pcoCas9 (ADGENE) ikili vektörü (13.330 bp) (Şekil 4.5) belirlenmiştir. Tip II CRISPR-Cas9 sisteminin işlevini yerine getirebilmesi için gerekli elemanlardan biri olan *Streptococcus pyogenes* kökenli Cas9 endonükleazı bu plazmit üzerinde yer almaktadır. Bitki hücrelerinde Cas9 proteininin ekspresyonunu sağlayan 35SPDK:pcoCas9:NOS kaseti ve kılavuz RNA'nın eklenmesi için çoklu klonlama bölgesi (MCS) bu ikili plazmitte bulunmaktadır.

pcoCas9 geninin uzunluğu 4290 bp olup, içinde 189 bp uzunluğunda bir intron bölgesi, patates ST-LS1 genine ait IV2 intronu (Vancanneyt et al., 1990) yer almaktadır. Ayrıca, gen dizisinin yukarısında 48 bp (16 aa) uzunluğunda bir nükleer lokalizasyon dizisi (nükleoplazmin NLS) bulunmaktadır. Bu amino asit dizisi sayesinde sentezlenen protein çekirdeğe taşınabilmektedir. Vektör ayrıca, *E. coli* suşlarında çoğaltılmasını sağlayan pBR322 replikasyon orijinine sahiptir.

Agrobacterium aracılığıyla bitkilere aktarım için tasarlanan CRISPR yapısı, ikili vektörün LB (25 bp) ve RB (25 bp) bölgeleri arasına ligasyonu sağlanmıştır. Vektörde yer alan *aphA-3* geni sayesinde üretilen aminoglikozid fosfotransferaz enzimi, bakteriyel seleksiyon için kullanılan kanamisin direncini sağlamaktadır (bu gen LB-RB bölgesi dışında yer alır). Bitki seleksiyonu için kullanılan bialofos veya fosfinotrisin

etken maddelerine karşı direnç ise, LB-RB bölgesi içerisinde yer alan MAS promotörü (mannopin sentaz promotörü (Velten et al., 1984)) ve terminatörü ile kontrol edilen *BlpR* (*Streptomyces hygroscopicus bar*) genine ait 552 aa uzunluğundaki fosfinotrisin asetiltransferaz protein ürünü sayesinde sağlanmaktadır.

Ayrıca, vektörün çoklu klonlama bölgesinde (ÇKB) yer alan *PacI* restriksiyon enzimi kesim bölgesi sayesinde sgRNA kasetlerinin bu bölgeye kolaylıkla ligasyonu mümkün olmuştur.



Şekil 4.5. pFGC-pcoCas9 (ADDGENE) ikili vektörü (13.330 bp)

4.2. Laboratuvar Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular

4.2.1. pTZ57R-SICCD8-gRNA1/2 ve pFGC-pcoCas9 Vektörlerinin Klonlanması ve Doğrulanması

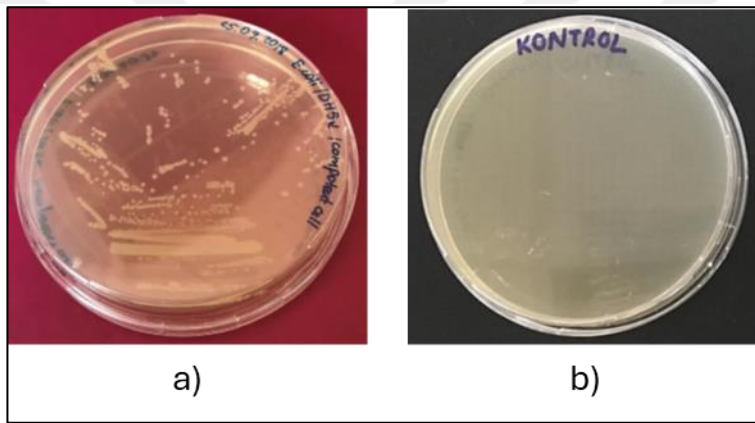
Sentebiolab Biyoteknoloji firması tarafından sentezlenen sgRNA'lar, toplamda 2887 bp uzunluğunda pTZ57R omurgasına sahip plazmitler içerisinde gönderilmiştir. Sentrifügasyon sonrası plazmitlerin konsantrasyonu, DNase/RNase içermeyen saf dH₂O'dan 100 µl eklenerek optimize edilmiştir. 100 µl ddH₂O ilavesi sonrası, plazmitlerin konsantrasyonları Biodrop cihazı ile ölçülmüştür:

SICCD8-pTZ57R-gRNA1: 16,0 ng/μl

SICCD8-pTZ57R-gRNA2: 57,0 ng/μl

Hazırlanan stok plazmitler -20°C’de muhafaza edilmiş ve stok miktarlarını artırmak amacıyla ısı-şok yöntemiyle transformasyon ve ardından plazmit saflaştırması gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, öncelikle bakterilerin ve transformasyonda kullanılacak olan *E. coli* (DH5α suşu) hücrelerinin yaşaması için gerekli koşulları sağlayan besiyerleri, CaCl₂ muamelesine uygun şekilde hazırlanmıştır.

Hazırlanan kompetent hücreler, kontrollü ve antibiyotiksiz ortamlarda çoğaltılmış ve eş zamanlı olarak Ampisilin içeren ortamda da büyütülerek kontrol denemesi yapılmıştır. Bu sayede, pTZ57R-gRNA plazmitlerinin klonlanması sürecinde bakteriyel seçim için kullanılacak olan Ampisilin antibiyotiğine dirençli olup olmadıkları test edilmiştir (Şekil 4.6). Yapılan bu kontrol ile deneylerde kullanılacak olan *E. coli* DH5α suşunun saflığı ve uygunluğu doğrulanmıştır.

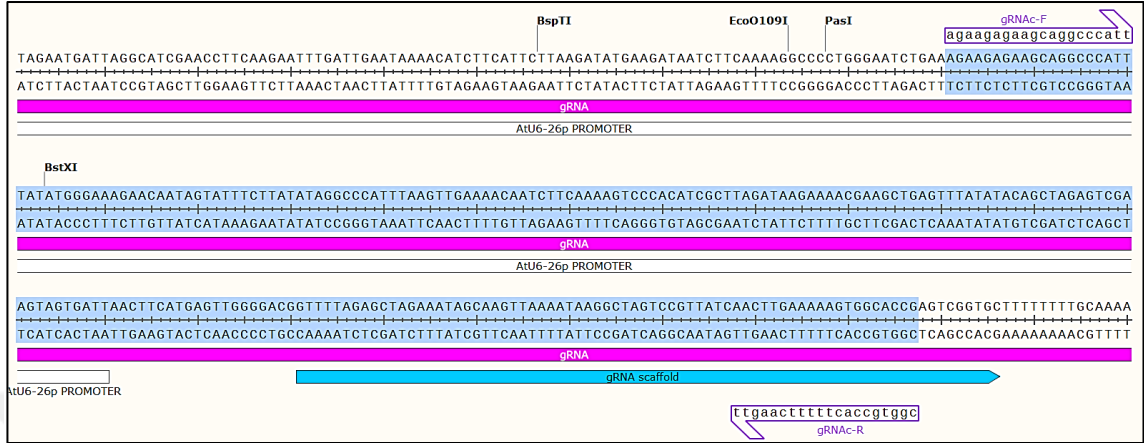


Şekil 4.6. *E. coli* DH5α canlılık testi; **a)** Antibiyotiksiz ortamda çoğaltılmış *E. coli* DH5α suşuna ait hücreler; **b)** Ampisilin içeren ortamda çoğaltılmış *E. coli* DH5α suşuna ait hücreler

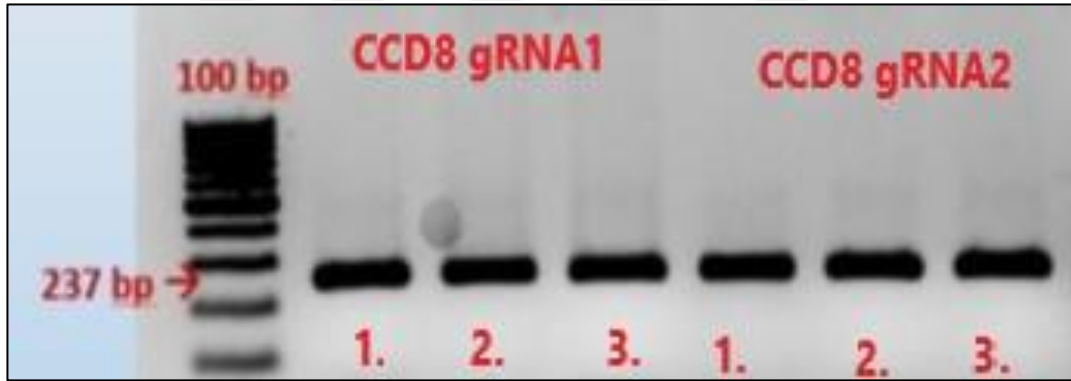
pTZ57R-SICCD8-gRNA1 ve pTZ57R-SICCD8-gRNA2 plazmitlerinin *E. coli* (DH5α suşu) yetkin (kompetent) hücrelerine aktarımı ısı şoku yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ampisilin içeren seçici besiyerlerinde inkübe edilen ve rekombinant koloniler içeren her bir Petri kabından üç koloni seçilmiş, bu koloniler 37 °C’de, Ampisilin içeren sıvı besiyerinde bir gece süreyle çoğaltılmıştır. Ardından, plazmit saflaştırması Thermo Fisher Scientific firmasına ait Plasmid Miniprep Kit ile yapılmıştır.

Saflaştırılan plazmitlerin doğruluğunu teyit etmek amacıyla hedef bölgeye özgü bir amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, Primer3Plus programı kullanılarak, pTZ57R-SICCD8-gRNA1 ve pTZ57R-SICCD8-gRNA2 plazmitleri için ortak olan gRNA bölgelerinden ileri (forward) ve geri (reverse) yönlü bir çift kontrol primeri tasarlanmış ve Sentebiolab Biyoteknoloji firmasından temin edilmiştir. İleri primer (gRNAc/F) AtU6-26p promotörü üzerine, geri primer (gRNAc/R) ise gRNA iskelet bölgesine (scaffold) yerleştirilmiştir (Şekil 4.7). Bu tasarıma göre, her iki plazmit

için 237 bp uzunluğunda bir PCR ürünü elde edilmesi öngörülmüştür. Gerçekleştirilen amplifikasyon sonucunda, seçilen üç farklı koloniye ait plazmit DNA'larının her birinden 237 bp'lik bantlar elde edilmiş ve bu sonuç, ilgili plazmitlerin doğruluğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.8).

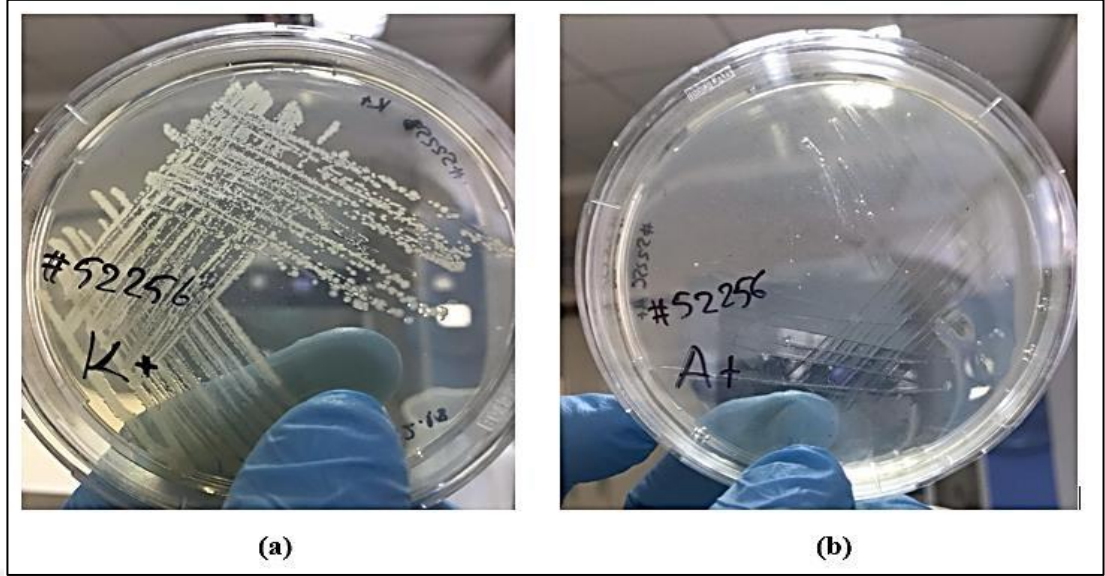


Şekil 4.7. AtU6-26p promotörü ve gRNA iskelet bölgesi baz alınarak, gRNA bölgelerine ortak şekilde tasarlanmış primer çifti



Şekil 4.8. Tasarlanan gRNAC/F-R primer çifti ile elde edilen PCR ürünleri: sırasıyla pTZ57R-SlCCD8-gRNA1 ve pTZ57R-SlCCD8-gRNA2 plazmidlerine ait 3 farklı miniprep örneğinden elde edilen bantlar (100 bp GeneRuler Ladder (Thermo Scientific), 100 V, 1 saatlik elektroforez sonrası)

E. coli DH5a yetkin hücreleri, kontrol amacıyla Kanamisin içeren besiyerinde test edilmiştir (Şekil 4.9a). Aynı ısı-şok yöntemiyle transforme edilen pFGC-pcoCas9 kolonilerinden seçilen iki koloni, 5 ml agarsız LB besiyeri ve 5 µl Kanamisin seçici ajan (50 mg/ml Kanamisin stok çözeltisinden eklenmiştir) içeren ortamda 225 rpm'de 37°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ayrıca Ampisilin içeren kontrol ortamında da test edilmiştir (Şekil 4.9b). pFGC-pcoCas9 plazmidini taşıyan hücrelerden, GeneJET Plasmid Miniprep Kiti kullanılarak plazmid saflaştırması yapılmış ve elde edilen ürünler -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 4.9. a) Kanamisin içeren seçici ortamda gelişen pFGC-pcoCas9 kolonileri; b) Ampisilin içeren kontrol ortamında gelişemeyen pFGC-pcoCas9 kolonileri

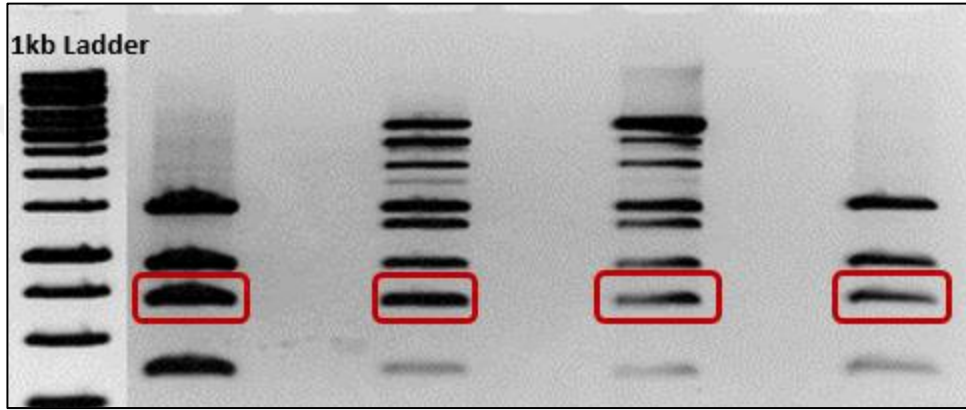
pFGC-pcoCas9 plazmit DNA'larının doğruluğunu belirlemek amacıyla, plazmid üzerinde bulunan iki restriksiyon bölgesi (EcoRI ve NcoI) seçilerek bir kesim (digestion) reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu enzimlerle yapılan kesim sonucunda 4931 bp ve 8399 bp olmak üzere iki beklenen bandın gözlemlenmesiyle, vektör olarak kullanılacak pFGC-pcoCas9 plazmidinin doğruluğu kanıtlanmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. EcoRI ve NcoI enzimleriyle kesilen pFGC-pcoCas9 (#52256) 1-2 numaralı plazmitlerinin kesim reaksiyonu sonucu elde edilen bant profili (1 kb GeneRuler Ladder (Thermo Scientific), 100 V, 1 saat sonra)

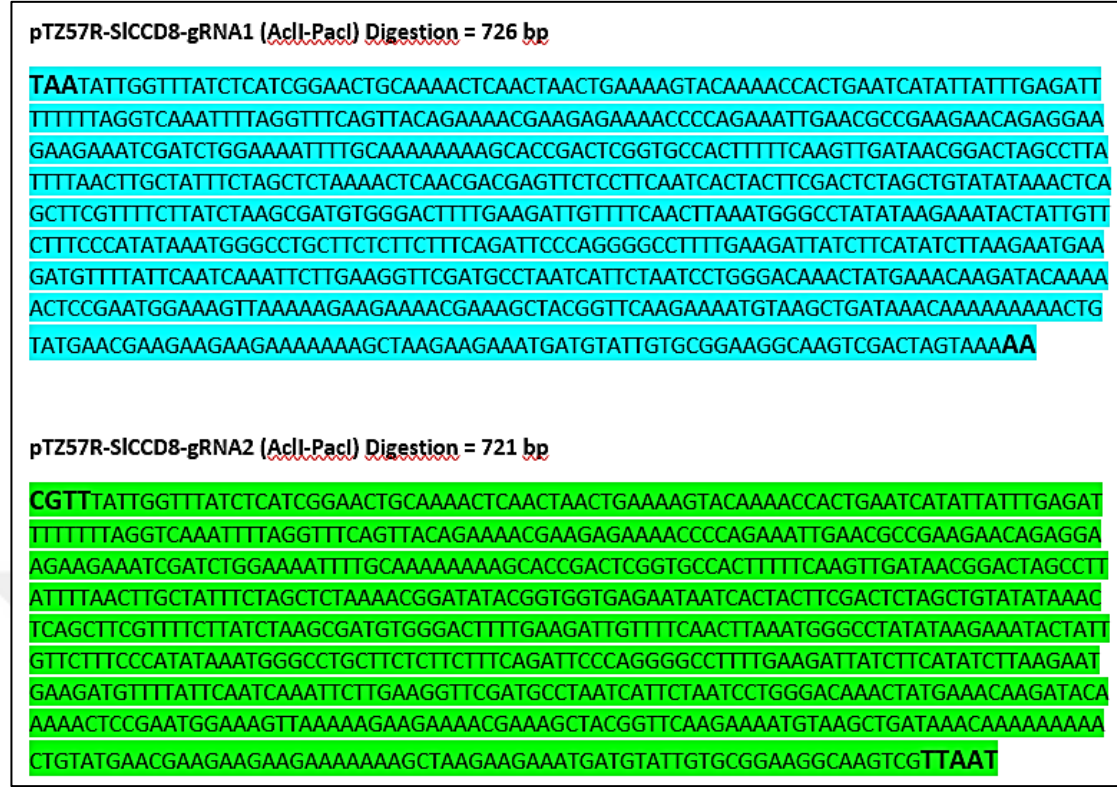
4.2.2. SICC8 gRNA1 ve gRNA2 Dizilerinin Birleştirilmesi ve pFGC-pcoCas9 Vektörüne Ligasyonu

SICC8 genine özgü hedef bölgeleri taşıyan pTZ57R-SICC8-gRNA1 ve pTZ57R-SICC8-gRNA2 plazmitleri, gRNA bölgelerinin her iki ucuna eklenmiş olan PacI ve AclI restriksiyon enzim kesim bölgeleri aracılığıyla kesime tabi tutulmuştur. Bu enzimler yardımıyla hedef gRNA bölgeleri plazmitten ayrıştırılmıştır. Kesim reaksiyonunun başarıyla gerçekleşip gerçekleşmediğini ve kesim ürünlerinin yeterince ayrışıp ayrışmadığını kontrol etmek amacıyla kesim sonrası ürünlerin bir kısmı UV transillüminatör üzerinde görüntülenmiştir. Kalan kesim ürünleri ise elektroforez işlemi sonrasında (100 V, 1 saat) UV transillüminatör altında incelenmiş ve bantların varlığı doğrulanmıştır (Şekil 4.11).



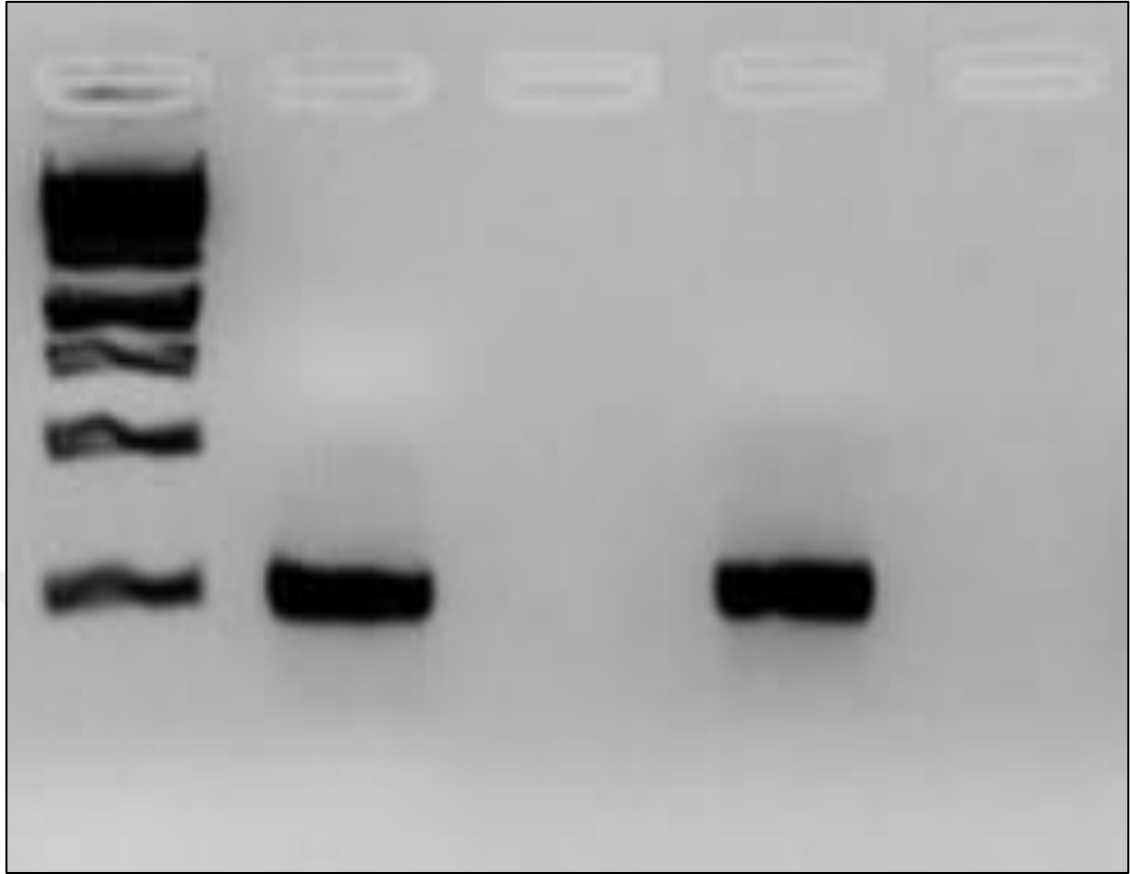
Şekil 4.11. pTZ57R-SICC8-gRNA1 ve pTZ57R-SICC8-gRNA2 plazmitlerinin AclI ve PacI enzimleriyle sindirilmesi sonucu elde edilen bantların elektroforez profili (1 kb GeneRuler Ladder [Thermo Scientific], 100 V, 1 saat sonrası)

Beklendiği üzere, pTZ57R plazmidlerinde SICC8-gRNA1 için yaklaşık 726 bp, SICC8-gRNA2 için ise 721 bp uzunluğunda DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 4.12). Doğru boyuttaki bu bantlar agaroz jelden kesilerek saflaştırılmıştır.



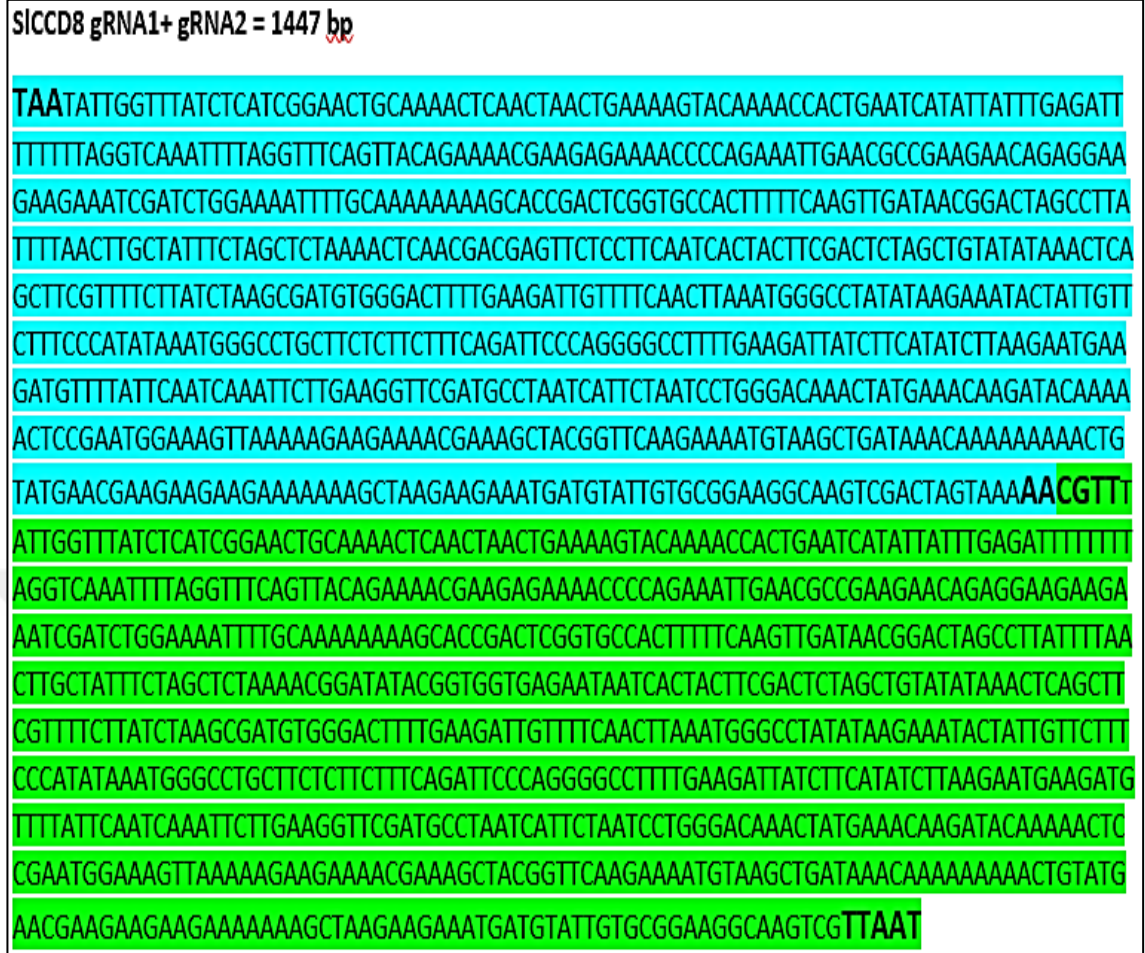
Şekil 4.12. pTZ57R plazmidinde yer alan SICCD8-gRNA1 ve gRNA2'ye ait dizi bilgileri (kalın puntolu nükleotidler, AclI ve PacI enzimlerine ait restriksiyon bölgelerini göstermektedir)

Saflaştırılan DNA parçalarının doğruluğunu teyit etmek amacıyla, tüm gRNA bölgelerine ortak olan AtU6-26p promotörü üzerinden tasarlanan ileri primer (gRNAc/F) ve gRNA scaffold bölgesi üzerinden tasarlanan geri primer (gRNAc/R) ile yapılan DNA çoğaltımı sonucunda elde edilmesi beklenen 237 bp uzunluğundaki ürünün başarıyla elde edildiği belirlenmiş ve doğrulanmıştır (Şekil 4.13).



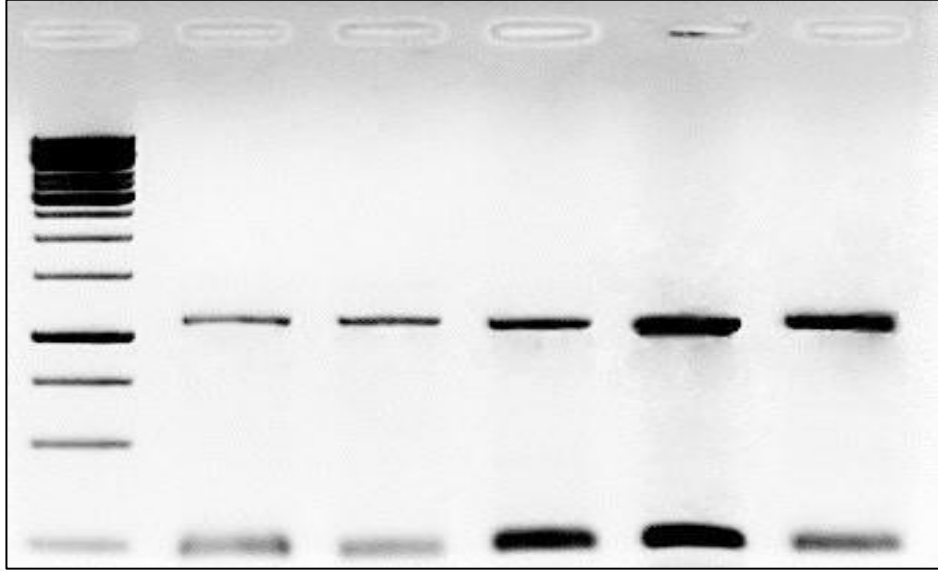
Şekil 4.13. Plazmid pTZ57R'den kesilen sırasıyla SICCD8-gRNA1 ve SICCD8-gRNA2'ye ait bölgelerin, gRNAc-F / R primer çifti ile çoğaltılması sonucu elde edilen amplifikasyon ürünleri (1 kb GeneRuler Ladder (Thermo Scientific), 100 V, 1 saat)

PacI restriksiyon enzimi ile pFGC-pcoCas9 (#52256) vektörünün çoklu klonlama bölgesinde (ÇKB) 78. baz pozisyonundan kesilmesiyle vektör, gRNA ürünlerinin ligasyonuna hazır hale getirilmiştir. Enzimatik kesim sonrasında doğru boyutta tek bir bant elde edilmiş, bu bant UV translüminatör üzerinde agaroz jelden bisturi ile kesilerek saflaştırılmıştır. Ligasyon işleminden önce, yalnızca bir noktadan PacI enzimi ile kesilmiş olan pFGC-pcoCas9 (#52256) vektörü, rSAP (recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase) enzimi ile muamele edilmiştir. Bu işlem, DNA ve RNA fosfomonoesterlerinin 5' ve 3' uçlarındaki fosfat gruplarını katalitik olarak uzaklaştırarak vektörün kendi kendine ligasyonunu önlemeyi amaçlamıştır. Daha sonra, SICCD8 genine ait gRNA1 ve gRNA2 ürünleri, T4 ligaz enzimi kullanılarak pFGC-pcoCas9 vektörüne ayrı ayrı ligasyonu sağlanmıştır (Şekil 4.14). Elde edilen rekombinant vektörler, ısı-şok yöntemi kullanılarak *E. coli* DH5α suşuna ait kompetent hücrelere transforme edilmiştir.

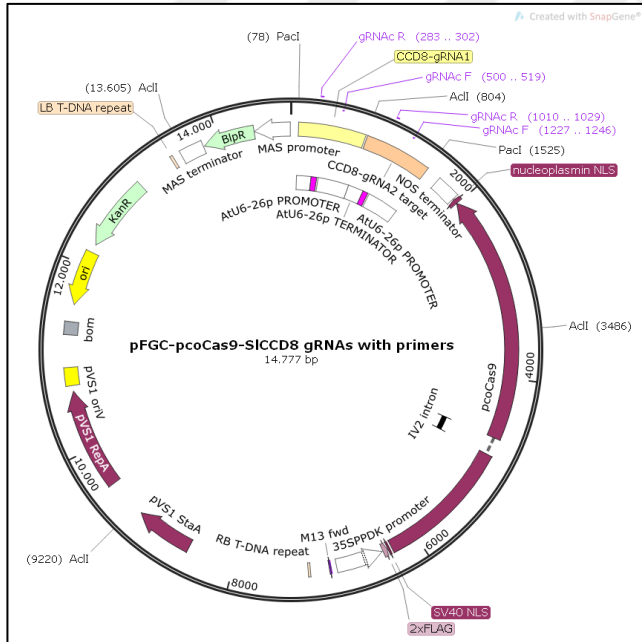


Şekil 4.14. T4 ligaz enzimi kullanılarak SI CCD8 genine ait gRNA1 ve gRNA2 dizilerinin pFGC-pcoCas9 vektörüne ligasyonu sonrasında elde edilmesi beklenen ürüne ait dizi bilgisi. Kalın harflerle gösterilen nükleotidler AclI ve PacI restriksiyon enzimlerine ait tanıma bölgelerini temsil etmektedir

Transformasyon sonrası plazmid izolasyonu amacıyla seçilen kolonilerin doğruluğunu belirlemek için, her iki besiyerinden rastgele seçilen beşer koloni kalıp DNA olarak kullanılmış ve gRNAc-F/R primer çifti ile koloni PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri jel elektroforez sonrasında görselleştirilmiş ve doğru amplifikasyonun varlığı doğrulanmıştır (Şekil 4.15). SI CCD8 genine özgü gRNA'ların pFGC-pcoCas9 vektörüne başarıyla ligasyonu sonrasında oluşması beklenen plazmid yapıları SnapGene Viewer programı ile temsili olarak modellenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. SICCD8 genine ait gRNA1 ve gRNA2 bölgelerinin pFGC-pcoCas9 (#52256) vektörüne ligasyonu sonrası yapılan klonlamaya ait, seçilen 5 koloniden elde edilen koloni PCR sonuçlarının elektroforez görüntüsü (1 kb GeneRuler Ladder, Thermo Scientific; 100 V, 1 saat)



Şekil 4.16. SICCD8 genine ait gRNA1 ve gRNA2 dizilerinin pFGC-pcoCas9 vektörüne ligasyonundan sonra oluşturulan temsili plazmid haritası ve gRNAC primerlerinin plazmid üzerindeki konumları

SICCD8 genine özgü gRNA dizilerinin pFGC-pcoCas9 vektörüne başarıyla ligasyonunu doğrulamak amacıyla gRNAC-F/R primer çifti kullanılarak yapılan PCR

analizinde iki farklı bant gözlemlenmiştir. Bu durum, her bir gRNA kasetinde ortak olan primer bağlanma bölgelerinin birden fazla kopyada bulunmasıyla açıklanabilir. SnapGene Viewer programında oluşturulan temsili plazmid haritaları incelendiğinde, bu primerlerin farklı bölgelerde bağlanmasıyla iki ayrı amplifikasyon ürünü olduğu anlaşılmaktadır. Jel görüntüsünde, birinci kombinasyonla (1./2. gRNAc-F ve 1./2. gRNAc-R primerleriyle) elde edilen 237 bp'lik fragman (UV görüntülemeye 1 kb ladder'a göre en alt bant) ve ikinci kombinasyonla (ilk gRNAc-F ve ikinci gRNAc-R primerleriyle) elde edilen yaklaşık 964 bp'lik fragman (daha yüksek moleküler ağırlıklı bant) tespit edilmiştir (Şekil 4.17). Bu sonuçlar, hedef bölgelere ait gRNA dizilerinin plazmide doğru şekilde entegre edildiğini göstermektedir.

```
AGAAGAGAAGCAGGCCCATTTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTT
TAAGTTGAAAACAATCTTCAAAAGTCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTA
TATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGA
AATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAGTGGCACCGAGTCGGT
GCTTTTTTTTGCAAATTTTCCAGATCGATTCTTCTCTCTCTGTTCTTCGGCGTTCAATTTCT
GGGGTTTTCTCTTCGTTTTCTGTAAGTAAACCTAAAATTTGACCTAAAAAAAATCTCAAATA
ATATGATTCAAGTGGTTTTGTACTTTTCAGTTAGTTGAGTTTGCAGTTCCGATGAGATAAACC
AATAAACGTTTTTACTAGTCGACTTGCCTTCCGCACAATACATCATTTCTTCTTAGCTTTTTT
CTTCTTCTTCGTTTCATACAGTTTTTTTTTTGTTTATCAGCTTACATTTCTTGAACCGTAGCTTTC
GTTTTCTTCTTTTTAACTTTCCATTTCGGAGTTTTTGTATCTTGTTCATAGTTTGTCCCAGGATT
AGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTTCATTCTTAAGAT
ATGAAGATAATCTTCAAAAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCCATTTAT
ATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAAAACAATCTTCAAAAG
TCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTG
ATTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTA
GTCCGTTATCAACTTGAAAAGTGGCACCG
```

Şekil 4.17. SI CCD8 genine özgü gRNA dizilerinin pFGC-pcoCas9 vektörü

SI CCD8 genine özgü gRNA1 ve gRNA2 dizilerinin pFGC-pcoCas9 vektörüne ligasyonu ile oluşturulan yeni plazmidlerin bazıları, doğrulama amacıyla dizileme analizine gönderilmeden önce Biodrop cihazı kullanılarak ng/µl cinsinden ölçülmüştür. Ardından bu plazmidler, dizi doğrulaması yapılmak üzere POLGEN Biyoteknoloji (Ankara) firmasına yönlendirilmiştir. Ligasyon işlemleri sonucunda, SI CCD8 genine göre tasarlanan gRNA dizilerinin pFGC-pcoCas9 vektörüne başarılı bir şekilde entegre edildiği net bir şekilde ortaya konmuştur.

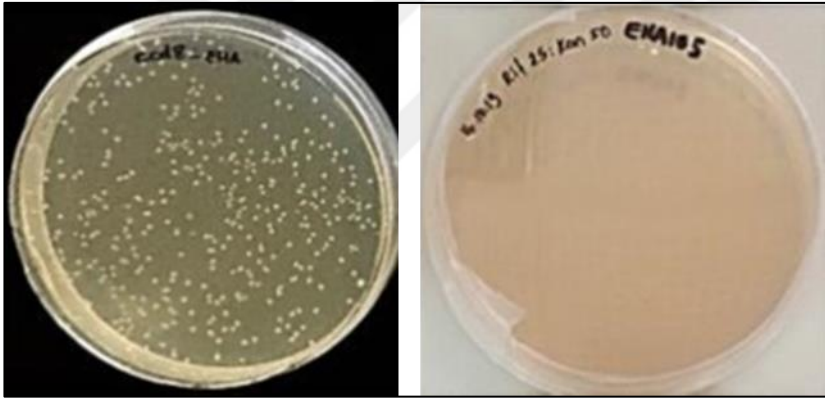
4.2.3. SI CCD8-gRNA1+2 Dizilerini Taşıyan pFGC-pcoCas9 Plazmidlerinin *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 Suşuna Transformasyonu

SI CCD8 geni için ayrı ayrı tasarlanan gRNA1 ve gRNA2 dizilerinin başarılı bir şekilde birleştirilmesi ve ligasyonu ile elde edilen nihai pFGC-pcoCas9 vektörü, literatürde bitki transformasyonunda yüksek verimlilik gösterdiği bildirilen *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşuna aktarılmıştır (Şekil 4.18). Transformasyon sonrasında, plazmid taşıyan hücreler ile kontrol amaçlı boş EHA105 hücreleri, 50 µg/ml Kanamisin (pFGC-pcoCas9 plazmidinin bakteriyel seçimi için) ve 25 µg/ml Rifampisin (muhtemel kontaminasyonları önlemek için) içeren seçici besiyerinde inkübe edilmiştir. Yapılan 48 saatlik inkübasyonun ardından, gRNA'ları taşıyan pFGC-pcoCas9 plazmidleri seçici ortamda koloniler oluştururken, Kanamisin direnci bulunmayan

kontrol grubu EHA105 hücrelerinin yaşamını sürdüremediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.19).

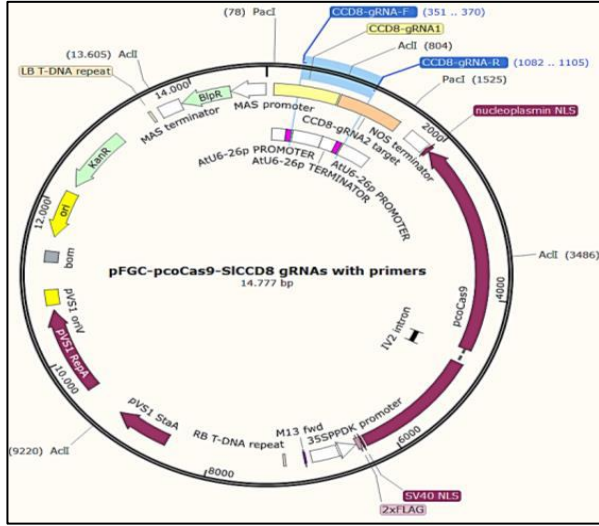


Şekil 4.18. 40 µg/ml Rifampisin içeren besiyerinde büyüyen *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşuna ait koloniler

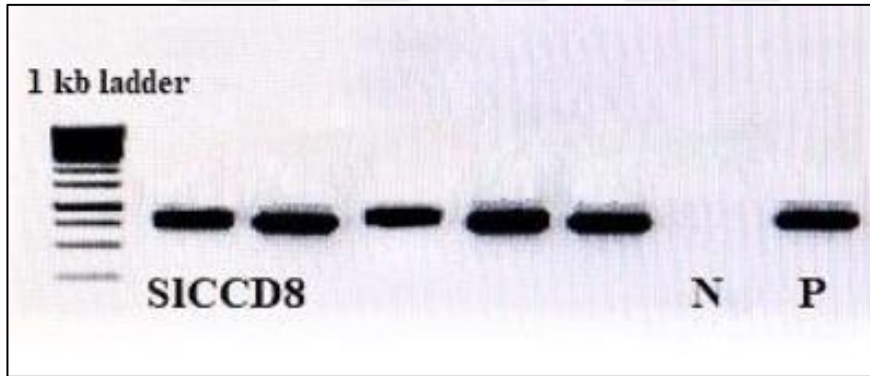


Şekil 4.19. *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşu ile yapılan transformasyon sonrası, 50 µg/ml Kanamisin + 25 µg/ml Rifampisin içeren seçici besiyerinde oluşan koloniler ve kontrol amaçlı boş EHA105 suşu ile hazırlanan ortamda gözlenen sonuçlar

Stok hücreler hazırlanmadan önce, SICCD8 genine göre belirlenen gRNA'lar için tasarlanan ve ligasyon sonrası gRNA1-gRNA2 birleşik formunu kapsayacak şekilde Primer3Plus programı ile tasarlanan yeni primerlerle koloni PCR'sı gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.20). Elde edilen PCR ürünleri %1,5 agaroz jel içerisinde elektroforez uygulanarak UV altında görüntülenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.20. pFGC-pcoCas9 vektörü üzerinde yer alan gRNA primerlerinin temsili haritaları SICCD8 genine özgü gRNA1 ve gRNA2 bölgelerinin varlığını doğrulamak amacıyla, pFGC-pcoCas9-SICCD8-gRNA1+2 plazmid dizileri kullanılarak tasarlanan CCD8-gRNA ileri/geri primer çifti

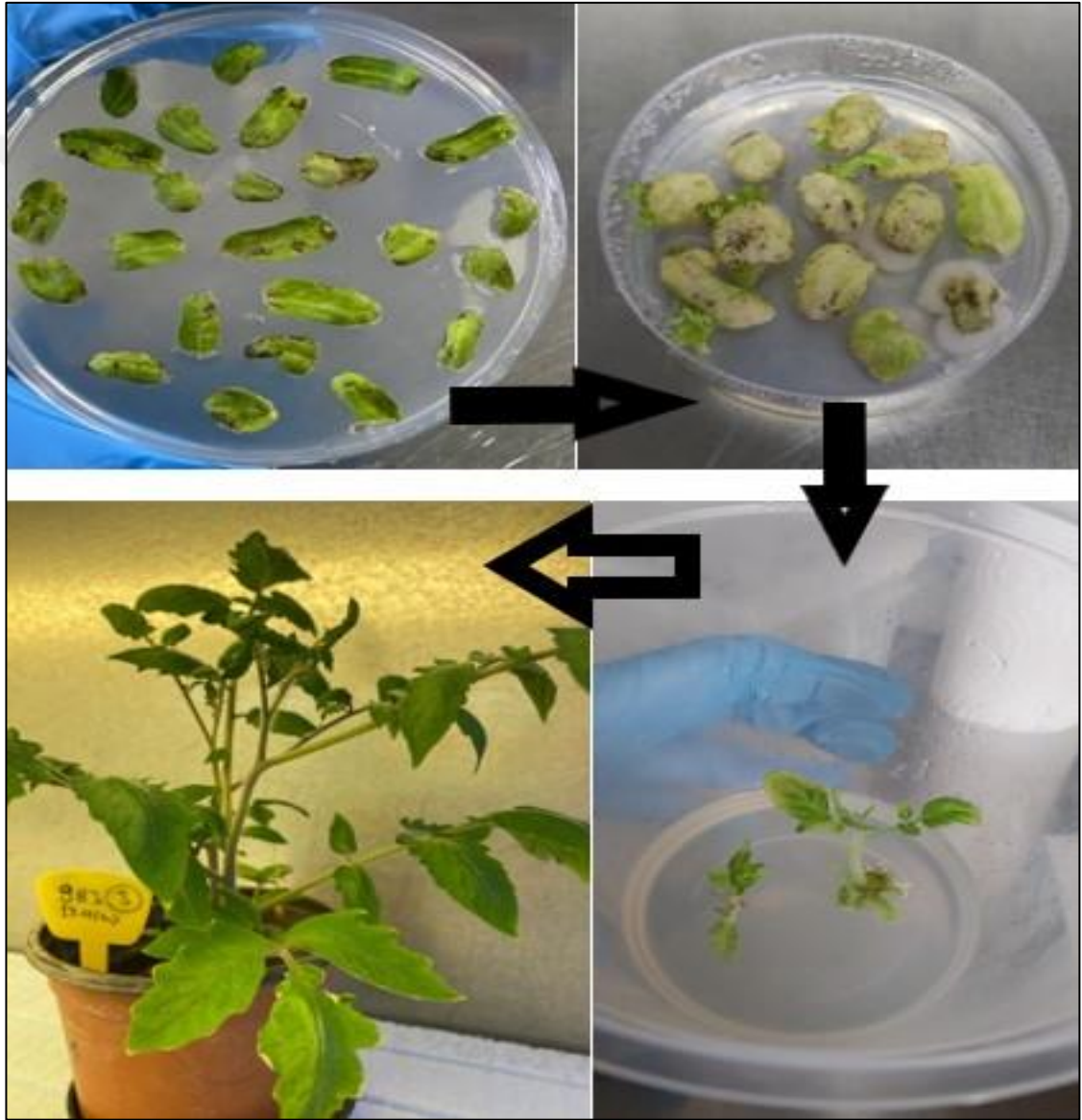


Şekil 4.21. CCD8-gRNA F/R primer çifti ile gerçekleştirilen koloni PCR'sına ait görüntü (negatif kontrol olarak su, pozitif kontrol olarak ise ligasyon ürünlerinin miniprep stokları kullanılmıştır) (1 kb GeneRuler Ladder (Thermo Scientific), 100 V, 1 saat sonra görüntülenmiştir)

Elde edilen amplifikasyon ürünleri doğrultusunda, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşu ile gerçekleştirilen transformasyonun doğruluğu teyit edilmiştir. SICCD8 genine yönelik olarak oluşturulan pFGC-pcoCas9-SICCD8-gRNA1+2 plazmidine ait 755 bp'lık hedef bandın amplifikasyonu, stok bakteri kültürlerinde başarılı bir şekilde gözlemlenmiştir.

4.3. Bitki Transformasyonu ile İlgili Bulgular

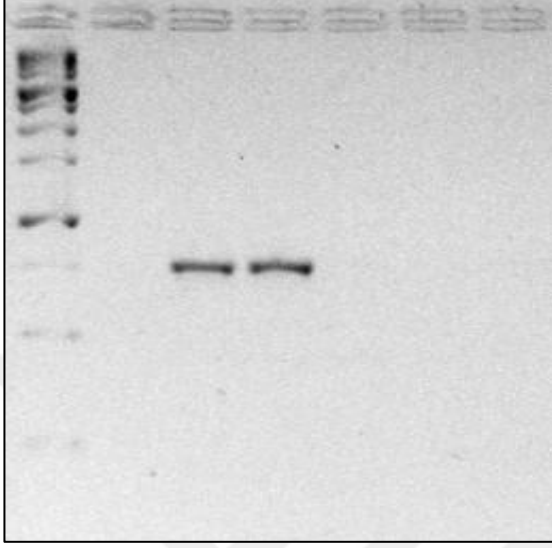
Bitki transformasyonu çalışmalarında sırık domates çeşidi olduğu ve *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonuna karşı dirençli olmadığını bildiğimiz için 267 F1 kullanılmıştır. Transformasyon çalışmaları 4 tur olarak yapılmış ve her turda çimlendirme ortamına 50 adet tohum ekilmiş ve 100'er eksplant kültüre alınmış toplamda ise 400 eksplant kültüre alınmıştır. Çalışmalara aynı şekilde devam edilerek ikincil jenerasyon ortamında ise 18 adet eksplant ta sürgün oluşumu gözlenmiştir. Gelişen sürgünler köklendirme ortamına alındığında ise 6 bitki köklenmiş bu köklenen bitkilerden ise 2 tanesi transgenik olarak bulunmuştur (Şekil 4.22). Böylece bu çalışmada transformasyon oranı yüzde 0,05 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.22. Bitki transformasyonunun birincil jenerasyondan dış ortama alıştırılmasına kadar olan aşamalarından görüntüler

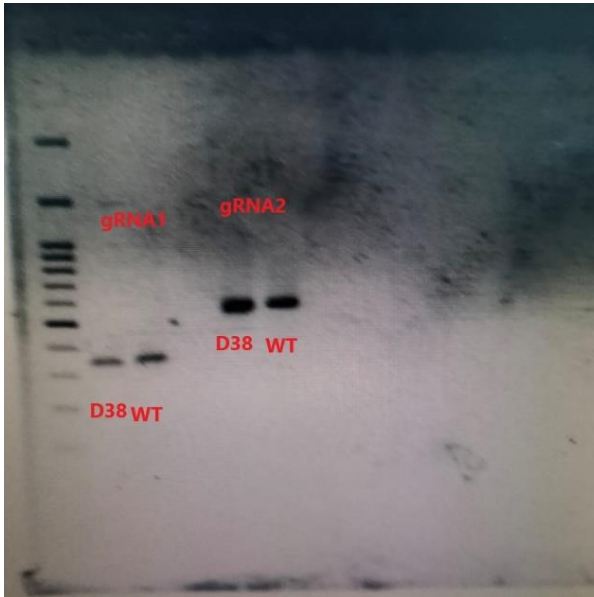
4.4. Transgenik ve Mutant Hatların Belirlenmesi ile İlgili Bulgular

Bitki transformasyon çalışmalarından elde edilen 6 tane bitki SICCD8F/R primer seti kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu ile taranmış bunlardan 2 tanesinde bant varlığına bakılarak transgenik oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Bitki transformasyonunda elde edilmiş bitkilerin SICCD8F/R primer seti kullanılarak PCR reaksiyonu taranmasının agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Sanger dizilemesi amacıyla, gRNA1 ve gRNA2 hedef bölgelerini içeren PCR ürünleri elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Sanger dizilemesi için gönderilen gRNA1 ve gRNA2 hedeflerini içine alan PCR ürünlerin agaroz jel deki görüntüleri

Sanger dizileme sonuçlarına göre D38 kodlu genotipte mutasyon profili karakterize edilmiştir. Bu genotipte mutasyon hem gRNA1 hedef bölgesinde 6 bazlık çerçeve içi delesyon tespit edilmiş hemde gRNA2 hedef bölgesinde 4 bazlık delesyon tespit edilmiştir. Bu sonuçlar gRNA1 bölgesinde var olan 1 bazlık uyumsuzluğa rağmen bu hedef bölgesinde mutasyon bulunabilmiştir. Öte yandan özellikle gRNA2 bölgesindeki delesyonun 4 bazlık delesyonun olması açık okuma çerçevesinde kaymaya sebep olacağı için D38 nolu genotipin tam dayanıklı olmasını moleküler yönden de teyit etmektedir. Dizileme verileri Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da sunulmuştur.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment			
D38-gRNA1	--GATTAGTAGGAGAAAGCTTGCTGCATGGACTAGCGTACGCCAAGAAAGATGGGAAGGA	58	
WT-gRNA1	GGATTAGTAGGAGAAAAGCTTGCTGCATGGACTAGCGTACGCCAAGAAAGATGGGAAGGA	60	
	* * *****		
D38-gRNA1	GAACTCGTCG-----TCGAGTTACATTGTGGCTGGTATGTTATTGTTTGTGTATATAA	112	
WT-gRNA1	GAACTCGTCGTTGAAGGCGAGTTACATTGTGGCTGGTATGTTATTGTTTGTGTATATAA	120	

D38-gRNA1	GTAAATATGAACGTTTCGTGTTACATCCATTTTTTTGTTTTAATGTGAAGTTTTCTTT	172	
WT-gRNA1	GTAAATATGAACGTTTCGTGTTACATCCATTTTTTTGTTTTAATGTGAAGTTTTCTTT	180	

D38-gRNA1	TTTGAATCACTTATATATTATGATTTTTCTTCACCAAAAAGTATTGAGATCAAAGATGC	232	
WT-gRNA1	TTTGAATCACTTATATATTATGATTTTTCTTCACCAAAAAGTATTGAGATCAAAGATGC	240	

D38-gRNA1	ATGTGTACCTAATACATGTTTTCTCTCAAGAAAATATGAAGTATACATATTGAAAACAA	292	
WT-gRNA1	ATGTGTACCTAATACATGTTTTCTCTCAAGAAAATATGAAGTATACATATTGAAAACAA	300	

D38-gRNA1	AGGTTTATGAAA-	304	
WT-gRNA1	AGGTTTATGAAAT	313	

Şekil 4.25. D38 kodlu genotipin Sanger dizileme sonucunun SICCD8 geninin orijinal dizisi ile hizalanmış görüntüsü (gRNA1 bölgesi)

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment			
D38-gRNA2	--ATTACTCTCCGGTGCATCCCTAACCGATAATGCTAACACTGGAGTCGTTAAACTTGGG	58	
WT-gRNA2	AAATTACTCTCCGGTGCATCCCTAACCGATAATGCTAACACTGGAGTCGTTAAACTTGGG	60	

D38-gRNA2	GATGGACGCGTAGTCTGCTTAAGTACGACGATAAAAGGTTCCATTGTAATTGATCCGAAC	118	
WT-gRNA2	GATGGACGCGTAGTCTGCTTAAGTACGACGATAAAAGGTTCCATTGTAATTGATCCGAAC	120	

D38-gRNA2	ACCCTAGATACAATTGGGAAATTTGAATATAGTGACTCGTTAGGTGGATTGATTCA	178	
WT-gRNA2	ACCCTAGATACAATTGGGAAATTTGAATATAGTGACTCGTTAGGTGGATTGATTCA	180	

D38-gRNA2	GCTCATCCAGTGGTTACGGACAGTGAGTTCATAACGTTGATTCCGGATTTAATGAACCCG	238	
WT-gRNA2	GCTCATCCAGTGGTTACGGACAGTGAGTTCATAACGTTGATTCCGGATTTAATGAACCCG	240	

D38-gRNA2	GGA---CGGTGGTGAGAATGGAGGCAGGGACAAATGAGAGGAAGTATATAGGGAGAGTG	294	
WT-gRNA2	GGATATACGGTGGTGAGAATGGAGGCAGGGACAAATGAGAGGAAGTATATAGGGAGAGTG	300	
*** *****			
D38-gRNA2	AGTTGTAGAGGAGGACCAGCACCAGGATGGGTTTCATTCATTTCTGTTACAGAAAATTAT	354	
WT-gRNA2	AGTTGTAGAGGAGGACCAGCACCAGGATGGGTTTCATTCATTTCTGTTACAGAAAATTAT	360	

D38-gRNA2	GTTATTGTGCCTGAGATGTCACTAAGGTATTGTGCAAAAAATTTGTTGAAGGCTGAGCCA	414	
WT-gRNA2	GTTATTGTGCCTGAGATGTCACTAAGGTATTGTGCAAAAAATTTGTTGAAGGCTGAGCCA	420	

D38-gRNA2	ACACCACTGTATAAGTTTGAGTGGCATCCTGATTCTAAAGCATTTGTACATGTTATGTGT	474	
WT-gRNA2	ACACCACTGTATAAGTTTGAGTGGCATCCTGATTCTAAAGCATTTGTACATGTTATGTGT	480	

D38-gRNA2	AAAGCCAGTGGCAACATTGTAAGTCATTCTTTCA	509	
WT-gRNA2	AAAGCCAGTGGCAACATTGTAAGTCATTCTTTCA	515	

Şekil 4.26. D38 kodlu genotipin Sanger dizileme sonucunun SICCD8 geninin orijinal dizisi ile hizalanmış görüntüsü (gRNA2 bölgesi)

Ayrıca, D38 genotipine ait SICCD8 geninin amino asit dizisi ile kontrol (WT) dizisi karşılaştırıldığında, her iki hedef bölgesinde de anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir (Şekil 4.27 ve Şekil 4.28).

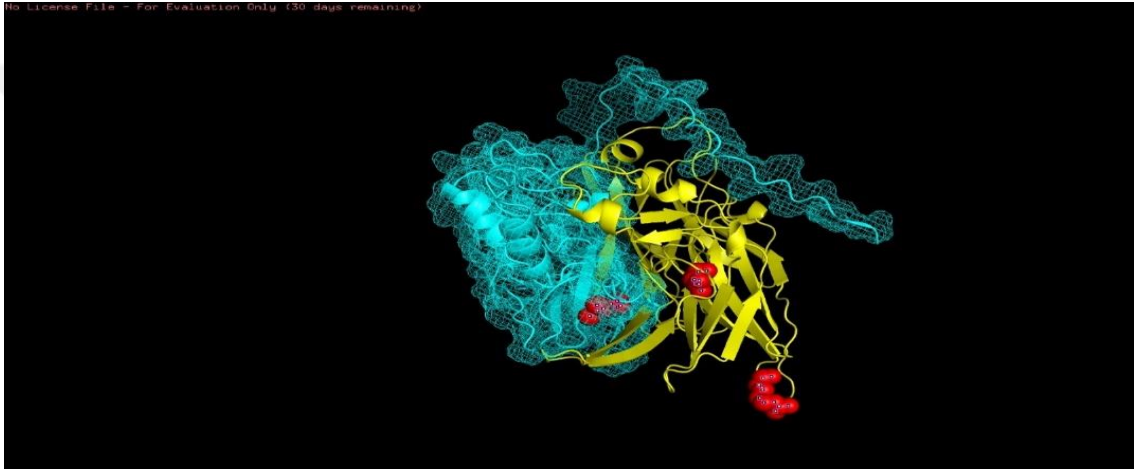


Şekil 4.27. D38 kodlu genotip ve WT genotipin SICCD8 geninin amino asit dizilerinin hizalanmış görüntüsü (gRNA1 bölgesi)

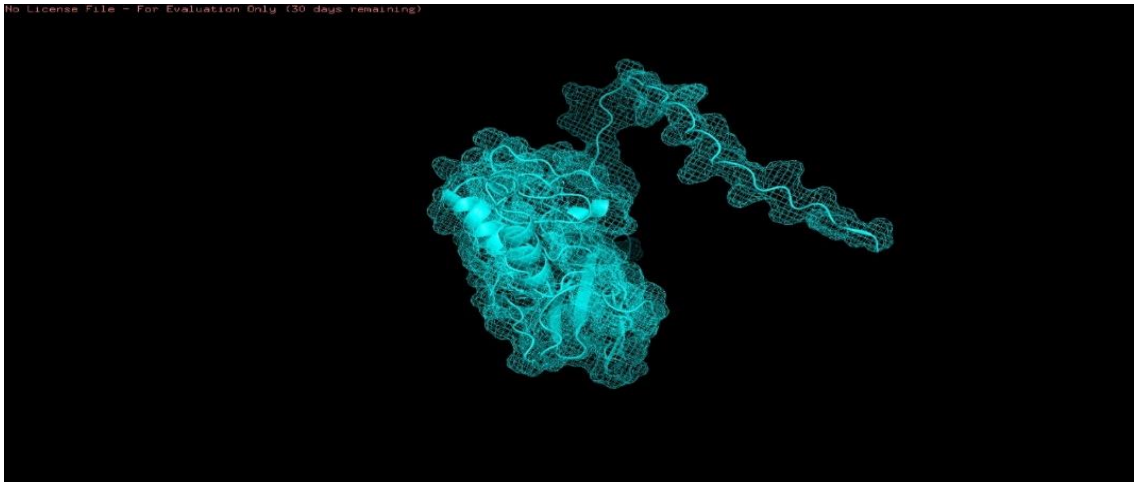


Şekil 4.28. D38 kodlu genotip ve WT genotipin SICCD8 geninin amino asit dizilerinin hizalanmış görüntüsü (gRNA2 bölgesi)

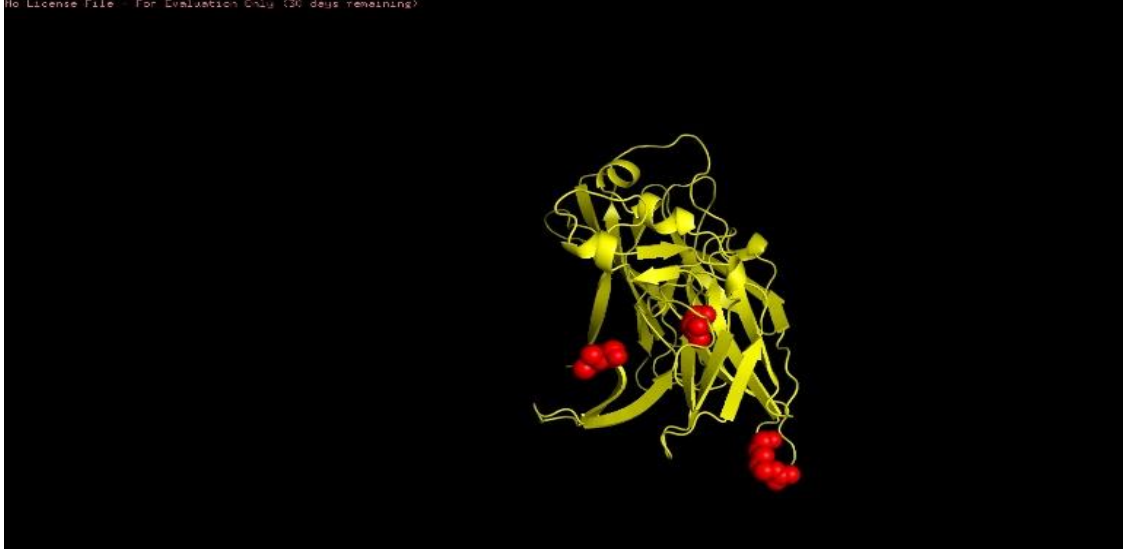
Yapısal biyoinformatik analizlerle, SICCD8 genine ait proteinin üç boyutlu yapısı modellenmiştir (Şekil 4.29) ve D38 mutant genotipine ait mutasyona uğramış yapı ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.30). Ayrıca mutasyon sonucu kaybedilen alt birim de ayrıca görselleştirilmiştir (Şekil 4.31). Elde edilen modeller, mutasyonların proteinin üç boyutlu yapısında belirgin konformasyonel değişikliklere yol açtığını göstermektedir. Özellikle çerçeve kaymasına bağlı olarak oluşan amino asit dizisi değişiklikleri, proteinin katlanma biçimini bozmakta ve yapısal bütünlüğünü önemli ölçüde etkilemektedir. D38 genotipinde kaybolan alt birimin, proteinin işlevsel bölgelerinde yer alması, CCD8 enzim aktivitesinin muhtemelen tamamen ortadan kalktığını düşündürmektedir. Bu durum, biyosentetik yolda kritik role sahip olan CCD8 proteininin işlevsiz hâle geldiğini düşündürmektedir. Sonuçlar, moleküler düzeyde mutasyonun yalnızca genetik değil, aynı zamanda yapısal ve fonksiyonel bir etkiye de sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 4.29. CCD8 proteinin orijinal amino asit sekansına göre görselleştirilmiş 3 Boyutlu yapısı



Şekil 4.30. CCD8 proteinin D38 mutant genotipinin amino asit sekansına göre görselleştirilmiş 3 Boyutlu yapısı



Şekil 4.31. CCD8 proteinin D38 mutant genotipinin amino asit sekansında mutasyon ile kaybedilen protein alt biriminin görsellştirilmiş 3 Boyutlu yapısı

4.5. Hidroponik Sistem Denemeleri ile Genotiplerin Canavar Otuna Karşı Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi

T1 generasyona ait deneme sonucunda (Çizelge 4.2) kontrol genotipin toplam tüberkül sayılarının ortalaması 6,5 , CCD8 T1 generasyonu bitkilerinin toplam tüberkül sayılarının ortalaması 7,4 ve CCD8 T2 generasyonu bitkilerinin toplam tüberkül sayılarının ortalaması ise 1,5 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Hidroponik Sistem Denemelerindeki T1 generasyonu Genotiplerin gözlem verileri

Genotip	Bitki No	Tüberkül adet/bitki			Toplam Tüberkül Sayısı
		1-5 mm	5-10 mm	>10 mm	
WT	1	2	0	0	2
WT	2	8	5	2	15
WT	3	9	4	0	13
WT	4	10	2	0	12
WT	5	3	0	0	3
WT	6	3	0	0	3
WT	7	1	0	0	1
WT	8	2	0	0	2
WT	9	8	0	0	8
WT	10	2	2	1	5
Ortalama		4,8	1,3	0,3	6,4

(Devamı Arkada)

Çizelge 4.3'nin devamı

CCD8/T1/1(+)	1	3	1	0	4
CCD8/T1/1(+)	2	0	0	0	0
CCD8/T1/1(+)	3	0	0	0	0
CCD8/T1/1(+)	4	7	4	0	11
CCD8/T1/1(+)	5	10	10	0	20
CCD8/T1/1(+)	6	1	2	1	4
CCD8/T1/1(+)	7	3	2	0	5
CCD8/T1/1(+)	8	2	4	0	6
CCD8/T1/1(+)	9	1	0	0	1
CCD8/T1/1(+)	10	3	0	0	3
CCD8/T1/1(+)	11	4	0	0	4
CCD8/T1/1(+)	12	5	0	0	5
CCD8/T1/1(+)	13	6	2	0	8
CCD8/T1/1(+)	14	3	0	0	3
CCD8/T1/1(+)	15	4	1	0	5
CCD8/T1/1(+)	16	18	0	1	19
CCD8/T1/1(+)	17	22	6	0	28
Ortalama		5,4	1,9	0,1	7,4
CCD8/T1/3(+)	1	1	0	0	1
CCD8/T1/3(+)	2	0	0	0	0
CCD8/T1/3(+)	3	3	1	0	4
CCD8/T1/3(+)	4	0	0	0	0
CCD8/T1/3(+)	5	0	0	0	0
CCD8/T1/3(+)	6	1	0	0	1
CCD8/T1/3(+)	7	1	1	0	2
CCD8/T1/3(+)	8	2	0	0	2
CCD8/T1/3(+)	9	0	0	0	0
CCD8/T1/3(+)	10	1	0	0	1
CCD8/T1/3(+)	11	4	0	0	4
CCD8/T1/3(+)	12	0	0	0	0
CCD8/T1/3(+)	13	1	0	0	1
CCD8/T1/3(+)	14	0	0	0	0
CCD8/T1/3(+)	15	9	0	0	9
CCD8/T1/3(+)	16	0	1	0	1
CCD8/T1/3(+)	17	0	0	0	0
Ortalama		1,4	0,2	0	1,5

CCD8 geninde oluşturulan mutasyon T0 bitkilerinde heterozigot, T1 generasyonunda ise 1:2:1 genetik açılım, 1:3 (dayanıklı:hassas) fenotipik açılım beklenmektedir. Birinci grupta test edilen 17 T1 bitkisinden iki bitki, ikinci gruptan test edilen aynı sayıdaki T1 bitkisinden ise 7 bitki tam dayanıklı bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Bir başka ifade ile test edilen 34 T1 bitkisinden 8 adet tam dayanıklı bitki tespit edilmiştir. Dayanımın tek resesif lokus tarafından sağlandığı dikkate alındığında sonuçlar 1:3 açılımına uygundur.

Şekil 4.32’de gösterilen T2 generasyonu bitkileri ile kurulan hidroponik deneme sonucunda (Çizelge 4.3) kontrol genotipin toplam tüberkül sayılarının ortalaması 7,625 ve D38 mutant bireyin T2 generasyonu bitkilerinin toplam tüberkül sayılarının ortalaması 0 olarak bulunmuştur.

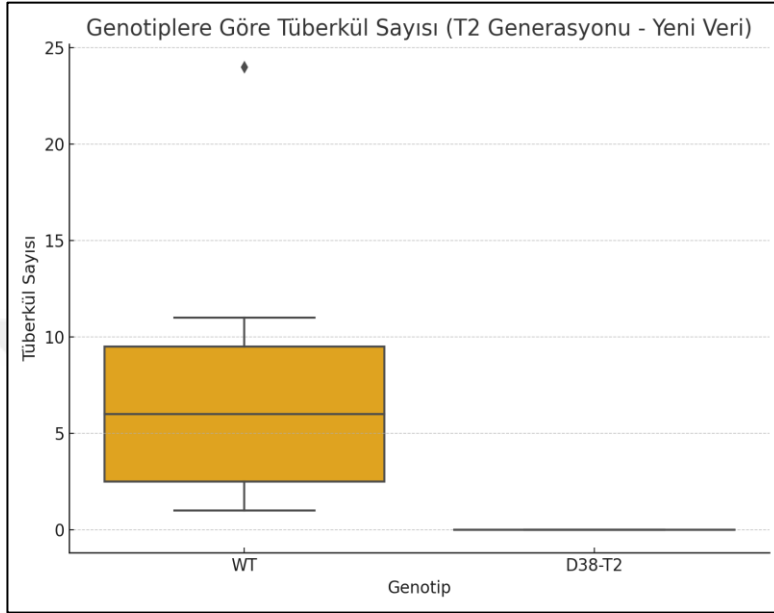


Şekil 4.32. T2 generasyonu bitkileri ile kurulmuş Hidroponik denemenin görüntüsü

Çizelge 4.4. Hidroponik Sistem Denemelerindeki T2 generasyonu Genotiplerin gözlem verileri

Genotip	Bitki No	Tüberkül adet/bitki			Toplam Tüberkül Sayısı
		1-5 mm	5-10 mm	>10 mm	
WT	1	9	0	0	9
WT	2	22	2	0	24
WT	3	1	0	0	1
WT	4	1	0	0	1
WT	5	11	0	0	11
WT	6	8	0	0	8
WT	7	4	0	0	4
WT	8	3	0	0	3
Ortalama		7,3	0,25	0	7,6
D38-T2	1	0	0	0	0
D38-T2	2	0	0	0	0
D38-T2	3	0	0	0	0
D38-T2	4	0	0	0	0
D38-T2	5	0	0	0	0
Ortalama		0	0	0	0

T2 tohumları T1 generasyonunda yapılan testleme sonucunda dayanıklı bulunan bitkilerin kendilenmesinden elde edilmiştir. Dolayısıyla homozigot resesif dayanıklı olması beklenen T2 bitkilerinin tamamı dayanıklı olarak tespit edilmiştir. T2 generasyonunda yapılan ANOVA testi sonucunda, genotipler arasında toplam tüberkül sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4.33) ($p = 0.049$).



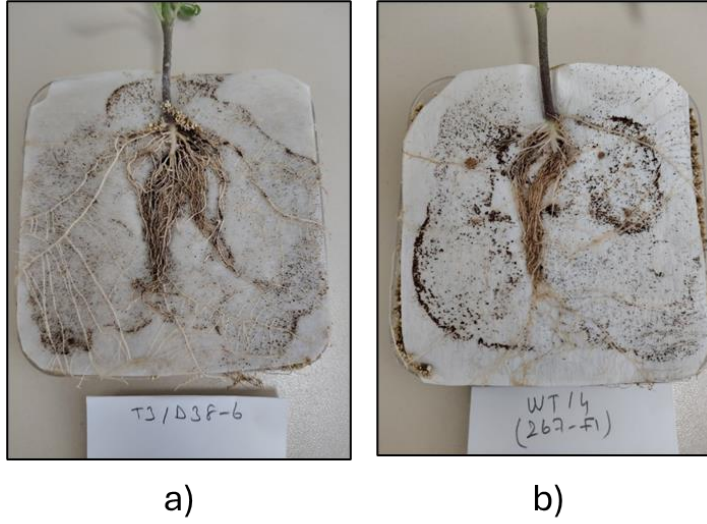
Şekil 4.33. Genotiplere göre tüberkül sayısı (T2 Generasyonu)

Elde edilen bu sonuçlar, T2 kuşağında genetik stabilitenin tam olarak sağlandığına ve bireysel varyasyonların olmayacağını göstermektedir. İlerleyen çalışmalarda dayanıklı T2 bitkilerinden alınan kendilenmiş tohumlar kullanılarak saha denemelerinin yapılması, dayanıklılık performansının tarla şartlarında ortaya konması önem arz etmektedir.

T3 tohumları T2 generasyonunda yapılan testleme sonucunda dayanıklı bulunan bitkilerin kendilenmesinden elde edilmiştir (Şekil 4.34). Bu tohumlardan elde edilen bitkiler ile kurulan üçüncü hidroponik denemenin sonucunda kontrol genotipin toplam tüberkül sayılarının ortalaması 6,5 ve D38 mutant bireyin T3 generasyonu bitkilerinin toplam tüberkül sayılarının ortalaması 0, DAÇ-498 kodlu genotipin toplam tüberkül sayılarının ortalaması 1,83 ve DAÇ-502 kodlu genotipin toplam tüberkül sayılarının ortalaması 0 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4).

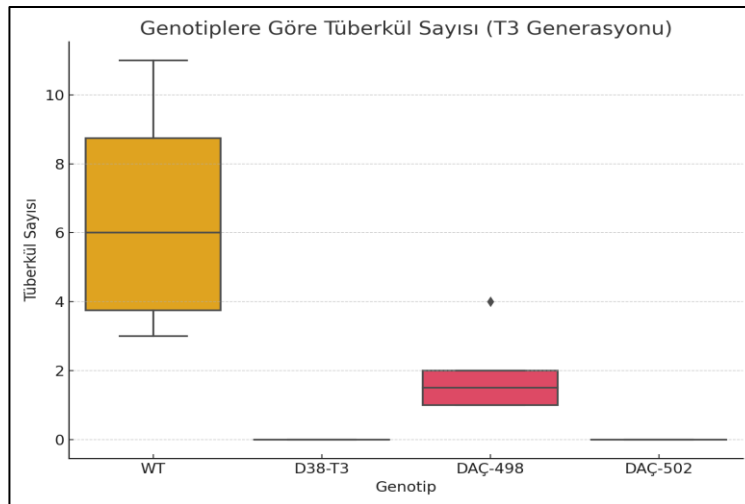
Çizelge 4.5. Hidroponik Sistem Denemelerindeki T3 generasyonu Genotiplerin gözlem verileri

Genotip	Bitki No	Tüberkül adet/bitki			Toplam Tüberkül Sayısı
		1-5 mm	5-10 mm	>10 mm	
WT	1	11	0	0	11
WT	2	8	0	0	8
WT	3	4	0	0	4
WT	4	3	0	0	3
Ortalama		6,5			6,5
D38-T3	1	0	0	0	0
D38-T3	2	0	0	0	0
D38-T3	3	0	0	0	0
D38-T3	4	0	0	0	0
D38-T3	5	0	0	0	0
Ortalama		0	0	0	0
DAÇ-498	1	1	0	0	1
DAÇ-498	2	2	0	0	2
DAÇ-498	3	4	0	0	4
DAÇ-498	4	1	0	0	1
DAÇ-498	5	1	0	0	1
DAÇ-498	6	2	0	0	2
Ortalama		1,83			1,83
DAÇ-502	1	0	0	0	0
DAÇ-502	2	0	0	0	0
DAÇ-502	3	0	0	0	0
DAÇ-502	4	0	0	0	0
DAÇ-502	5	0	0	0	0
DAÇ-502	6	0	0	0	0
Ortalama		0	0	0	0



Şekil 4.34. T3 generasyonu hidroponik denemesinden elde edilen görüntüleri; **a)** mutant D38 bitkisi; **b)** kontrol bitkisi

CCD8 mutasyonu taşıyan T3 generasyonuna ait bitkilerin hiçbirinde canavar otu gelişmemiştir. WT kontrol bitkilerinde beklendiği gibi tüberkül gelişimi gözlenmiştir. T3 generasyonunda yapılan ANOVA testi sonucunda, genotipler arasında toplam tüberkül sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0.000057$). DAÇ-498 kodlu genotipler CCD7 çerçeve içi delesyonu taşıyan homozigot mutant bitkilerdir ve DAÇ-502 kodlu olan genotipler ise aynı CCD7 mutasyonu yanında crimson mutasyonunu da taşıyan homozigot hatlardır (Bülbül 2021). Görüldüğü gibi CCD8 mutasyonu yüksek genetik dayanıklılık sağlamıştır (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. Genotiplere göre tüberkül sayısı (T3 Generasyonu)

CCD8 mutasyonu tek başına in-frame CCD7 mutasyonu + crimson çift mutant hattına eşdeğer bir genetik dayanıklılık sağlamıştır.

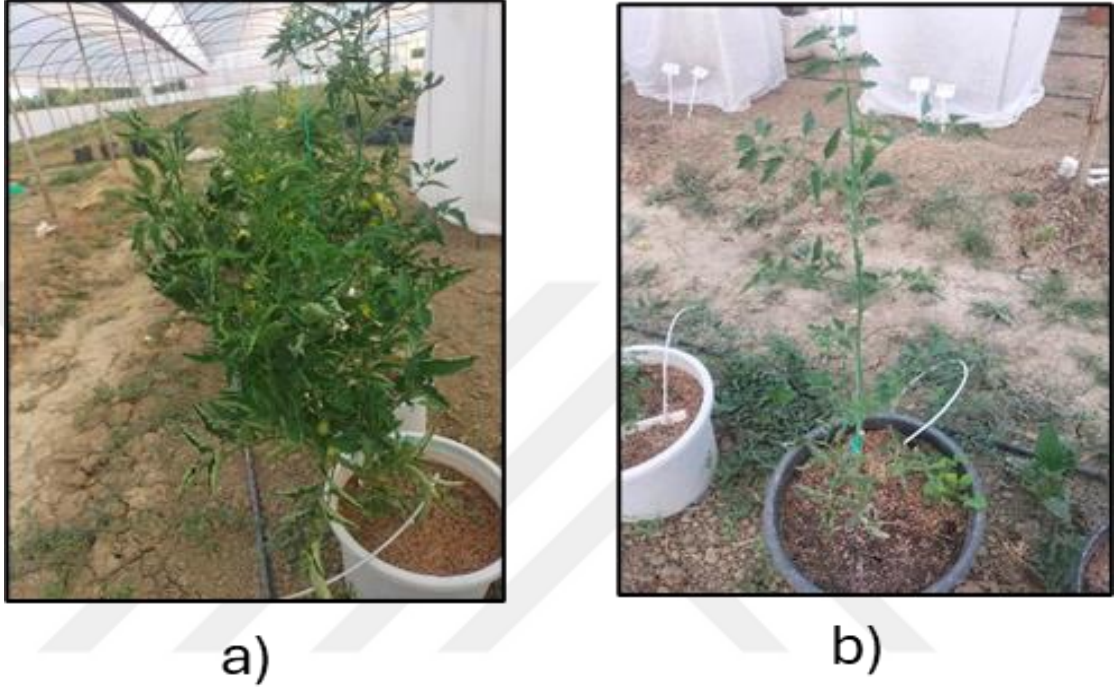
4.6. Saksı Denemeleri ile Genotiplerin Canavar Otuna Karşı Dayanıklık Durumlarının Belirlenmesi

Saksı denemelerinde dayanıklı T1 bitkilerinde canavar otu görülmezken WT bitkilerde ve açılım gösteren homozigot veya heterozigot hassas bitkilerde beklenen canavar otu gelişimleri gözlenmiştir (Çizelge 4.5). ANOVA testi sonucunda, genotipler arasında 'Canavar otu ve Domates yaş-kuru ağırlık (gr)' açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0.065$). Bunun sebebi açılım gösteren T1 populasyonları içinde hem dayanıklı hemde hassas genotiplerin varlığından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.6. Saksı Denemelerindeki T1 generasyonu Genotiplerin gözlem verileri

Genotip	Tekerrür	Canavar otu yaş ağırlık (gr)	Canavar otu kuru ağırlık (gr)	Domates gövde yaş ağırlık (gr)	Domates kök yaş ağırlık (gr)	Domates gövde kuru ağırlık (gr)	Domates kök kuru ağırlık (gr)
267 F1 (WT)	1	85	8	160	13	22	2,6
267 F1	2	90	8,5	155	15	19	2,5
267 F1	3	75	6,5	165	18	24	3,5
267 F1	4	60	5,5	180	19	27	3,4
Ortalama		77,5	7,125	165	16,25	23	3
T1-1(+)	1	0	0	45	5	9	2
T1-1(+)	2	25	2,5	50	15	6	4
T1-1(+)	3	150	18	215	35	24	8
T1-1(+)	4	125	14	295	20	27	5
T1-1(+)	5	95	9,5	265	18	35	9
Ortalama		79	8,8	174	18,6	20,2	5,6
T1-1(+)	6	15	1	85	20	11	6
T1-3(+)	1	50	4	425	50	38	10
T1-3(+)	2	0	0	25	15	5	3
T1-3(+)	3	0	0	223	31	21	5
T1-3(+)	4	0	0	385	45	34	9
T1-3(+)	5	0	0	95	20	9	2,5
Ortalama		10,83	0,83	206,3	30,16	19,6	5,916

T2 generasyonunda yapılan saksı denemesi sonuçları dayanıklı T2 bitkilerinin WT kontrol bitkisine göre çok daha az miktarda tuberkül oluşumu görülmüş ve dayanıklı olan bitkilerin kontrol bitkilerine göre daha iyi geliştiği görülmüştür (Şekil 4.36 ve Çizelge 4.6). Kuru tuberkül ağırlıkları dikkate alındığından dayanıklı bitkilerde WT kontrollere göre 10-15 kat azalma gözlenmiştir. ANOVA testi sonucunda, genotipler arasında 'Canavar otu yaş ağırlık (gr)' açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4.37) ($p = 0.00001$).



Şekil 4.36. T2 generasyonu saksı denemesinden elde edilen görüntüleri; **a)** mutant D38 bitkisi; **b)** kontrol bitkisi

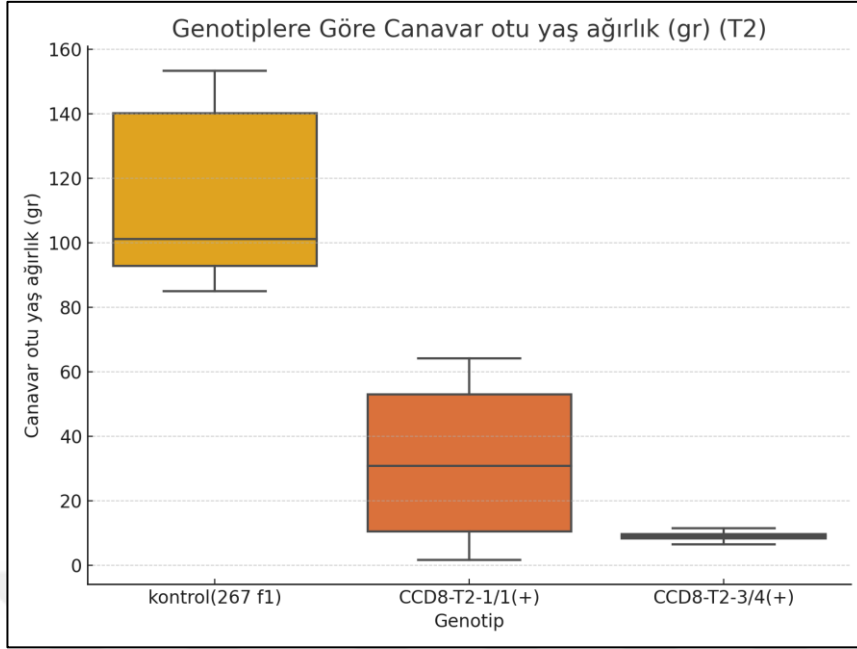
Çizelge 4.7. Saksı Denemelerindeki T2 generasyonu Genotiplerin gözlem verileri

Genotip	Tekerrür	Canavar otu yaş ağırlık (gr)	Canavar otu kuru ağırlık (gr)	Domates gövde yaş ağırlık (gr)	Domates kök yaş ağırlık (gr)	Domates gövde kuru ağırlık (gr)	Domates kök kuru ağırlık (gr)
267 F1	1	153,353	19,858	194	19,09	31	3,542
267 F1	2	101,175	11,827	196	13,475	33	2,719
267 F1	3	84,96	10,275	325	22,753	40	4,372
267 F1	4	92,88	11,144	154	14,907	25	2,924
267 F1	5	140,103	15,641	235	20,855	32	3,22
Ortalama		114	13,2	220	17,6	32,2	3,3

(Devamı Arkada)

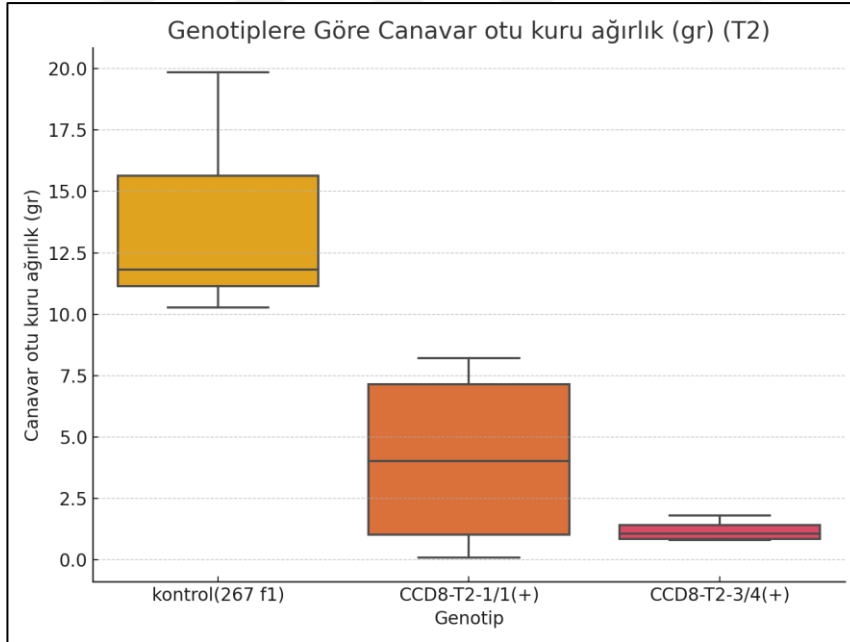
Çizelge 4.8'nin devamı

CCD8-T2-1/1(+)	1	53,087	7,154	262	7,449	31	0,833
CCD8-T2-1/1(+)	2	58,96	8,211	15	2,265	11	0,313
CCD8-T2-1/1(+)	3	64,17	7,78	46	4,03	9	0,342
CCD8-T2-1/1(+)	4	28,435	2,941	34	2,735	6	0,144
CCD8-T2-1/1(+)	5	30,876	4,02	41	2,243	4	0,184
CCD8-T2-1/1(+)	6	10,484	1,02	47	3,408	9	0,396
CCD8-T2-1/1(+)	7	1,788	0,101	102	2,945	22	0,3
CCD8-T2-1/1(+)	8	45,812	6,229	25	2,244	4	0,22
CCD8-T2-1/1(+)	9	3,402	0,213	319	17,257	42	1,887
CCD8-T2-3/4(+)	1	11,61	1,808	250	20,483	35	3,732
CCD8-T2-3/4(+)	2	6,497	0,866	90	4,095	17	0,528
CCD8-T2-3/4(+)	3	9,172	0,81	53	5,138	12	0,448
CCD8-T2-3/4(+)	4	-	-	-	-	-	-
CCD8-T2-3/4(+)	5	9,01	1,274	274	13,571	43	1,736
CCD8-T2-3/4(+)	6	-	-	-	-	-	-
CCD8-T2-3/4(+)	7	-	-	-	-	-	-



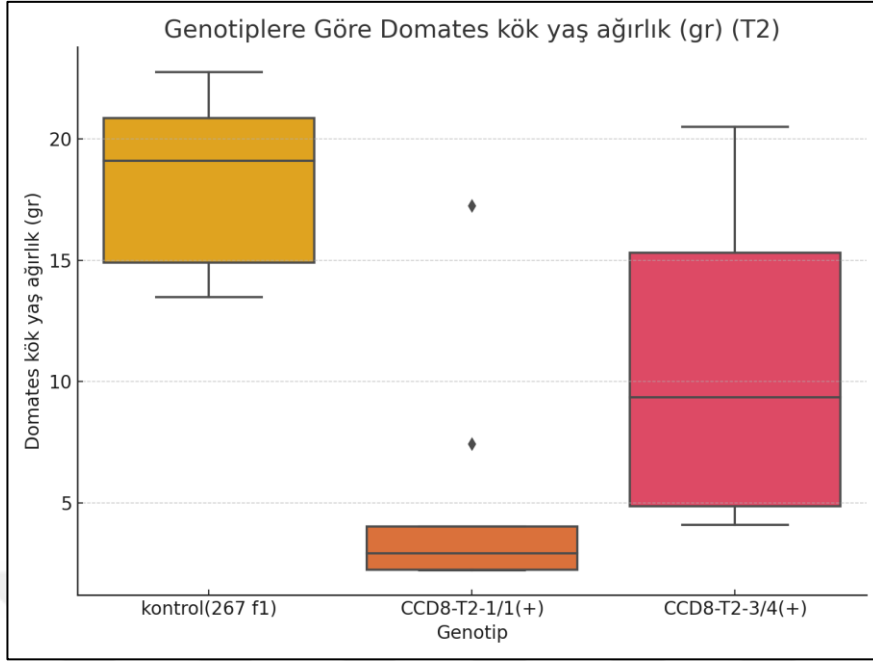
Şekil 4.37. Genotiplere göre Canavar otu yaş ağırlık (gr) (T2)

ANOVA testi sonucunda, genotipler arasında 'Canavar otu kuru ağırlık (gr)' açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4.38) ($p = 0.00004$).



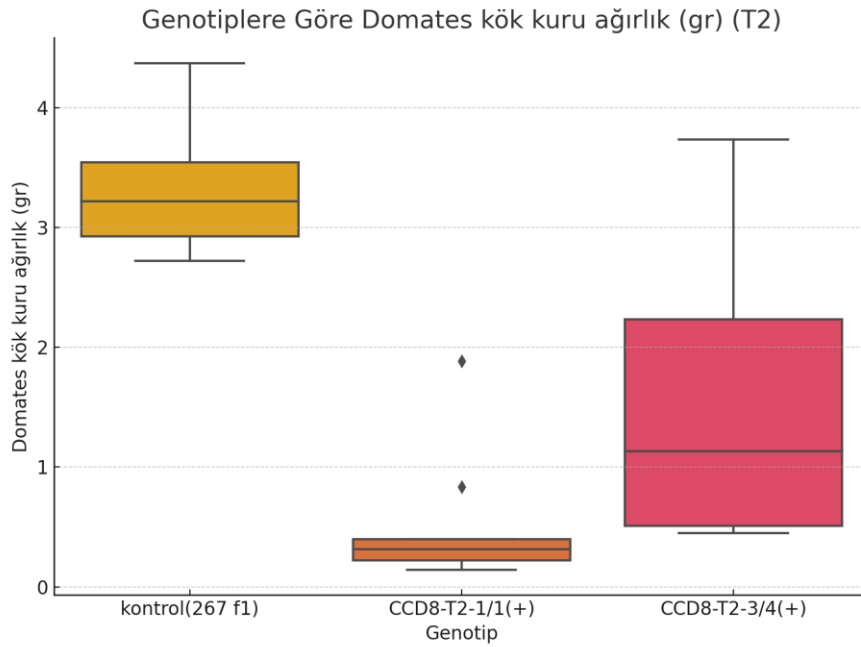
Şekil 4.38. Genotiplere göre Canavar otu kuru ağırlık (gr) (T2)

ANOVA testi sonucunda, genotipler arasında 'Domates kök yaş ağırlık (gr)' açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4.39) ($p = 0.00182$).



Şekil 4.39. Genotiplere göre domates kök yaş ağırlık (gr) (T2)

ANOVA testi sonucunda, genotipler arasında 'Domates kök kuru ağırlık (gr)' açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4.40) ($p = 0.00012$).



Şekil 4.40. Genotiplere göre domates kök kuru ağırlık (gr) (T2)

4.7. Dayanıklı Mutant Genotipin Gen Ekspresyon Analizleri

Strigolaktonlar, karotenoidlerden türeyen bitki hormonlarıdır ve yan dallanmanın inhibisyonu gibi işlevleri vardır. Strigolakton biyosentezinin çekirdek yolunda önce D27 enzimi all-trans- β -karoteni 9-cis- β -karotene izomerize eder; ardından CCD7 (MAX3 ortoloğu) enzimi 9-cis- β -karoten türevini keserek bir apokarotenoid aldehit üretir; bunu takiben CCD8 (MAX4 ortoloğu) enzimi, bu aldehite üç oksijen ekleyerek karlakton (carlactone) adı verilen strigolakton öncüsünü sentezler (Alder vd. 2012)

Son aşamada MAX1 olarak bilinen sitokrom P450 mono-oksiyenz, karlaktonu farklı aktif strigolakton moleküllerine dönüştürür (Bari vd. 2019).

Bu yolak *Arabidopsis thaliana*'da MAX3/AtCCD7, MAX4/AtCCD8 ve MAX1 gen ürünlerini içerirken, aynı genlerin homologları diğer bitkilerde de saptanmıştır (Mashiguchi vd. 2009).

Örneğin, petunyada DAD1 (Decreased Apical Dominance 1) geni CCD8'dir ve mutasyonunda aşırı dallanma görülmüştür. Benzer şekilde, pirinçte D10 olarak adlandırılan gen, CCD8 ortoloğu olup yanal tomurcuk gelişimini kontrol etmektedir. *Arabidopsis*'te MAX1 geninin yokluğunda MAX3 ve MAX4'ün ürettiği sinyalin dallanma inhibisyonu yapamadığı; MAX1'in, MAX3/4 enziminin ürettiği öncül metaboliti aktif hormona çevirdiği gösterilmiştir (Gao vd. 2018).

Dolayısıyla CCD7, CCD8 ve MAX1 ardışık olarak çalışarak strigolakton hormonlarının sentezini sağlar.

CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak CCD8 geninde mutasyon oluşturulan domates D38 hattı, strigolakton üretiminin azalması nedeniyle belirgin fenotipik değişiklikler sergilemektedir. Nitekim CCD8 geninin işlevinin kaybı, bitkilerde bodur kalma, aşırı yan dal oluşumu ve kök mimarisinde değişiklikler ile ilişkilidir (Bari vd. 2019).

Bu çalışmada D38 mutanlığı ile yabancı tip (267 F₁) karşılaştırıldığında, kök dokularında CCD7 ve MAX1 gen ifadelerinin sayısal olarak biraz farklı olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği bulunmuştur. Yabancı tipte CCD7 ifadesi D38'e göre hafif düşük (267 F₁'de 9.99, D38'de 10.19) ölçülmüş, ancak bu fark önemli değildir ($p>0.05$). Benzer şekilde MAX1 gen ekspresyonunda da D38 ile WT arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Bu sonuç, CCD7 ve MAX1 genlerinin ekspresyonunun, CCD8'deki mutasyona karşı belirgin bir geri besleme tepkisi vermediğini göstermektedir (Çizelge 4.7). Nitekim farklı türlerde geri besleme tepkisinin değişkenlik gösterebildiği bildirilmektedir. Örneğin, bezelyede strigolakton sinyal yolak geni RMS2 (D53 ortoloğu) mutasyona uğradığında, upstream biosentez genleri RMS5 (CCD7) ve RMS1 (CCD8) transkript düzeyleri ciddi oranda yükselmektedir. *Arabidopsis*'te de strigolakton sinyal mutasyonları (max2 veya d14) biyosentez genlerinde arttırmıştır (Karniel vd. 2024).

Buna karşın, *Arabidopsis*'in max4 (ccd8) mutanlığında CCD7 geninin ifadesinde belirgin bir artış olmadığı, dahası dışarıdan strigolakton analogu uygulandığında CCD7/CCD8 genlerinin ifadesinin baskılandığı gösterilmiştir (Mashiguchi vd. 2009).

Bu durum, Arabidopsis'te strigolakton varlığının kendi biyosentez genlerini negatif geri beslemeyle kontrol ettiğini göstermektedir. Dolayısıyla D38 domates mutantında CCD7 ve MAX1 genlerindeki değişimin önemsiz olması, strigolakton eksikliğine rağmen bu genlerin transkripsiyonel düzeyde fazla etkilenmediğini ve türler arası geri besleme mekanizması farklılıklarını işaret edebilir. Gerçekten de, bazı araştırmalar domates gibi türlerde strigolakton biyosentez genlerinin geri besleme kontrolünün zayıf olabileceğini belirtmiştir (örneğin, SLCCD8 düzeyinin düşürülmesinin SLCCD7 ekspresyonunu anlamlı değiştirmedeği rapor edilmiştir) (Kohlen vd. 2012).

Bu bulgu, petunya ve bezelye gibi türlerde gözlenen kuvvetli geri besleme artışının domateste aynı derecede görülmeyebileceğini düşündürmektedir. CCD8 Ekspresyonundaki Artış (D38 > WT): Çalışmanın en dikkat çekici sonucu, CCD8 geninin mutant D38 genotipinde transkript seviyesinin yabancı tipe kıyasla belirgin derecede artmış olmasıdır (Şekil 4.41) (D38'de 5.68, WT'de 2.55; $p < 0.05$ farkla). CCD8 geninin fonksiyonel olmayan bir alele sahip olmasına rağmen mRNA düzeyinin yükselmesi, strigolakton yetersizliğinin yarattığı bir negatif geri besleme sinyali eksikliği ile açıklanabilir. Normalde bitki, yeterli strigolakton bulunduğunda CCD7/CCD8 gen ekspresyonunu baskı altında tutmaktadır; ancak CCD8 fonksiyonu bozulduğunda strigolakton sentez ürünleri azalır ve bitki bunu telafi etmek üzere CCD8 geninin transkripsiyonunu artırır (Karniel vd. 2024).

Mashiguchi ve arkadaşlarının (2009) Arabidopsis üzerinde yaptığı çalışmada, max3 ya da max4 mutanti gibi strigolakton sentezi yapamayan bitkilerde MAX3 ve MAX4 gen ifadelerinin yabancı tipten birkaç kat daha yüksek olduğu ve dışarıdan strigolakton uygulandığında bu genlerin ifadesinin tekrar normal düzeylere indirildiği gösterilmiştir.

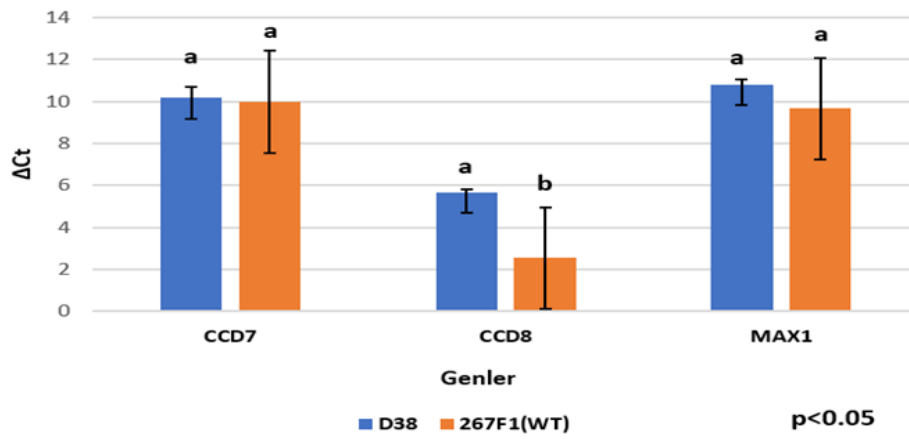
Benzer şekilde, Johnson vd. (2006) bezelye mutantlarında strigolakton sinyali olmadığı durumda CCD7/CCD8 ortologlarının aşırı ifade edildiğini rapor etmişlerdir (Karniel vd. 2024).

Bu çalışmalardan elde edilen veriler, strigolaktonların kendi biyosentez genlerini bastırdığı, yokluklarında ise bu genlerin daha fazla çalıştığı yönünde güçlü kanıtlar sunmaktadır. Nitekim, yakın zamanda domateste yapılan bir araştırmada CRISPR/Cas9 ile CCD8 geni devre dışı bırakıldığında bitkinin kök salgılarındaki strigolakton (orobanchol) miktarının belirgin şekilde azaldığı; buna karşın toplam karotenoid birikiminin ve karotenoid/strigolakton yoluna ait bazı genlerin ifade düzeylerinin arttığı bulunmuştur (Bari vd. 2019).

Mevcut çalışmada D38 mutantında gözlemlenen CCD8 transkript artışı da bu literatür bulgularıyla uyumludur ve strigolakton biyosentez yolundaki geri besleme düzenlemesinin bir sonucudur. Sonuç olarak, RT-qPCR verileri D38 mutant genotipinde yolaktaki diğer genler (CCD7 ve MAX1) bakımından anlamlı bir değişim olmadığını, ancak mutasyon hedefi CCD8 geninin ifadesinin yabancı tipe göre arttığını ortaya koymaktadır. Bu durum, strigolakton eksikliğine bitkinin transkripsiyonel bir tepki verdiğini, fakat bu tepkinin yolaktaki tüm genleri eşit etkilemediğini göstermektedir

Çizelge 4.9. Domates Genotiplerinin *CCD7*, *CCD8* ve *MAXI* genlerinin ekspresyon değerlerini (ΔCt)

Genotip	<i>CCD7</i> (ΔCt)(ORT $\pm$ SS*)	<i>CCD8</i> (ΔCt)(ORT $\pm$ SS*)	<i>MAXI</i> (ΔCt)(ORT $\pm$ SS*)
D38	10,19 $\pm$ 0,52 a	5,68 $\pm$ 0,22 a	10,81 $\pm$ 0,52 a
267F1 (WT)	9,99 $\pm$ 0,16 a	2,55 $\pm$ 0,08 b	9,66 $\pm$ 0,48 c
P value	0,59	0,0001	0,67
Df	24	24	24
*ORT: Ortalama, SS:Standart Sapma Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır			



Şekil 4.41. Domates genotiplerinin *CCD7*, *CCD8* ve *MAXI* genlerinin ekspresyon değerleri (ΔCt)

5. SONUÇ

CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak domatesin strigolakton biyosentez yolağındaki kritik bir gen olan Carotenoid Cleavage Dioxygenase 8 (CCD8) genine yönelik gerçekleştirilen bu çalışma, parazit yabancı ot olan *Orobanch* ve *Phelipanche* türlerine karşı dayanıklılık kazandırmada başarılı sonuçlar vermiştir. Elde edilen SICCD8 mutant domates hatları, hem hidroponik koşullarda hem de saksı denemelerinde yabancı tipe kıyasla belirgin düzeyde daha az parazit bulaşması göstermiştir. Özellikle T2 ve T3 jenerasyonlarında seçilen bazı mutant hatlarda parazit tüberkül oluşumu ve gelişimi neredeyse tamamen engellenmiştir. Örneğin, ilerlemiş bir hat olan D38-T3 kodlu genotipte *Phelipanche aegyptiaca* tohumlarının hiçbirinde çimlenme ve tüberkül oluşumu gözlenmemiştir. Bu sonuç, strigolakton sentezinin kısıtlanması yoluyla parazit bitki tohumlarının çimlenmesini tetikleyen sinyallerin ortadan kaldırılabilirdiğini göstermektedir. Nitekim strigolakton hormonları konukçu bitki köklerinden salgılanarak parazit tohumlarını uyarır ve bu etkileşim olmadığında parazit bitkiler konukçuya bağlanamamaktadır.

Bu çalışmada geliştirilen CCD8 mutantları da salgıladıkları strigolakton miktarının ciddi oranda azalması sayesinde canavar otu baskısına karşı doğal bir dayanıklılık kazanmıştır. Saksı denemelerinde, mutant hatların köklerinde canavar otunun tüberkül yapılarının yaş ve kuru ağırlıkları kontrol bitkilerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Benzer şekilde hidroponik ortamdaki analizlerde, mutant bitkilerin köklerine tutunabilen tüberkül sayısı yok denecek kadar azalmıştır. Tüm bu bulgular, hedeflenmiş gen düzenlemesi yoluyla kazanılan dayanıklılığın kalıcı ve sonraki jenerasyonlara aktarılabilir olduğuna işaret etmektedir. Nitekim T1 kuşağındaki mutasyonların T2 ve T3 jenerasyonlarında da korunduğu saksı ve hidroponik denemelerle doğrulanmıştır.

Elde edilen dayanıklı materyallerin morfolojik ve gelişimsel özellikleri, literatürde tanımlanan strigolakton-yetersiz mutant fenotipleriyle büyük ölçüde örtüşmektedir. Çalışmamızda gözlenen en belirgin özelliklerden biri, mutant bitkilerin bodur gelişim sergilemesidir. Bu fenotipik değişiklikler, strigolakton hormonunun yokluğunda bitkilerin klasik “aşırı dallanma” tepkisi vermesiyle tutarlıdır.

Çalışmamızda gözlenen bitki boyundaki kısılma ve kök/gövde biyokütlesindeki değişimler de strigolakton eksikliği fenotipinin bir parçası olarak değerlendirilebilir. Örneğin, T1 kuşağı mutantlarımızdan birinde parazit bulaşması olmamasına rağmen toplam bitki yaş ağırlığının kontrolden düşük olması, büyüme hızındaki yavaşlama ve kısa boğum arasına sahip, yoğun yan dallı yapı ile açıklanabilir.

Bununla birlikte, mutant hatlarda meyve verimi ve kalitesi gibi tarımsal açıdan önemli özelliklerin büyük ölçüde korunduğu ve ciddi bir olumsuz etki tespit edilmediği gözlemlenmiştir. Bu da, elde edilen dayanıklı hatların verimli tarımsal üretim için temel özelliklerini muhafaza edebildiklerini göstermektedir. Sonuçlarımız, strigolakton sinyalinin manipülasyonunun bitki morfolojisini önemli ölçüde değiştirebildiğini, ancak uygun genotip seçimi ve yetiştirme uygulamaları ile bu değişikliklerin tarımsal üretimi engelleyici düzeyde olmayabileceğini olursa da bu genotiplerin aşı anacı ıslahı çalışmalarında da kullanılabilir olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar, dayanıklılık ıslahı ve tarımsal sürdürülebilirlik açısından son derece değerlidir. Parazit yabancı otlar, özellikle Akdeniz havzası ve Ortadoğu'da domates tarımında ciddi verim kayıplarına yol açmaktadır. Geleneksel mücadele yöntemleri (kimyasal ilaçlama, toprak solarizasyonu, ekim nöbeti, tuzak bitkiler kullanımı vb.) çoğu zaman yetersiz kalmakta veya ekonomik açıdan uygulanabilir olamamaktadır. Örneğin, yabancı ot rekabeti ve parazitizm nedeniyle domates veriminde %36'dan %92'ye varan oranlarda kayıplar bildirilmiştir.

Bu denli büyük bir tehdide karşı, kalıcı genetik dayanıklılık kazanmış çeşitlerin kullanımı son derece sürdürülebilir bir çözüm sunmaktadır. Geliştirdiğimiz SICCD8 mutant hattı, parazit baskısı altındaki koşullarda dahi büyümelerini sürdürerek verim potansiyellerini büyük ölçüde koruyabilmektedir. Bu durum, çiftçilerin ilave bir girdiye (herbisit, fumigasyon vb.) ihtiyaç duymaksızın ürün alabilmesi anlamına gelmektedir. Ayrıca, bu çeşitlerin kullanımıyla toprağa karışan kimyasal ilaç miktarının azalacağı, biyolojik çeşitliliğin (özellikle toprak mikroorganizmalarının) korunacağı ve çevreye duyarlı bir üretim yapılabileceği öngörülmektedir.

Canavar otuna dayanıklı domates hatları, bulaşık tarım alanlarının tekrar üretime kazandırılmasına da olanak tanıyabilir. Bu sayede tarımsal sürdürülebilirlik yalnızca çevresel boyutta değil, ekonomik ve sosyal boyutta da desteklenecektir (çiftçilerin gelir kaybının önlenmesi, tarım alanlarının verimli kullanımı vb.).

Dayanıklı hatlarımızın ileri generasyonlara kalıtsal olarak aktarılabilen tek bir gen mutasyonu bu özelliği kazanmış olması, diğer tarım bitkilerinde de benzer yaklaşımların uygulanabilirliğini göstermektedir. Kök paraziti kaynaklı hastalıklara karşı dayanıklılık, klasik dayanıklılık genlerinin kullanımıyla elde edilmesi zor bir özellik olduğundan, genom düzenleme gibi yenilikçi teknikler bu alanda çığır açmaktadır.

Çalışmamız, CRISPR/Cas9 aracılı hassas gen mühendisliğinin domates ıslah programlarında etkin kullanılmasına dair önemli bir örnek teşkil etmektedir. Elde ettiğimiz bulgular bilimsel açıdan da yeni sorular ve fırsatlar gündeme getirmektedir. CCD8 geninin susturulması ile bitki içerisinde tetiklenen biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar, henüz tam olarak anlaşılmamış bazı geri besleme düzenlemelerine işaret etmektedir.

Örneğin, mutant bitkilerimizde CCD8 ifadesi belirgin biçimde azalırken, strigolakton yolundaki bir önceki basamak olan CCD7 geninin ifadesinde hafif bir artış gözlenmiştir. Bu durum muhtemelen, bitkinin ccd8 kaybına karşı geliştirdiği yukarı yönlü bir geri besleme mekanizmasıdır ve literatürdeki diğer strigolakton çalışmalarında da benzer geri besleme kontrolü rapor edilmiştir. İlginç bir şekilde, strigolakton biyosentezinin son adımındaki MAX1 geninin ekspresyonu ise farklı mutant bireylerimizde tutarsız değişimler göstermiştir – bazı bireylerde belirgin artışlar kaydedilirken bazılarında ciddi düşüşler saptanmıştır. Bu tür varyasyonlar, muhtemel epigenetik farklılıklara veya mutasyonun dolaylı etkilerine bağlanabilir ve gen düzenleme yoluyla bir metabolik yolakta yapılan müdahalenin tüm yolak boyunca karmaşık etkileşimlere yol açabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, strigolakton sentezinin genetik manipülasyonu sadece hedef hormonu değil, bitkinin genel hormonal dengesini ve hatta diğer sinyal yollarını da etkileyebilmektedir. Bu bulgu,

dayanıklılık ıslahı çalışmalarında pleiotropik etkilerin dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Ancak tüm bu potansiyel yan etkiler, uygun yetiştirme teknikleri (örneğin mutant hatların aşılansarak ticari çeşitlerin anaçları olarak kullanılması) ile yönetilebilir düzeydedir. Nitekim, strigolakton üretmeyen bodur anaçlar üzerinde gelişen normal domates kalemelerinin, hem parazite karşı korunduğu hem de normal boyda ve verimde meyve verebildiği kavramsal olarak öne sürülmektedir.

Geliştirdiğimiz bu yarıyol materyalinde de benzer bir yaklaşımla anaç materyali olarak değerlendirilerek, ticari domates çeşitlerinin *Phelipanche/Orobanch* baskısından kurtulmasına hizmet edebilir. Bu strateji, istenmeyen bodur fenotipin tarla koşullarında sorun olmasını engelleyerek dayanıklılık faktörünü kökle sınırlamış olacaktır.

Sonuç olarak, bu doktora çalışmasında elde edilen veriler, CRISPR/Cas9 tabanlı gen düzenleme yaklaşımının bitki ıslahında ne denli güçlü ve uygulanabilir bir araç haline geldiğini somut bir örnekle ortaya koymuştur. SlCCD8 geninin hedeflenmesi suretiyle geliştirilen domates mutantları, parazit yabancı otlara karşı etkin bir genetik direnç mekanizması kazandırırken, bitki gelişiminde meydana gelen değişimler yönetilebilir düzeydedir ve bitkinin hayati fonksiyonlarını sürdürmesine engel olmamıştır.

Bu bulgular, literatürdeki benzer çalışmalar ışığında değerlendirildiğinde, strigolakton biyosentezinin kontrollü manipölasyonunun tarımsal ürün güvenliğini artırmada önemli bir kilometre taşı olabileceğini göstermektedir.

Elde edilen dayanıklı materyalleri ve bu tez kapsamındaki deneysel yöntemler, gelecekte ileri ıslah programlarında ve biyoteknolojik uygulamalarda yol gösterici olacaktır. Özellikle gen düzenleme teknolojilerinin hızla geliştiği günümüzde, sadece domates için değil, parazit bitkilerden zarar gören diğer önemli kültür bitkileri için de benzer yaklaşımların uygulanması mümkündür. Bu çalışmanın sonuçları, hem temel bilim açısından bitki-hormon-parazit etkileşimlerine dair yeni bir bakış açısı sunmakta, hem de uygulamalı tarım açısından sürdürülebilir ve yenilikçi bir çözümün kapılarını aralamaktadır.

Bundan sonraki araştırmalarda, strigolakton sinyalinin daha ince ayarlarla düzenlenmesi (örneğin doku-spesifik promotörler kullanılarak sadece kökte gen susturulması) veya alternatif sinyal yollarının hedeflenmesi gibi stratejiler ile dayanıklılık ıslahının daha da geliştirilmesi mümkün gözükmektedir. Sonuçta, bu tez çalışmasıyla ortaya konan CRISPR ile parazit dirençli domates modeli, gelecekte tarımsal üretimde karşılaşılan benzer biyotik stres faktörlerine karşı direnç geliştirilmesi adına önemli bir örnek teşkil etmektedir. Böylece, modern biyoteknoloji araçlarının akıllıca kullanımıyla, bitki ıslahında uzun yıllardır aşılansayan engellerin aşılabileceği ve tarımsal sürdürülebilirliğin bilimsel inovasyonla desteklenebileceği bir kez daha kanıtlanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Abuauf, H., Haider, I., Jia, K.P., Ablazov, A., Mi, J., Blilou, I. and Al-Babili, S. 2018. The Arabidopsis DWARF27 gene encodes an all-trans-/9-cis- β -carotene isomerase and is induced by auxin, abscisic acid and phosphate deficiency. *Plant Science*, 277: 33-42.
- Abu-Gharbieh, W., Makkouk, K., ve Saghir, A. (1978). Response of different tomato cultivars to the root-knot nematode, tomato yellow leaf curl virus, and Orobanche in Jordan.
- Abu-Irmaileh, B. (1991). Soil solarization controls broomrapes (*Orobanche* spp.) in host vegetable crops in the Jordan Valley. *Weed Technology*, 5(3), 575-581.
- Acharya, B. D. (2012). Assessment of different non-host crops as trap crop for reducing *Orobanche aegyptiaca* Pers. seed bank. *Ecoprint: An International Journal of Ecology*, 19, 31-38.
- Aksoy, E. and Pekcan, V. 2014. Canavar otları (*Orobanche* spp., *Phelipanche* spp.) ve Mücadelesi. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı Yayınları, Ankara, p. 80.
- Aksoy, E. and Uygur, F.N. 2008. Effect of broomrapes on tomato and faba bean crops. *Turkish Journal of Weed Science*, 11(1): 1-7.
- Akula, R. and Ravishankar, G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6(11): 1720-1731.
- Al-Babili, S. and Bouwmeester, H.J. 2015. Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 66: 161-186.
- Alcántara, E., Morales-García, M., ve Díaz-Sánchez, J. (2006). Effects of broomrape parasitism on sunflower plants: growth, development, and mineral nutrition. *Journal of plant Nutrition*, 29(7), 1199-1206.
- Alder, A., Jamil, M., Marzorati, M., Bruno, M., Vermathen, M., Bigler, P., ... & Al-Babili, S. (2012). The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science*, 335(6074), 1348-1351.
- Aly, R., Cholakh, H., Joel, D. M., Leibman, D., Steinitz, B., Zelcer, A., Naglis, A., Yarden, O., ve Gal-On, A. (2009). Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. *Plant biotechnology journal*, 7(6), 487-498.
- Aly, R., Dubey, N.K., Yahyaa, M., Abu-Nassar, J. and Ibdah, M. 2014. Gene silencing of CCD7 and CCD8 in *Phelipanche aegyptiaca* by tobacco rattle virus system retarded the parasite development on the host. *Plant Signaling and Behavior*, 9(8): e29376.

- Aly, R., Plakhin, D., ve Achdari, G. (2006). Expression of sarcotoxin IA gene via a root-specific tob promoter enhanced host resistance against parasitic weeds in tomato plants. *Plant Cell Reports*, 25, 297-303.
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A. and Jinek, M. 2014. Structural basis of PAMdependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519): 569-573.
- Anonymous, "Six Questions About CRISPRs, Microbial Embraces", <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2011/04/sixquestions-about-risprs.html> [Son erişim tarihi: 20.06.2025].
- Avdeyev, Y., Scherbinin, B., Ivanova, L., ve Avdeyev, A. (2002). Studying of tomato resistance to broomrape and breeding varieties for processing. VIII International Symposium on the Processing Tomato 613,
- Babiker, A., Mohamed, E., ve El-Mana, M. (1994, 8-12 November 1993). *Orobanche problem and management in the Sudan* Proceedings of the third international workshop on Orobanche and related Striga research, Amsterdam, Netherlands.
- Bai, Y., ve Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of botany*, 100(5), 1085-1094.
- Bari, V. K., Nassar, J. A., Kheredin, S. M., Gal-On, A., Ron, M., Britt, A., ... & Aly, R. (2019). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 in tomato provides resistance against the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Scientific reports*, 9(1), 11438.
- Bari, V.K., Nassar, J.A. and Aly, R. 2021. CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of MORE AXILLARY GROWTH 1 in tomato confers resistance to root parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Scientific Reports*, 11(1): 1-11.
- Bari, V.K., Nassar, J.A., Kheredin, S.M., Gal-On, A., Ron, M., Britt, A., Steele, D., Yoder, J. and Aly, R. 2019. CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis of CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 in tomato provides resistance against the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Scientific Reports*, 9(1): 1-12.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A. and Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819): 1709-1712.
- Bauske, E. M., Zehnder, G. M., Sikora, E. J., ve Kemble, J. (1998). Southeastern tomato growers adopt integrated pest management. *HortTechnology*, 8(1), 40-44.
- Bernhard, R. H., Jensen, J., ve Andreassen, C. (1998). Prediction of yield loss caused by *Orobanche* spp. in carrot and pea crops based on the soil seedbank. *Weed research*, 38(3), 191-197.
- Boari, A., ve Vurro, M. (2004). Evaluation of *Fusarium* spp. and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche ramosa*). *Biological Control*, 30(2), 212-219.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. and Ehrlich, S.D. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8): 2551-2561.

- Brahmi, I., Mabrouk, Y., Brun, G., Delavault, P., Belhadj, O., ve Simier, P. (2016). Phenotypical and biochemical characterisation of resistance for parasitic weed (*Orobancha foetida* Poir.) in radiation-mutagenised mutants of chickpea. *Pest management science*, 72(12), 2330-2338.
- Brewer, P.B., Dun, E.A., Gui, R., Mason, M.G. and Beveridge, C.A. 2015. Strigolactone inhibition of branching independent of polar auxin transport. *Plant Physiology*, 168(4): 1820-1829.
- Britton, G. (1983). The biochemistry of natural pigments. Cambridge University Press.
- Brown, R., Johnson, A.W., Robinson, E. and Todd, A.R. 1949. The stimulant involved in the germination of *Striga hermonthica*. Proceedings of the Royal Society of London. *Biological Sciences*, 136(882): 1-12.
- Bruno, M. and Al-Babili, S. 2016. On the substrate specificity of the rice strigolactone biosynthesis enzyme DWARF27. *Planta*, 243(6): 1429-1440.
- Butt, H., Jamil, M., Wang, J. Y., Al-Babili, S., ve Mahfouz, M. (2018). Engineering plant architecture via CRISPR/Cas9-mediated alteration of strigolactone biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 18, 1-9.
- Bülbül, C. (2021). *Development of broomrape (Orobancha spp., Phelipanche spp.) - resistant tomato (Solanum lycopersicum) using gene editing technology (CRISPR) / Cas9* [Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi]. Antalya.
- Bülbül, F., Aksoy, E., Uygur, S., ve Uygur, N. (2009). Broomrape (*Orobancha* Spp.) Problem in the Eastern Mediterranean Region of Turkey/El Problema Del Jopo (*Orobancha* Spp.) En La Región Mediterránea Oriental De Turquía Problème Dû À L'orobanche (*Orobancha* Spp.) Dans La Région Méditerranéenne Orientale De La Turquie. *Helia*, 32(51), 141-152.
- Cagaň, L., ve Tóth, P. (2003). A decrease in tomato yield caused by branched broomrape (*Orobancha ramosa*) parasitization. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 6, 65-68.
- Chandrasegaran, S. 2017. Recent advances in the use of ZFN-mediated gene editing for human gene therapy. *Cell and Gene Therapy Insights*, 3(1): 33.
- Cheng, X., Ruyter-Spira, C. and Bouwmeester, H. 2013. The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development. *Frontiers in Plant Science*, 4(199): 1-16.
- Child, A. 1990. A Synopsis of *Solanum* Subgenus *Potatoe* (G. Don) D'Arcy [Tuberarium (Dun.) Bitter (s.l.)]. Feddes Repert. 101: 209-235
- Chylinski, K., Le Rhun, A. and Charpentier, E. 2013. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biology*, 10(5): 726-737.
- Cook, C.E., Whichard, L.P., Turner, B., Wall, M.E., Egley, G.H. 1966. Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science*, 154(3753): 1189-1190.
- Costa, J. M. and Heuvelink, E. 2018. The global tomato industry. In: Heuvelink, E. (Ed.), *Tomatoes*. CABI, Boston, pp. 1.

- Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24: 1250-1319.
- Crozier, A., Clifford, M.N. and Ashihara, H. 2008. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. In: Crozier, A., Clifford, M.N. and Ashihara, H. (Eds.), *Plant secondary metabolites*. John Wiley and Sons.
- Cubero, J. I. (1986). Breeding for resistance to Orobanche and Striga: a review. Workshop biology and control of Orobanche, Wageningen.
- Czarnecki, O., Yang, J., Weston, D.J., Tuskan, G.A. and Chen, J.G. 2013. A dual role of strigolactones in phosphate acquisition and utilization in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4): 7681-7701.
- Çiftçi, M. B., ve Tapkı, N. (2023). Türkiye'nin hatay ilinde açıkta domates üretiminin pazarlama yapısının analizi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 10(1), 18-26.
- Da Silva Costa, K.D., da Silva, J., dos Santos, A.M.M., deCarvalho Filho, J.L.S., dos Santos, P.R. and de Oliveira Silva, M. 2017. Botany and breeding of tomato to obtain genotypes resistant to bacterial wilt. *Journal of Experimental Agriculture International*, 19(2): 1-11.
- Dalela, G., ve Mathur, R. (1971). Resistance of varieties of eggplant, tomato and tobacco to broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.). *PANS Pest Articles ve News Summaries*, 17(4), 482-483.
- Deif, H.A.R., Al-Menoufi, O.A. and Ahmed, M.F. 2000. A taxonomic study of the populations of three common species of the genus *Orobanche* L. (*Orobanchaceae*) in Egypt. 2. Macro- and micromorphology of the seeds and their taxonomic implication. In: Nordernstam, B., El Ghazaly, G., Kassas, M. (Eds.), *Plant Systematics for the 21st Century*, Portland Press, London, pp. 251–266.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M.R., Vogel, J. and Charpentier, E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340): 602-607.
- Demircan, S. (2023). *Domates Ürün Raporu* T. E. v. P. G. E. Müdürlüğü.
- Dhanapal, G.N., Struik, P.C., Udayakumar, M. and Timmermans, P.C.J.M. 1996. Management of broomrape (*Orobanche* spp.)—a review. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 176(5): 335-359.
- Díaz, J., Norambuena, H., ve López-Granados, F. (2006). Caracterización del holoparasitismo de *Orobanche ramosa* en tomate bajo condiciones de campo. *Agricultura Técnica*, 66(3), 223-234.
- Díez, M. J., & Nuez, F. (2008). Tomato. In *Vegetables II: fabaceae, liliaceae, solanaceae, and umbelliferae*. New York, NY: Springer New York.
- Disciglio, G., Lops, F., Carlucci, A., Gatta, G., Tarantino, A., Frabboni, L., Carriero, F., ve Tarantino, E. (2016). Effects of different methods to control the parasitic

- weed *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel in processing tomato crops. *Italian Journal of Agronomy*, 11(1), 39-46.
- Dor, E., Alperin, B., Wininger, S., Ben-Dor, B., Somvanshi, V.S., Koltai, H., Kapulnik, Y. and Hershenhorn, J. 2010. Characterization of a novel tomato mutant resistant to the weedy parasites *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Euphytica*, 171(3): 371-380.
- Dor, E., Yoneyama, K., Wininger, S., Kapulnik, Y., Yoneyama, K., Koltai, H., Xie, X. and Hershenhorn, J. 2011. Strigolactone deficiency confers resistance in tomato line SL-ORT1 to the parasitic weeds *Phelipanche* and *Orobanche* spp. *Phytopathology*, 101(2): 213-222.
- Doudna, J. A., ve Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293). Springer.
- Dubey, N. K., Eizenberg, H., Leibman, D., Wolf, D., Edelstein, M., Abu-Nassar, J., Marzouk, S., Gal-On, A., ve Aly, R. (2017). Enhanced Host-Parasite Resistance Based on Down-Regulation of *Phelipanche aegyptiaca* Target Genes Is Likely by Mobile Small RNA. *Frontiers in plant science*, 8.
- Duman, İ., & Düzyaman, E. (2017). Processing tomato production in Turkey. *Chronica Horticulturae*, 57(3), 20-22.
- Eizenberg, H., Aly, R. and Cohen, Y. 2012. Technologies for smart chemical control of broomrape (*Orobanche* spp. and *Phelipanche* spp.). *Weed Science*, 60(2): 316-323.
- Eizenberg, H., Hershenhorn, J., Ephrath, J. H., ve Kanampiu, F. (2013). Chemical Control. In D. M. Joel, J. Gressel, ve L. J. Musselman (Eds.), *Parasitic Orobanchaceae* (pp. 415-428). Springer.
- Eizenberg, H., Lande, T., Achdari, G., Roichman, A., ve Hershenhorn, J. (2007). Effect of Egyptian broomrape (*Orobanche aegyptiaca*) seed-burial depth on parasitism dynamics and chemical control in tomato. *Weed Science*, 55(2), 152-156.
- Eizenberg, H., ve Goldwasser, Y. (2018). Control of Egyptian broomrape in processing tomato: A summary of 20 years of research and successful implementation. *Plant Disease*, 102(8), 1477-1488.
- Ephrath, J.E. and Eizenberg H. 2010. Quantification of the dynamics of *Orobanche cumana* and *Phelipanche aegyptiaca* parasitism in confectionery sunflower. *Weed Research*. 50(2): 140-152.
- Ertürk, Y., ve Çirka, M. (2015). Türkiye ve Kuzey Doğu Anadolu Bölgesi (KDAB)'nde Domates Üretimi Ve Pazarlaması. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 25(1), 84-97.
- Esquinas-Alcázar, J. and Nuez, F. 1995. Situación taxonomica, domesticación y difusión. In: Nuez, F. (Ed.), *El Cultivo del Tomate*. Ediciones Mundi, Madrid, pp. 14-42.

- FAO. (2008). Tomato. In: Crop Information. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Erişim adresi: <https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/tomato/en/>
- FAOSTAT. (2023). Crops and livestock products. Retrieved 11.06.2025 from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Fernández-Aparicio, M., Delavault, P. and Timko, M.P. 2020. Management of infection by parasitic weeds: A review. *Plants*, 9(9): 1184.
- Fernández-Aparicio, M., Reboud, X., ve Gibot-Leclerc, S. (2016). Broomrape weeds. Underground mechanisms of parasitism and associated strategies for their control: a review. *Frontiers in plant science*, 7, 135.
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J.D., Saha, S., Tecle, I.Y., Strickler, S.R., Bombarely, A., Fisher-York, T., Pujar, A., Foerster, H. et al. 2015. The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Research*, 43(D1): D1036-D1041.
- Fishman, M. R., ve Shirasu, K. (2021). How to resist parasitic plants: pre-and post-attachment strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, 62, 102004.
- Foy, C., Jacobsohn, R., ve Jain, R. (1987). Evaluating tomato lines for resistance to glyphosate and/or Orobanche aegyptiaca Pers.
- Foy, C., Jacobsohn, R., ve Jain, R. (1988). Screening of Lycopersicon spp. for glyphosate and/or Orobanche aegyptiaca Pers. resistance. *Weed research*, 28(5), 383-391.
- Foy, C.L., Jain, R. and Jacobsohn, R. 1989. Recent approaches for chemical control of broomrape (Orobanche spp.). *Reviews of Weed Science*, 4,: 123-152.
- Fracchiolla, M., ve Boari, A. (2003). Effect of the infestation of Orobanche ramosa on tomato and cauliflower yield. *Informatore Fitopatologico*, 53, 52-53.
- Frank, B. 1883. Arbeiten aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Königlichen landwirtschaftlichen Hochschule in Berlin. I. über einige neue und weniger bekannte Pflanzenkrankheiten. *Landw. Jb.*, 12: 511-539.
- Frodin, D. G. (2004). History and concepts of big plant genera. *Taxon*, 53(3), 753-776.
- Gao, J., Zhang, T., Xu, B., Jia, L., Xiao, B., Liu, H., ... & Xia, Q. (2018). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 8 (CCD8) in tobacco affects shoot and root architecture. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1062.
- Garneau, J.E., Dupuis, M.È., Villion, M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A.H. and Moineau, S. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320): 67-71.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. and 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.

- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. and Bairoch, A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13): 3784-3788.
- Gersbach, C.A., Gaj, T. and Barbas III, C.F. 2014. Comparing Genome Editing Technologies. *Genetic Engineering and Biotechnology News*, 34(5): 1-32.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., ve Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120, 881-902.
- Gevezova, M., Dekalska, T., Stoyanov, K., Hristeva, T., Kostov, K., Batchvarova, R. and Denev, I. 2012. Recent advances in Broomrapes research. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 1(2): 91-105.
- Gleditzsch, D., Pausch, P., Müller-Esparza, H., Özcan, A., Guo, X., Bange, G. And Randau, L. 2019. PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. *RNA Biology*, 16(4): 504-517.
- Gobena, D., Shimels, M., Rich, P. J., Ruyter-Spira, C., Bouwmeester, H., Kanuganti, S., Mengiste, T., ve Ejeta, G. (2017). Mutation in sorghum LOW GERMINATION STIMULANT 1 alters strigolactones and causes Striga resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(17), 4471-4476.
- Goldwasser, Y. and Yoder, J.I. 2001. Differential induction of Orobanche seed germination by *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 160(5): 951-959.
- Goldwasser, Y., ve Rodenburg, J. (2013). Integrated agronomic management of parasitic weed seed banks. In D. M. Joel, J. Gressel, ve L. J. Musselman (Eds.), *Parasitic Orobanchaceae* (pp. 393-413). Springer Verlag.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J.-P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., ve Portais, J.-C. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455(7210), 189-194.
- Gonzalez-Jorge, S., Ha, S.H., Magallanes-Lundback, M., Gilliland, L.U., Zhou, A., Lipka, A.E., Nguyen, Y.N., Angelovici, R., Lin, H., Capela, J. et al. 2013. Carotenoid cleavage dioxygenase4 is a negative regulator of β -carotene content in *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell*, 25(12): 4812-4826.
- Gottesman, S. 2011. Dicing defence in bacteria. *Nature*, 471(7340): 588-589.
- Graves, J.D. 1995. Host-plant responses to parasitism. *Parasitic Plants*, 131(4): 206-225.
- Grissa, I., Vergnaud, G. and Pourcel, C. 2007. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 8(1): 172.
- Gutiérrez, N., Palomino, C., Satovic, Z., Ruiz-Rodríguez, M., Vitale, S., Gutiérrez, M., Rubiales, D., Kharrat, M., Amri, M., ve Emeran, A. (2013). QTLs for Orobanche spp. resistance in faba bean: identification and validation across different environments. *Molecular Breeding*, 32, 909-922.
- Habimana, S., Nduwumuremyi, A. and Chinama, R. 2014. Management of orobanche in field crops: A review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(1): 43-62.

- Haft, D.H., Selengut, J., Mongodin, E.F. and 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.
- Hasegawa, S., Tsutsumi, T., Fukushima, S., Okabe, Y., Saito, J., Katayama, M., Shindo, M., Yamada, Y., Shimomura, K., ve Yoneyama, K. (2018). Low infection of *Phelipanche aegyptiaca* in micro-tom mutants deficient in CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2645.
- Hassan, E.A., El-Akkad, S.S., Moustafa, S.M. and El-Awadi, M.E. 2004. Histochemical aspects of penetration and vascular connection of broomrape haustoria in the host root, and the possible implication of phenylpropanoids. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6(3): 430-434.
- Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O’Gara, F. and Haas, D. 2000. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2): 232-237.
- Hershenhorn, J., Eizenberg, H., Dor, E., Kapulnik, Y. and Goldwasser, Y. 2009. *Phelipanche aegyptiaca* management in tomato. *Weed Research*, 49(1): 34-47.
- Hibberd, J., Quick, W., Press, M., Scholes, J., ve Jeschke, W. (1999). Solute fluxes from tobacco to the parasitic angiosperm *Orobancha cernua* and the influence of infection on host carbon and nitrogen relations. *Plant, Cell ve Environment*, 22(8), 937-947.
- Hobson, G. and Grierson, D. 1993. Tomato. In: Seymour, G.B., Taylor, J.E., Tucker G.A. (Eds.), *Biochemistry of Fruit Ripening*. Springer, Dordrecht, pp. 405-442.
- Iancu, D. 2018. Genomic Editing—From Human Health to the “Perfect Child”. In: Hostiuc, S. (Ed.), *Clinical Ethics at the Crossroads of Genetic and Reproductive Technologies*. Academic Press, p. 7.
- Ilahy, R., Hdider, C., Lenucci, M.S., Tlili, I. and Dalessandro, G. 2011. Antioxidant activity and bioactive compound changes during fruit ripening of high-lycopene tomato cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4-5): 588-595.
- Iseki, M., Shida, K., Kuwabara, K., Wakabayashi, T., Mizutani, M., Takikawa, H. And Sugimoto, Y. 2018. Evidence for species-dependent biosynthetic pathways for converting carlactone to strigolactones in plants. *Journal of Experimental Botany*, 69(9): 2305-2318.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. and Nakata, A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12): 5429-5433.
- Jansen, R., Embden, J.D.V., Gastra, W. and Schouls, L.M. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6): 1565-1575.

- Jhu, M.-Y., ve Sinha, N. R. (2022). Parasitic plants: an overview of mechanisms by which plants perceive and respond to parasites. *Annual review of plant biology*, 73(1), 433-455.
- Jia, K.P., Li, C., Bouwmeester, H.J. and Al-Babili, S. 2019. Strigolactone Biosynthesis and Signal Transduction. In: Koltai, H. and Prandi, C. (Eds.), *Strigolactones- Biology and Applications*. Springer, p. 21.
- Jiang, F., Zhou, K., Ma, L., Gressel, S. and Doudna, J.A. 2015. A Cas9–guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*, 348(6242): 1477-1481.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096): 816-821.
- Joel, D.M., Hershenhorn, J., Eizenberg, H., Aly, R., Ejeta, G., Rich, P.J., Ransom, J.K., Sauerborn, J. and Rubiales, D. 2007. Biology and management of weedy root parasites. *Horticultural Reviews*, 33(4): 267–350.
- Kadioğlu, İ. 2009. Description, Damages and Control of Broomrape (*Orobanche* spp.). *Turkish Journal of Weed Science*, 12(2): 1-6.
- Karniel, U., Koch, A., Bar Nun, N., Zamir, D., & Hirschberg, J. (2024). Tomato mutants reveal root and shoot strigolactone involvement in branching and broomrape resistance. *Plants*, 13(11), 1554.
- Kaundun, S. S., Martin-Sanz, A., Rodríguez, M., Serbanoiu, T., Moreno, J., Mcindoe, E., ve Le Goupil, G. (2024). First case of evolved herbicide resistance in the holoparasite sunflower broomrape, *Orobanche cumana* Wallr. *Frontiers in plant science*, 15, 1420009.
- Kaya, Y. (2014). Current situation of sunflower broomrape around the world. Proceedings of the 3rd International Symposium on Broomrape (*Orobanche* spp.) in Sunflower,
- Kebreab, E., ve Murdoch, A. (2001). Simulation of integrated control strategies for *Orobanche* spp. based on a life cycle model. *Experimental Agriculture*, 37(1), 37-51.
- Khan, S.H. 2019. Genome-editing technologies: concept, pros, and cons of various genome-editing techniques and bioethical concerns for clinical application. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 16: 326-334.
- Kim, H.I., Xie, X., Kim, H.S., Chun, J.C., Yoneyama, K., Nomura, T., Takeuchi Y. And Yoneyama, K. 2010. Structure–activity relationship of naturally occurring strigolactones in *Orobanche* minor seed germination stimulation. *Journal of Pesticide Science*, 35(3): 344-347.
- Kleifeld, Y., Goldwasser, Y., Herzlinger, G., Joel, D., Golan, S., ve Kahana, D. (1994). The effects of flax (*Linum usitatissimum* L.) and other crops as trap and catch crops for control of Egyptian broomrape (*Orobanche aegyptiaca* Pers.). *Weed research*, 34(1), 37-44.

- Klein, O. and Kroschel, J. 2002. Biological control of *Orobanch* spp. with *Phytomyza orobanchia*, a review. *Biocontrol*, 47(3): 245-277.
- Kohlen, W. 2011. Regulation of biosynthesis and transport of strigolactones and their effect on plant development. Doctoral dissertation, Wageningen University, Wageningen, p. 11.
- Kohlen, W., Charnikhova, T., Lammers, M., Pollina, T., Tóth, P., Haider, I., ... & López-Ráez, J. A. (2012). The tomato CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 (SLCCD8) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *New Phytologist*, 196(2), 535-547.
- Koltai, H. 2014. Receptors, repressors, PINs: a playground for strigolactone signaling. *Trends in Plant Science*, 19(11): 727-733.
- Koltai, H., LekKala, S. P., Bhattacharya, C., Mayzlish-Gati, E., Resnick, N., Wininger, S., Dor, E., Yoneyama, K., Yoneyama, K., ve Hershenhorn, J. (2010). A tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. *Journal of Experimental Botany*, 61(6), 1739-1749.
- Koonin, E.V., Makarova, K.S. and Zhang, F. 2017. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*, 37: 67-78.
- Kostov, K., Batchvarova, R., ve Slavov, S. (2007). Application of chemical mutagenesis to increase the resistance of tomato to *Orobanch* *ramosa* L. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13(5), 505-513.
- Krupp, A., Rücker, E., Heller, A. and Spring, O. 2015. Seed structure characteristics of *Orobanch* *cumana* populations. *Helia*, 38(62): 1-14.
- Kunin, V., Sorek, R. and Hugenholtz, P. 2007. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biology*, 8(4): R61.
- Liang, P.H., Ko, T.P. and Wang, A.H.J. 2002. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *European Journal of Biochemistry*, 269(14): 3339-3354.
- Lieber, M.R. 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79: 181-211.
- Lin, H., Wang, R., Qian, Q., Yan, M., Meng, X., Fu, Z., Yan, C., Jiang, B., Li, J. And Wang, Y. 2009. DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *The Plant Cell*, 21(5): 1512-1525.
- Linke, K.H., Sauerborn, J. and Saxena, M.C. 1989. *Orobanch* field guide. University of Hohenheim, Germany. p. 42.
- Lins, R. D., Colquhoun, J. B., ve Mallory-Smith, C. A. (2007). Effect of small broomrape (*Orobanch* *minor*) on red clover growth and dry matter partitioning. *Weed Science*, 55(5), 517-520.
- Livak, K. J., ve Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.

- Longo, A., Lo Monaco, A., ve Mauromicale, G. (2010). The effect of *Phelipanche ramosa* infection on the quality of tomato fruit. *Weed research*, 50(1), 58-66.
- Mahmud, S., Ahmed, J., Aziz, M.A., Hasan, M.R., Shaon, S.M., Bhuiyan, M.N.A.H., Rahman, M.F., Rakib, H.H. and Islam, M.S. 2015. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats cas systems: a comprehensive review. *International Journal of Basic and Clinical Pharmacology*, 4(4): 613.
- Makarova, K.S. and Koonin, E.V. 2015. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. In: Lundgren M., Charpentier E. and Fineran P. (Eds.), *CRISPR, Methods in Molecular Biology*, Vol 1311. Humana Press, New York, pp. 47-75.
- Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P. and Van Der Oost, J. 2011. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6): 467.
- Mander, L. and Liu, H.W. 2010. Chemistry and biology. In: Townsend, C.A. and Ebizuka, Y. (Eds.), *Comprehensive natural products II*, Vol. 1. Elsevier, p. 71.
- Maoka, T. 2020. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of natural medicines*, 74(1): 1-16.
- Martín-Sanz, A., Pérez-Vich, B., Rueda, S., Fernández-Martínez, J. M., ve Velasco, L. (2020). Characterization of post-haustorial resistance to sunflower broomrape. *Crop Science*, 60(3), 1188-1198.
- Mashiguchi, K., Sasaki, E., Shimada, Y., Nagae, M., Ueno, K., Nakano, T., ... & Asami, T. (2009). Feedback-regulation of strigolactone biosynthetic genes and strigolactone-regulated genes in *Arabidopsis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(11), 2460-2465.
- Matusova, R., Rani, K., Verstappen, F.W., Franssen, M.C., Beale, M.H. and Bouwmeester, H.J. 2005. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology*, 139(2): 920-934.
- Mauromicale, G., Monaco, A. L., ve Longo, A. M. (2008). Effect of branched broomrape (*Orobanch ramosa*) infection on the growth and photosynthesis of tomato. *Weed Science*, 56(4), 574-581.
- Miller, P. (1754). *The Gardener's Dictionary*, Abridged 4th ed. London. John and James Rivington.
- Minoia, S., Petrozza, A., D'Onofrio, O., Piron, F., Mosca, G., Sozio, G., Cellini, F., Bendahmane, A., ve Carriero, F. (2010). A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC research notes*, 3, 1-8.
- Mojica, F.J., García-Martínez, J. and Soria, E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2): 174-182.
- Musselman, L.J. 1980. The biology of *Striga*, *Orobanch*, and other root-parasitic weeds. *Annual Review of Phytopathology*, 18(1): 463-489.

- Naito, Y., Hino, K., Bono, H. and Ui-Tei, K. 2015. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 31: 1120-1123.
- NCBI, 1988. National Center for Biotechnology Information, Gene (SICCD8). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=SICCD78> [Accessed: 19.03.2021].
- Nelson, D. C. (2021). The mechanism of host-induced germination in root parasitic plants. *Plant physiology*, 185(4), 1353-1373.
- Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F. and O. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5): 935-949.
- Nuñez, J.K., Kranzusch, P.J., Noeske, J., Wright, A.V., Davies, C.W. and Doudna, J.A. 2014. Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(6): 528.
- O'Reilly, D., Kartje, Z.J., Ageely, E.A., Malek-Adamian, E., Habibian, M., Schofield, A., Barkau, C.L., Rohilla, K.J., DeRossett, L.B., Weigle, A.T. et al. 2019. Extensive CRISPR RNA modification reveals chemical compatibility and structure-activity relationships for Cas9 biochemical activity. *Nucleic Acids Research*, 47(2): 546-558.
- Oerke, E.C. 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1): 31-43.
- Ouédraogo, J. T., Tignegre, J.-B., Timko, M. P., ve Belzile, F. J. (2002). AFLP markers linked to resistance against *Striga gesnerioides* race 1 in cowpea (*Vigna unguiculata*). *Genome*, 45(5), 787-793.
- Paduchuri, P., Gohokar, S., Thamke, B., ve Subhas, M. (2010). Transgenic tomatoes-a review. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* 1(2), 69-72.
- Parker, C. (2012). Parasitic weeds: a world challenge. *Weed Science*, 60(2), 269-276.
- Parker, C. (2013). The Parasitic Weeds of the Orobanchaceae. In *Parasitic Orobanchaceae* (pp. 499). Springer.
- Parker, C. 2013. The Parasitic Weeds of the Orobanchaceae. In: Joel, D., Gressel, J. And Musselman, L. (Eds), *Parasitic Orobanchaceae*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 313-344.
- Parker, C., ve Riches, C. R. (1993). *Parasitic weeds of the world: biology and control*.
- Parry, A.D. and Horgan, R. 1992. Absciscic-acid biosynthesis in roots. 1. The identification of potential absciscic-acid precursors, and other carotenoids. *Planta*, 187: 185–191.
- Piwowarczyk, R. and Jankowska-Błaszczuk, M. 2014. Intra-Specific Diversity of Seed Productivity and Morphological Features in Parasitic Species *Orobanche bartlingii* Griseb. (Orobanchaceae). *Polish Journal of Ecology*, 62(4): 723–738.
- Poczai, P., Amiryousefi, A., Hyvönen, J.T. and Sablok, G. 2018. Chloroplast and nuclear phylogenomics reveals concordant phylogenetic structure in wild

- tomatoes (*Solanum* sect. *Lycopersicon*, Solanaceae). The 15th Solanaceae Conference, , pp. 1, September 30th-October 4th, Chiang Mai, Thailand.
- Pourcel, C., Salvignol, G. and Vergnaud, G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151(3): 653-663.
- Priya, R. and Siva, R. 2014. Phylogenetic analysis and evolutionary studies of plant carotenoid cleavage dioxygenase gene. *Gene*, 548(2): 223-233.
- Qasem, J. R. (2019). Branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.) control in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by trap crops and other plant species in rotation. *Crop Protection*, 120, 75-83.
- Raiola, A., Rigano, M. M., Calafiore, R., Frusciante, L., ve Barone, A. (2014). Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. *Mediators of inflammation*, 2014(1), 139873.
- Rajanna, L., Shivamurthy, G.R., Niranjana, R. and Vijay, C.R. 2005. Occurrence of phloem in the haustorium of *Aeginetia pedunculata* Wall.-a root holoparasite of Orobanchaceae. *Taiwania*, 50(2): 109-116.
- Rick, C.M. 1951. Hybrids between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Solanum lycopersicoides* Dun. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37(11): 741-744.
- Ricroch, A., Eriksson, D., Miladinović, D., Sweet, J., Van Laere, K., ve Woźniak-Gientka, E. (2024). *A Roadmap for Plant Genome Editing*. Springer Nature.
- Rispail, N., Dita, M. A., González-Verdejo, C., Pérez-de-Luque, A., Castillejo, M. A., Prats, E., Román, B., Jorrín, J., ve Rubiales, D. (2007). Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe. *New Phytologist*, 173(4), 703-712.
- Rubiales, D., Fernández-Aparicio, M., Pérez-de-Luque, A., Castillejo, M. A., Prats, E., Sillero, J. C., Rispail, N., ve Fondevilla, S. (2009). Breeding approaches for crenate broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) management in pea (*Pisum sativum* L.). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(5), 553-559.
- Rubiales, D., Moreno, M., ve Sillero, J. (2005). Search for resistance to crenate broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) in pea germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 853-861.
- Rubiales, D., Pérez-de-Luque, A., Joel, D. M., Alcántara, C., ve Sillero, J. C. (2003). Characterization of resistance in chickpea to crenate broomrape (*Orobanche crenata*). *Weed Science*, 51(5), 702-707.
- Ruyter-Spira, C., Al-Babili, S., Van Der Krol, S. and Bouwmeester, H. 2013. The biology of strigolactones. *Trends in Plant Science*, 18(2): 72-83.
- Sauerborn, J. 1991. The economic importance of the phytoparasites *Orobanche* and *Striga*. Proceedings of the 5th international symposium of parasitic weeds, Nairobi, pp. 137-143, 24-30 June 1991, Kenya.

- Sauerborn, J., Linke, K. H., Saxena, M. C., ve Koch, W. (1989). Solarization; a physical control method for weeds and parasitic plants (*Orobanche* spp.) in Mediterranean agriculture. *Weed research*, 29(6), 391-397.
- Seigler, D.S. 1998. Tetraterpenes or carotenoids. In: Seigler, D.S. (Ed.), *Plant Secondary Metabolism*. Springer, Boston, pp. 486-505.
- Serghini, K., de Luque, A. P., Castejón-Muñoz, M., García-Torres, L., ve Jorrín, J. V. (2001). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loeffl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *Journal of Experimental Botany*, 52(364), 2227-2234.
- Seto, Y., Sado, A., Asami, K., Hanada, A., Umehara, M., Akiyama, K. and Yamaguchi, S. 2014. Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4): 1640-1645.
- Shabbir, M. A., Hao, H., Shabbir, M. Z., Wu, Q., Sattar, A., & Yuan, Z. (2016). Bacteria vs. bacteriophages: parallel evolution of immune arsenals. *Frontiers in microbiology*, 7, 1292.
- Shah, S.A., Erdmann, S., Mojica, F.J. and Garrett, R.A. 2013. Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity. *RNA Biology*, 10(5): 891-899.
- Shindo, M., Shimomura, K., Yamaguchi, S. and Umehara, M. 2018. Upregulation of DWARF 27 is associated with increased strigolactone levels under sulfur deficiency in rice. *Plant Direct*, 2(4): e00050.
- Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., Semenova, E., Minakhin, L., Joung, J., Konermann, S., Severinov, K. et al. 2015. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Molecular Cell*, 60(3): 385-397.
- Smith, S.M. 2014. Q&A: What are strigolactones and why are they important to plants and soil microbes?. *BMC Biology*, 12(1): 19.
- Stall, W. M., ve Gilreath, J. P. (2002). Weed control in tomato. *Weed management in Florida fruits and vegetables*, 2003, 55-58.
- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C. and Doudna, J.A. 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490): 62-67.
- Sternberg, S.H., Richter, H., Charpentier, E. and Qimron, U. 2016. Adaptation in CRISPR-Cas systems. *Molecular Cell*, 61(6): 797-808.
- Stewart, G.R. and Press, M.C. 1990. The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. *Annual Review of Plant Biology*, 41(1): 127-151.
- Surov, T., Aviv, D., Aly, R., Joel, D.M., Goldman-Guez, T. and Gressel, J. 1998. Generation of transgenic asulam-resistant potatoes to facilitate eradication of parasitic broomrapes (*Orobanche* spp.), with the *sul* gene as the selectable marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(1): 132-137.
- Sürmen, B., Kutbay, H.G. and Yılmaz, H. 2014. Parazit Çiçekli Bitkilerin Gelişimi ve Hayat Tipleri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(2): 9-16.

- Tan, S., Evans, R. R., Dahmer, M. L., Singh, B. K., ve Shaner, D. L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61(3), 246-257.
- Tester, M., ve Langridge, P. (2010). Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 327(5967), 818-822.
- Theis, N. and Lerda, M. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences*, 164(3): 93-102.
- Tholl, D. 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3): 297-304.
- Tomato Genome Consortium, x. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635.
- TÜİK. (2023). *Bitkisel Üretim İstatistikleri*. Retrieved 25 February 2024 from <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=Tarim-111>
- Twyford, A. D. (2018). Parasitic plants. *Current Biology*, 28(16), R857-R859.
- Umehara, M., Cao, M., Akiyama, K., Akatsu, T., Seto, Y., Hanada, A., Li, W., Takeda-Kamiya, N., Morimoto, Y. and Yamaguchi, S. 2015. Structural requirements of strigolactones for shoot branching inhibition in rice and Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 56(6): 1059-1072.
- Van Eck, J., Keen, P. and Tjahjadi, M. 2019. Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Tomato. In: Kumar S., Barone P. and Smith M. (Eds.), Transgenic Plants. Methods in Molecular Biology, vol 1864. Humana Press, New York, NY., pp. 225-234.
- Visser, J. and Dorr, I. 1987. The haustorium. In: Musselman, L.J. (Ed.), Parasitic weeds in agriculture, vol. 1. CRC, Boca Raton, pp 91-106.
- Visser, J.H., Dorr, I. and Kollmann, R. 1984. The hyaline body of the root parasite Alectra orobanchoides Benth. (Scrophulariaceae)-its anatomy, ultrastructure and histochemistry. *Protoplasma*, 121: 146-56.
- Vogel, J. T., Walter, M. H., Giavalisco, P., Lytovchenko, A., Kohlen, W., Charnikhova, T., Simkin, A. J., Goulet, C., Strack, D., ve Bouwmeester, H. J. (2010). SICCD7 controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. *The Plant Journal*, 61(2), 300-311.
- Wakabayashi, T., Hamana, M., Mori, A., Akiyama, R., Ueno, K., Osakabe, K., Osakabe, Y., Suzuki, H., Takikawa, H., ve Mizutani, M. (2019). Direct conversion of carlactonoic acid to orobanchol by cytochrome P450 CYP722C in strigolactone biosynthesis. *Science Advances*, 5(12), eaax9067.
- Waldie, T., McCulloch, H. and Leyser, O. 2014. Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. *The Plant Journal*, 79(4): 607-622.
- Wang, H., Chen, W., Eggert, K., Charnikhova, T., Bouwmeester, H., Schweizer, P., Hajirezaei, M., Seiler, C., Sreenivasulu, N., von Wiren, N. et al. 2018. Abscissic acid influences tillering by modulation of strigolactones in barley. *Journal of Experimental Botany*, 69(16): 3883-3898.

- Wang, L., Wang, B., Yu, H., Guo, H., Lin, T., Kou, L., Wang, A., Shao, N., Ma, H., ve Xiong, G. (2020). Transcriptional regulation of strigolactone signalling in Arabidopsis. *Nature*, 583(7815), 277-281.
- Wang, R.K., Lu, J.J., Xing, G.N., Gai, J.Y. and Zhao, T.J. 2011. Molecular evolution of two consecutive carotenoid cleavage dioxygenase genes in strigolactone biosynthesis in plants. *Genetics and Molecular Research*, 10(4): 3664-3673.
- Weeks, W.W. 1986. Carotenoids: A source of flavor and aroma. *ACS Symposium Series*, 317(12): 157-166.
- Weese, T. L., ve Bohs, L. (2007). A three-gene phylogeny of the genus Solanum (Solanaceae). *Systematic botany*, 32(2), 445-463.
- Wei, Y., Wan, H., Wu, Z., Wang, R., Ruan, M., Ye, Q., Li, Z., Zhou, G., Yao, Z. And Yang, Y. 2016. A comprehensive analysis of carotenoid cleavage dioxygenases genes in Solanum lycopersicum. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(2): 512-523.
- Wheldale, M. 1916. The Anthocyanin Pigments of Plants. In: Fetter-Lane, E.C. (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, U.K., p. 44.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H. and Doudna, J.A. 2012. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385): 331-338.
- Wu, Z., Sun, S., Wang, F., ve Guo, D. (2011). Establishment of regeneration and transformation system of Lycopersicon esculentum microtom. *British Biotechnology Journal*, 1(3), 53-60.
- Xie, X., Yoneyama, K. and Yoneyama, K. 2010. The strigolactone story. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 93-117.
- Xie, X., Yoneyama, K., Kisugi, T., Uchida, K., Ito, S., Akiyama, K., Hayashi, H., Yokota, T., Nomura, T. and Yoneyama, K. 2013. Confirming stereochemical structures of strigolactones produced by rice and tobacco. *Molecular Plant*, 6(1): 153-163.
- Yamada, Y., & Umehara, M. (2015). Possible roles of strigolactones during leaf senescence. *Plants*, 4(3), 664-677.
- Yang, X., Chen, L., He, J. and Yu, W. 2017. Knocking out of carotenoid catabolic genes in rice fails to boost carotenoid accumulation, but reveals a mutation in strigolactone biosynthesis. *Plant Cell Reports*, 36(10): 1533-1545.
- Ye, X., Zhang, M., Zhang, M., ve Ma, Y. (2020). Assessing the performance of maize (Zea mays L.) as trap crops for the management of sunflower broomrape (Orobancha cumana Wallr.). *Agronomy*, 10(1), 100.
- Yoneyama, K., Awad, A. A., Xie, X., Yoneyama, K., ve Takeuchi, Y. (2010). Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant and Cell Physiology*, 51(7), 1095-1103.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H. and Sheen, J. 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols*, 2(7): 1565.

- Yoshida, S., Cui, S., Ichihashi, Y., ve Shirasu, K. (2016). The haustorium, a specialized invasive organ in parasitic plants. *Annual review of plant biology*, 67(1), 643-667.
- Young, N.D. and dePamphilis, C.W. 2000. Purifying selection detected in the plastid gene *matK* and flanking ribozyme regions within a group II intron of nonphotosynthetic plants. *Molecular Biology and Evolution*, 17(12): 1933-1941.
- Zabodalova, L., Ishchenko, T., Skvortcova, N., Baranenko, D. and Chernjavskij, V. 2009. Liposomal beta-carotene as a functional additive in dairy products. *Agronomy Research*, 12(3): 825–834.
- Zermane, N., Souissi, T., Kroschel, J., ve Sikora, R. (2007). Biocontrol of broomrape (*Orobanche crenata* Forsk. and *Orobanche foetida* Poir.) by *Pseudomonas fluorescens* isolate Bf7-9 from the faba bean rhizosphere. *Biocontrol science and technology*, 17(5), 483-497.
- Zhang, Y., Van Dijk, A.D., Scaffidi, A., Flematti, G.R., Hofmann, M., Charnikhova, T., Verstappen, F., Hepworth, J., van der Krol, S., Leyser, O. et al. 2014. Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, 10(12): 1028–1033.
- Zwanenburg, B., Pospíšil, T. and Zeljković, S.Ć. 2016. Strigolactones: new plant hormones in action. *Planta*, 243(6): 1311-1326.

ÖZGEÇMİŞ

Alparslan KARABENİZ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2019-2025	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2016-2018	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Antalya
Lisans 2012-2016	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Mühendis 2024-Devam Ediyor	ABEL ZİRAAT SANAYİ VE TİCARET A.Ş Konya
Mühendis 2016-2018	Vatan Tohumculuk Ltd. Şti. Sebze Tohumculuğu Araştırma-Deneme İstasyonu, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Zailasheva, A., Sancar, B., Zonon, M., Karabeniz, A., Pakashtica, V., Mutlu, S. S., & Mutlu, N. (2025). Molecular Marker Aided Selection of Restorer of Fertility (Rf/rf) Alleles to Develop Maintainer Lines in Sunflower. Turkish Journal Of Field Crops, 30(1), 88-97.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Çiğnitaş, E., Şimşek, C., Kitiş, Y. E., Pınar, H., Karabeniz, A., Kaba, A., ... Soylu, İ.(2024). CRISPR/Cas9-Mediated modification of CCD7 gene enhances tomato resistance against *Phelipanche spp.* . The 17th World Congress on Parasitic Plants (pp.38). Nara, Japan

2- Şimşek, C., Soylu, İ., Pınar, H., Kaba, A., Karabeniz, A., Kitiş, Y. E., Çiğnitaş, E. Mutlu, N. (2023). Development of resistance against broomrape (*Orobanche spp.*, *Phelipanche spp.*) using CRISPR/-cas9 technology in tomato (*Solanum lycopersicum*). 2nd International Molecular Plant Protection Congress (Oral Presentation). 15-18/05/2023. Bursa, Turkey

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1.Çiğnitaş, E., Şimşek, C., Kitiş, Y. E., Pınar, H., Karabeniz, A., Kaba, A., Soylu, İ., Mutlu, N. (2023). Gen Düzenleme Teknolojisi (CRISPR/Cas9) ile Elde Edilen Domates Genotiplerinin Canavar Otuna (*Phelipanche spp.*) Karşı Dayanıklılık Seviyelerinin Belirlenmesi. Türkiye Herboloji Kongresi (Sözlü sunum). 19-21 Ekim 2023.Şanlıurfa, Türkiye.

2- Pınar, H., Şimşek, C., Çiğnitaş, E., Kitiş, Y. E., Karabeniz, A., Kaba, A., Soylu, İ., Yiğit, M.A., Duruk, Z., Mutlu, N. (2023). Gen düzenleme teknolojisi (CRISPR/Cas9) ile domates ve patlıcanda herbisitlere ve Canavar Otuna (*Phelipanche spp.*) karşı dayanıklılığın geliştirilmesi. Türkiye Herboloji Kongresi (Sözlü sunum). 19- 21 Ekim 2023. Şanlıurfa, Türkiye.