

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

CRISPR/CAS9 YÖNTEMİ İLE HIYAR MOZAİK VİRÜS (CMV)'ne DAYANIKLI
TRANSGENİK OLMAYAN KAVUN GENOTİPİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Serdar ALTINTAŞ

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Ali Ergül

Kasım

2022

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Serdar ALTINTAŞ

İmzası:

ONAY

Prof. Dr. Ali Ergül danışmanlığında Serdar ALTINTAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 09&11&2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ali ERGÜL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Erkan YILMAZ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza:

Üye: Doç. Dr. Behcet İNAL

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Muhemet Zeki KARİPÇİN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

CRISPR/Cas9 Yöntemi ile Hıyar Mozaik Virüs (CMV)'üne Dayanıklı Transgenik Olmayan Kavun
Genotipinin Geliştirilmesi

Serdar Altıntaş

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Ali Ergül

CmVPS41 geni bazı viral faktörlerin iletim demetleri boyunca taşınımında rol oynadığı bilinmektedir. CMV tarımsal üretimde ciddi zararlanmalara yol açmakta ve birçok bitki familyası bu virüsün doğal konukçusu durumundadır. CMV floem boyunca bitkinin üst kısımlarına doğru taşınmaktadır. Bu çalışmada *CmVPS41* geninin fonksiyonu CRISPR/Cas9 yöntemiyle ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla hedef bölgeye yönelik 2 tane sgRNA tasarlanmıştır. Golden Gate klonlama kullanılarak tek bir vektörde toplanan ekspresyon kasetleri *Agrobacterium* aracılığıyla aktarılmıştır. Doku kültüründe en uygun şartlar sürgün ortamı için 2.2 mg/L BAP ve 0.8 mg/L NAA olarak, köklendirme ortamı için ise 0.5 mg/L NAA olarak belirlenmiştir. Çalışma sonunda yetiştirilen bitkilerde yapılan analizler sonucu ağırlıklı olarak delesyon şeklinde mutasyonlar tespit edilmiştir.

2022, 137 sayfa

Anahtar kelimeler: CMV; *CmVPS41*, CRISPR; *Cucumis melo* L.

ABSTRACT

PhD Thesis

Development of Non-transgenic Melon Genotype Resistant to Cucumber Mosaic Virus (CMV) by
CRISPR/Cas9 Method

Serdar Altıntaş

Ankara University Institute of Biotechnology

Prof. Dr. Ali Ergül

The CmVPS41 gene is known to play a role in the transport of some viral factors across vascular bundles. CMV causes serious damage to agricultural production and many plant families are natural hosts of this virus. CMV is transported along the phloem to the upper parts of the plant. In this study, Resistance melon lines was tried to develop creating loss of function mutants by the CRISPR/Cas9 method. For this purpose, two sgRNAs were designed for the target region. Expression cassettes collected in a single vector using Golden Gate cloning were transferred by *Agrobacterium*. Optimal conditions in tissue culture were determined as 2.2 mg/L BAP and 0.8 mg/L NAA for shoot medium and 0.5 mg/L NAA for root induction medium. At the end of the study, mutations were determined mainly in the form of deletion as a result of the analyzes made in the grown plants.

2022, 137 pages

Keywords: CMV; *CmVPS41*, CRISPR; *Cucumis melo* L.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her türlü sorun ve sıkıntıda bana yardımcı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali ERGÜL'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca deneyimleriyle her zaman destek olan hocam Sayın Doç.Dr. Behcet İNAL'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarım süresince bana rahat bir çalışma ortamı sağlayan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne ve tüm çalışanlarına şükranlarımı sunarım.

Tez İzleme Komite'sindeki katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Erkan YILMAZ'a ve Siirt Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Muhemet Zeki KARİPÇİN'e şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Murat AKDEMİR, Dr. Öğr. Üyesi Sara YASEMİN, Araş. Gör. Sedriye ÇATKIN, Uzman Öğr. Görevlisi Merve BALABAN, Yıldırım SOYLU'ya ve Siirt Üniversitesi Bilgi İşlem Daire Başkanlığı'na şükranlarımı sunarım.

Ve son olarak bu süreçte maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. KAVUN	2
2.2. TAKSONOMİ VE SINIFLANDIRMA	3
2.3. HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ (CMV).....	3
2.4. GENOM ORGANİZASYONU (CMV).....	5
2.5. CMV İLE MÜCADELE	7
2.6. RESESİF DAYANIKLILIK.....	8
2.7. GENOM DÜZENLEME YÖNTEMLERİ.....	11
2.7.1. CRISPR/CAS SİSTEMİ.....	14
3. GEREKÇE VE AMAC	31
4. MATERYAL VE YÖNTEM	34
4.1. MATERYAL	34

4.2. TOHUM CANLILIK TESTİ.....	34
4.3. gRNA’LARIN DİZAYN EDİLMESİ	34
4.3.1. PRİMER DİZAYNI.....	34
4.3.2. DNA İZOLASYONU	34
4.3.3. RNA İZOLASYONU	35
4.3.4. cDNA SENTEZİ.....	36
4.3.5. PZR KOŞULLARI	37
4.3.6. PZR ÜRÜNLERİNİN DİZİLENMESİ	38
4.3.7. gRNA PRİMERLERİNİN TASARLANMASI.....	38
4.4. PLAZMİTLERİN RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİM KESİMLERİ VE JEL PÜRİFİKASYONU	39
4.5. FRAGMANLARIN ÇOĞALTILMASI	41
4.6. BAĞLANMA (LİGASYON)	43
4.7. KOMPETANT <i>E. Coli</i> HÜCRELERİNİN HAZIRLANMASI.....	44
4.8. TRANSFORMASYON	44
4.9. OLUŞAN POZİTİF KOLONİLERDEN PLAZMİT İZOLASYONU	45
4.10. KOLONİ PZR.....	46
4.11. KOMPETAN <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> HÜCRELERİNİN HAZIRLANMASI.....	47
4.12. PDIRECT_23C VEKTÖRÜNÜN <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (EHA 105) BAKTERİLERİNE TRANSFORMASYONU	48
4.13. TOHUMLARIN YÜZEY STERİLİZASYONU VE ÇİMLENDİRİLMESİ	49
4.14. ADAY TRANSGENİK BİTKİLERDE ANALİZLER.....	51
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI</u>	<u>54</u>
5.1. TOHUM CANLILIK TESTİ.....	54
5.2. HEDEF GENİN BELİRLENMESİ	54

5.3.	SEKANS PRİMERLERİNİN OLUŞTURULMASI	55
5.4.	RNA İZOLASYONU, cDNA SENTEZİ VE PZR	56
5.5.	PZR ÜRÜNLERİNİN DİZİLENMESİ	57
5.6.	gRNA'LARIN DİZAYN EDİLMESİ	58
5.7.	<i>E. coli</i> 'den PLAZMİT İZOLASYONU	59
5.8.	LİGASYONUN KOLONİ PZR İLE DOĞRULANMASI	59
5.9.	SANGER SEKANSLAMA İLE DOĞRULAMA	60
5.10.	Bitki Materyali, Eksplant Hazırlanması ve Doku Kültürü Koşulları.....	62
5.11.	RNA İZOLASYONU ve cDNA SENTEZİ	64
5.12.	PZR	65
6.	<u>TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	<u>68</u>
6.1.	TARTIŞMA.....	68
6.2.	SONUÇ	72
	<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>73</u>
	<u>EKLER.....</u>	<u>93</u>
	EK 1: sgRNA 1 ve 2'yi içeren pDIRECT_23C vektörüne ait dizi verileri.....	94
	EK 2: Çalışmada kullanılan kimyasallar ve tedarikçileri	101
	<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>102</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. A) Hıyar mozaik virüsü (CMV). B) CMV partikülleri	4
Şekil 2.2. Çift zincir kırıklarının DNA tamir mekanizmalarını indüklemesi	14
Şekil 2.3. CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme mekanizmasının şematik gösterimi. ...	16
Şekil 2.4. Sınıf 1 ve 2 CRISPR/Cas sistemlerinin sınıflandırılması	20
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan pDIRECT_23C vektörü.....	39
Şekil 4.2. Saflaştırılmış PZR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü	43
Şekil 4.3. Transformasyon sonrası <i>E. coli</i> bakterilerinin seçici besi yerlerine ekilmesi ...	45
Şekil 4.4. <i>Agrobacterium</i> solüsyonunun hazırlanması.	50
Şekil 5.1. Tohum canlılık testi	54
Şekil 5.2. RNA izolasyonuna ait agaroz jel görüntüsü	56
Şekil 5.3. PZR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü	56
Şekil 5.4. Elde edilen dizilerin NCBI veri tabanında kontrol edilmesi	57
Şekil 5.5. pDIRECT_23C plazmid ve MluI ve PmeI enzimleriyle kesilmiş plazmitin agaroz jeldeki görüntüsü	59
Şekil 5.6. Koloni PZR'ye ait agaroz jel görüntüsü	59
Şekil 5.7. pDIRECT_23C plazmitinin kromotogram görüntüsünden bir kesit	60
Şekil 5.8. Kavun tohumlarının in vitro ortamda çimlendirilmesi.....	62
Şekil 5.9. Eksplantların <i>Agrobacterium</i> ile muamele edilmesi.	63
Şekil 5.10. Eksplantların seçici besiyerine aktarılması ve gelişimi	63
Şekil 5.11. Yaklaşık 6 haftalık kalluslarda sürgün oluşumu	64
Şekil 5.12. RNA izolasyonuna ait agaroz jel görüntüsü.....	64
Şekil 5.13. PZR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü	65
Şekil 5.14. sgRNA1'in hedeflediği bölgede meydana gelen mutasyon tipleri ve pozisyonları	66
Şekil 5.15. sgRNA2'nin hedeflediği bölgede meydana gelen mutasyon tipleri ve pozisyonları	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bitki biyoteknolojisinde kullanılan genom düzenleme araçlarının karşılaştırılması	12
Çizelge 2.2. Genom düzenlemede kullanılan doğal ya da genetik açıdan modifiye edilmiş Cas enzimleri	18
Çizelge 2.3. gRNA dizaynında kullanılan biyoinformatik araçlar	23
Çizelge 2.4. Çeşitli patojenlere karşı yapılan CRSIPR tabanlı dayanıklılık çalışmaları.	27
Çizelge 4.1. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar.	37
Çizelge 4.2. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları.	37
Çizelge 4.3. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.	38
Çizelge 4.4. Restriksiyon Endonükleaz enzim kesim reaksiyonuna ait bileşeler ve miktarları.	40
Çizelge 4.5. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	41
Çizelge 4.6. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları	41
Çizelge 4.7. Ligasyon reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.....	43
Çizelge 4.8. Koloni PZR koşulları	47
Çizelge 4.9. Doku kültürü çalışmalarında kullanılan ortamlar ve içerikleri	50
Çizelge 4.10. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	52
Çizelge 4.11. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları	52
Çizelge 4.12. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları	53
Çizelge 5.1. CmVPS41 geninin dayanıklılık bölgeleri.....	55
Çizelge 5.2. CmVPS41 gen bölgesi için dizayn edilen primerlerin listesi.....	55
Çizelge 5.3. PZR ürünlerine ait dizi verileri.....	57
Çizelge 5.4. gRNA tasarımı için CRISPR direct uygulaması tarafından önerilen gRNA dizileri.....	58
Çizelge 5.5. sgRNA1 ve 2'yi içeren gen kasetlerine ait dizi verileri	61
Çizelge 5.6. RNA örneklerine ait kalite ve miktar tayinleri	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Degree Celsius (santigrat derece)
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
BAP	6-Benzilaminopurin
BÇ	Baz Çifti
cDNA	Complimenter Deoksiribo Nükleik Asit
CMV	Cucumber mosaic virus
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated 9
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSB	Double Strand Break
HCl	Hidroklorür
HDR	Homoloji Yönelimli Tamir
HR	Homolog Rekombinasyon
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MS	Murashige ve Skoog
NAA	Naftalin Asetik Asit

NHEJ	Non-homologous End Joining
ng	Nanogram
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PEG	Polietilen Glikol
pg	Pikogram
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Revolution Per Minute
sgRNA	Single Guide Ribonükleik Asit
TALEN	Transcription Activator-Like Effector-Based Nucleases
TTC	2,3,5 Trifeniltetrazolium Klorid
VPS41	Vacuolar Sorting Protein 41
YM	Yeast Malt
ZFN	Zinc Finger Nuclease

1. GİRİŞ

Cucumovirus grubunda yer alan hıyar mozaik virüsü (CMV: *Cucumber mosaic virus*), virüsler arasında en geniş konakçı yelpazesine sahip olup, *Solanaceae*, *Cruciferae* ve *Cucurbitaceae* familyaları başta olmak üzere, kavununda (*Cucumis melo* L.) yer aldığı, yaklaşık 1.200'den fazla bitki türünde önemli zararlar yapmaktadır (1). Bitkilerde bilinen yaklaşık 200 virüs direnç geninin (R genleri) yarısı ise resesif kalıtım göstermektedir. Bitki hastalıklarına dayanıklılıkta, resesif dayanıklılığın dominant dayanıklılığa oranla kalıtımı daha stabil ve dayanımının daha yüksek olduğu göz önüne alındığında, resesif genler üzerine yapılan araştırmalar bitki hastalıklarını kontrol altına almada büyük önem arz etmektedir. Bitkide CMV'ye direncin genetik kontrollü dominant, resesif, monogenik ve poligenik kontrollerle sağlanarak çok farklılık gösteren heterogenik bir durum göstermektedir. Bunlar arasında en yaygın olanı ise resesif ve poligenik dayanıklılıktır (2).

Resesif genlerde yapılan rastgele mutajenez tarafından üretilen hassaslık/duyarlılık kaybı (resesif dayanıklılık) genetik olarak bitki doğal varyantlarında bulunan resesif dayanıklılıkla eşdeğer görülmekte, doğal gen kaynaklarında bulunan genetik varyasyonların kullanımında oluşabilecek sınırlamaları ortadan kaldırmaktadır. Bitki transkripsiyon başlangıç faktörleri (eIF4E'ler) virüslere dayanıklılıkta hedef olarak kullanılmakla birlikte, konakçılara ait diğer genlerin belirlenmesi resesif dayanıklılıkta hedef seçilmesi birçok bitki türünde virüs gruplarına bağlı olmaksızın dayanıklı bitki geliştirmeye olanak sağlamaktadır.

Diğer taraftan hedef genlerin klasik ıslah yöntemleri ile aktarılması uzun zaman alırken, genom/gen düzenleme yaklaşımlarından CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated 9:Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri/Cas 9) yöntemi virüse dayanıklı bitki eldesi sürecini hızlandırmanın yanında susturulan geni taşıyan bitkilerin bir sonraki dönemlerde transgen olmayan ancak dayanıklı bitkiler olmasına olanak sağlamaktadır.

Tez çalışması kapsamında kavunda CMV'nin floeme girişini dolayısıyla uzun mesafeli viral taşınımı ve sistemik enfeksiyonunu engelleyen, doğal resesif dayanıklı bir gen olduğunu kanıtlamış Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 41 Homolog (*VPS41*) geninin, hassaslığa neden olan 5 no.lu ekzonunun CRISPR/Cas9 yöntemi ile susturulması ve dayanıklılığın sağlanması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KAVUN

Kavun (*Cucumis melo* L.) *Cucurbitaceae* familyasının bir üyesi olup, diploid ($2n=2x=24$) bir türdür. Dünya genelinde en yaygın yetiştirilen sebze türlerinden biridir. Ağırlıklı olarak; tropik, subtropik ve ılıman bölgelerde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Dünya geneli kavun üretimi 31,948,349 tondur. Üretim miktarı açısından ilk sırayı 17,147,817 tonla Çin alırken ikinci sırada 1,813,422 tonla Türkiye yer almaktadır. Bu ülkeleri sırasıyla İran, Mısır, Hindistan ve Kazakistan takip etmektedir. Kökeni hakkındaki ilk çalışmalar, bu türün Afrika kökenli olduğunu ortaya koymuşsa da, daha sonra yapılan çalışmalar Asya kökenli olabileceğini göstermektedir (3). Bu türün yabani akrabaları Asya, Afrika ve Avustralya'ya dağılmış durumdadır (4). İlk olarak, protein ve yağca zengin tohumları için kültüre alındığı tahmin edilmektedir. Ancak, daha sonraları etli meyve kabuğu içinde yetiştirilmeye başlanmıştır. Yapılan seleksiyon çalışmaları, daha küçük meyve boyutuna sahip ve nispeten daha acı tada sahip varyetelerden, günümüzde farklı amaçlarla kullanılan çeşitlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Günümüzde, sebze olarak pişirilerek ya da taze olarak tüketilmekte, tatlı yapımında kullanılmakta ya da güzel kokusu için yetiştirilmektedir (5).

Kavun genomu ilk olarak 2012 yılında dizilenmiş ve anotasyonu yapılmıştır (6). Genom boyutu yaklaşık olarak 475 Mb'dır (6). Genom dizi verileriyle ilgili bilgileri korumak ve paylaşmak adına bir genomik platform oluşturulmuştur (<http://melonomics.net/>). Yayımlanan ilk versiyonda toplam 1,594 scaffold ve 29,865 contig bulunmaktaydı. Transpozon elementler genomun yaklaşık % 19,7'sini oluşturmaktadır. Ayrıca, ilk versiyonda toplam 27,427 protein kodlayan gen ve 34,848 transkriptin anotasyonu yapılmıştır. Kavun genomuna yönelik yapılan güncel çalışmalarda optik haritalama yöntemi kullanılmış ve kavun genomunun daha kapsamlı bir haritası ortaya konulmuştur. Daha önceki versiyonlara kıyasla daha bütünleştirici bir stratejinin izlendiği bu yöntemde 29,980 protein kodlayan lokus tanımlanmıştır. Daha önceki versiyonlarda karşılaşılan sorunlar göz önünde bulundurulduğunda, bu versiyon gen yapısının bütünlüğü, intron-ekzon bağlantı bölgeleri ve kodlama yapmayan bölgeler gibi çeşitli yönlerden önemli avantajlara sahiptir.

2.2. TAKSONOMİ VE SINIFLANDIRMA

Cucumis cinsi içerisinde yer alan kavun aynı cins içinde yer alan diğer türlere göre oldukça farklılık göstermektedir (7, 8). Asya ya da Afrika kökenli olduğu düşünülen kavunun ilk önce besleyici çekirdeklerinden dolayı kültüre alındığı düşünülmekte, bu amaçla yapılan seleksiyon çalışmaları meyve ve çekirdek boyutunda artışla sonuçlanmıştır (3) Hâlihazırda bu tür içerisinde yabani ve kültüre alınmış varyeteler bulunmaktadır. Şekeri yüksek olan varyeteler tatlı olarak tüketilirken, tatlı olmayan varyeteler ise pişirilerek, ham olarak ya da turşu olarak tüketilmektedir (9). Yabani kavunlar Orta Asya'dan Hindistan'a, Orta ve Batı Afrika'da kavunun zengin gen kaynağını oluşturmaktadır. Kavun varyetelerinin varyasyonu genel olarak Akdeniz havzası ile Orta Asya, Hindistan ile Doğu Asya ülkeleri arasında yoğunlaşmıştır (10).

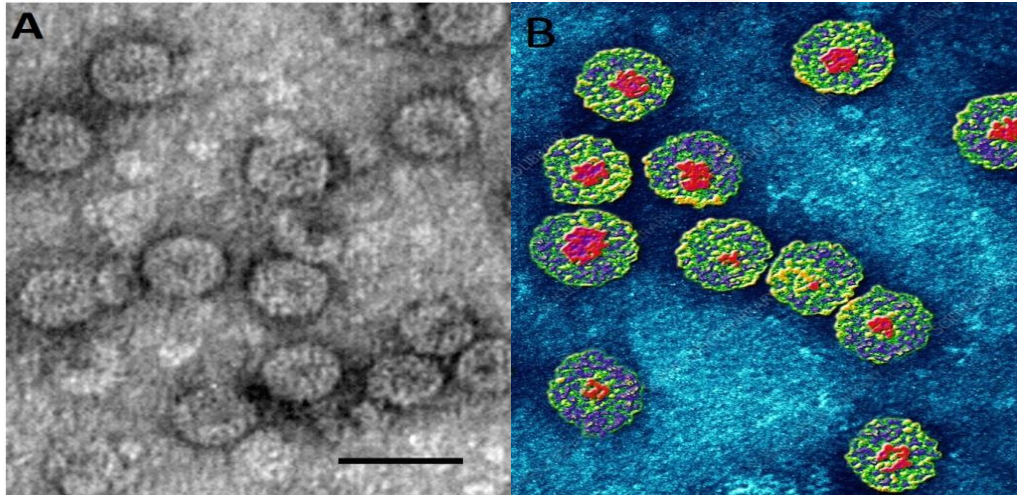
Geleneksel sınıflandırmada kavunun iki alt türe (*melo* ve *agrestis*) ayrıldığı kabul edilmektedir (11). En basit ve yaygın olarak kabul edilen sınıflandırmada tek bir yabani varyete (var. *agrestis* Naud) belirtilirken, altı tane kültüre alınmış varyete (*cantalupensis* Naud., *inodorus* Naud., *flexuosus* Naud., *dudaim* Naud., *momordica*, ve *conomon* Mak.) yer almaktadır (10, 12). Son zamanlarda yapılan sınıflandırma çalışmalarında bu varyeteler 15 botanik gruba (*cantalupensis*, *reticulatus*, *adana*, *chandalak*, *ameri*, *inodorus*, *chate*, *flexuosus*, *dudaim* ve *tibish* (subsp. *melo*), *momordica*, *conomon*, *chinensis*, *makuwa*, ve *acidulus* (subsp. *agrestis*)) ayrılmıştır (13). Ancak bu gruplardan bazıları hala tam olarak tanımlanmamış ve oldukça heterojen durumdadırlar.

Kavun gen kaynaklarında görülen büyük varyasyon araştırmacılara tarımsal açıdan önemli olan meyve kalitesi, olgunlaşma ve hastalık direnci gibi özelliklerin genetik arka planının araştırılması için büyük olanak sağlamaktadır. Bu mekanizmaların anlaşılması için yapılan çalışmalarda çeşitli F₂, yakın izogenik hatlar, double haploid hatlar, rekombinant ıslah hatları, farklı harita popülasyonları ve geriye melez hatlar geliştirilmiştir.

2.3. HIYAR MOZAİK VİRÜSÜ (CMV)

Kavun başta olmak üzere, kabakgiller familyası birçok virüse konakçı olmakta ve bu nedenle ürünlerde önemli kayıplar gerçekleşmektedir (14). Türkiye'de kabakgil yetiştirilen bölgelerde görülen başlıca virüsler; Hıyar Mozaik Virüsü (*Cucumber mosaic virus*, CMV), Kabak Sarı Mozaik Virüsü (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV), Kabak Mozaik Virüsü (*Squash mosaic virus*, SqMV), Karpuz Mozaik Virüsü II (*Watermelon mosaic virus II*,

WMV II), Papaya Halkalı Leke Virüsü (*Papaya ring spot virus*, PRSV) virüsleridir. Bu virüslerden özellikle CMV; yaygınlığı ve oluşturduğu zarar bakımından diğer virüslere göre önemli ekonomik kayıplar meydana getirmektedir (15). Bu virüsten kaynaklanan zararlanmalar dünya genelinde meydana gelse de, özellikle ılıman, tropik ve subtropik bölgelerde zararlanma daha barizdir. Ülkemizde ise özellikle İç Anadolu Bölgesinde Ankara ili kavun alanlarında yapılan bazı çalışmalarda Kırkağaç ve Kazan kavunlarında, özellikle CMV virüsünün büyük zarar verdiği belirtilmektedir (16). Bu virüsten kaynaklanan ekonomik kayıplar yıldan yıla büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Bu durumun nedeni ise viral taşınımında rol oynayan afet popülasyonunun mevsimsel koşullara göre değişmesidir. Örneğin, ilkbaharın serin geçmesi durumunda viral enfeksiyonlar sadece belirli bölgelerle sınırlı kalırken, daha ılık ve az yağışlı durumlarda enfeksiyon çok daha geniş alanları etkileyebilmektedir. Bu durumlarda enfeksiyon kaynaklı ürün kaybı %100'e ulaşabilir.



Şekil 2.1. A) Hıyar mozaik virüsü (CMV). B) CMV partikülleri (Virion-yeşil renkli partiküller, RNA-kırmızı partiküller)

İlk olarak 1916 yılında tanımlanan hıyar mozaik hastalığı virüs kaynaklı hastalıklar içinde ilk önce tanımlananlardan biridir (17). Bu hastalığa neden olan virüs Cucumovirus cinsinin bir üyesi olan hıyar mozaik virüsü (CMV)'dür. Yaklaşık olarak 85 familyaya ait 1200'den fazla tür bu virüsün doğal konukçusu durumundadır. Bu durum CMV'yi en geniş konukçu yelpazesine sahip virüslerden biri haline getirmektedir (18). Virüs bir konukçudan diğerine afet vektörleri ile taşınmaktadır. Bu virüs verimde önemli zararlara neden olurken meyve kalitesinde de bozulmalar görülmektedir. Bitki gelişiminin farklı dönemlerinde etkili olabilmektedir.

2.4. GENOM ORGANİZASYONU (CMV)

Bromoviridea familyasının diğer üyeleri gibi CMV genomu da 3 tane pozitif yönelimli RNA (RNA1, RNA2 ve RNA3) ve iki tane subgenomik RNA (RNA4 ve RNA4A)'dan oluşmaktadır. Her bir RNA'nın 3'-tRNA benzeri bir yapısı vardır (19). Farklı RNA'ların uzunlukları virüs suşları arasında farklılık göstermektedir. RNA1 3357 ve 3391 nt arasındaki bir uzunluğa sahipken, RNA2 3036 ve 3060 nt arasında bir uzunluğa ve RNA3 2197 ile 2220 nt arasında bir uzunluğa sahiptir (20). RNA1 111 kDa büyüklüğünde olan, metiltransferaz ve helikaz motifleri içeren ve viral replikasyonda görev alan protein 1a'yı kodlamaktadır. RNA2 97 kDa büyüklüğe sahip olan helikazı (2a) ya da 11 kDa büyüklüğe sahip 2b proteinini kodlamaktadır. RNA3 ise hücreden hücreye taşınımında görev alan ve 30 kDa büyüklüğe sahip 3a proteinini ya da virion oluşmasında görev alan 3b proteinini kodlamaktadır. RNA1 ve RNA2'nin virüs replikasyonu için şart olduğu bildirilmiştir. Replikasyondaki fonksiyonunun yanı sıra RNA1 hücreden hücreye ya da uzun mesafelere taşınımında da görev almaktadır (21). Ayrıca patojenitenin indüklenmesinde muhtemel bir rolü bulunmakta ve semptomların şiddeti ile ilgisi bulunmaktadır (22). 2a proteini virüs replikasyonunda görev alan virüs RNA polimeraz enzimidir. Bu protein düzenli bir replikasyon için 1a proteini ile etkileşim içinde bulunmak zorundadır. 2a proteininin N terminalinde bulunan 126 aminoasitlik bölgenin fosforillenmesi durumunda 2a proteinin 1a proteini ile etkileşime giremez ve replikasyon inhibe olur (23). Ayrıca 2a proteini hücreden hücreye harekette ve semptomların gelişiminde görev almaktadır (24). 2b proteini post transkripsiyonel gen susturmanın baskılayıcısı olarak bilinir (25). Ayrıca 2b proteininin salisilik asit aracılı antiviral savunma mekanizmasıyla ilgisi de bulunmaktadır (26). RNA3 tarafından kodlanan 3a proteini plasmodesmata adı verilen mikro kanalcıklar boyunca virüs hareketinde görev almaktadır (27). Virüsler bu kanallarda ribonükleoprotein kompleksi şeklinde hareket ederler (28). 3a proteini yönünden mutant olan virüsler normal tütün bitkilerini enfekte edemezler. Virüs kapsülasyonunda görev alan ve subgenomik RNA4 tarafından kodlanan coat proteini (CP) hem hücreden hücreye hem de uzun mesafelere olan hareketler için gereklidir. CMV' ler genomik RNA'lardaki dizi benzerliklerine göre alt grup I (WT) ve alt grup II (S) (29) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Yürütülen araştırmalar sonucunda CMV izolatlarının %70 grup I'e, %20'sinin de grup II' ye ait olduğu belirtilmiştir (30).

CMV alt grup I (CMV-FNY) ile alt grup II (CMV-LS) arasındaki farklılıkların kimerlerden kaynaklandığı, bunun ise virülans esnasında bitki *cmv1*'genine karşı virüsün

hareket proteini (MP: movement protein) tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir. CMV-FNY(alt grup I)'nin hareketli proteininde, dört protein grubunun veya protein gruplarının kombinasyonu ile *cmv1* geni aracılığı ile sağlanan direncin kırılabilirdiği görülmüştür (31). CMV-LS (alt grup II)'nin ise dirençli bitkide kendini replike edebildiği ve hücreden hücreye hareket edebildiği bildirilmektedir. Ancak CMV'nin virüsün sistemik taşınmasını floemde tespit edildiğine dair bir bulguya rastlanmamıştır. İmmunogold etiketleme deneyleri, virüsün dirençli bitkinin yapraklarındaki iletim demetlerinin dışındaki dokularda/hücrelerde (BS: bundle sheath (BS) cells: Demet Kılıf hücrelerinde) kaldığı, ancak vasküler parankima (VP) hücrelerine ya da ara hücreler (IC) ulaşamadığını dışarıdaki demet kılıf hücrelerinde kaldığı tespit edilmiştir (32). Bu nedenle, CMV sistemik enfeksiyonunun başlamasında veya engellenmesinde BS hücrelerinin moleküler kapı rolünü gördüğü gibi, floemde virüsün girişinin/engellenmesinin ise viral MP (hareketli protein)'ye bağlı olarak belirlendiği tespit edilmiştir.

Kavun (*Cucumis melo* L.)'da CMV'ye doğal dayanıklılık kaynağının/kalıtımının belirlenmeye çalışıldığı birçok araştırma rapor edilmiştir. Suşlara göre dayanıklılık spesifitesi gösteren 3 gen kaynağı (1-Freeman's Cucumber kavunu, 2- C-189 japon genotipi 3- C-189 ve Korenin PI 161375 kodlu "Songwhan Charmi" (SC) çeşididir) ön plana çıkmaktadır (33-35). Kavun LGXII- linkage grubunda yapılan doygun haritalama QTL çalışmasında SC'de mevcut olan CMV direncinin resesif, oligogenik ve kantitatif kalıtım gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Sonradan, LG XII harita popülasyonunda, tek bir gen haritalaması çalışmaları sonucu, CMV alt grup II suşlarına resesif dirençten sorumlu genin *cmv1* olduğu belirlenmiştir (31, 36). Ayrıca, CMV'nin daha agresif alt grup I suşlarına karşı direncin ise *cmvqw3.1* ve *cmvqw10.1* tarafından sağlandığı ve bunların *cmv1* ile birlikte ortak fonksiyon gösterdiği yine haritalama çalışmaları sonucu tespit edilmiştir (37). Diğer bir ifade ile CMV'nin iki alt grubuna da kavunda dayanıklılık geninin *cmv1* olduğu belirlenmiştir (38).

Bir çok meyve sebze ve süs bitkilerinde ekonomik kayıplara neden olduğu belirtilmektedir (30, 39) Kavun bitkilerinde, CMV enfeksiyonu sonrasında yapraklarda ilk belirti olarak yaprak damarları arasında yeşil-sarı lekelenmeler gözlemlenmektedir. Bu belirti sonrasında bu lekelenmeler mozaik halini almakta, daha ileri zamanlarda ise damarlar arasında kabarcık oluşumu başlamaktadır. Kavun meyvelerinde ise, koyu yeşil ve sarı lekelenmeler meydana gelmekte ve yeşil kısımlarda kabartılar oluşmaktadır. Bu durum meyvelerde şekil bozukluklarına yol açabilmektedir.

2.5. CMV İLE MÜCADELE

Bu patojenle tam anlamıyla mücadelede etkili olabilecek bir pestisit olmadığı için, en muhtemel kontrol stratejileri arasında virüse karşı genetik dayanıklılık öngörülmektedir. Ancak genetik dayanıklılığın artırılmasına yönelik çalışmalarda bazı kabakgiller ve ıspanak için hala tam anlamıyla başarı sağlanamamıştır. Yapılan detaylı çalışmalar sonucunda hıyarda yüksek dayanıklılığın oluşması için 3 adet homozigot dominant genin gerekliliği belirtilmiştir. Benzer şekilde diğer kabakgillerde de dayanıklılığın tespitine yönelik çalışmalarda önemli bir başarı elde edilememiştir. Her ne kadar bazı türlerde dayanıklılık söz konusu olsa da, türler arasındaki genetik uyumsuzluk dayanıklılığın diğer türlere aktarılmasında en büyük engeli teşkil etmektedir.

Kavun gen kaynaklarında bu virüse karşı dayanıklılığa yönelik yapılan çalışmalarda Kore'ye ait olan PI161375 nolu genotipin CMV-Song suşu hariç diğer bütün suşlara karşı dayanıklı olduğu belirtilmiştir. Hassas bir genotip olan Vedranta ve dayanıklı genotip olan SC (PI161375) kullanılarak oluşturulan yakın izogenik hatlar kullanılarak, çalışmada kullanılan bütün izolatlara karşı dayanıklılıktaki değişimi inceleyen bir QTL (LG XII) tespit edilmiştir. Çalışmada bazı minör QTL'ler tespit edilmişse de bunların izolata özgü oldukları belirtilmiştir.

Genetik direncin geliştirilmesi, virüs hastalıklarını kontrol etmenin en basit ve en etkili yöntemidir. Bu anlamda, özellikle hıyar ve ıspanak için bazı önemli gelişmeler kaydedilmiştir, ancak diğer türlerde başarı oranı değişkendir. Hıyarda (*Cucumis sativus*) CMV direncinin tarihi, doğuya özgü "Chinese Long" ve "Tokyo Long Green" çeşitlerinin ABD'de piyasaya sürüldüğü 1927 yılına kadar uzanır. Kapsamlı bir çalışmadan sonra, hıyarda yüksek düzeyde bir direnç için üç kısmi baskın (dominant) genin homozigotluğunun gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Diğer kabakgil türlerinde dirençli gen kaynağı bulma konusunda çok fazla ilerleme kaydedilmemiştir. Diğer kabakgil türlerinde direnç bulunmuş olsa da, türler arasındaki genetik uyumsuzluk, bu direncin yaz kabağı (*Cucurbita pepo*) gibi türlere aktarılmasının önünde bir engel olmaya devam etmektedir.

Virüslerin doğal konukçusu olarak yabancı otların ortadan kaldırılması, bu virüsün geniş konukçu yelpazesi nedeniyle genellikle zor bir iştir. Bununla birlikte, bitkilerin yakınında bulunan çok yıllık veya iki yıllık önemli yabancı otların birçoğunun ortadan kaldırılması,

virüs baskısını azaltabilir ve bu yöntem CMV'yi kontrol etmek için başarıyla kullanılmıştır. Ayrıca, bu virüse hassas olmayan mısır gibi bariyer bitkiler diğer hassas türlerin izolasyonunda kullanılabilir. CMV ile mücadelede kullanılan bir diğer yöntem mineral yağların ve insektisitlerin kullanımıdır. Bu yöntem, dönüm başına bitki sayısının yüksek olduğu domates ve biber gibi türlerde etkili olmakta, kavun ve karpuz gibi bitki sayısının az olduğu türlerde ise çok etkili olmamaktadır. Kavun gibi hassas türlerde enfeksiyonu önlemek için kullanılan yöntemlerden bir diğeri de, bitki büyümesinin ilk haftalarında göçmen yaprak bitlerini dışarıda bırakmak için sıra örtüsü kullanmaktır. CMV ile mücadelede çapraz koruma, bitkilerin koruyucu CMV suşları ile inoküle edilmesi ya da satRNA kullanımı gibi alternatif yöntemler de bulunmaktadır. Kapsit proteinlerini ya da satRNA'yı ifade eden transgenik domates hatlarında CMV'ye karşı önemli ölçüde direnç sağlanmıştır. Direnç mekanizmasını indükleyebilecek bakteriler ile muamele de CMV'ye karşı kısmi direnç sağlamaktadır (39).

2.6. RESESİF DAYANIKLILIK

Bakteri, virüs, fungus ve nematodların neden olduğu hastalıklar, dünya genelinde tarımsal üretimi olumsuz yönde etkileyen başlıca faktörler arasında yer almaktadır. Dünya tarımsal üretiminde meydana gelen kaybın yaklaşık %15'inin çeşitli hastalıklardan kaynaklandığı ve bu hastalıkların üçte birinden fazlasına çeşitli fitopatojen virüslerin neden olduğu belirtilmiştir (40). Şimdiye kadar genom dizisine dayalı olarak yapılan çalışmalar sonucunda 26 familyaya ait toplam 1500 virüs türü tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (41). Genomik yapılarına göre virüsler; (1) çift zincirli DNA virüsleri, (2) tek zincirli DNA virüsleri, (3) çift zincirli RNA virüsleri, (4) pozitif zincirli RNA virüsleri (ssRNA+), (5) negatif zincirli RNA virüsleri (ssRNA-) ve (6) retrovirüsler olmak üzere 6 gruba ayrılır.

Bitki virüsleri düşük kodlama kapasitesine sahip, hayat döngülerinin büyük kısmı konukçuya bağlı olan zorunlu hücre içi parazitler olarak bilinmektedir. Diğer bitki patojenlerinden farklı olarak, çoğu durumda virüslerle etkili bir şekilde mücadelede kullanılabilecek antibiyotik bulunmamaktadır. Bu yüzden bitkisel üretimde virüslerin kontrol altına alınması için dayanıklı çeşitlerin kullanılması, virüs bağışıklılığın sağlanması ya da tolerant bitkilerin üretilmesinde moleküler bitki ıslahı öncül rol oynamaktadır.

Bu hastalıkların kontrol altına alınmasında kullanılan tedbirleri bitki savunma mekanizmasına bağlı olanlar ve bağlı olmayanlar olmak üzere iki kategoride toplamak mümkündür. Bitki konukçu dayanıklılığı iki şekilde sağlanmaktadır; birinci yöntemde

dominant dayanıklılık genleri (R-genleri: Resistance genes) rol oynarken ikinci yöntemde ise bitki viral enfeksiyonunda kritik öneme sahip resesif gen alelleri devreye girmektedir. Dominant R genlerinin birçoğu nükleotit bağlayıcı ve lösine zengin tekrarlardan (NB-LRR) oluşan proteinleri kodlamakta ve aynı ailede yer alan diğer proteinlerde bakterilere ve funguslara karşı dayanıklılık sağlamaktadır (42, 43). Ayrıca NB-LRR tip R genlerinden farklı çeşitli genler de tanımlanmıştır (44). Bitkilerde virüslere karşı dayanıklılığı sağlayan ikinci mekanizma ise resesif dayanıklılık olarak bilinmekte ve bu özellikten sıklıkla faydalanılmaktadır (45). Aslında çeşitli türlerde virüslere dayanıklılık ile ilgili alellerin yarısı resesif karakterdedir (46). Resesif dayanıklılık özelliği; rastgele mutagenез, seleksiyon veya çaprazlama yöntemleriyle çeşitli türlere aktarılabilir (47). Virüslere karşı hassas olan bitkiler viral enfeksiyon döngüsü için uygun bir ortam sunmak zorundadırlar. Benzer şekilde virüslerde enfekte ettiği hücrelerde çoğalmak, plazmodesmata yoluyla hücreden hücreye hareket etmek, iletim sistemlerini kullanarak bütün bitkiyi kolonize etmek ve diğer bitkilerde enfeksiyon döngüsünü tekrardan başlatmak için çeşitli vektörlerle etkileşim içine girmek zorundadırlar. Oldukça küçük genom boyutundan dolayı viral gen ürünlerinin son derece sınırlı olması virüslerin zorunlu olarak enfeksiyon döngülerini tamamlamak için bitkilerin konukçu faktörlerini kullanmalarını gerektirmektedir. Bitki konukçu faktörlerinin ve virüslerin etkileşimi sonucu bitkide hassasiyet meydana gelmekte ve ilgili faktörün yokluğu ise dayanıklılığı sağlamaktadır. Bu durum pasif dayanıklılık olarak nitelendirilmekte, çünkü dayanıklılığın sağlanmasında herhangi bir bitki aktivitesine ihtiyaç duyulmamaktadır. Genetik açıdan konukçuda hassasiyeti sağlayan faktörler dominant aleller tarafından kodlandığı için, dayanıklılık çekinik karakterdeki aleller ile sağlanmaktadır (48). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda virüslere karşı dayanıklılık sağlayan 200 genin yarısından fazlasının kalıtımının çekinik karakterde olduğu, resesif kalıtımın diğer bitki patojenlerine kıyasla virüslere karşı dayanıklılıkta daha yaygın bir fenomen olduğu ve bu özelliğin kalıtımının monogenik karakterde olduğu belirtilmiştir (48, 49). Tanımlanan resesif dayanıklılık genlerinin büyük kısmının özellikle çeşitli potivirüslere karşı dayanıklılıkta etkili olduğu bilinmekte ve bilinen bitki virüslerinin %30'undan fazlasını bu ailede (Potivirüs) yer almaktadır (49). Bitki virüsleri konukçu transkripsiyon faktörlerini sadece kendi RNA'larının transkripsiyonunda değil, aynı zamanda enfeksiyon süreçlerinin gerçekleşmesi için gereken diğer faktörlerin transkripsiyonunda da kullanırlar. Bu yüzden konukçu faktörleri ilk zamanlar öncü viral faktörler olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları Transkripsiyon/replikasyon/taşıma ve metabolizma ile ilgili birçok konukçu faktörü tanımlanmış ve karakterize edilmiş ve bu faktörler bitki viral

hastalıklarının kontrol edilmesinde kullanılmıştır. Resesif dayanıklılık bitki savunma mekanizması için negatif bir düzenleyici olarak ya da virüsün hayat döngüsü/enfeksiyon aşamaları için önemli bir faktörü kodlayan gende meydana gelen mutasyonla karakterize edilmektedir (50). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda ökaryotik translasyon başlangıç faktörü ve bu faktörün çeşitli izoformları resesif dayanıklılıkta kullanılmıştır. Hıyar bitkisinde eIF4E geninin susturulmasıyla zucchini yellow mozaik virüs (ZYMV), papaya ringspot mozaik virüs-W (PRSV-W), ve hıyar vein yellowing virüse (CVYV) karşı tam dayanıklılık elde edilmiştir (51). Ayrıca çeltikte bulunan yeni bir eIF4E allelinin CRISPR/Cas9 ile hedeflenmesiyle rice tungro spherical virüs (RTSV)'e karşı tam dayanıklılık kazanılmıştır (52). Benzer şekilde CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak manyok ve *Arabidopsis*te yapılan çalışmalarda eIF (iso) 4E geninin hedeflenmesiyle cassava brown streak virüs (CBSV) ve turnip mosaic virus carrying GFP (TuMV-GFP)'e karşı dayanıklılık elde edilmiştir (53, 54). Manyok bitkisi novel cap-binding protein-1(nCBP-1) ve nCBP-2 gibi alternatif eIF4E-benzeri proteinleri kodlamaktadır. Bu genler CRISPR/SpCas9 sistemi ile hedeflendiğinde mutant hatlar cassava brown streak virüsüne karşı dayanıklılık göstermiştir (53). CRISPR-Cas9n-sitidin baz düzenleyici uygulamaları da benzer amaçla kullanılmaktadır. Bu sistem kullanılarak; *Arabidopsis* eIF4E1 hassaslık alleli N176K mutasyonu ile hedeflenerek clover yellow vein virüse (CIYVV) karşı dayanıklı bitkiler elde edilmiştir (55). Bütün bu çalışmalara rağmen, resesif dayanıklılıkla ilgili çalışmaların birçoğu eIF4E ve izoformları üzerinde yoğunlaşmıştır.

Bitkilerde dayanıklılıkla ilgili tanımlanmış birçok R geni bulunsa da bunların birçoğu düşük verim, zayıf aroma ya da küçük meyve boyutu gibi genellikle arzu edilmeyen karakterlerle ilgili olduğu için hedef gen olarak pek kullanışlı değildir. Benzer şekilde viral enfeksiyonda rol oynayan konukçu faktörlerinin bir kısmı bitki canlılığını da etkilemektedir. Örneğin gen susturulması ile elde edilen *Arabidopsis ssi2* hatlarında yüksek miktarlarda bir bitki savunma hormonu olan salisilik asit birikimi görülmekte ve hıyar mozaik virüsüne karşı dayanıklılık sağlanmakta ancak anormal fenotipler ortaya çıkmaktadır (56). Yapılan bazı çalışmalar (57-60) sonucu bitki ıslahında kullanılabilecek çeşitli aday genler belirlenmiştir. Belirlenen bu aday genlerden birçoğu Geminiviridae familyası (9 cins, 485 tür) ve Potyviridae familyasına (12 cins, 228 tür) ait virüsler ile ilgilidir ki bu iki familya tarımsal üretime en çok zararı veren bitki virüslerinin neredeyse yarısını oluşturmaktadır. Bu konukçu faktörleri fonksiyonlarına göre 4 grupta toplanmaktadır: rgs-Cam gibi bitki savunmasının negatif düzenleyicileri (1). Bu

düzenleyiciler RDR6 transkripsiyonunu baskılayarak ve otofaji yoluyla SGS3 proteinini (61) ya da homeodomain leucine zipper protein 1 (HAT1) ve ilgili genleri (HAT2 ve HAT3) deşrede ederek RNA susturma mekanizmasını inhibe ederler (62). Viral replikasyon/translasyon/taşınım ve hayat döngüsüyle ilgili diğler aşamalarda yer alan hassasiyet faktörleri (2): Tobamovirus multiplication 1 (TOM1) ve homologları viral replikasyonda rol oynarken (63), eEF1A ve eEF4s potivirüslerin translasyonda görev almakta, PCaP1 (plasma membrane-associated cationbinding protein-1) ve Sec24a(a COPII coatomer) proteinleri potivirüslerin taşınımında rol almaktadır (64). Enfeksiyonda rol oynayan proteinlerin etkinliğini göstermeleri için bu proteinlerin modifikasyonunda rol alan konukçu faktörleri (3): shaggy-ilişkilili protein kinaz (SK4-1, NsAK, vb.) geminiviral C4 proteinleriyle etkileşime girip onları fosforile ederek hastalık semptomlarının oluşmasına neden olurlar (65). Patates A virüsü coat proteini (CP) hücresel CK2 tarafından fosforilasyona uğrattılır ve fosforile CP proteinleri ubikitin ligaz CP-interacting protein ve HSP90 ile etkileşime girer ki bu durum viral replikasyon ve CP rotein birikimi için gereklidir (66). Virüs için avantaj sağlayan çeşitli hücresel süreçlerde yer alan konukçu faktörleri (4): fenilpropanoid metabolizma faktörü (kumarat:CoA ligaz 1, 4CL1) ya da ikincil hücre duvarı sentezinde rol oynayan faktörler (Bearskin2B, BRN2) bu grupta yer alır. Bu faktörlerin transkripsiyonel olarak susturulması geminivirüs enfeksiyonunu geciktirmektedir (65).

2.7. GENOM DÜZENLEME YÖNTEMLERİ

Genom düzenleme, genetik yapıda yer alan spesifik bir bölgenin tanınarak bu yapıda çeşitli modifikasyonlara imkân tanıyan bir sistemdir. Genetik materyali genomda rastgele yerleştiren geleneksel transgen teknolojisinden farklı olarak, bu sistemde spesifik bölgeler hedeflenir ve değişiklikler hedeflenen bu bölgeler üzerinde gerçekleşir. Bunu gerçekleştirmek için, genom düzenlemede spesifik dizileri tanıyan belirli restriksiyon nükleazlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nükleazlar sadece genomdaki belirli bir bölgeye bağlanmakla kalmaz, ama aynı zamanda moleküler bir makas görevi de görürler. Şimdiye kadar, genom düzenlemede dört farklı nükleaz ailesi kullanılmış ve bu nükleazların her biri farklı zamanlarda geliştirilmiştir. Bu nükleazları; mega nükleazlar, çinko parmak nükleazlar (ZFN), transcription activator-like effector-based nucleases (TALEN) ve düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar dizileri (CRISPR) şeklinde sıralamak mümkündür (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Bitki biyoteknolojisinde kullanılan genom düzenleme araçlarının karşılaştırılması

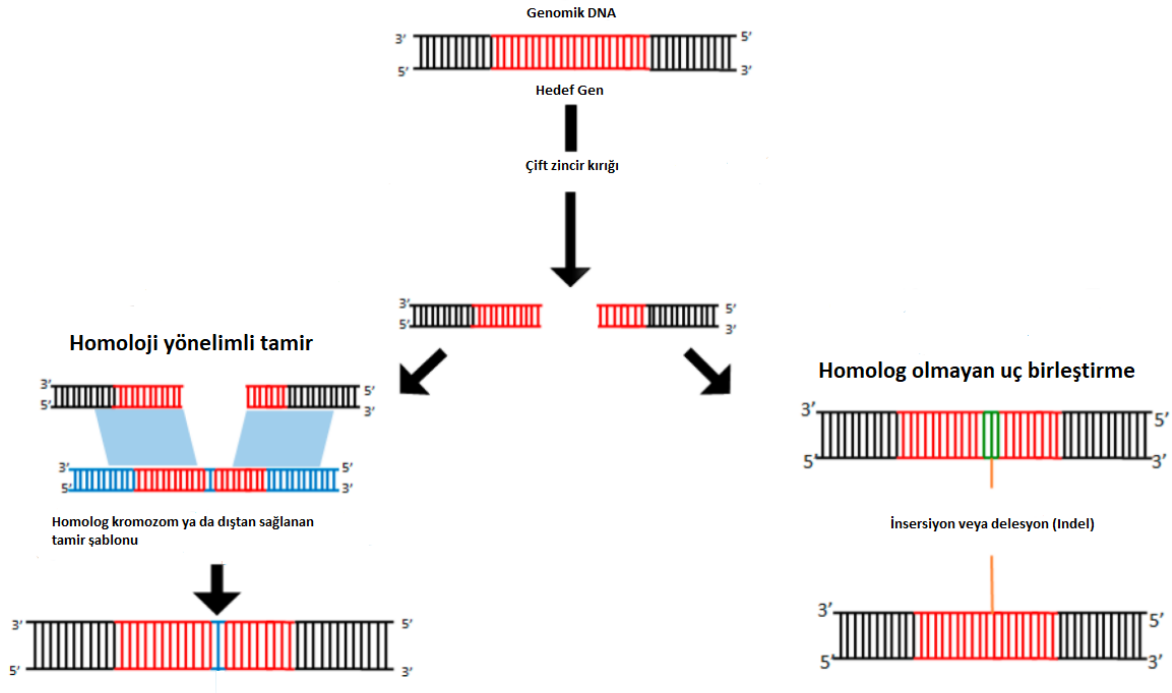
Özellikler	ZFN	TALEN	CRISPR
Çalışmanın tasarlanması ve vektör dizaynı	Tasarlanması çok zor ve maliyetli	Görece daha basit, ancak her bir hedef için tekrardan tasarlanması gerekir	Kolay ve hızlı tasarlanabilir.
Hedef dizi uzunluğu	18-24	24-59	20-22
Hedef bölgede yanlış eşleşme toleransı	Orta seviyede	Düşük	Oldukça yüksek
Kesim spesifikliğı	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Hedef tanıma etkinliğı	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Çok sayıda geni hedefleme yeteneğı	Yok	Uygulanabilirliğı çok zor	Aynı anda birden fazla gen hedeflenebilir
Off-target durumu	Nadir off-target durumu	Yüksek off-target durumu	Orta seviyeli off-target durumu
Kesim modülü	Fok I nükleaz domeini	Fok I nükleaz domeini	Cas9 proteini
Tanım modülü	Çinko parmak domeini	TALEN domeini	crRNA
Tamir mekanizması	NHEJ ve HR	NHEJ ve HR	NHEJ ve HR
Yavru döllerin transgen'den ari olma durumu	Evet	Evet	Evet

İlk olarak, genom düzenleme amacıyla 1980’lerde meganükleazlar kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra sırasıyla ZFN ve TALEN sistemleri geliştirilmiştir (67-69). Bu sistemlerden özellikle, ZFN ve TALEN sistemleri çok geniş şekilde kullanılmış, tarım ve klinik çalışmalarda kullanılmak üzere bazı ticari ürünler bile geliştirilmiştir (70). Ancak, bu sistemler hem pahalı, hem kullanımı zor, hem de zaman ve işçilik gerektiren sistemlerdir. Daha sonra, CRISPR sistemi araştırmacıların ilgisini çekmeye başlamış ve yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Kullanım kolaylığı, etkinliği ve düşük maliyeti CRISPR sistemini en etkili ve en yaygın kullanılan genom düzenleme yöntemlerinden biri haline getirmiştir. Bu özellikleri sayesinde farklı alanlarda ve farklı türlerde kullanım olanağı bulmuştur (71).

Karmaşık genomlarda bile tek bir uygulama ile eşzamanlı olarak farklı gen bölgelerini hedefleyen mutasyonları oluşturabilme kabiliyeti bu sistemin diğerlerinden ayıran en önemli özelliklerdendir.

Moleküler seviyede dizilere özgü nükleazlar, DNA tamir mekanizmaları tarafından düzeltilen çift zincir kırıkları oluşturulmaktadır. Çift zincir kırıklarına yanıt olarak devreye giren temel tamir mekanizmaları hataya meyilli uç birleştirme (NHEJ/Non-homologous end joining) ve homolog rekombinasyondur (HR/Homologous recombination) (Şekil 2.2). NHEJ durumunda çift zincir kırığının olduğu bölgede rastgele insersiyon ve delesyonlar (indel) oluşmaktadır (72). Tam tersine HR durumunda tamir mekanizması hataya çok daha az meyillidir ve spesifik dizi değişimlerine ve dizi yerleştirmelerine imkan tanımaktadır (73).

Çift zincir kırıkları NHEJ ya da HR ile tamir edilebilir. NHEJ çoğunlukla insersiyon ya da delesyon ile sonuçlanırken, HR ile yapılan tamir genellikle yüksek güvenilirlikte ve doğrulukta gerçekleşmektedir (74).



Şekil 2.2. Çift zincir kırıklarının DNA tamir mekanizmalarını indüklemesi

Homolog rekombinasyonun meydana gelme sıklığının NHEJ tamir mekanizmasına göre çok daha düşük frekansta meydana gelmesi istenilen dizilerin hedef genoma aktarılmasını çok zor bir hale getirmektedir (75). Bu yüzden somatik hücrelerde tercihen kullanılan tamir mekanizması NHEJ'dir ve genom düzenlemede en yaygın kullanılan yöntemdir (76).

2.7.1. CRISPR/CAS SİSTEMİ

CRISPR–Cas sistemi, prokaryotlarda viral genoma ait bilgileri depolayarak olası faj enfeksiyonunu önleyen adaptif bir bağışıklık sistemidir. Sistem, doğrudan tekrarlar olarak adlandırılan tekrarlı nükleotid dizileriyle çevrili viral DNA'dan bir kesit içermektedir. Bu doğrudan tekrarlar Cas proteinleri adı verilen proteinleri kodlayan diziler ile çevrilidir. Bu sistem, yeniden programlanmış endonükleazları hedef gene yönlendirmek için yapay olarak düzenlenmiştir. CRISPR, DNA/RNA'yı diziye özgü bir şekilde değiştiren ve yeniden programlanabilen bir genom düzenleme tekniğidir. CRISPR ile ilişkili endonükleaz Cas proteinleri, genleri hassas bir şekilde modifiye etmek için çeşitli şekillerde kullanılmıştır. Bu sistem, tarım alanında, terapötik ve bulaşıcı ajanlarda, gıda endüstrilerinde ve biyoenerjide başarıyla uygulanmaktadır.

2.7.1.1. Tarihçe

CRISPR tekrarları ilk olarak 1987'de tesadüfen keşfedilmiştir. *Escherichia coli*'de amino peptidazın dönüştürülmesinden sorumlu olan alkalın fosfataz izozimini kodlayan gen dizisinin belirlenirken, genin downstream yönünde özel bir tekrar dizisi saptanmıştır (77). Daha sonra yapılan çalışmalarda, benzer tekrar dizileri farklı *E. coli* suşlarında ve *Shigella dysenteriae* ve *Salmonella enterica* gibi farklı enterobakterilerde de tespit edilmiştir.

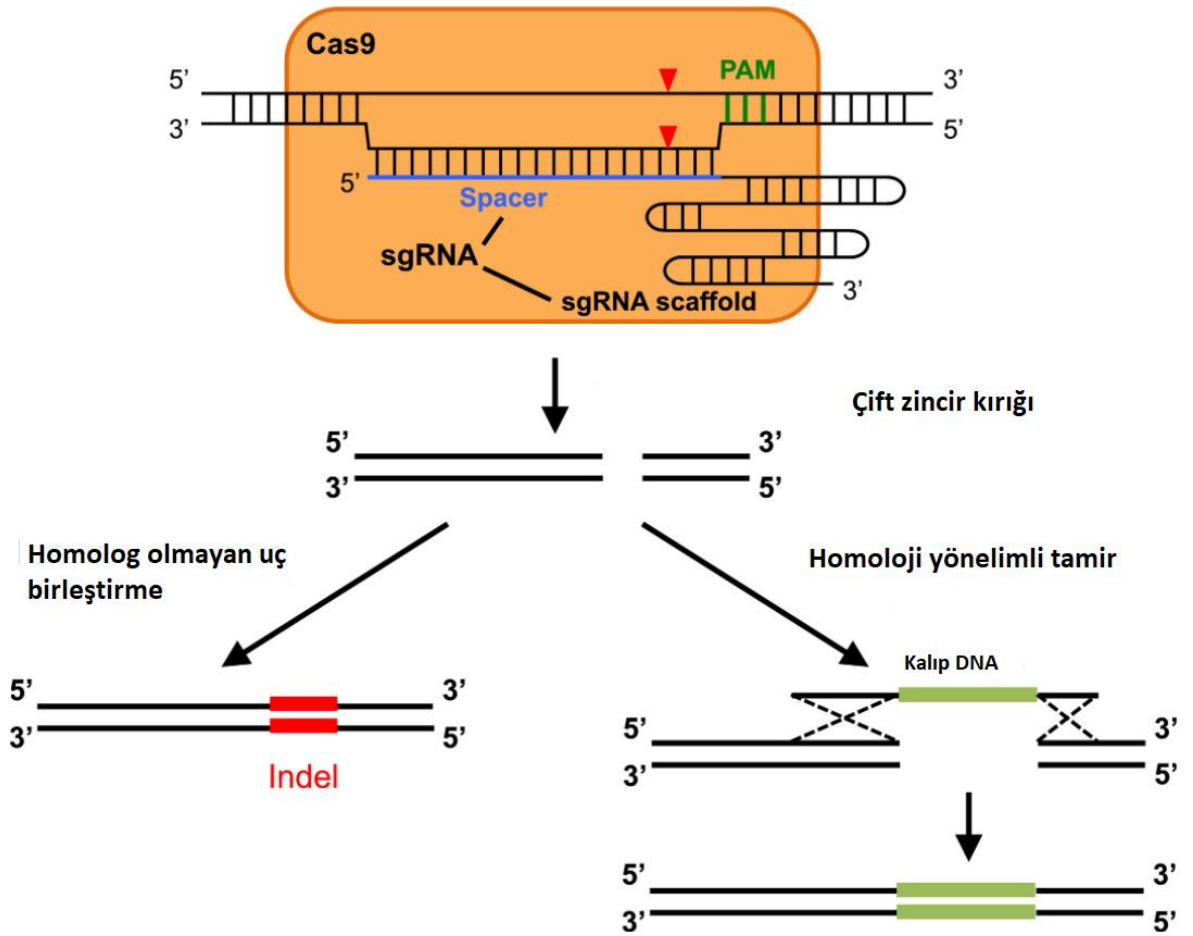
Arkeal CRISPR dizileri ilk olarak 1993 yılında bir halofit arkea olan *Haloferax mediterranei* üzerine çalışılırken bulunmuştur. Bu araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada *E. coli* ile dizi benzerliği göstermese de düzenli aralıklarla bölünmüş uzun DNA dizilerine rastlamışlardı (77).

Ancak, bu dizilerin fonksiyonları keşfedildikten 20 yıl sonrasına kadar da tam olarak anlaşılmamış, bu süreç boyunca bu dizileri isimlendirmek için farklı öneriler sunulmuştur. Mevcut durumda kullanılan terim (CRISPR) ilk olarak Jansen, Embden (78) tarafından önerilmiştir ve bu öneri bilim camiası tarafından hızlıca kabul görmüştür, çünkü bu dizilerin karakteristik özelliklerini en iyi tanımlayan isimlendirme bu isimlendirme olmuştur. Aynı çalışmada, CRISPR içeren organizmalarda, birçoğu oldukça korunmuş olan genlerle bağlantılı lokuslar tanımlanmıştır. Bu genler CRISPR bağlantılı (*cas*) genler olarak tanımlanmış ve ilk dört *cas* geninin CRISPR lokusuna çok yakın bir bölgede kümelandığı görülmüştür. Aynı dönemde, Makarova, Aravind (79) tarafından bakteriler ve arkealar üzerine yapılan karşılaştırmalı genomik çalışmalarda da bu genler tespit edilmiştir. Bu araştırmacılar, bu genlerin nükleaz ve helikazları kodladıkları için DNA metabolizmasında bir rolünün olabileceğini düşünmüşlerdir.

2.7.1.2. Crispr/Cas9 Sisteminin Parçaları

CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme sistemi, hedef bölgeye bağlanacak olan (ı) sentetik 20 nükleotitlik gRNA, (ıı) PAM dizisinden 3 yada 4 nükleotitlik uzaklıkta kesim yapacak olan Cas9 nükleazını gerektirmektedir. Cas9 nükleazı ise, RuvC ve HNH benzeri domeinden oluşmaktadır. Bu domeinlerden her biri karşılıklı zincirlere bağlanarak çift zincir kırığı meydana getirmektedir. CRISPR sisteminin doğal hali ve sentetik formları arasında DNA'nın işlenmesi açısından farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin doğal halinde gRNA ve tracrRNA ayrı ayrı bulunurken laboratuvar ortamında geliştirilen versiyonlarda bunlar sgRNA olarak olarak tek bir kompleks altında toplanmışlardır. Özet olarak,

CRISPR sisteminin etkinlik gösterebilmesi için, hedefdiziye bağlanacak olan sgRNA, hedef bölgenin 3' ucunda bulunması gereken protospacer adjacent motif (PAM) ve karşılıklı zincirlerde kırıklar meydana getirecek olan Cas9 endonükleazına ihtiyaç duyulmaktadır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme mekanizmasının şematik gösterimi.

Cas9-sgRNA kompleksi PAM dizisine sahip herhangi bir DNA bölgesine bağlanır (yeşil renkli). Spacer bölgenin hedef DNA bölgesine eşlenik olması durumunda, Cas9 enzimi PAM dizisinin 3 baz yukarısından çift zincir kırığı oluşturur (Kırmızı oklar). Bu çift zincir kırığının hataya meyilli olması durumunda, kırığın meydana geldiği noktada indel mutasyonları meydana gelir. Bu mutasyonların genin ekzon ya da promotör bölgesinde meydana gelmesi sonucu gen susturulmuş olur. Ancak, çift zincir kırıklarının tamiri

sırasında bir şablonun olması ile homoloji yönelimli tamir (HDR) devreye girer ve bu durum herhangi bir genin genoma entegre edilmesini mümkün kılar (Kesikli çizgiler) (80)

Rehber RNA, Cas9'un, olası birçok lokus içerisinde spesifik bir genomik yeri kesmesini sağlar. Cas9 endonükleazının hedef genomik lokusa bağlanmasına, hem hedef diziyi içeren rehber RNA (gRNA) hem de hedef sekansın bitişiğindeki DNA motifi (PAM) olarak bilinen 3 bazlı bir dizi aracılık eder. Çift zincirli DNA'nın Cas9 tarafından kesilmesi için, rehber RNA ile hedeflenen dizinin hemen 3'ucunun PAM sekansını içermesi gerekir. Hem PAM dizisi hem de rehber RNA (gRNA) olmadığında, Cas9 hedef diziye bağlanamayacak ve de kesemeyecektir. Farklı organizmalardan elde edilen Cas9 enziminin homologları ya da çeşitli lablarda geliştirilen mutant Cas9'lar farklı PAM dizilerine sahiptir. Farklı PAM dizileri, araştırmacıların farklı genomik lokusları hedefleyebilmesini sağlar. Cas9 ve varyantlarının 2 endonükleaz domaini vardır: N ucu RuvC benzeri nükleaz domaini ve protein merkezine yakın HNH benzeri nükleaz domaini, PAM interacting domain (PI). Cas9'un hedefe bağlanması ile hedeflenen DNA zincirinin karşılıklı kesebilmesi için bu 2 nükleaz domaininin gerekli pozisyona getirilmesi gerekir. Bu yüzden, Cas9 konfirmasyonel değişikliğe uğrar. HNH sgRNA'ya eşlenik olan zinciri keserken, RuvC diğer zinciri keser. Böylece, Cas9 aracılığı ile oluşan DNA hasarının nihai sonucunda, hedef DNA üzerindeki PAM dizisinin yaklaşık 3-4 baz yukarısında çift zincir kırığı oluşur.

Çizelge 2.2. Genom düzenlemede kullanılan doğal ya da genetik açıdan modifiye edilmiş Cas enzimleri

İsim	Kaynak	CRISPR/ Cas	PAM*	Lokasyon	Referans
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Tip II	NGG	3'	(81, 82)
SaCas9	<i>Streptococcus aureus</i>	Tip II	NNGRRT	3'	(83)
FnCas9	<i>Francisella novicida</i>	Tip II	NGG	3'	(84)
NmCas9	<i>Neisseria meningitidis</i>	Tip II	NNNNGATT	3'	(85)
CjCas9	<i>Campylobacter jejuni</i>	Tip II	NNNNRYAC	3'	(86)
St1Cas9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Tip II	NNAGAAW	3'	(87, 88)
St1Cas9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Tip II	NGGNG	3'	(87, 88)
AsCas12a	<i>Acidaminococcus sp.</i>	Tip II	TTTV	5'	(89)
LbCas12a	<i>Lachnospiraceae bacterium</i>	Tip II	TTTV	5'	(89)
FnCas12a	<i>Francisella novicida</i>	Tip II	TTTN ya da YTN	5'	(89, 90)
LsCas13#	<i>Leptotrichia shahii</i>	Tip VI			(91)
Cas14 ^{&}	Archaea				(92)
FnCas9 variant	Modifiye FnCas9	Tip II	YG	3'	(84)
Modified	Modifiye SpCas9	Tip II	NGA ya da NAG	3'	(93)
eSpCas9	Modifiye SpCas9	Tip II	NGG	3'	(94)
SpCas9-NG	Modifiye SpCas9	Tip II	NG	3'	(95)
xCas9	Modifiye SpCas9	Tip II	NG	3'	(96)
Sniper-Cas9	Modifiye SpCas9	Tip II	NGG	3'	(97)
evoCas9	Mutant SpCas9	Tip II	NGG	3'	(98)

Çizelge 2.2. (Devamı)

HypaCas9	Mutant SpCas9-HF	Tip II	NGG	3'	(99)
Cas9-NRNH	Modifiye SpCas9	Tip II	NRNH	3'	(100)
SpG	Modifiye SpCas9	Tip II	NGN	3'	(101)
SpRY	Modifiye SpCas9	Tip II	NRN or NYN	3'	(101)

* N herhangi bir nükleotittir. R, A veya G'dir. H, A, C veya T'dir. Y, C veya T'dir. W, A veya T'dir. # Cas13, DNA yerine RNA dizilerini hedefler; \$ Cas14, PAM dizisine ihtiyaç duymaz ve dsDNA'lar yerine ssDNA'ları hedefler

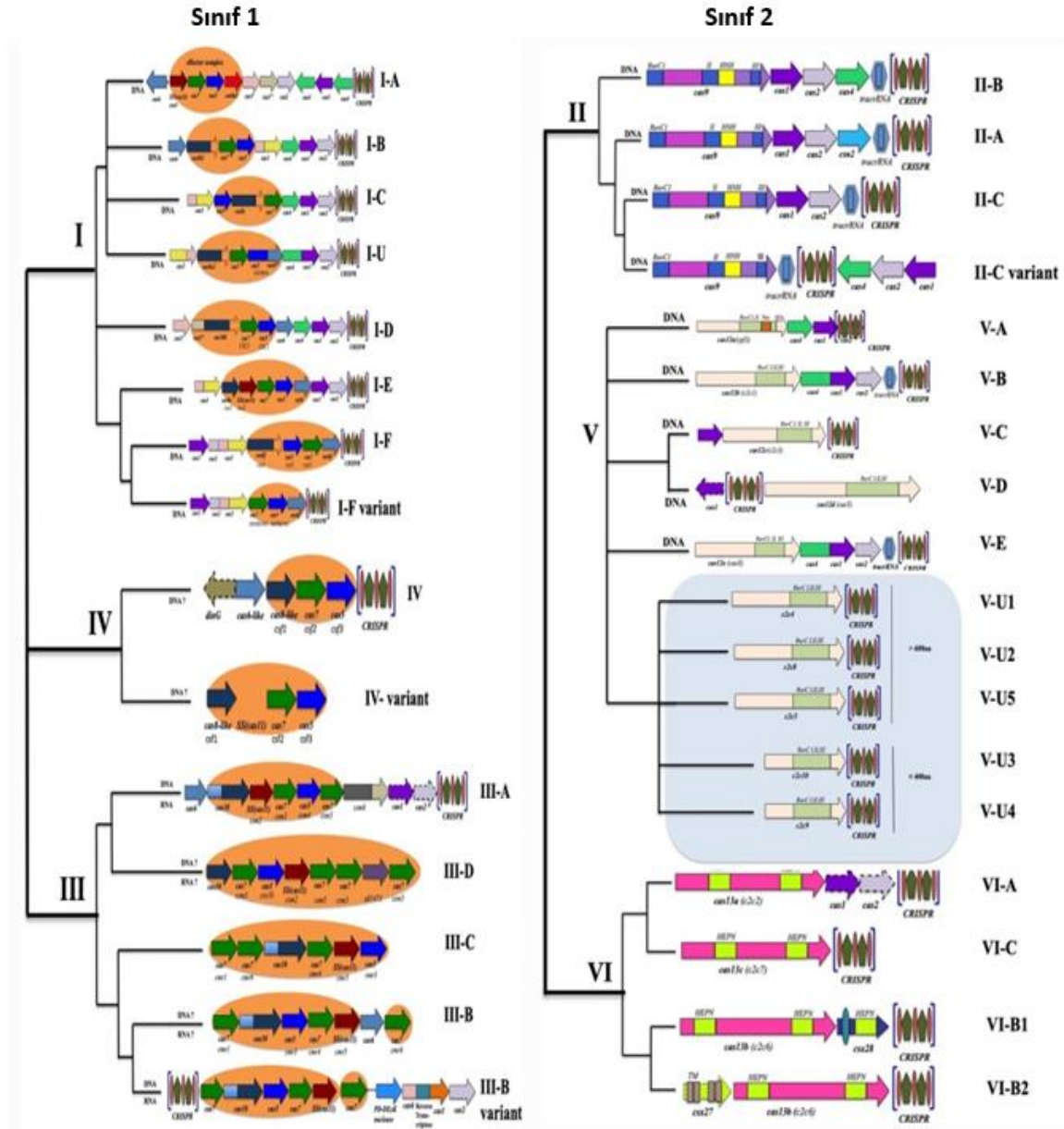
Farklı türlerden elde edilen, ancak birbirleriyle büyük benzerlik gösteren farklı Cas enzimleri farklı PAM dizilerini tanırlar ve bu durum Cas ve PI etkileşimi için özgünlük gösterir (Çizelge 2.2.). Örneğin en yaygın kullanılan spCas9 sadece NGG dizisini tanıırken (81), *S. thermophilus* bakterisinden elde edilen Cas9 enzimi NNAGAAW dizisini tanımaktadır (87). Ayrıca, farklı Cas sistemleri hedef bölgenin farklı yönlerinde yer alan PAM dizilerine de ihtiyaç duyarlar. Cas enzimlerinin birçoğu, 3' yönünde yer alan PAM dizisine ihtiyaç duyarken, Cas12 gibi enzimler hedef DNA'nın 5' ucunda yer alan PAM dizisine ihtiyaç duyar.

PAM gereksinimi genom düzenleme için ulaşılabilir DNA dizilerini sınırlandırmaktadır. Araştırmacılar, mümkün olduğu kadar fazla DNA dizisini ulaşılabilir yapmak için PAM dizilerini artırmaya yönelik çalışmalar yürütmektedir. Bu anlamda yapılan çalışmaları iki kategoride toplamak mümkündür: (1) farklı PAM gereksinimlerine sahip yeni kaynaklar bulmak, bu strateji özellikle farklı organizmalardan yeni Cas proteinleri bulma temeline dayanır ve Cas ailesinin genişletilmesine büyük katkı sunar. (2) Mevcut PAM dizileri üzerinde modifikasyonlar yaparak PAM dizilerini daha ulaşılabilir hale getirmektir.

CRISPR sisteminin bir diğer parçası da nükleer lokalizasyon sinyalıdır (NLS). Cas proteinlerinin nükleusa aktarılması büyük ölçüde proteinlerin N ve/veya C ucunda bulunan bu sinyale bağlıdır. 5'/3' uçlarında bulunan NLS, Cas proteininin nükleusta düzenli bir şekilde fonksiyon göstermesi için oldukça önemlidir. Şimdiye kadar bitkilerde yapılan çalışmalarda, simian vacuolating virüs 40 (SV40) ve nükleoplazmin gibi çeşitli NLS'ler kullanılmıştır (102).

2.7.1.3. CRISPR/Cas Sisteminin Sınıflandırılması

CRISPR/Cas sistemleri çok geniş bir ailedir. Yapılan son çalışmalar bu sistemleri sekans benzerlikleri ve filogenetik analizlere dayalı olarak iki sınıf, 6 tip ve 33 alt tipe ayırmaktadır (103) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Sınıf 1 ve 2 CRISPR/Cas sistemleri; CRISPR/Cas lokuslarına, efektör proteinlerin domain yapılarına ve farklı PAM/PFS dizisine sahip tahmini hedef nükleik asitlere göre sınıflandırılması (104)

Yeni Cas proteinleri tanımlandıkça sınıflandırma daha da genişleyecektir. İlk grup CRISPR sistemlerinde hedef DNA'nın kesilmesi için birçok protein bir arada çalışır. İkinci grupta ise bütün işlemler tek bir protein tarafından gerçekleştirilir. İlk grup sistemleri

oluşturmak ve transformasyonunu sağlamak daha zordur. Bu yüzden hali hazırda ikinci sınıf CRISPR sistemleri kullanılmaktadır.

2.7.1.4. CRISPR/Cas9 Vektörünün Aktarım Yöntemleri

CRISPR/Cas sistemlerinin bitkilere aktarımı ve genetik açıdan modifiye bitkilerin eldesi genom düzenlemenin en önemli basamaklarındandır. DNA, RNA ve ribonükleoprotein (RNP) gibi CRISPR aracılı düzenleme araçları, bitki hücrelerine protoplast transfeksiyonu, *Agrobacterium* aracılı tranfer DNA (T-DNA) transformasyonu ve partikül bombardımanı şeklinde aktarılmaktadır. Polietilen glikol (PEG) aracılı aktarım daha çok geçici ifade çalışmalarında kullanılmakta, partikül bombardımanı ve *Agrobacterium* aracılı transformasyon ise genetik açıdan modifiye edilmiş bitkilerin elde edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (105).

PEG (Polietilen glikol) aracılı transformasyon, PEG varlığında gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu yöntem; mısır, soya fasulyesi, *A. thaliana*, buğday, çeltik ve tütün protoplastlarına başarıyla uygulanmıştır. Bu yöntemde, Cas9 ve sgRNA içeren vektörler PEG varlığında protoplastlar ile birlikte inkübe edilir. CRISPR kasetlerinin PEG aracılı aktarımı, ilk olarak mısır bitkisinde gerçekleştirilmiş, bu sistemde gRNA için U3 promotörü ve Cas9 için CaMV35S promotörü kullanılmıştır (106). Bu sistemde, plazmit DNA'sı su içinde çözünür bir steril hale getirmek için filtrelendir ve protoplast süspansiyonu ile karıştırılır. Birkaç dakika sonra gerekli miktarda PEG karışıma yavaşça eklenir. Daha sonra, protoplastlar uygun rejenerasyon ortamlarına alınır (107). PEG aracılı aktarım yönteminin en önemli avantajı, bu yöntemle elde edilen bitkiler vektör içermediği ya da DNA'dan ari oldukları için yani transgen içermedikleri için daha kabul edilebilir olması ve etik açıdan daha az endişeye neden olmalarıdır. Bu yöntemin en büyük dezavantajı ise; protoplast izolasyonunun zor olması ve süspansiyon hücrelerin hazırlanmasındaki zorluklardır. Diğer bir sorun da; bazı inatçı bitkilerin rejenerasyonunda karşılaşılan zorluklardır (108).

Aktarım yöntemlerinden bir diğeri de partikül bombardımanıdır. Bu yöntem gen tabancası ya da biyolistik tabanca olarak da bilinmektedir. Bu sistemde, Cas9/gRNA kompleksini taşımak için genellikle altın, gümüş ya da tungstenden yapılmış partiküller kullanılır. CRISPR/Cas9 kompleksi, yüksek basınç uygulanarak katlanmış partiküllerle aktarılır. Bu metot, helyum basıncı, partikül boyutu, hedef mesafe ve kullanılacak eksplant gibi çeşitli

optimize edilmiş koşullar gerektirmektedir. Transforme bitkiler, rejenerasyon ortamında uygun basınç kullanılarak rejenere edilir. Bu sistem kullanılarak, Cas9/gRNA kompleksi mısır (109) ve patates (110) bitkilerine başarılı bir şekilde aktarılmış ve bu bitkiler başarıyla rejenere edilmiştir. CRISPR/Cas9 binary vektör gerekliliğinin olması bu sistemin en güçlü yönünü oluşturmaktadır. Diğer taraftan, genomda herhangi bir bölgeye entegre olması, maliyetinin nispeten yüksek olması ve partikül bombardıman bölgelerinin kontrol edilememesi sistemin en önemli dezavantajlarıdır (108).

CRISPR/Cas9 aktarımında en yaygın kullanılan yöntemlerden biri de *Agrobacterium* aracılı aktarım yöntemidir. İlk önce, Cas9 ve gRNA ifade kasetlerini içeren vektörler *Agrobacterium* suşlarına transforme edilir. Daha sonra, CRISPR kasetlerinin, bitkilerin kallus ve yaprak diski gibi eksplantlara *Agrobacterium* aracılı genetik transformasyonu gerçekleştirilir. *Agrobacterium* aracılı aktarımda transformasyon etkinliği ve düzenleme etkinliği partikül bombardımanına göre daha yüksektir. Düşük rejenerasyon ve transformasyon etkinliğine sahip monokot bitkilerde de *Agrobacterium* aracılı aktarım yöntemi kullanılmaktadır. Monokot ve dikot bitkilerde kullanılmak üzere tasarlanmış ve yüksek düzenleme etkinliğine sahip CRISPR/Cas9 vektörleri dizayn edilmiştir (111). Bu yöntemin en güçlü yönü, transformasyon etkinliğinin diğer bilinen aktarım yöntemlerine göre daha yüksek olması, maliyetinin düşük olması, gerekli malzemelerin kolay ulaşılabilir olması ve geniş uygulama alanına sahip olmasıdır. En önemli dezavantajı ise binary vektör kullanımıdır (108).

2.7.1.5. gRNA ve İfade Kasetlerinin Tasarımında Kullanılan Biyoinformatik Araçlar

gRNA dizisindeki bir nükleotitlik farklılık, hedef dışı mutasyona neden olacağı için, gRNA tasarımı büyük önem taşımaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda kullanılan gRNA'lar kullanılarak gRNA dizaynı için gerekli olan bazı kriterler geliştirilmiştir (112). Hayvanlardakinden farklı olarak, bitkilere yönelik dizayn edilen gRNA içindeki GC oranı etkinliği ve fonksiyonelliği etkilememekte ve %30-80 arası GC oranına sahip gRNA'lar başarılı bir şekilde etkinlik göstermektedir. gRNA'lar genellikle 20-23 bazlık hedef dizi içermektedir (113). Ayrıca, gRNA'nın kendisi de hedef tanımlamadan kaçınmak için kendisiyle 6 bazdan fazla eşlenik olmamalıdır (112). gRNA dizaynında dikkat edilmesi gereken bir diğer hususta gRNA'ların ikincil yapılarıdır. gRNA'lar dört tane sap ilmeğe sahiptir: Sap ilmek RAR (Tekrar ve ters-tekrar bölgeler), 1,2 ve 3. İkincil yapı analizleri,

Sap ilmek 1'in Cas9-gRNA-DNA kompleksinin fonksiyonu için gerekli olmadığını göstermiştir. Diğer taraftan RAR, sap ilmek 1 ve 2 bu kompleksin düzenli bir şekilde çalışması için gereklidir (112).

Çizelge 2.3. gRNA dizaynında kullanılan biyoinformatik araçlar

Program (Alfabetik sıra)	URL	Referans
Benchling	https://benchling.com/	
Breaking Cas	http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/	(114)
CCTop	http://crispr.cos.uni-heidelberg.de	(115)
CGAT	http://cbc.gdcb.iastate.edu/cgat/	(116)
CHOPCHOP	http://chopchop.cbu.uib.no	(117, 118)
CLD	https://github.com/boutrosfab/cld	(119)
CRISPOR	http://crispor.tefor.net	(120, 121)
CRISPR direct	http://crispr.dbcls.jp	(122)
CRISPR-GEd	http://skl.scau.edu.cn	(123)
CRISPR GRNA Design Tool	https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/input?multipleContacts=false	
CRISPR MultiTargeter	http://www.multicrispr.net	(124)
CRISPR-P	http://cbi.hzau.edu.cn/CRISPR2/	(124-127)
CRISPR-Local	http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR-Local/	
CRISPR- PLANT	https://www.genome.arizona.edu/crispr/	(123, 128)
CRISPR Primer Designer	http://plantsignal.cn/CRISPR/crispr_primer_designer.html	(129)
CRISPR RGEN Tools	http://www.rgenome.net	(130-135)
CRISTA	http://crista.tau.ac.il	(136)
CT-Finder	http://bioinfolab.miamioh.edu/ct-finder/	(133, 137, 138)
CRISPR-DT	http://bioinfolab.miamioh.edu/CRISPR-DT/	
CRISPR-RT	http://bioinfolab.miamioh.edu/CRISPR-RT/	
DESKGEN	https://www.deskgen.com/landing/cloud	(139)
Dharmacon CRISPR Design Tool	https://dharmacon.horizondiscovery.com/gene-editing/crispr-cas9/crispr-design-tool/	
E-CRISP	http://www.e-crisp.org/E-CRISP/	(140)
GT-Scan	https://gt-scan.csiro.au	(141)
PhytoCRISP- Ex	http://www.phytocrispex.biologie.ens.fr/CRISP-Ex/	(142)
Synthego CRISPR Design Tool	https://design.synthego.com/#/	
WheatCrispr	https://crispr.bioinfo.nrc.ca/WheatCrispr/	

gRNA'lar manuel ya da biyoinformatik araçlar kullanılarak tasarlanabilir. Şimdiye kadar, potansiyel hedef dışı bağlanmaları belirlemek, restriksiyon enzimlerinin kesim yerlerini belirlemek ve gRNA tasarımı için birçok program geliştirilmiştir (Çizelge 2.3.). Ancak, PAM dizisindeki farklılıktan dolayı bu konularda daha fazla gelişmeye ihtiyaç duyulmaktadır (gRNA'ların 5' ve hedef bölgenin PAM dizisi arasındaki etkileşim, düzenleme etkinliğinde önemli farklılıklara neden olmaktadır) (108).

2.7.1.6. Hedeflenen Bölgelerde Mutasyon Tespiti

CRISPR/Cas9 aracılı mutant genotiplerin doğrulanması ve sonuçların analiz edilmesi için, ilk önce genomda meydana gelmesi beklenen mutasyonların tespit edilmesi gerekmektedir. Bu işlem farklı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Örneğin; hedeflenen bölge restriksiyon kesim bölgesi içeriyorsa, hedef bölgedeki mutasyonlar kesim bölgesini parçalayacaktır ve bu durum restriksiyon enzimleriyle doğrulanabilir (143). Benzer şekilde, GFP, YFP, RFP ya da beta glukuronidaz gibi hedef bölgede bulunan raportör genler mutasyonların belirlenmesinde kullanılabilir (144).

Mutant veya yabani tip hatların PCR ürünlerinin erime eğrileri arasındaki farklılıklar; yüksek çözünürlüklü erime teknolojisi (HRMT) kullanılarak mutasyon tespitinde kullanılabilir. Bu yöntem mutasyon tespitinde etkili bir yöntem olarak kullanılsa da, DNA dizisinde meydana gelen değişikliği karakterize edemediği için, bu yöntemin kullanımı sınırlıdır ve mutasyonlar hakkında sadece bir ön bilgi verir (145).

Mutasyon tespitinde kullanılan en etkili yöntem DNA dizilemedir. Yeni nesil dizileme teknolojileri (NGS) tek nükleotitik mutasyonların tespitinde oldukça tutarlı ve başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (146). Sanger dizileme yöntemi, basit ya da kimerik mutasyonları başarıyla tespit edebilse de; NGS'ler gibi derin dizileme yöntemleri, nadir, çoklu ya da daha karmaşık mutasyonları genom seviyesinde tespit edebilmekte ve rutin bir şekilde kullanılmaktadır (147).

2.7.1.7. Bitki Biyoteknolojisinde CRISPR/Cas9 Uygulamaları

CRISPR/Cas 9 aracılı gen düzenleme yöntemi, Cas enzimine ve çift zincir kırık tamir mekanizmasına bağlı olarak birçok farklı alanda kullanılabilmektedir. Gen susturma CRISPR/Cas9 sistemlerinin en yaygın uygulamasıdır. Bu sistem birçok bitki türünde farklı gen gruplarının susturulmasında başarıyla kullanılmıştır. En yaygın kullanılan

CRISPR/Cas9 ve diğer CRISPR sistemleri çift zincirli DNA'yı keser ve genellikle çift zincir kırığı meydana getirirler. Birçok durumda çift zincir kırığı NHEJ ile tamir edilir. Bu tamir sisteminin hataya meyilli olması, ilgili gende insersiyon ya da delesyon gibi nokta mutasyonları meydana gelir. Bu mutasyonların ekzon gibi kodlama yapan bölgelerde meydana gelmesi ilgili genin fonksiyonunu kaybetmesine ya da susturulmasına neden olur. T-DNA mutagenезisi ile kıyaslandığında, CRISPR aracılı gen susturmanın birçok avantajı bulunmaktadır. En önemli avantajı, gen düzenlemenin çok spesifik olmasıdır. Bu sistemde herhangi bir gen herhangi bir yan etki olmaksızın hedeflenebilir. Bu yüzden, CRISPR sistemi bir geni hızlı ve doğru bir şekilde amaca uygun olarak susturabilir. Bu durum özellikle gen fonksiyonuna yönelik çalışmalarda ya da olumsuz bir özelliği kontrol eden genlerin fonksiyonunun ortadan kaldırılmasında oldukça kullanışlıdır.

CRISPR sisteminin çok yönlü kullanılabilmesi ve diğer yöntemlerle kıyaslandığında üstün özelliklere sahip olması, hem sanayiden hem de bilimsel kuruluşlardan araştırmacıların ilgisini çekmiş ve bu sistem kullanılarak istenilen özelliklere sahip ürünlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Kısa sürede CRISPR sistemi kullanılarak birçok bitki türünde çalışmalar yapılmış ve bu sistem çeltik, pamuk ve buğday gibi başlıca türler için optimize edilmiştir (148). Bu çalışmalar sayesinde, CRISPR sistemi çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlere karşı dayanıklı bitki geliştirme, verim ve kalitenin artırılmasına yönelik çalışmalarda rutin olarak kullanılmaktadır.

Stres, tarımsal ürünlerin verimliliğini önemli ölçüde azaltır. Bitkilerdeki stres iki kategoriye ayrılabilir: abiyotik stres; kuraklık, su baskını, aşırı sıcaklıklar, tuzluluk, ağır metaller, radyasyon vb. farklı faktörlerden kaynaklanırken, biyotik stres; virüsler, bakteriler, mantarlar, otoburlar ve çeşitli patojenlerin saldırılarını içerir. Çeltik, domates, hıyar ve greyfurt gibi türlerde çeşitli stres faktörlerine karşı dayanıklılığın sağlanması için mutant hatlar oluşturulmuştur (149). Bu hatlar TALEN ve ZFN gibi sistemler kullanılarak oluşturulmuştur. Ancak, daha önce de belirtildiği gibi bu sistemlerin önemli sınırlamaları bulunmaktadır. CRISPR sisteminin bitkilerde kullanımına yönelik ilk çalışmalar çeltik, buğday, tütün ve model bitki *A. thaliana*'da yürütülmüştür (105). Buğday ve çeltik bitkilerinde, bu tür için optimize edilmiş CRISPR sistemi kullanılarak ilk mutant bitkiler elde edilmiş ve CRISPR sisteminin bitkilerde kullanımının kolay olduğu bu çalışmalarla anlaşılmıştır (150). Cas12a'nın Cas9'a göre daha kısa gRNA gerektirmesi, hedef bölgede daha büyük mutasyonlar meydana getirmesi ve NHEJ aracılı DNA insersiyonuna yardımcı

olması gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır. Yine Cas12a kullanılarak bitkilerde çeşitli genetik modifikasyonlar yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (151).

Kodlamayan RNA'lar da dâhil olmak üzere birçok yapısal ve düzenleyici gen, bitkilerin farklı çevresel streslere karşı tepkisinde rol oynar (152). Tüm bu genler, geleneksel transgenik teknolojiyi ve şu anda gelişmiş genom düzenleme araçlarını kullanarak abiyotik streslere karşı bitki toleransını geliştirmede potansiyel aday genler olabilirler. Bununla birlikte, biyotik strese dayanıklı bitki eldesine yönelik CRISPR çalışmalarıyla kıyaslandığında, abiyotik strese yönelik çalışmalarda daha az aşama kaydedilmiştir. Bu durum temelde herhangi bir abiyotik stres durumuyla ilişkilendirebileceğimiz binlerce genin varlığından ve bu süreçte dominant rol oynayan tek bir genin olmamasından kaynaklanmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bitkilerin etilen yanıtlarında negatif düzenleyici olarak görev yapan *AGRO8* geni CRISPR yöntemiyle modifiye edilerek, mısırın kuraklığa karşı dayanıklılığı artırılmıştır (153). Domateste, *SIAGAMOUS-Like 6 (SIAGL6)* geninin CRISPR yöntemiyle susturulması sonucu, yüksek sıcaklık koşullarında bile daha iyi büyüme performansı gösteren bitkiler elde edilmiştir (153). *A. thaliana*'da yapılan bir çalışmada, *dpa4-sod7-air256* geni CRISPR/Cas tarafından düzenlenmiş ve elde edilen hatların kuraklık dayanımının arttığı bildirilmiştir (154). Domates *ARF4* geninin susuturulması ya da ifadesinin azaltılması için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bitkilerin ozmotik ve tuzluluk stresine karşı dayanıklılığının arttığı bildirilmiştir (155). Çeltikte; G protein genleri *gs3* ve *dep1*'in CRISPR/Cas aracılı genetik modifikasyonu, tuzluluk stresi ve çeşitli abiyotik streslere karşı toleransı arttırmıştır (156). Benzer şekilde; *Ppa6* geninin susturulması alkali stresine karşı çeltik toleransını arttırmıştır (157).

Zararlı ve patojenlerin neden olduğu hastalık ve zararlar birçok bitki türü için önemli bir sorun teşkil etmektedir. Biyotik faktörler sadece bitki büyüme ve gelişmesini değil aynı zamanda ürün verimi ve kalitesini de olumsuz yönde etkilemekte, bazen bu durum bütün ürünün kaybedilmesiyle sonuçlanmaktadır. Bitkilerin çeşitli hastalıklara karşı vermiş oldukları tepkiler oldukça karmaşık bir mekanizmanın sonucudur. Bu mekanizmalar genellikle birçok genin etkileşimini gerektirmektedir. Transgen teknolojisi kullanılarak hastalıklara karşı dayanıklılıktan sorumlu olduğu düşünülen birçok genin ifadesi artırılmış, ancak dayanıklılık mekanizmaları genellikle birçok genin etkileşimini gerektirdiğinden bu düzenlemeler yetersiz kalmıştır. Ancak, arzu edilmeyen fonksiyonlardan sorumlu genlerin susturulmasına yönelik düzenlemeler genellikle daha etkili sonuçlar vermektedir. CRISPR

sistemi bir gen düzenleme yöntemi olduğu için, virüs, fungus ve bakteri gibi çeşitli patojenlere karşı dayanıklı mutant hatlar elde etmede etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. Çeşitli patojenlere karşı yapılan CRSIPR tabanlı dayanıklılık çalışmaları.

Tür	Hedef Gen	Patojen	Sonuçlar	Transformasyon metodu	Referans
Karpuz	<i>Clpsk1</i>	Fungus	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. niveum'e dayanıklılık	<i>Agrobacterium</i>	(162)
Arabidopsis	<i>eIF(iso)4E</i>	potivirüs	<i>Turnip mosaic virus</i> (TuMV) 'e dayanıklılık	Dip daldırma	(54)
Çeltik	<i>Os8n3</i>	Bakteri	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo)'e dayanıklılık	<i>Agrobacterium</i>	(163)
Çeltik	<i>OsERF922</i>	Fungus	<i>Magnaporthe oryzae</i> 'e dayanıklılık	<i>Agrobacterium</i>	(164)
Domates	<i>SlJAZ2</i>	Bakteri	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (Pto) DC3000'e dayanıklılık	<i>Agrobacterium</i>	(165)
Sitrus	<i>CsLOB1</i>	Bakteri	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. citri (Xcc)'e dayanıklılık	<i>Agrobacterium</i>	(145)
Portakal	<i>CsWRKY22</i>	Bakteri	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. citri (Xcc)	<i>Agrobacterium</i>	(166)
Hıyar	<i>eif4e</i>	Virüs	<i>Cucumber vein yellowing virus</i> , <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> and <i>Papaya ring spot mosaic virus-W</i> 'e dayanıklılık	<i>Agrobacterium</i>	(51)
Pamuk	<i>14-3-3</i>	Fungus	<i>Verticillium dahliae</i> 'e dayanıklılık	<i>Agrobacterium</i>	(167)
Buğday	<i>mlo</i>	Fungus	powdery mildew'e dayanıklılık	Gen tabancası ve protoplast kültürü	(160)
Domates	<i>SiMlo</i>	Fungus	powdery mildew'e dayanıklılık	<i>Agrobacterium</i>	(161)

Külleme hastalığı birçok bitki türünde önemli zararlanmaya neden olan ve fungal patojenlerin neden olduğu bir hastalıktır (158). Yapılan çalışmalar *MILDEW-RESISTANCE LOCUS (MLO)* genlerinin bu hastalıkta negatif düzenleyici olarak görev aldığını ve bu genlerin baskılanmasının arpada hastalığı önlediğini ortaya koymuştur (159). CRISPR sisteminin bitkilere uyarlanmasıyla hemen sonra, bu sistem kullanılarak hekzaploid buğdayda *MLO* genleri açısından mutant hatlar elde edilmiş ve bu hatların külemeye karşı dayanıklı oldukları belirtilmiştir (160). Bu çalışma bitkilerde patojenlere karşı dayanıklılığın sağlanmasına yönelik ilk CRISPR aracılı çalışmadır. O zamandan beri, birçok bitki türünde ve birçok araştırmacı tarafından bu sistem kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmış. *Mlo* genleri domateste de mutant hale getirilmiş ve benzer sonuçlar bu tür için de elde edilmiştir (161).

Fusarium solgunluğu, *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*'un (FON) neden olduğu karpuz da dâhil olmak üzere birçok bitki türünde görülen en yaygın fungal kaynaklı hastalıklardan biridir. FON, karpuzda %30-80'e kadar ve hatta daha fazla verim kaybına neden olabilir (168). Bununla birlikte, bilinen gen kaynakları arasında geleneksel ıslah metotlarıyla dayanıklı çeşit eldesinde kullanılabilecek bir çeşit bulunmamaktadır (162). Zhang, Liu (162) bitki bağışıklığını düzenleyen bir disülfatlı pentapeptit bitki hormonu olan fitosülfokin (PSK) öncüsünü kodlayan *Clpsk1* genini susturmak için CRISPR/Cas9 sistemini başarıyla kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, bu genin susturulmasının *Fusarium solgunluğuna* karşı önemli ölçüde dayanıklılık sağladığı belirtilmiştir. (162). Wang, Wang (164), çeltikte, CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak bir ERF transkripsiyon faktörü olan OsERF922'yi susturmuşlardır. Çalışma sonucunda, test edilen tüm mutant çeltik bitkilerinin, hem fide hem de kardeşlenme aşamalarında yanıklığa karşı direncin önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir. Benzer şekilde, pamukta 14-3-3 genlerinin CRISPR/Cas9 aracılı susturulması, *Verticillium solgunluğu* açısından hem hastalıklı bitki sayısında hem de hastalık hızında düşüşe yol açmış. Ayrıca enfekte yapraklardaki fungal biyokütle miktarında %80 azalma görülmüştür (167).

Birçok bakteri farklı bitki türlerinde hastalık yapabilmektedir. Örneğin, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) çeltikte önemli zararlar meydana getiren bakterilerden biridir. Xoo, enfeksiyon sürecinde spesifik bir transcription activator-like (TAL) sınıfına ihtiyaç duyar. Aslında TAL faktörlerine, bitkileri enfekte etmek gereken belirli hastalık hassasiyet genlerine bağlanmak için ihtiyaç duyulmaktadır. OsSweet11 geni TAL faktörlerinin bağlandığı ve bu sayede konakçı bitkiyi enfeksiyon için hassas duruma getiren genlerden

biridir (169). Kim, Moon (163) yapılan çalışmada OsSweet11 geni susturularak, bitkiler bu bakteriye karşı dayanıklı hale getirilmiştir. Benzer şekilde, citrusta *CsLOB1* hassasiyet geni susturularak, bitkilerin *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*)'e karşı dayanıklı olması sağlanmıştır (145).

CRISPR/Cas teknolojisi, virüslere karşı yüksek dirençli bitkilerin geliştirilmesinde de kullanılmaktadır. Bitki virüsleri, doğal ortamda her yerde bulunur ve sıklıkla bitkileri enfekte eder ve bitki büyümesi ve gelişmesi üzerinde önemli etkilere neden olur. Pyott, Sheehan (54) CRISPR/Cas9 teknolojisini kullanarak model bitki *Arabidopsis*'te eIF(iso)4E genini başarılı bir şekilde susturmuşlardır. Elde edilen sonuçlar, eIF(iso)4E mutant hatların, biyokütle ve çiçeklenme zamanı dâhil olmak üzere diğer özellikleri etkilemeden tarlada yetiştirilen sebze mahsullerinde önemli bir patojen olan şalgam mozaik virüsünün (TuMV) enfeksiyonuna karşı dirençli olduğunu göstermiştir (54).

CRISPR sistemi bitkilerin strese dayanımının artırılmasının yanı sıra, ürün veriminin ve kalitesinin artırılması gibi konularda da sık sık kullanılmaktadır. Özellikle verim ve kalite parametrelerinin iyileştirilmesine yönelik çalışmalar hem klasik ıslahçılar hem de geleneksel transgenik teknolojisi için uzun vadeli bir amaç olmuştur. Ancak, çoğu durumda bu özelliklerin genellikle poligenik karakterde olması, bu konularda büyük ilerlemeler kaydetmenin önünde bir engel teşkil etmiştir. Birçok çalışma; verime etki eden tek bir dominant genin var olmadığını gösterse de, bu konuda negatif düzenleyici olan birçok gen tanımlanmıştır. Eğer bu genler direkt olarak engellenir ve hatta ortadan kaldırılabilirse, bu durum verime katkı sunacaktır. CRISPR sistemi verimde negatif düzenleyici olarak rol oynayan genlerin susturulmasında kullanılabilecek mükemmel bir araçtır. Li, Li (170) tarafından çeltikte yapılan bir çalışmada, *gn1a*, *dep1* veya *gs3* genlerinin susturulması; daha büyük tane boyutu, tane ağırlığı ve tane yoğunluğu gibi verimle ilgili belirli parametrelerde belirgin artışlara yol açmıştır. Yine çeltikte yapılan bir başka çalışmada; *gw2*, *gw5* ve *tgw 6*, negatif düzenleyicileri CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak susturulmuştur. Çalışma sonunda, mutant hatların daha büyük tane ağırlığı ve boyutuna sahip olduğu bildirilmiştir (171).

CRISPR sisteminin bitki biyoteknolojisinde kullanıldığı bir diğer alan da ürün kalitesine yönelik ikincil metabolizmaların aydınlatılmasıdır. Protein, karbonhidrat, yağ ve biyoaktif bileşikler, gıdalardaki başlıca fonksiyonel bileşiklerdir ve bunların bileşimi, ürün kalitesinde belirleyici konumundadır. Likopen, kardiyovasküler hastalıklar ve belirli

kanserler dâhil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarının tedavisinde kullanılan ve en iyi bilinen fonksiyonel biyoaktif bileşenlerden biridir. Li, Wang (172), karotenoid metabolik yolağı ile ilişkili birkaç gende CRISPR/Cas aracılı düzenleme yaparak domates meyvelerinde likopen biyosentezini ve üretimini artırmışlardır. Protein, bitkisel ürünlerde bulunan başlıca primer bileşenlerden biridir. Bununla birlikte, protein bileşimi, protein karışımının kalitesini belirler. Dünya nüfusunun %1-2'si Buğday ve diğer bazı ürünlerde yaygın olarak bulunan glütene karşı duyarlıdır. Sánchez-León, Gil-Humanes (102) CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisini kullanarak buğday *α -gliadin* genini hedeflemişler ve düşük gluten içermeyen buğday elde etmişlerdir. Arpada bulunan *D-hordein* geninin CRISPR/Cas aracılı susturulması, arpadaki nişasta granüllerini çevreleyen protein miktarının artmasıyla sonuçlanmıştır (173). Keten bitkisinde yapılan bir çalışmada, tohum depo proteini olan *CRUCIFERIN C (CRUC)* geninin CRISPR aracılı düzenlenmesi, tohumlardaki protein miktarının artmasıyla sonuçlanmıştır. Ayrıca bu düzenleme aminoasit kompozisyonunda da değişikliğe yol açmıştır. Alanin, sistein ve prolinde artış görülürken, izolösin, tirozin ve valin miktarlarında bir azalma kaydedilmiştir (174). Şimdiye kadar bahsedilen uygulamaların dışında, CRISPR/Cas teknolojisi, farklı türlerin kültüre alınması ve belirli bir bitkideki spesifik bir özelliği çalışmak için de kullanılmaktadır. Örneğin, pamukta bir MYB transkripsiyon faktörü geni CRISPR/Cas9 aracılı modifiye edilerek pamuk lifsiz hale getirilmiştir (148).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Kavun üretimi yapan ülkeler arasında Türkiye (1.854.356 ton), Çin' den (15.944.800 ton) sonra ikinci sırada yer almaktadır (FAO, 2014; TUIK, 2016). Ülkemizde açıkta üretimin yanında özellikle örtüaltı üretiminin de artması ile kavun yetiştiriciliği en fazla Akdeniz Bölgesinde ve İç Anadolu Bölgesinde yapılmaktadır. Bu kavunların yaklaşık %85'ini Kırkağaç, Hasanbey, Yuva, Kışlık Sarı, %15'ini ise *cantalupensis* ve *reticulatus* grubunda yer alan kavun çeşitleri oluşturmaktadır (175).

Bitki virüslerinin, bitkilerde ortaya çıkan enfeksiyonel hastalıklarının yarısından sorumlu olduğu düşünülmektedir (176). Virüs yaygınlığı ise bitkilerde önemli verim-kalite kayıplarına neden olmaktadır (41). Virüsler, birkaç protein kodlayan tek veya çoklu DNA veya RNA molekülüne sahip olup, bazıları DNA veya RNA'dan viral parçacıklar oluşturmak üzere kapsülleşmektedir. Bitki virüsleri, bitki hücrelerine girişler esnasında (bulaşma) özel yapılar oluşturmayıp genel olarak pasif giriş(yaralardan vs) yapmaktadır. Virüsün bitkilere bulaşmasının bir diğer yolu ise böcekler, nematodlar (akarlar) ve mantarlar dahil olmak üzere vektör organizmalarla olmaktadır (50). Virüslerin genomlarında kendilerini çoğaltmak üzere sık replikasyon olmakta, bunun sonucu olarak ise mutasyona açık özellikteki genomları nedeniyle sık mutasyona uğramaktadırlar. Sık mutasyonla farklı ırkların gelişmesi ise virüslerin bitki savunma sistemini devre dışı bıraktırarak kolay enfeksiyon sağlamaktadır (177).

Cucumovirus grubunda yer alan hıyar mozaik virüsü (CMV: *Cucumber mosaic virus*), virüsler arasında en geniş konakçı yelpazesine sahip *Solanaceae*, *Cruciferae* ve *Cucurbitaceae* familyaları başta olmak üzere yaklaşık 1.200'den fazla bitki türünde önemli zararlar yapmaktadır (178). CMV'nin geniş konukçusu olmasının esas nedeni ise iki alt grubu olması nedeni ile virüs genomunun zengin bir genomik değişkenlik içermesinden kaynaklanmaktadır (179).

Kavun dahil olmak üzere, Türkiye'de kabakgil yetiştirilen bölgelerde görülen virüslerin başında; Hıyar Mozaik Virüsü (*Cucumber mosaic virus*, CMV) gelmektedir. CMV, virüsü yaygınlığı ve oluşturduğu zarar bakımından diğer virüslere göre önemli ekonomik kayıplar meydana getirmektedir (180, 181). İç Anadolu Bölgesinde Ankara ili kavun alanlarında yapılan bazı çalışmalarda Kırkağaç ve Kazan kavunlarında, özellikle CMV virüsünün büyük zarar verdiği belirtilmektedir (182).

Bitkilerde bilinen yaklaşık 200 virüs direnç geninin yarısı resesif kalıtım göstermektedir (183). Bitki hastalıklarına dayanıklılıkta, resesif dayanıklılığın dominant dayanıklılığa oranla kalıtımı daha stabil ve dayanımın daha yüksek olduğu göz önüne alındığında, resesif genler üzerine yapılan araştırmalar bitki hastalıklarını kontrol altına almada büyük önem arz etmektedir (184). Bitkide CMV'ye direncin genetik kontrolü dominant, resesif, monogenik ve poligenik kontrollerle sağlanarak çok farklılık gösteren heterogenik bir durum göstermektedir. Bunlar arasında en yaygın olanı ise resesif ve poligenik dayanıklılıktır (185).

Resesif genlerde yapılan rastgele mutajenez tarafından üretilen hassaslık kaybı (viral enfeksiyona vb) genetik olarak bitki doğal varyantlarında bulunan resesif dayanıklılıkla eşdeğer görülmekte, doğal gen kaynaklarında bulunan genetik varyasyonların kullanımında oluşabilecek sınırlamaları ortadan kaldırmaktadır. Buna ek olarak, virüslere karşı bitki translasyon başlangıç faktörleri (eIF4E'ler) aracılığı ile oluşan resesif dayanıklılık, birçok bitki türünde mevcut olup, değişik bitkilerdeki rastgele mutagenез oluşturma ve hassaslık kaybı mutantlarının seçimi, resesif dayanıklılık uygulamaları ile dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi mümkün olabilmektedir (50).

eIF4Es 'lerde meydana gelen mutasyonlar, potyviruslere ve diğer birçok virüsler yönelik hassaslığı engellemektedir. Ancak, resesif dayanıklılıkta kullanılacak virüs gruplarındaki sınırların ortadan kaldırılabilmesi için ise; viral etmenlere karşı resesif dayanıklılık gösterebilecek, gen hedeflerini tanımlamak ve karakterize etmek büyük önem taşımaktadır (50). Belirlenen bu konakçı hedeflerinin genom düzenleme çalışmaları ile susturulması (hassaslık sağlayan gen bölgelerinin çalışır hale getirilmesi) ise kontrolü mutagenез ile resesif dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi ıslahı bütünleyen yenilikçi biyoteknolojinin bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Gen susturma aşamalarında kullanılan genom editing teknolojileri, yalnızca model bitkilerinde değil aynı zamanda çeşitli bitki türlerinde de gerçekleştirilmekte ve daha yaygın şekilde uygulanmaktadır. Genom editing sistemlerinden CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated 9:Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri/CRISPR ilişkili Cas 9) avantajlı noktalarından biri, orijinal genom düzenleme transgenlerinin düzenleme sonrasında segregasyon yoluyla kaldırılabilmesidir. Diğer bir ifade ile To aşamasında transgenik olan

bitkilerin kendileme sonrası transgenlerden arındırılarak resesif dayanıklılığı kazanmasıdır (51).

Bu tez projesinin amacı; kavunda CMV'nin floeme girişini dolayısıyla uzun mesafeli viral taşınımı ve sistemik enfeksiyonunu engelleyen, doğal resesif dayanıklı bir gen olduğunu kanıtlamış *CmVPS41*'geninin, hassaslığa neden olan 5 no.lu exonunun CRISPR/Cas9 yöntemi ile susturulması, hedefi ise; hassas bölgesi susturulan *CmVPS41*' genini içeren CMV'ye dayanıklı kavun genotipinin resesif dayanıklılık yaklaşımı ile elde edilmesidir.



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Bu tez çalışmasında SunAgri tohumculuk firmasından temin edilen ticari Kırkağaç 637 kavun çeşidinin tohumu kullanılmıştır.

4.2. TOHUM CANLILIK TESTİ

Biyokimyasal bir yöntem olan Tetrazolium testinde, tohum canlılığı, embriyoların 2,3,5 trifeniltetrazolium klorid (TTC) çözeltisinde bekletilmeleri durumunda, kırmızı renge boyanma derecelerine göre saptanır (186). Embriyonun hücreleri tarafından absorbe edilen bu kimyasal madde suda çözünmeyen, formozan olarak bilinen kırmızı renkli bir bileşik haline dönüşmektedir. Canlı embriyolarda renk kırmızıya dönerken cansız dokularda ise herhangi bir boyanma olmamaktadır. Renk dönüşümü, kullanılan materyalin çeşidine göre, farklı şekillerde meydana gelmektedir. Bu tez çalışmasında kimyasal olarak 2,3,5 trifeniltetrazolium kloridin % 1'lik çözeltisi kullanılmıştır. Kırkağaç 637 tohumu için rastgele seçilen 30 adet tohum steril edilerek çalışmada kullanılmıştır. Steril tohumlar 24 saat süreyle suda bekletilerek şişmeleri beklenmiştir. Daha sonra tohum kabukları behere konmuş ve bunları tamamen kaplayıncaya kadar tetrazolium çözeltisi eklenmiştir. Işığın neden olabileceği bozulmaları önlemek amacıyla alüminyum folyo ile sarılarak, direk güneş ışığı almayan bir yerde, 23 ± 1 °C'de 24 saat süreyle tutulmuşlardır.

4.3. gRNA'LARIN DİZAYN EDİLMESİ

4.3.1. PRİMER DİZAYNI

Çalışmada hedeflenecek olan *CmVPS41* geninin 5 nolu ekzonunun öncelikle dizilenmesi gerçekleştirilmiştir. Dizileme amacıyla çeşitli primerler dizayn edilmiştir. Genel olarak DNA dizisine yönelik tasarlanan primerlerin hedef bölgeyi çoğaltmaması üzerine, ikinci bir seçenek olarak RNA dizileri baz alınarak primerler tasarlanmış ve 5. ekzon bu şekilde çoğaltılarak dizilenmiştir.

4.3.2. DNA İZOLASYONU

DNA izolasyonu (32) tarafından belirtilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası DNA saflık ve miktar ölçümleri için %1 konsantrasyondaki agaroz jel kullanılmış

ve Nanodrop ND–1000 cihazı ile konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir.

- İklim odasında çimlendirilen bitkiler bütün olarak sıvı azotla ezilmiştir,
- Örneklerden yaklaşık 100 mg alınarak ependorf tüplere aktarılmıştır,
- 1 ml DNA ekstraksiyon çözültisi örnekler eklenmiştir,
- Karışım 65 °C’de çalkalamalı su banyosunda 15 dk bekletilmiştir,
- Su banyosundan alınan tüplere 0,5 ml (24:1) oranında hazırlanan kloroform/isoamil alkol karışımı eklenmiş ve buz üzerinde 30 dk bekletilmiştir,
- Tüpler 5 dk boyunca oda sıcaklığında, 14.000 rpm hızda santrifüj edilmiştir,
- Süpernatant kısmı yeni bir ependorf tüpe transfer edilmiştir,
- Süpernatant kısmın üzerine 0,8 ml izopropanol eklenmiştir,
- Örnekler, 15-20 dk boyunca buz üzerinde soğutulduktan sonra 1 dk süre boyunca 14.000 rpm hızda santrifüj edilmiştir,
- Süpernatant kısmı tekrar yeni bir ependorf tüpe transfer edilmiştir,
- 1 ml % 70’lik ethanol ile Pellet (alt katı) karıştırılıp, 2 dk boyunca 14.000 rpm hızda santrifüj edilmiştir,
- Elde edilen pellet, 50–100 µl TE ile çözülmüş ve RNase (10mg/ml) ile muamele edilip karışımdaki RNA uzaklaştırılmıştır.

4.3.3. RNA İZOLASYONU

RNA İzolasyonu kit kullanılarak (Promega SV Total RNA Isolation System, Z3100) yapılmıştır. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir.

- Bitki doku örneği sıvı azot ile porselen havanda ezilmiştir,
- 30mg ezilmiş doku örneğine 175µl RNA Lysis Buffer eklenmiş ve bunun üzerine 350 µl RNA Dilüsyon Buffer eklenip tüp vortekslenmiştir,
- Karışım maximum hızda oda koşulunda 10 dk santrifüj yapılmıştır,
- Pellete dokunmadan üst faz yeni temiz 1.5’luk tüpe aktarılmıştır,
- Üzerine 200µl %95’lik ethanol eklenmiş, 3-4 kez pipetaj yapılmıştır.
- Karışım Spin Kolona aktarılmış ve 12.000-14.000g’ de spin kolon tüpleri santrifüj yapılmıştır,
- Alt kısımdaki sıvı dökülmüş ve bu aşamadan sonra DNase karışımının hesaplanmasına geçilmiştir. Her bir örnek başına 40 µl Yellow core Buffer, 5 µl 0.09M MnCl₂ ve 5 µl DNase olacak şekilde mix 1.5’luk tüpte hazırlanmıştır,

- Her bir filtrenin üzerine 50 µl olacak şekilde bu karışım eklenmiştir. Bu aşamada karışım filtreye dokunmadan eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında, 25 dk bekletilmiştir,
- Bekleme süresi sonrasında, tüplerin üzerine 200 µl SV DNASE Stop solution filtrelerin üzerine eklenmiştir,
- 12.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiş ve alta geçen sıvı dökülmüştür,
- Filtrelerin üzerine 600 µl Wash solution (önceden ethanol eklenen) eklenmiştir,
- 12.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilip alta geçen sıvı dökülmüştür,
- Filtrelerin üzerine 250 µl Wash Solution eklenmiştir,
- Maximum hızda 2 dk santrifüj edilip alta geçen sıvı dökülmüştür. Alt tüpler bu basamakta atılmıştır,
- Yeni 1.5'luk tüpler alınıp bu tüplerin üzerine filtreler yerleştirilmiştir. Filtrelerin üzerine 30 µl Rnase Free Water eklenip oda sıcaklığında tüpler 5 dk bekletilmiştir,
- 12.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Alta geçen sıvı artık RNA'dır. Bu sıvı alınmış ve tekrar filtreye konulup bu sefer 2 dk beklenmiştir,
- 12.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Alta geçen sıvı RNA'dır. Buzdan ayırmadan agaroz jelde kontrol edilmiş ve porsiyonlanarak -80 e kaldırılmıştır, RNA kalite ve miktar ölçümleri amacı ile %1'lik jel ve Nanodrop ND-1000 spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

4.3.4. cDNA SENTEZİ

RNA'lardan oligo (Dt) ve gen spesifik (revers primer ile oluşturulan) cDNA'lar elde edilmiştir. cDNA reaksiyonları WizScript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity) (katalog no: W2211 200rxn) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Total RNA 10 ng ile 5000 ng arası kullanılmıştır (veya 10 µl). 2x RT master mix hazırlanması Çizelge 4.1.'de verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

2X RT master mix buz üzerinde 1.5'luk tüp içinde hazırlanmıştır. Mix pipetaj yapılarak iyice karıştırılmıştır.

- 5000 ng RNA örneği pipetlendikten sonra mix üzerine eklenmiş ve pipetaj ile karıştırılmıştır.
- Hava kabarcığı varsa, elemine etmek amaçlı santrifüjde spin atılmıştır.
- RT reaksiyonuna kadar tüp buz üzerinde saklanmıştır.

Çizelge 4.1. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar.

İçerik	Miktar
10X reaksiyon tamponu	2 µl
20X dNTP karışımı	1 µl
Oligo dT	1 µl
WizScript™ RTase	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
RNase ari su	4.5 µl
Toplam	10 µl

Reverse Transkripsiyon PZR programı:

25°C 10 dk, 37 °C 120 dk, 85 °C 5 dk, 10 °C’de bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA -20 °C de saklanmıştır.

4.3.5. PZR KOŞULLARI

Çizelge 4.2. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları.

İçerik	Miktar
cDNA	3 µl
dNTP	1 µ
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse	1 µl
MgCl ₂	2.5 µl
Taq polimeraz	0.3 µl
Taq polimeraz tamponu	3 µl
BSA	1 µl
dH ₂ O	12.2 µl
Toplam	25 µl

Çalışmada kullanılan polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) yer alan bileşenler aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.2.).

PZR programı ise her primere göre ayrı ayrı düzenlenerek aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95 °C	5 dk
Denatürasyon	95 °C	45 sn
Bağlanma	52 °C	1 dk
Uzama	72 °C	1 dk
Son uzama	72 °C	7 dk

4.3.6. PZR ÜRÜNLERİNİN DİZİLENMESİ

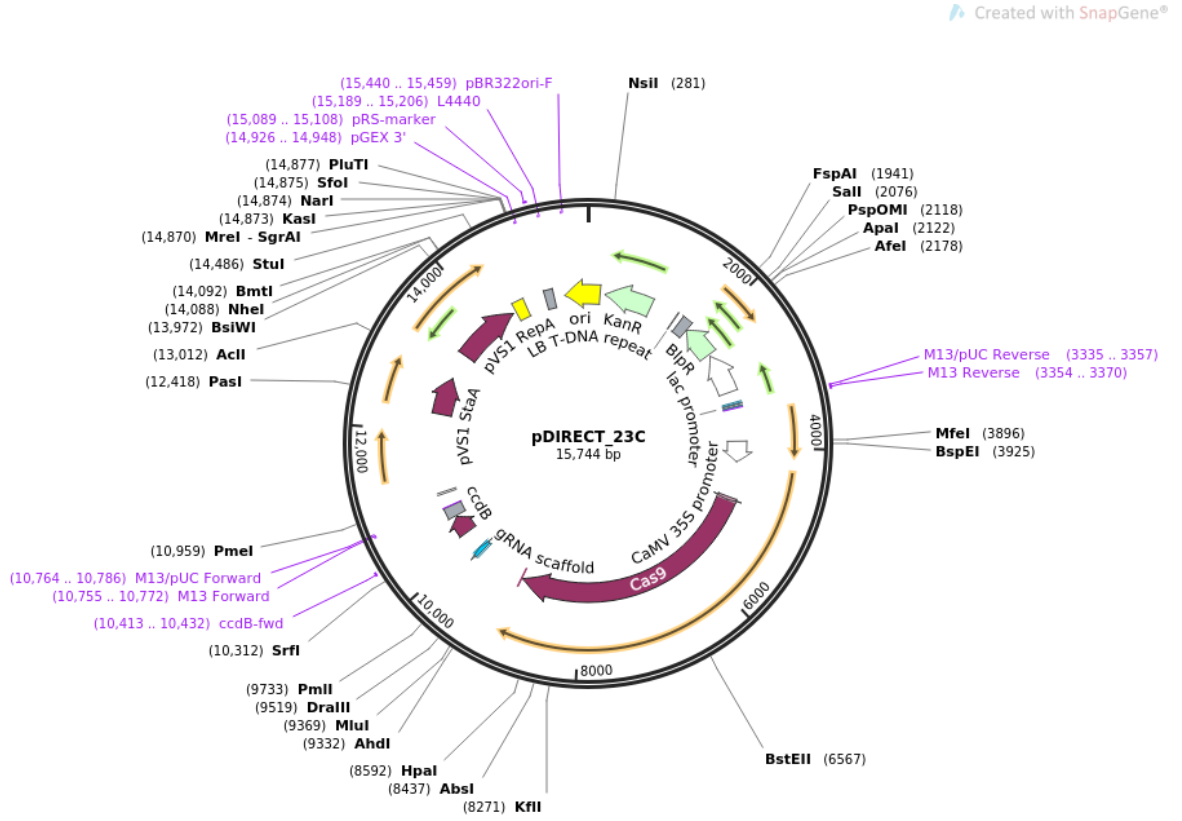
PZR ürünlerinin dizilenmesi BM Labosis (Ankara) firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Gen bankalarında (NCBI vb.) yer alan mevcut diziden hareketle tezde çalışılan kavun genini (*CmVPS41* Exon 5'e yönelik) hedefleyecek şekilde sgRNA (single guide RNA) dizayn edilmiştir. Ancak ilgili bölgenin tür içi polimorfizminin fazla olması nedeniyle tezde kullanılan kavun çeşidine yönelik bu bölgenin spesifik çoğaltılması ikinci bir seçenek olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla hedef bölge Sanger sekanslama ile dizilenerek hedef bölgeye yönelik sgRNA tasarlanmıştır.

4.3.7. gRNA PRİMERLERİNİN TASARLANMASI

sgRNA tasarımı için CRISPRdirect uygulaması kullanılmıştır. CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>) 10 kb'a kadar olan nükleotit dizilerini işleyebilen ve hedef diziyi, yönü, PAM dizisini, hedef dışı durumları ve mutasyon dizisini analiz eden çevrimiçi bir araçtır. CRISPR/Cas hedeflerinin seçiminde kullanılan oldukça fonksiyonel ve kullanımı basit olan bir araçtır. Online olarak kullanılan bu araç, hedef dizi ve PAM dizisiyle en iyi eşleşmeyi sağlayacak şekilde bütün genomu tarar (122). Analiz sonucu belirtilen alternatifler arasından hedef bölgeye yönelik 2 tane sgRNA seçilmiştir.

4.4. PLAZMİTLERİN RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİM KESİMLERİ VE JEL PÜRİFİKASYONU

Çalışmada kullanılan CRISPR/Cas vektörü pDIRECT_23 (Plasmid #91140) Addgene firmasından satın alınmıştır. Kullanılan vektörün yapısı şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan pDIRECT_23C vektörü

Çalışma boyunca kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri ve bu enzimlere ait çözeltiler Thermo Scientific firmasından sağlanmıştır. Tüm kesim reaksiyonları için Çizelge 4.4’te verilen reaksiyon karışımları kullanılmıştır. pDIRECT_23C plazmid; MluI ve PmeI restriksiyon endonükleaz kesim enzimleriyle 37 °C’de 1 saat termal döngü cihazında belirli bölgelerden kesilmiştir.

Çizelge 4.4. Restriksiyon Endonükleaz enzim kesim reaksiyonuna ait bileşeler ve miktarları

Reaksiyon bileşenleri	Miktar
pDIRECT_23C	1 µg
MluI	1 µl
PmeI	1 µl
10×Buffer	3 µl
ddH2O	30 µl'ye tamamlandı
Total	30 µl

Enzim kesimi yapılmış pDIRECT_23C plazmidinin elektroforezi için %1 konsantrasyonda agaroz jel hazırlanmıştır. Daha sonra her bir örnek için karışıma 4µl SafeView DNA 27 Stain (GMbiolab, Tayvan) boyası ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra katılan jelden taraklar çıkarılmış ve jel, içinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Uygun restriksiyon endonükleazlarla kesilen plazmid ve 2 Kilobaz çiftlik (Kb) markır (M) (Solis BioDyne, Estonya) kuyucuklara yüklenmiştir. Ardından örnekler 5 V/cm olacak şekilde yaklaşık 50 dk boyunca agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve UV ışık (Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR System) görüntülenmiştir.

Jel ekstraksiyonu Thermo Scientific GeneJET Jel Ekstraksiyon Kiti (Kat. No. K0692) kullanılarak yapılmıştır. İlk olarak, jelden steril bir bistüri yardımıyla UV ışık (Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR System) altında ince bir kesit halinde bir parça kesilmiş ve 1.5 ml'lik ependorf tüpe alınmıştır. Jel dilimini içeren Ependorf tüpüne 100 µl Binding buffer (1:1 hacim olacak şekilde) eklenmiştir. Jelin tamamen çözünmesini sağlamak için kısa bir vorteks aşamasından sonra 60 °C'de bekletilmiş ve aralıklarla ters alt üst edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra karışıma 100 µl %100 izopropanol ilave edilmiştir. Karışım üretici firma tarafından sağlanan DNA Safaştırma Mikro Kolonuna yüklenmiş ve oda sıcaklığında 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve altta toplanan kısım atılmıştır. Aynı kolona 100 µL Binding bufer eklenmiş ve oda sıcaklığında 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilip altta kalan kısım atılmıştır. Daha sonra kolona 700 µL yıkama solüsyonu eklenmiş, oda sıcaklığında 1 dk 14.000 rpm'de santrifüj edilip alttaki kısım atılmıştır. 14,000 rpm'de (oda sıcaklığı) 2 dk ek bir santrifüj daha yapıp altta kalan kısım atılmıştır ve kolon, temiz bir 1.5 mL'lik ependorf tüpüne yerleştirilmiştir. Son olarak, kolona daha

önceden ısıtılmış (70 °C) 40 µL elüsyon tamponu eklenmiş, oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilip 2 dk boyunca 14,000 rpm hızda santrifüjlenmiştir. Aynı işlem iki defa tekrarlanmıştır. Örnekler daha sonraki kullanımlar için -20 °C'de saklanmıştır.

4.5. FRAGMANLARIN ÇOĞALTILMASI

Çalışmada kullanılan olan gRNA'ları içeren fragmanlar FicusBio (FicusBio, Ankara) firmasında ticari olarak sentezlenmiştir. İlgili gen fragmentleri termal döngü cihazında çoğaltılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve koşullar çizelge 4.5. ve 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

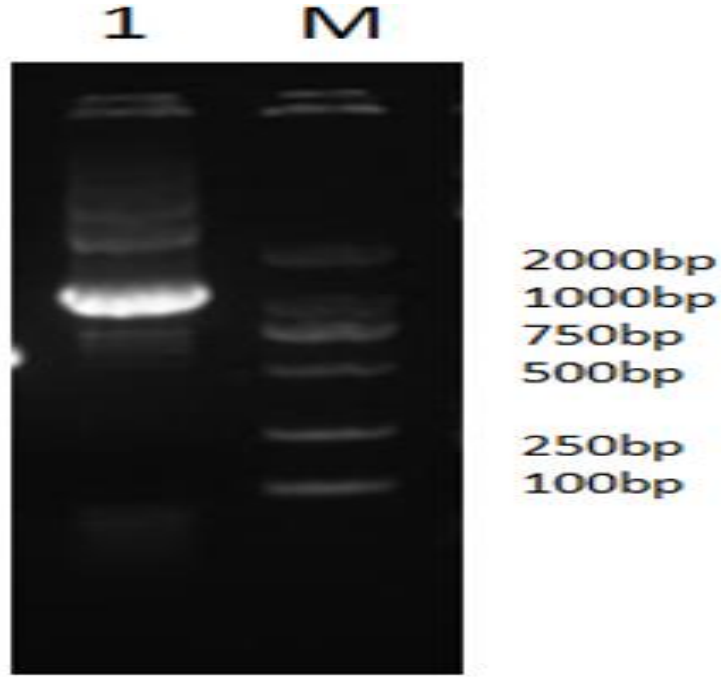
Reaksiyon bileşenleri	Miktar
Oligos Mix Template : 23C_VPSA_G5_alternatif-sgRNA1-2-CSY4	1 µl
23C_VPSA_G5_alternatif-sgRNA1-2-CSY4-F (10P)	1 µl
23C_VPSA_G5_alternatif-sgRNA1-2-CSY4-R (10P)	1 µl
2x PCR Master Mix	10 µl
PCR enhancer	4 µl
dd H2O	3 µl
Toplam	20 µl

23C_VPSA_G5_alternative-sgRNA1-2-CSY4-F:CTGTCCACAAATGAAGATGGAATCTGTAAAAGAAAACGCGTGAAATAATGCG
23C_VPSA_G5_alternative-sgRNA1-2-CSY4-R:CCCGCCAATATATCCTGTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGCGGGAAACGACAAT

Çizelge 4.6. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
94°C	2 dk 30 sn	
94°C	20 sn	20
56°C	30 sn	
72°C	1 dk	
72°C	5 dk	
15°C	∞	

PZR ürünlerinin elektroforezi için %1.5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Örnekler kuyucuklara yüklendikten sonra 3 V/cm olacak şekilde yaklaşık 50 dk agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. PZR ürünleri GeneJET PZR pürifikasyon kiti (Thermo Scientific, Cat. No. K0702) kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla, UV ışık (Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR System) altında steril bistüri yardımıyla bir parça kesilip alınmış ve 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarılmıştır. Yaklaşık 100 µl binding bufer eklendikten sonra, karışıma soğukta bekletilmiş 100 µl izopropanol eklenmiştir. Karışım GeneJet pürifikasyon kolonuna yüklendikten sonra, oda sıcaklığında 14,000 rpm'de 1 dk süre boyunca santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra 700 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve 2 dk boyunca 14,000 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Altta toplanan kısım uzaklaştırıldıktan sonra boş kolon 2 dk boyunca 14,000 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Altta toplanan kısım uzaklaştırıldıktan sonra kolon yeni bir ependorf tüpüne aktarılmıştır. Son olarak, daha önceden ısıtılmış 15 µl elüsyon tamponu kolona eklenip oda sıcaklığında 2 dk inkübasyona bırakılmış ve 2 dk boyunca 14,000 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Ardından örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve UV ışık (Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR System) altında görüntülenmiş ve daha sonraki kullanımlar için -20°C'de muhafaza edilmiştir. Agaroz jel görüntüsü Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Saflaştırılmış PZR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü (1: 23C_VPSA_G5_alternatif-sgRNA1-2-CSY4, M:Markır (2 kb))

4.6. BAĞLANMA (LİGASYON)

MluI ve PmeI enzimleriyle kesilerek lineer hale getirilmiş olan pDIRECT_23C vektörü ve 23C_VPSA_G5_alternative-sgRNA1-2-CSY4 ligasyon yoluyla birleştirilmiştir. Bu amaçla Çizelge 4.7’de ki gibi hazırlanan karışım 50°C’de 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 4.7. Ligasyon reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktarı
pDIRECT_23C/MluI, PmeI	4 µl
23C_VPSA_G5_alternative-sgRNA1-2-CSY4	1 µl
Seamless klonlama kiti	15 µl
Toplam	20 µl

4.7. KOMPETANT *E. coli* HÜCRELERİNİN HAZIRLANMASI

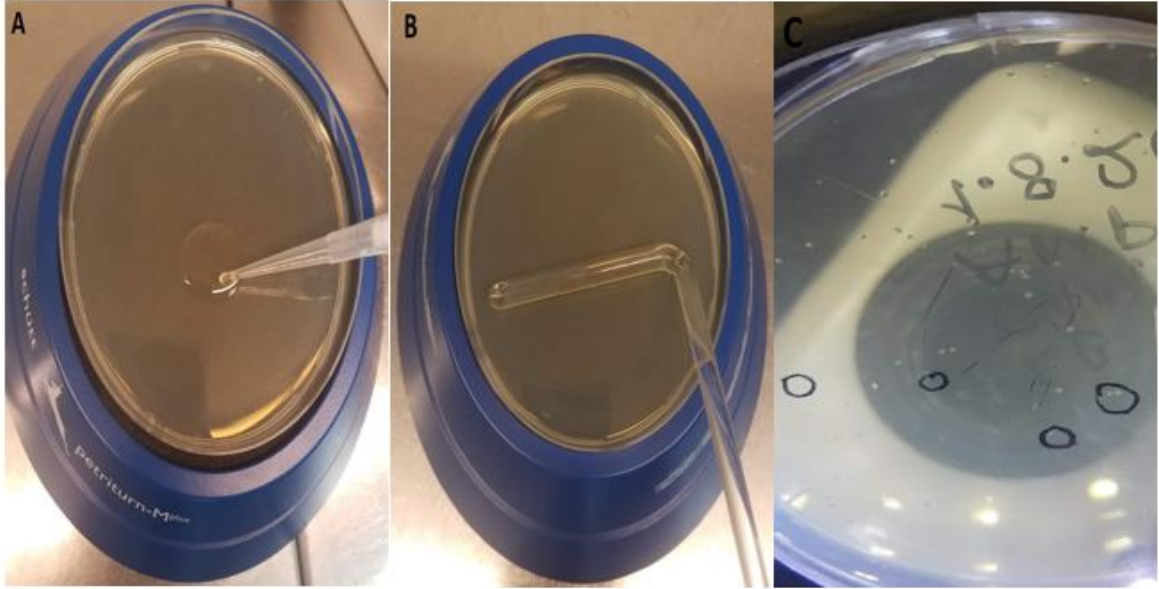
Plazmitlerin hücelere transformasyonundan önce, *E. coli* hüceleri kompetan hale getirilmiştir. Tek bir *E. coli* kolonisi herhangi bir antibiyotik içermeyen 2 mL (Lurai Bertani) LB ortamına inoküle edilmiştir. Hüceler gece boyu 37 °C sıcaklık ve 200-250 rpm’de çalışan inkübatörde büyümeye bırakılmıştır. Sonrasında 2000 ml’lik erlen içerisinde steril 100 ml LB ortamı koyularak 1 ml bakteri kültürü inoküle edilmiş, 37 °C sıcaklık ve 200 rpm hızda OD600 değeri 0.4’e ulaşınca kadar inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra bu kültürler 50 ml’lik falkon tüplerine alınıp, bu tüpler 10 dk boyunca buz üzerinde bekletilmiştir. Buz üzerinden alınan hüceler 10 dk boyunca 4000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırılıp, pellet kısmı buzda soğutulmuş 5 ml CaCl₂ (4mM) ile çözündürülmüştür. Hüceler 5 dk boyunca 2500 rpm’de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Pellet tekrar buzda soğutulmuş 2 ml CaCl₂ çözeltisi (4mM) ile çözündürülmüştür. Bu işlem bir defa daha tekrar edilmiştir. Son olarak pellet 2 ml CaCl₂ (4 mM) ile çözündürülmüştür. Bakteriler daha sonraki transformasyon işleminde kullanılmak üzere -80 °C’ de muhafaza edilmiştir.

4.8. TRANSFORMASYON

Bu çalışmada *Escherichia coli* DH5α suşu kullanılmıştır. Transformasyon aşamasının basamakları aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir;

- Her bir transformasyon için 1 tüp *Escherichia coli* DH5α hücresi buz üzerinde çözündürülmüştür,
- Buz üzerinde çözünen hücelerin her bir tüpüne 1-5 µl DNA (10 pg ile 100 ng) eklenip elle yavaşça karıştırılmıştır,
- Tüpler buz üzerinde 30 dk bekletilmiştir,
- Hüceler sallanmadan 42°C’de 30 sn (sıcak su banyosunda) boyunca ısı- şokuna maruz bırakılmıştır,
- Tüpler sıcak 42°C su banyosundan çıkarılmış ve 2 dk boyunca buz üzerinde bekletilmiştir,
- Önceden oda koşulunda ısınmış S.O.C ortamından (kabin içerisinde steril tüpe ihtiyaç kadar alınan) 250 µl alınıp her bir tüpe eklenmiştir,
- Sonrasında tüplerin kapakları sıkıca kapatılıp 37°C’ de, 225 rpm’ de 1 saat boyunca tüpler çalkalamalı etüvde bekletilmiştir,

- Önceden +4 °C'den çıkartılarak kabin içerisinde oda sıcaklığına getirilmiş selektif plate'lere her bir transformasyon tüpünden 25–100 µl yayılmıştır (Şekil 4.3.(B)),
- Plate'ler gece boyu 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 4.3. Transformasyon sonrası *E. coli* bakterilerinin seçici platelere ekilmesi A) Bakteri kültürünün ortama aktarılması, B) Drigalski spatülü yardımıyla bakterilerin ortama yayılması, C) Gece boyu inkübasyon sonucu ortamda çoğalan bakteriler.

4.9. OLUŞAN POZİTİF KOLONİLERDEN PLAZMİT İZOLASYONU

Plazmit izolasyonu için ilk önce transforme edilen hücreler aşağıda belirtilen şekilde çoğaltılmıştır;

- İlgili antibiyotiği içeren (ampisilin) Luria Bertani (LB) ortamından 5ml bir tüpe alınmıştır,
- Beyaz kolonilerden daha önceden sterilize (otoklavlanmış) kürdanlar yardımı ile bir adet beyaz koloni alınıp ortam içine daldırılmıştır,
- 37 °C etüvde, 180 rpm' de 12-16 saat karıştırılmıştır,
- Karıştırıcıdan alınan bakteri kültürü, 2 dk boyunca 8000 rpm hızda oda koşulunda santrifüj edilmiştir,
- Santrifüj sonrası süpernatant (üst sıvı) atılmıştır.

Bu aşamadan sonra izolasyon aşamasına geçilmiştir. İşlem basamakları aşağıda belirtildiği gibidir;

- Pelletlerin üstüne 250µl Resuspension Solution eklenir. Pelletli soluyon karışımı tüpe aktarılmış ve pellet tamamen çözününceye kadar vortex yapılmıştır,
- 250µl Lysis Solution eklenir ve 4-6 kere tüp ters düz edilerek karıştırılmıştır,
- 350µl Neutralization Solution eklenmiş ve 4-6 kez tüp ters düz edilerek karıştırılmıştır,
- 5 dk, 14000 rpm' de santrifüj yapılmıştır (Kromozomal DNA'nın çökmesi amaçlı),
- Süpernatant pipet yardımı ile GeneJET spin kolona aktarılmıştır,
- Kolon 1 dk, 14000 rpm' de santrifüj yapılmıştır,
- GeneJET spin kolona 500µl Wash Solution'u eklenmiştir,
- 14000 rpm' de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Kolonun dibindeki sıvı atılıp alt tüp tekrar kolona takılmıştır,
- Tekrar GeneJET spin kolona 500µl Wash Solution'u eklenmiştir,
- Tekrar 14000 rpm' de 1 dk santrifüj yapıp kolonun dibindeki sıvı atılmıştır. Alt tüp tekrar kolona takılmıştır,
- 1 dk 14000 rpm' de kolon boş olarak kalan atıkların uzaklaştırılması amaçlı santrifüj edilmiştir,
- GeneJET spin kolon yeni temiz 1.5'luk tüpe takılmıştır. GeneJET spin kolonun tam ortasına, kolona pipet değmeden, 50µl Elution Buffer eklenip 2 dk oda koşulunda inkübe edilmiştir,
- 2 dk boyunca 14,000 rpm hızda santrifüj yapıp kolon atılmıştır ve pürifiye plazmid DNA'sı -20 °C' de saklanmıştır.

4.10. KOLONİ PZR

Transformasyon işleminin doğru bir şekilde gerçekleştiğini tespit etmek için koloni PZR yapılmıştır. Bu amaçla, kanamisin (50 mg/L) içeren selektif besiyerinde büyüyen kolonilerden rastgele 6 tane seçilmiş ve koloni PZR yapılmıştır. PZR koşulları çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Koloni PZR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95 °C	5 dk
Denatürasyon	95 °C	30 sn
Bağlanma	56 °C	45 sn
Uzama	72 °C	1 dk
Son uzama	72 °C	5 dk

4.11. KOMPETAN *Agrobacterium Tumefaciens* HÜCRELERİNİN HAZIRLANMASI

1. *A. tumefaciens*'in log faz (üreme) kültüründen bir aliquat, 2.8 L'lik bir Fernbach şişesi içine konulan 1.5 L'lik yeast malt (YM) broth'a inoküle edilmiştir.
2. İnoküle örnek, gece boyunca 30 °C'de ve 300 rpm'de inkübe edilmiştir (hücreler, 5–10x10⁷ hücre/ml (OD550 ~ 1.0) değerine ulaşınca kadar büyümeye bırakılmıştır).
3. Sonrasında hücreler, 500 ml'lik steril santrifüj falkonlarına boşaltılmış ve 4 °C'de 10 dk 3000xg'de santrifüj yapılarak, hücreler pelletleştirilmiştir.
4. Santrifüj sonrasında, her bir falkondaki süpernatant dikkatlice dökülerek atılıp sonrasında hücre peletlerini içeren falkonlar buz üzerine yerleştirilmiştir.
5. Her bir falkona yaklaşık 50 ml steril ve buz ile soğutulmuş %10 gliserol eklenmiş ve hücre peletlerinin yeniden süspanse olması için vorteks yapılmıştır. Sonrasında her bir falkonun hacmi steril, soğutulmuş %10 gliserol ile 500 ml'ye tamamlanmış, Sonrasında, 4 °C'de 10 dk 3000xg'de santrifüjleme ile hücreler peletlenmiş ve santrifüj sonrasında falkonlardaki süpernatant dökülerek uzaklaştırılmıştır.
6. Her bir falkondan ayrı ayrı elde edilen hücre peletleri tek bir falkonda birleştirilmiş ve hücreler 5. madde'deki uygulama gibi tekrar yıkanmıştır.
7. Hücre peletleri, 25 ml steril, buzla soğutulmuş %10 gliserol içinde yeniden süspanse edilmiş ve soğutulmuş halde olan 30 ml hacimdeki Oakridge tüpüne aktarılmıştır. 4 °C'de 5 dk 3000 xg'de santrifüjleme sonrasında süpernatant dökülerek atılmış ve hücreler pelletleştirilmiştir.

8. Hücre pelleti 0,5 ml steril, buz ile soğutulmuş %10 gliserol içinde yeniden süspanse edilmiştir. Dondurmak için, steril 1.5 ml mikrofüt tüplerinde elektrokompentan hücreler 200 µl'lik alikvatlar halinde dağıtılmış; hücreler izopropanol-kuru buz yardımı ile dondurulup daha sonraki çalışmalar için -70 °C'de saklanmıştır. Hücreler bu koşullar altında yaklaşık 6 ay stabil kalabilmektedir.

4.12. PDIRECT_23C VEKTÖRÜNÜN *Agrobacterium tumefaciens* (EHA 105) BAKTERİLERİNE TRANSFORMASYONU

1. Elektropore edilecek DNA örnekleri (en fazla 5µl TE'de 100 ng'ye kadar olacak şekilde) steril 1,5 ml mikrofüt tüplerine aktarılmış ve tüpler buz üzerine yerleştirilmiştir.
2. Elektrokompotent *A. tumefaciens* hücreleri buz üzerinde çözülmüş, elektropore edilecek her bir DNA örneği için, DNA örneklerine 20µl elektrokompotent hücre eklenip karıştırmak için tüplere hafifçe dokunulmuştur.
3. Elektroporasyona tabi tutulacak her DNA örneği için ayrı ayrı, oda sıcaklığındaki 17 x 100 tüpüne/tüplerine 1ml YM broth eklenmiş ve 0,1cm elektroporasyon küveti buz üzerine yerleştirilmiştir.
4. Gene Pulser Xcell aleti sağ tarafındaki siyah açma- kapama düğmesinden açılmış, **(Gene Pulser Xcell koşulları: C = 25 µF; PC = 200 ohm; V = 2.4 kV).**
5. DNA hücresi örnekleri elektroporasyon küvetlerine aktarılıp süspansiyonun dibe çökmesi amaçlı küvet hafifçe düz bir yere vurdurulmuştur.
6. Küvet (ağız açık ve yukarı bakacak şekilde) ShockPod'a yerleştirilmiştir.
7. Elektroporasyon işlemini başlatmak için '**PULSE**' tuşuna (ekranda sağ tarafta kırmızı tuş) bir kez basılmıştır.
8. Pulsing İşlemi bittikten sonra aletin ekranında görünen '**RESULTS**' ile başlayan uyarı ile birlikte Pulsing işlemi bitmiştir.
9. Küvetteki hücrelerin, 17 x 100 mm tüpe aktarılması için 1ml LB broth kullanılmıştır.
10. Elektropore edilmiş hücreler 3 saat boyunca 30 °C'de 250 rpm'de inkübe edilmiştir.
11. Daha önceden hazırlanan LB agar plateler Laminar Flow kabin içine konularak oda sıcaklığına gelmeleri için beklenilmiş ve sonrasında, elektroporasyonu yapılmış, 17 x 100 tüp steril tüpteki LB ve plazmid-hücre karışımı; 250, 200, 100, 50 mikrolitre olacak şekilde LB agar platelere steril Drigalski spatülü yardımı ile Laminar

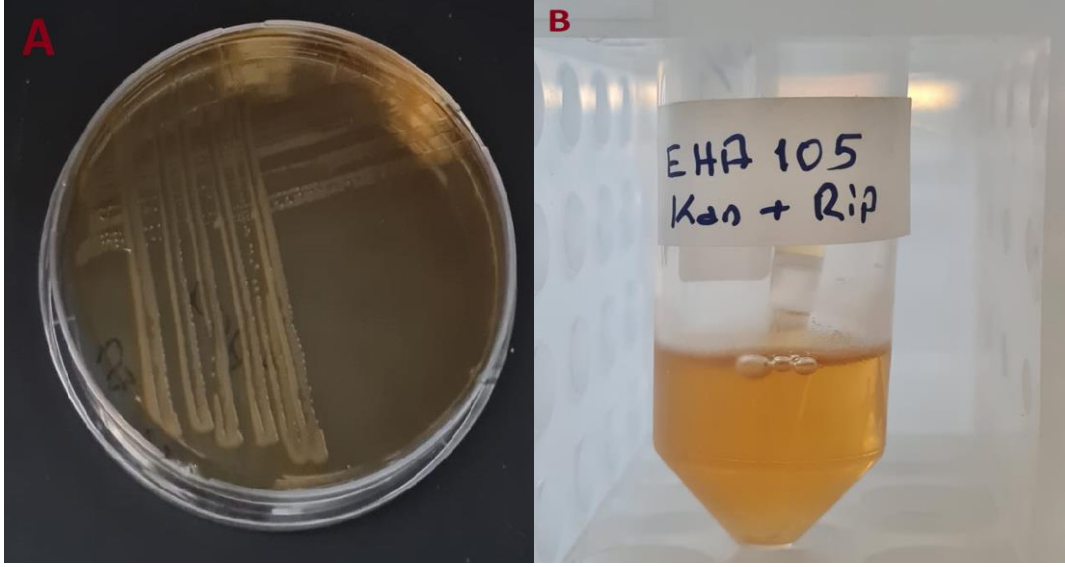
flow'da dağıtılmıştır. Petriler 5-10 dk kurumaları için Laminar Flow kabinde bekletilmiştir.

12. Plate'ler ters çevrilip, 48 saat boyunca 28 °C'de etüvde bekletilmiştir.

4.13. TOHUMLARIN YÜZEY STERİLİZASYONU VE ÇİMLENDİRİLMESİ

Tez kapsamında yürütülen çalışmalarda kullanılacak tohumların yüzey sterilizasyonu amacıyla ılık suda yaklaşık 2 saat bekletilen tohumlar, daha sonra ön sterilizasyon amacıyla akan çeşme suyunda 5 dk boyunca bekletilmiştir. Daha sonra; sterilizasyon koşullarının belirlenmesi için sırasıyla %70'lik etanol (a/h) çözeltisinde 2 ve 3 dk ve %20'lik NaOCl çözeltisinde 5, 10 ve 15 dk bekletildikten sonra her biri 5'er dk olmak üzere 3 kez steril saf su ile çalkalanarak yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonraki süreçte, olası kontaminasyon durumları, tohumların çimlenme durumu ve bitkilerin gelişim durumları gözlemlenerek çalışmanın geri kalanında kullanılacak en uygun sterilizasyon koşulları belirlenmiştir. Yüzey sterilizasyona tabi tutulan tohumlar, steril kurutma kağıtları üzerinde kurutulduktan sonra her bir steril petriye 9 adet tohum olacak şekilde ve bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen Murashige ve Skoog (MS) besin ortamına ekilmiş ve 24±2 °C sıcaklık, %65 nem, 5 LS ışık şiddeti, 16/8 saat fotoperiyot süresi olacak şekilde kontrollü şartlar altında bulunan iklim kabininde kültüre alınmıştır. Çalışma boyunca kullanılan bütün besin ortamları 121 °C sıcaklık ve 20 dk boyunca otoklav yapılarak steril hale getirilmiş ve ortam pH'sı 5,6-5,8'e ayarlanmıştır.

Çalışmada eksplant kaynağı olarak bitkilerin kotiledon ve hipokotil kısımları kullanılmıştır. *Agrobacterium* hücreleri kanamisin (50 mg/L) ve rifamisin (25 mg/L) antibiyotiğini içeren 50 ml sıvı LB ortamında 28 °C'de 200 rpm de 2 gün boyunca büyütülmüştür (Şekil 4.4. (B)). Yaklaşık olarak 4 günlük bitkilerden eşit boyutlarda olacak şekilde kesilen hipokotil ve kotiledonlar yaklaşık olarak 1 gün öncesinde hazırlanmış olan bakteri kültürü içerisinde 15 dk boyunca hafifçe çalkalanarak bekletilmiştir. Daha sonra, steril filtre kağıdında kurutulan eksplantlar hormon içermeyen kokültivasyon ortamına alınmıştır. Yaklaşık olarak 3 gün boyunca karanlık ortamda kokültivasyona bırakılmıştır. Buradan alınan eksplantların üzerinde biriken bakterileri uzaklaştırmak amacıyla 250 mg/L sefuroksim sodyum ve 100 mg/L kanamisin antibiyotiği içeren yıkama solüsyonunda 2 defa yıkanarak steril kurutma kağıtları üzerinde kurutulmuştur.



Şekil 4.4. *Agrobacterium* solüsyonunun hazırlanması. A) Katı LB ortamında yetişen *Agrobacterium*. B) Sıvı ortamda *Agrobacterium* kültürünün çoğaltılması.

Buradan alınan eksplantlar, içerisinde 250 mg/L sefuroksim sodyum ve 100 mg/L kanamisin bulunan, 2.2 mg/L 6-Benzilaminopurin (BAP) ve 0.8 mg/L Naftalin asetik asit (NAA) bulunan rejenerasyon ortamına alınmıştır. Doku kültürü çalışmalarında kullanılan ortamlar ve içerikleri Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Doku kültürü çalışmalarında kullanılan ortamlar ve içerikleri

Ortam Kimyasal	Çimlendirme ortamı	Ko-kültivasyon ortamı	Sürgün ortamı	Köklendirme ortamı
Murashige & Skoog medium	4,4 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L
Sükroz	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L
Agar	8 g/L	8 g/L	8 g/L	8 g/L
BAP	-	-	2.2 mg/L	
NAA	-	-	0.8 mg/L	0.5 mg/L
Kanamisin	-	-	100 mg/L	
Sefuroksim Sodyum	-	-	250 mg/L	

4.14. ADAY TRANSGENİK BİTKİLERDE ANALİZLER

Transformasyon işleminin başarıyla gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için çeşitli moleküler analizler yapılmıştır. Bu amaçla meydana gelmesi beklenen mutasyonları saptamak ve mutasyon çeşidini belirlemek için hedef bölge dizilenmiştir. Bu amaçla ilk önce 1 aylık kalluslardan RNA izole edilmiştir. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir.

- Yaklaşık 100 mg kallus sıvı azot kullanılarak ezilmiş ve 1 ml TRIzol kimyasal eklenerek 2 ml'lik steril tüplerde homojenize edilmiştir.
- Karışım 5 dk oda ısısında bekletilerek nukleoprotein bileşenlerinin ayrışması sağlanmıştır.
- Her bir karışıma 0,2 ml kloroform eklenmiş ve tüpler 15 sn boyunca elle kuvvetlice çalkalanarak karıştırılmış ve 2-3 dk oda koşullarında bekletilip 20 dk soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm hızda santrifuj edilmiştir.
- Süpernatant kısmı yeni bir tüpe transfer edilmiş ve isopropil alkolle karıştırılarak RNA'nın çökmesi sağlanmıştır. Bu aşamada ilk aşamada kullanılan TRIzol reaktifinin yarısı kadar isopropil alkol eklenmiştir.
- Karışım oda ısısında 10 dk inkübasyona bırakılmış ve daha sonra 15.000 rpm hızda ve soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifuj edilmiştir.
- Pellet %75'lik etanol ile bir kez yıkanmış, bu basamakta yaklaşık 1 ml etanol eklenmiştir.
- İşlemler sonunda RNA çökeltisi 5-10 dk kurumaya bırakılmış ve RNA 40 ml TE ile çözülüp ve 10 dk 55-60°C de bekletilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C de saklanmıştır.

Daha sonra izole edilen RNA'lar kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. cDNA sentezi OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi sırasında kullanılan bileşenler Çizelge 4.10.'da verilmiş olup reaksiyon koşulları aşağıdaki gibidir.

Çizelge 4.10. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Hacim
5X RT Buffer	4 µl
dNTP	1 µl
Primers	1 µl
Total RNA or poly(A) + mRNA	(1 ng - 2 µg/rxn)
OneScript® Plus RTase	1 µl
Nuclease-free H ₂ O	Değişken

Bileşenler uygun miktarlarda karıştırılıp daha sonra kısa süreli santrifüj edilmiştir. Daha sonra karışım at 50-55 °C’de 15 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 85°C’de 5 dk tutularak reaksiyonun sonlandırılması sağlanmıştır. Son olarak kısa bir süre buz üstünde tutulmuş ve daha sonraki çalışmalar için -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Toplamda 12 adet transgenik adayı örneğin cDNA’ları kullanılarak hedef bölge PZR ile çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları

İçerik	Miktar
cDNA	3 µl
dNTP	1 µ
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse	1 µl
MgCl ₂	2.5 µl
Taq polimeraz	0.3 µl
Taq polimeraz tamponu	3 µl
BSA	1 µl
dH ₂ O	12.2 µl
Toplam	25 µl

Polimeraz zincir reaksiyonunun koşulları Çizelge 4.12'deki gibidir.

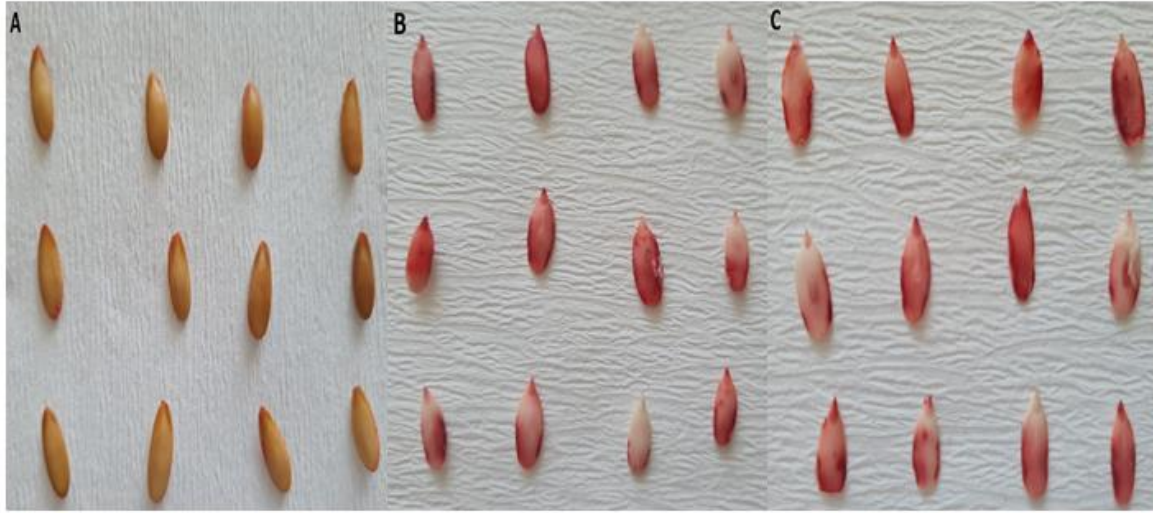
Çizelge 4.12. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları

Aşamalar	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95 °C	5 dk
Denatürasyon	94 °C	45 sn
Bağlanma	52 °C	1 dk
Uzama	72 °C	1 dk
Son uzama	72 °C	7 dk

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. TOHUM CANLILIK TESTİ

Çalışma materyali olarak kullanılan tohumlar; canlılık ve çimlenme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla tetrazolium testine tabi tutulmuşlardır. Rastgele seçilen 30 adet tohum 24 saat süreyle karanlıkta ve tetrazolium çözeltisinde bekletilmek suretiyle canlılık durumları belirlenmiştir (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Tohum canlılık testi A: Çalışmada kullanılan Kırkağaç-637 kavun çeşidine ait tohum B: Canlılık testi sonucu tohumların dıştan görünümü C: Tohumların içten görünümü

Çalışma materyali olarak kullanılan Kırkağaç-637 kavun çeşidinin tohumlarında tetrazolium testi kullanılarak tohum canlılık testi yapılmıştır. Rastgele seçilen 30 adet tohumdan 29 tanesi tetrazolium testine tabi tutulmuştur. Canlı dokuların suda çözünmeyen formazon adlı bileşiği absorbe etmesinden dolayı, kırmızı renge boyanan dokular canlı dokular olarak kabul edilir. Çalışmada kullanılan tohumlardan biri hariç diğerlerinde bu durum belirgin olarak gözlemlenmiştir. Bu durum tohumların yaklaşık %97 oranında canlı olduğunu göstermektedir.

5.2. HEDEF GENİN BELİRLENMESİ

CmVPS41 geninin dayanıklılıktan sorumlu olan ekzon bölgeleri Çizelge 5.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 5.1. *CmVPS41* geninin dayanıklılık bölgeleri

Predicted complete gene		
Ekzon	Başlangıç	Bitiş
MELO3C004827T1.ekzon4	9318450	9318540
MELO3C004827T1.ekzon5	9319045	9319147
MELO3C004827T1.ekzon13	9334732	9334851

5.3. SEKANS PRİMERLERİNİN OLUŞTURULMASI

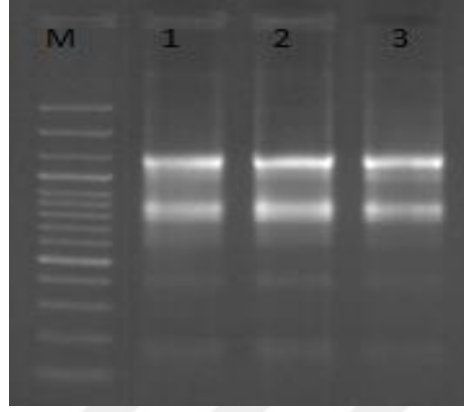
Çalışmada hedeflenecek olan *CmVPS41* geninin 5 nolu ekzonunun dizilenmesi amacıyla çeşitli primerler dizayn edilmiştir (Çizelge 5.2.).

Çizelge 5.2. *CmVPS41* gen bölgesi için dizayn edilen primerlerin listesi

Primer		Dizisi (5'→3')	Beklenen Uzunluk (bp)
Primer-1- <i>CmVPS41</i>	F	TGCTTGGGCAAATGATGCAG	352
	R	TTTTCGTGCCAACCGTGTTTC	
Primer-2- <i>CmVPS41</i>	F	GCAGCCAATGGGACACAAAG	412
	R	CCCACTGACCACCAGCATAG	
Primer-3- <i>CmVPS41</i>	F	GTTGGTCATTGGCTGGGGTA	435
	R	CCCACTGACCACCAGCATAGC	
Primer-4- <i>CmVPS41</i>	F	TCTGTTGGTCATTGGCTGGG	793
	R	AGAGGTTCAACACCCGCAG	
ekzon-5- <i>CmVPS41</i>	F	AGACCAGAAGTTCGCGTTGT	118
	R	CAAAGGGAGCATGTGCAAGG	
ekzon-3-7- <i>CmVPS41</i>	F	AGATTTGCAGCAGGTGGTCT	1113
	R	CTTTTTTCGTGCCAACCGTGT	
ekzon-3-10- <i>CmVPS41</i>	F	AGATTTGCAGCAGGTGGTCT	352
	R	TGGCCAAGTCTTAACAGTCGT	

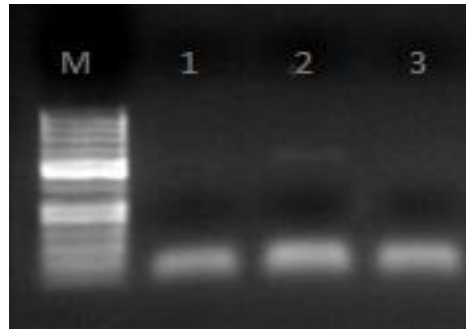
5.4. RNA İZOLASYONU, cDNA SENTEZİ VE PZR

Çalışmada hedeflenecek olan 5 nolu ekzonun dizilenmesi için örneklerden RNA izole edilmiş (Şekil 5.2.) ve daha sonra cDNA sentezlenip bu cDNA'lar PZR aşamasında kalıp DNA olarak kullanılmıştır.



Şekil 5.2. RNA izolasyonuna ait agaroz jel görüntüsü (M: Markır, 1,2 ve 3 no'lu örnekler)

Ekzon 5 bölgesinin hedeflenmesinde kullanılacak gRNA'ların dizayn edilmesi için çalışmada kullanılan materyalden ilk önce DNA izole edilmiştir. Normal şartlarda NCBI veri tabanında bulunan verilerden yola çıkılarak gRNA dizayn edilebilir. Ancak, özellikle kavunda tür içi varyasyonun fazla olması bu durumu zorlaştırmakta, ayrıca off-target durumundan kaçınmak için mevcut materyal üzerinden hareket edilmiştir. Ayrıca, gRNA seçiminde hedef bölge ile en yüksek komplimenterliği gösterecek olanı seçmek için bu strateji takip edilmiştir. Ancak, DNA izolasyonu sonucu yapılan PZR aşamaları sonucu herhangi bir bant elde edilmemiştir. Daha sonra ikinci bir alternatif olarak mRNA transkriptlerinden elde edilen cDNA'lara yönelik primer dizayn edilmiş ve bu şekilde ilgili bölgeye ait bantlar elde edilmiştir (Şekil 5.3.).



Şekil 5.3. PZR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü (M: Markır, 1,2 ve 3 no'lu örnekler)

5.5. PZR ÜRÜNLERİNİN DİZİLENMESİ

PZR ürünlerinin dizilenmesi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu dizilere ait veriler Çizelge 5.3.'te verilmiştir.

Çizelge 5.3. PZR ürünlerine ait dizi verileri

Örnek adı/Pozisyon	Dizi verileri
1/Forward	ATCAAGATAATNTCTACCGATGCCCTACCGGGTACATGGGTTTTGAGC ATTACAAGGCAAAGGACTATTCCCTTGCACATGCTCCCTTTGACATGC TCCCTTTGA
2/Forward	ACCAAGATGATNTCTACCGATGCCCTACCGGGTACATGGGTTTTGAGC ATTACAAGGCAAAGGACTATTCCCTTGCACATGCTCCCTTTGACATGC TCC
3/Forward	ACCAAGATGATNTCTACCGATGCCCTACCGGGTACATGGGTTTTGAGC ATTACAAGGCAAAGGACTATTCCCTTGCACATGCTCCCTTTGACA

Daha sonra; elde edilen dizilerin doğruluğunu kontrol etmek için NCBI veri tabanında blast yapılmış ve dizilerin *VPS41* geninin ekzon 5 bölgesine ait olduğu doğrulanmıştır (Şekil 5.4).

PREDICTED: Cucumis melo vacuolar protein sorting-associated protein 41 homolog (LOC103500583)

Sequence ID: [XM_008463940.2](#) Length: 3440 Number of Matches: 1

Range 1: 1208 to 1283 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
126 bits(68)	3e-26	75/78(96%)	2/78(2%)	Plus/Plus
Query 13	TCTACCGATGCCCTACCGGGTACATGGGTTTTGAGCATTACAAGGCAAAGGACTATTCCC	72		
Sbjct 1208	TCTACCGATGCCCGACCGG-TACAT-GGTTTTGAGCATTACAAGGCAAAGGACTATTCCC	1265		
Query 73	TTGCACATGCTCCCTTTG	90		
Sbjct 1266	TTGCACATGCTCCCTTTG	1283		

Şekil 5.4. Elde edilen dizilerin NCBI veri tabanında kontrol edilmesi

5.6. gRNA'LARIN DİZAYN EDİLMESİ

Çalışmada kullanılacak olan gRNA'ların tasarlanması için CRISPRdirect uygulaması kullanılmış olup program tarafından önerilen ilk iki sıradaki gRNA'lar çalışmada kullanılmıştır (Çizelge 5.4.).

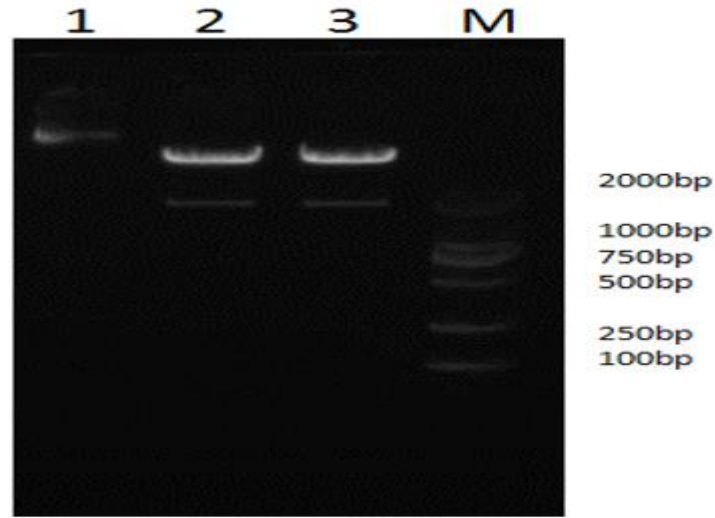
Çizelge 5.4. gRNA tasarımı için CRISPRdirect uygulaması tarafından önerilen gRNA dizileri

Pozisyon		Hedef dizi	Dizi bilgisi	
Başlangıç	+	20 baz+PAM (toplam 23 baz)	%GC	Tm
Bitiş	-			
17 - 39	+	CCGATGCCCTACCGGGTACATGG	65.00 %	81.11 °C
70 - 92	-	CCCTTGCACATGCTCCCTTTGAC	50.00 %	72.65 °C
18 - 40	+	CGATGCCCTACCGGGTACATGGG	60.00 %	78.73 °C
23 - 45	-	CCCTACCGGGTACATGGGTTTTG	50.00 %	73.45 °C
24 - 46	-	CCTACCGGGTACATGGGTTTTGA	50.00 %	74.45 °C
28 - 50	-	CCGGGTACATGGGTTTTGAGCAT	45.00 %	70.85 °C
35 - 57	+	CATGGGTTTTGAGCATTACAAGG	40.00 %	67.24 °C
41 - 63	+	TTTTGAGCATTACAAGGCAAAGG	35.00 %	65.94 °C
71 - 93	-	CCTTGCACATGCTCCCTTTGACA	50.00 %	73.56 °C
17 - 39	-	CCGATGCCCTACCGGGTACATGG	60.00 %	79.58 °C

gRNA'lar dizayn edilirken ve seçilirken dikkat edilen hususlardan biri off-target skorudur. Bu skor dizayn edilen gRNA'ların hedef dışı bölgelere bağlanma olasılıklarını göstermektedir. Daha yüksek skora sahip olanların genomdaki başka bir bölgeye bağlanma olasılıkları daha düşüktür. Bu amaçla off-target skoru (Diğer parametreler de göz önünde bulundurulduğunda) daha yüksek olanların seçilmesine dikkat edilmiştir. gRNA'lar seçilirken dikkat edilen bir diğer husus ise hedef bölgeye yönelik dizayn edilen gRNA sayısıdır. On-target durumunu artırmak ve hedef dışı bağlanmayı azaltmak için bu tez çalışmasında iki tane gRNA dizayn edilmiştir. Bu durum hem genom düzenleme etkinliğini artırmakta hem de gen susturulacak hatların elde edilme ihtimalini artırmaktadır.

5.7. *E. coli*'den PLAZMİT İZOLASYONU

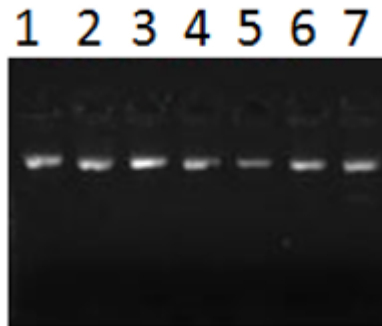
Klonlama deneylerinde kullanılacak olan pDIRECT_23C_VPSA_G5_alternatif-sgRNA1-2-CSY4 plazmiti bu plazmitleri içeren *E. coli* DH5 α hücrelerinden izole edilmiştir. Elde edilen plazmitler uygun restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek doğrusal hale getirilmiş ve agaroz jel elektroforezde görüntülenmiştir (Şekil 5.5.). pDIRECT_23C_VPSA_G5_alternatif-sgRNA1-2-CSY4 plazmiti 15.247 baz çifti (bç) uzunluğundadır.



Şekil 5.5. pDIRECT_23C plazmidi ve MluI ve PmeI enzimleriyle kesilmiş plazmitin agaroz jeldeki görüntüsü (1: pDIRECT_23C, 2,3: MluI ve PmeI enzimleriyle kesilmiş plazmit, M: Markır (2 kb)).

5.8. LİGASYONUN KOLONİ PZR İLE DOĞRULANMASI

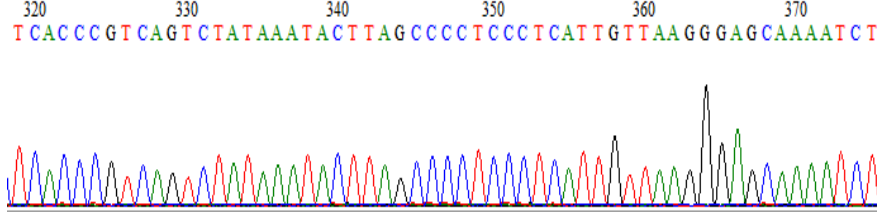
PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 90 voltta 45 dk yürütüldükten sonra pozitif kolonilerden 6 tanesi dizilenmek üzere seçilmiştir. Agaroz jel görüntüleri Şekil 5.6.'da verilmiştir.



Şekil 5.6. Koloni PZR'ye ait agaroz jel görüntüsü (1: pDIRECT_23C, 2,3,4,5,6,7: 23C_VPSA_G5_alternatif-sgRNA1-2-CSY4).

5.9. SANGER SEKANSLAMA İLE DOĞRULAMA

Pozitif kolonilerden izole edilen plazmitler doğrulama amacıyla dizilenmiştir. Dizilenen plazmitlere ait kromotogram görüntüsü şekil 5.7.'de verilmiştir.



Şekil 5.7. pDIRECT_23C plazmitinin kromotogram görüntüsünden bir kesit

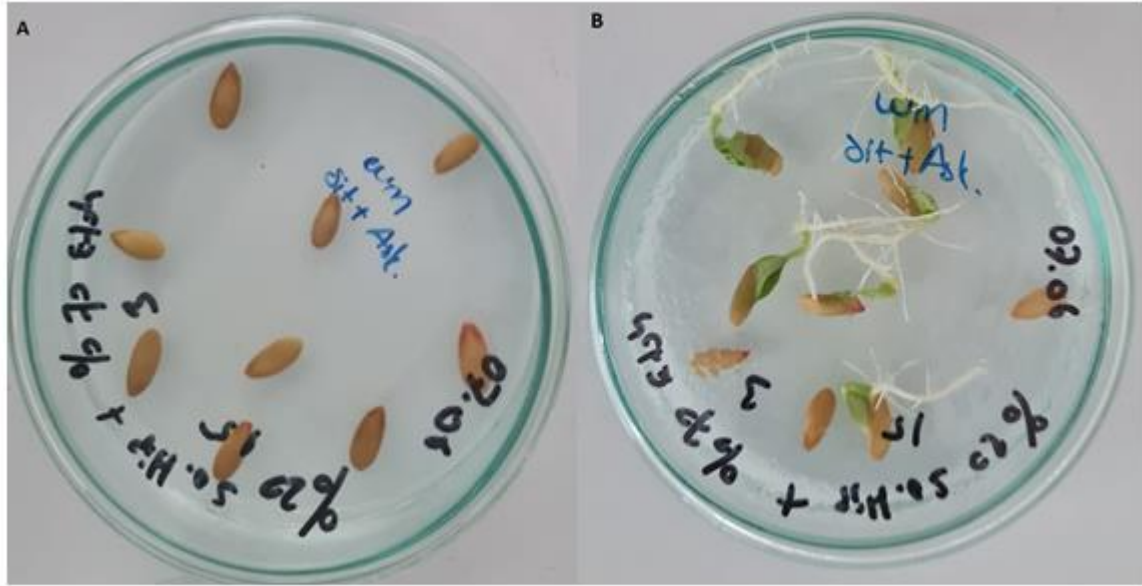
Daha sonra sgRNA1 ve 2'yi içeren gen kasetleri doğrulama amacıyla dizilenmiştir. Dizileme işlemi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu dizilere ait veriler çizelge 5.5.'te verilmiştir.

Cizelge 5.5. sgRNA1 ve 2'yi içeren gen kasetlerine ait dizi verileri

Pozisyon	Diziler
pDIRECT_23C_VPSA_G5_alternative-sgRNA1-2-CSY4	Forward TGGTAGGGACTCGGTGACGGACGGCGCGCCGAAGAGCTGGCAGACATACTGTCCCACA AATGAAGATGGAATCTGTAAAAGAAAACGCGTGAAATAATGCGTCTGACAAAGGTTAG GTCGGCTGCCTTTAATCAATACCAAAGTGGTCCCTACCACGATGGAAAACTGTGCAGT CGGTTTGGCTTTTTCTGACGAACAAATAAGATTCGTGGCCGACAGGTGGGGGTCCACCA TGTGAAGGCATCTTCAGACTCCAATAATGGAGCAATGACGTAAGGGCTTACGAAATAA GTAAGGGTAGTTTGGGAAATGTCCACTCACCCGTCAGTCTATAAATACTTAGCCCCCTCC CTCATTGTTAAGGGAGCAAAATCTCAGAGAGATAGTCCTAGAGAGAGAAAGAGAGCAA GTAGCCTAGAAGTAGTCAAGGCGGCGAAGTATTCAGGCACGTGGCCAGGAAGAAGAA AAGCCAAGACGACGAAAAACAGGTAAGAGCTAAGCTTCCTGCAGGTTCACTGCCGTATA GGCAGCCGATGCCCTACCGGGTACAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAATAAG GCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC GTTCACTGCCGTATAG GCAGCTTGCACATGCTCCCTTTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAATAAGGC TAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC GTTCACTGCCGTATAGGC AGGTCGATCGACAAGCTCGAGTTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAGG GAATTAGGGTTCCTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCCTTAGTAT GTATTTGTATTTGTAATAACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCC AGTACTAAAATCCAGATCCCCCGAATTACCGGTGGGCA Reverse AGCTTCTTTTTTTATTTCCGGATTATTCTAATAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTACCCGC CAATATATCCTGTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAACGACAATCTGATC CAAGCTCAAGCTGCTCTAGCATTGCGCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGAT CGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG ATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG CCACCGGTAATTCGGGGGATCTGGATTTTAGTACTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAGAA ATTTTATTGATAGAAGTATTTTACAAATACAAATACATACTAAGGGTTTCTTATATGCTC AACACATGAGCGAAACCCCTATAGGAACCCTAATTCCTTATCTGGGAACACTCACACA TTATTATGGAGAACTCGAGCTTGTGATCGACCTGCCTATACGGCAGTGAACGCACCG ACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTA GCTCTAAAACGCAAAGGGAGCATGTGCAAGCTGCCTATACGGCAGTGAACGCACCGAC TCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGC TCTAAAACGTACCCGGTAGGGCATCGGCTGCCTATACGGCAGTGAACCTGCAGGAAG CTTAGCTCTTACCTGTTTTCGTCGTCTTGGCTTTTCTTCTCCTGGCCACGTGCCTGAATA CTTCGCCGCCTTGACTACTTCTAGCTACTTGCTCTCTTTCTCTCTCTAGGACTATCTCTCT GAGATTTTGCTCCCTTAACAATGAGGGAGGGGCTAAGTATTTATAGACTGACGGGTGAG TGGACATTTCCCAACTACCCTTACTTATTTTCGTAAGCCCTTACGTCATTG

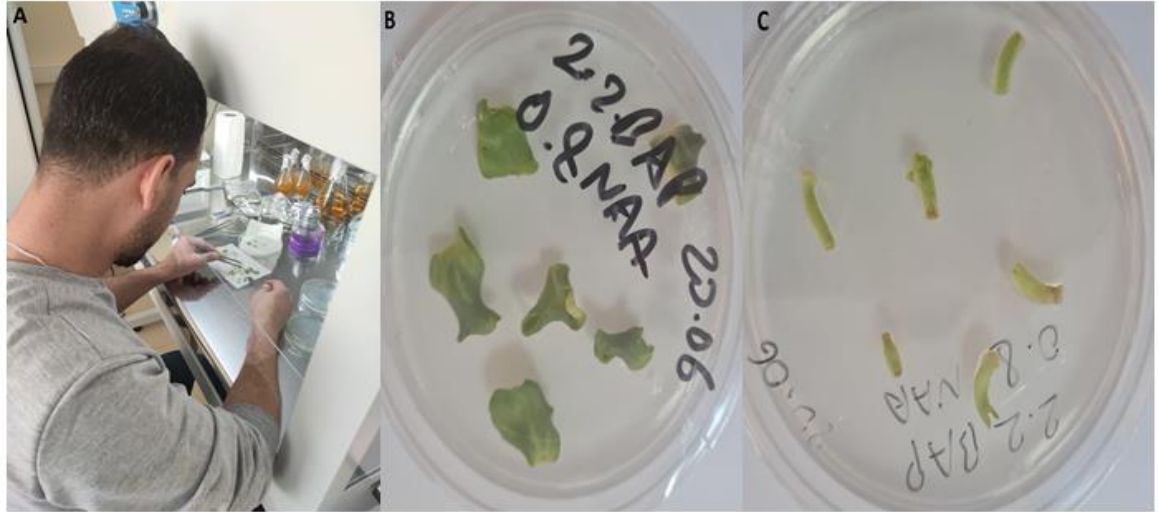
5.10. Bitki Materyali, Eksplant Hazırlanması ve Doku Kültürü Koşulları

Steril koşullarda ekilen ve çimlendirilen kavun bitkilerinde (Şekil 5.8.) en iyi rejenerasyon koşullarını belirlemek için farklı konsantrasyonlarda BAP (1-1.5-2.2 mg/L) ve NAA (0.5-0.8-1 mg/L) içeren ortamlar kullanılmıştır. Sürgün ortamı için en uygun koşulların 2.2 mg/L BAP ve 0.8 mg/L NAA içeren ortam olduğu, köklendirme ortamı için ise 0.5 mg/L NAA içeren ortam olduğu belirlenmiştir.



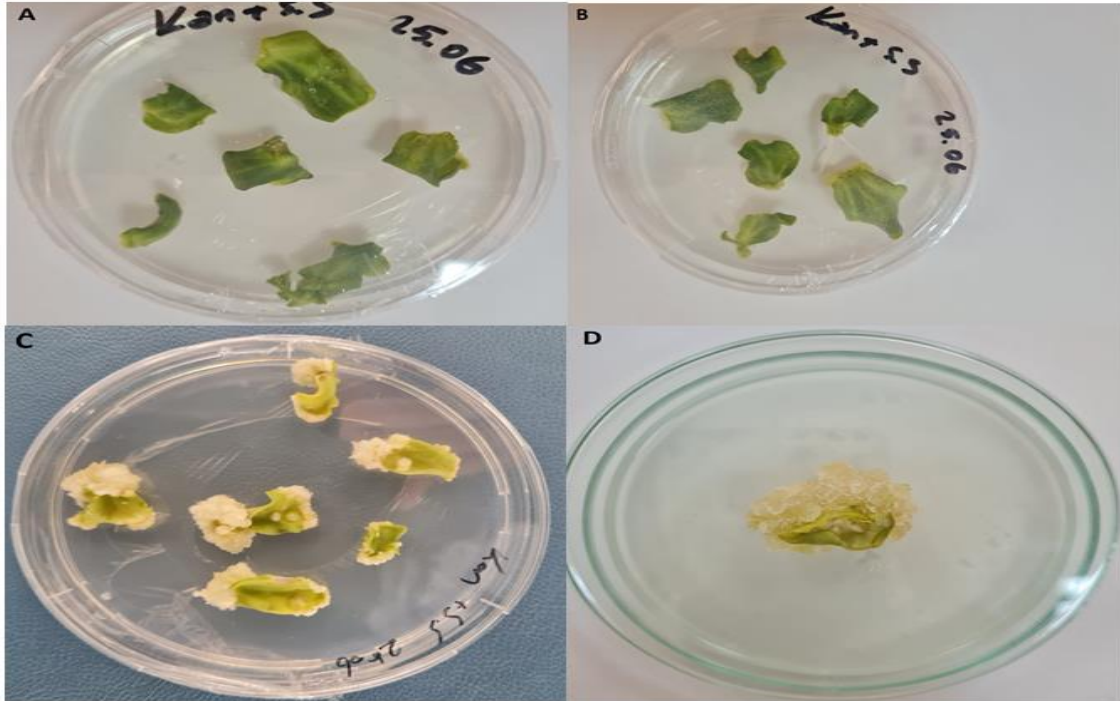
Şekil 5.8. Kavun tohumlarının *in vitro* ortamda çimlendirilmesi A: Tohumların MS-0 ortamına ekilmesi. B: 4 günlük kavun tohumları

Yaklaşık olarak 4 günlük bitkilerin hipokotil ve kotiledon kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Steril bir bistüri ile MS ortamı içinde kesilen eksplantlar daha önceden hazırlanmış bakteri solüsyonuna daldırılıp hafifçe çalkalanarak 20 dk oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Daha sonra steril filtre kağıtları ile bakteri solüsyonunun fazlası uzaklaştırılıp ko-kültivasyon ortamına alınıp burada 3 gün boyunca karanlıkta bekletilmiştir (Şekil 5.9.).



Şekil 5.9. Eksplantların *Agrobacterium* ile muamele edilmesi. A: Eksplantların kesilmesi. B: Ko-kültivasyon ortamına alınan kotiledon eksplantları. C: Ko-kültivasyon ortamına alınan hipokotil eksplantları.

Üç gün sonra eksplantlar, *Agrobacterium* eliminasyonunu ve dolaylı organogenezi sağlayacak olan seçici yarıkatı MS besiyerine (2.2 mg/L BAP, 0.8 mg/L NAA ve 100 mg/L kanamisin) alınmıştır (Şekil 5.10.). Daha sonra, eksplantlar düzenli olarak iki haftada bir alt kültüre alınmıştır.



Şekil 5.10. Eksplantların seçici besiyerine aktarılması ve gelişimi A: Seçici besiyerine aktarılmış 1 haftalık eksplantlar. B: İki haftalık eksplantlarda kallus başlangıcı. C: 3 hafta sonunda kallusların görünümü. D: 4 haftalık kallus.

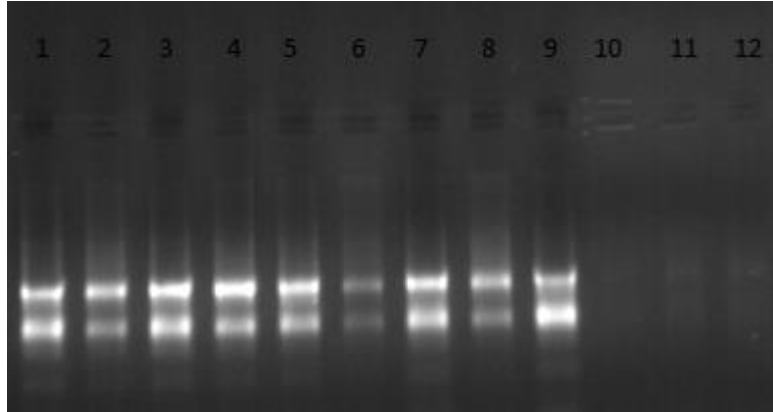
Kalluslardan oluşan sürgünler, 2-3 cm boya ulaştıktan sonra (Şekil 5.11.) steril bistüri ile kallustan ayrılmış ve rejenerasyon ortamından alınıp, köklendirme ortamına alınmıştır.



Şekil 5.11. Yaklaşık 6 haftalık kalluslarda sürgün oluşumu

5.11. RNA İZOLASYONU ve cDNA SENTEZİ

Kallus örneklerinden 12 tanesi RNA izolasyonu amacıyla kullanılmıştır. TRIzol yöntemiyle yapılan izolasyona ait agaroz jel görüntüsü şekil 5.12.'de verilmiştir.



Şekil 5.12. RNA izolasyonuna ait agaroz jel görüntüsü

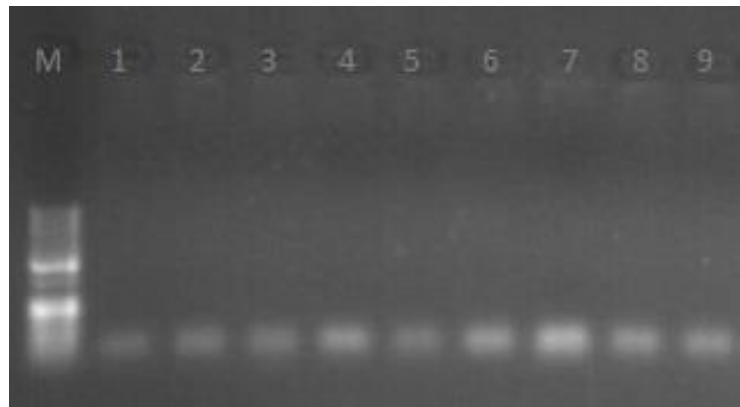
Ayrıca; RNA örneklerinde saflık ve miktar tayinleri Nanodrop cihazı (Nanodrop ND-1000 spectrophotometer) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (çizelge 5.6.). Kalite ve saflık analizlerinden sonra 10, 11 ve 12 nolu örnekler çalışmadan çıkarılmıştır. Daha sonra kalan RNA örnekleri kullanılarak PZR işleminde kalıp DNA olarak kullanılacak olan cDNA'lar sentezlenmiştir.

Çizelge 5.6. RNA örneklerine ait kalite ve miktar tayinleri

Örnek No	A260	A280	A260/A280	Miktar (ng/ul)
1	33.338	16.81	1.98	1333.52
2	33.556	15.621	2.15	1342.24
3	33.019	14.294	2.31	1320.76
4	33.881	17.241	1.97	1355.27
5	33.393	17.501	1.91	1335.74
6	33.384	15.339	2.18	1335.38
7	32.980	15.758	2.09	1319.21
8	35.055	17.808	1.97	1402.21
9	33.246	16.751	1.98	1338.58
10	7.375	2.625	2.81	295.015
11	28.248	8.279	3.41	1129.95
12	12.553	3.029	4.14	502.32

5.12. PZR

Transformasyon işleminin başarıyla gerçekleşip gerçekleşmediğini öğrenmek için PZR işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.13.). Daha sonra meydana gelen mutasyonların tespiti için PZR ürünleri dizilenmiştir. PZR ürünlerinin dizilenmesi BM Labosis (Ankara) firması tarafından gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.13. PZR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü (M: Marker (100 bç))

PZR ürünlerine ait diziler elde edildikten sonra NCBI veri tabanında doğrulukları kontrol edilmiştir. Daha sonra BioEdit Sekans işleme programı (Versiyon 7.2) kullanılarak

hizalanmıştır. Dizilerin kontrol olarak kullanılan yabani hatlarla karşılaştırılması sonucu toplamda 9 örnekten 6 tanesinde herhangi bir mutasyonun meydana gelmediği görülürken 7, 8 ve 9 no'lu örneklerde farklı pozisyonlarda mutasyonlar meydana gelmiştir.

	PAM	Mutasyon tipi	Pozisyon
WT	TCCCTTGCACATGCTCCCTTTGA		
1	TCCCTTGCACATGCTCCCTTTGA	/	/
2	TCCCTTGCACATGCTCCCTTTGA	/	/
3	TCCCTTGCACATGCTCCCTTTGA	/	/
4	TCCCTTGCACATGCTCCCTTTGA	/	/
5	TCCCTTGCACATGCTCCCTTTGA	/	/
6	TCCCTTGCACATGCTCCCTTTGA	/	/
7	TCCCTTGCAC-TGCTCCCTTTGA	Delesyon	-1
8	TCCCTTGC--ATGCTCCCTTTGA	Delesyon	-2
9	TCCCTT----ATGCTCCCTTTGA	Delesyon	-4

Şekil 5.14. sgRNA1'in hedeflediği bölgede meydana gelen mutasyon tipleri ve pozisyonları

	PAM	Mutasyon tipi	Pozisyon
WT	CCGATGCCCTACCGGGTACATGGG		
1	CCGATGCCCTACCGGGTACATGGG	/	/
2	CCGATGCCCTACCGGGTACATGGG	/	/
3	CCGATGCCCTACCGGGTACATGGG	/	/
4	CCGATGCCCTACCGGGTACATGGG	/	/
5	CCGATGCCCTACCGGGTACATGGG	/	/
6	CCGATGCCCTACCGGGTACATGGG	/	/
7	CCGATGCCCTACCG--TACATGGG	Delesyon	-2
8	CCGATTCCCTACCGG-TACATGGG	Delesyon/Yanlış eşleşme	-1
9	CCGATGCCCTAC----TACATGGG	Delesyon	-4

Şekil 5.15. sgRNA2'nin hedeflediği bölgede meydana gelen mutasyon tipleri ve pozisyonları

SgRNA1 hedef bölgeleri dikkate alındığında 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 no'lu örneklerde herhangi bir mutasyonun meydana gelmediği görülmektedir. Ancak 7 no'lu örnekte 1 baz, 8 No'lu örnekte 2 baz ve 9 No'lu örnekte 4 bazın çıkarılması şeklinde delesyonlar meydana gelmiştir.

SgRNA2'in hedeflediği bölgeler göz önünde bulundurulduğunda 7. örnekte 2 bazın çıkarılması (delesyon) şeklinde bir mutasyon meydana gelmiştir. 8. örnekte ise aynı

bölgede ancak tek bir bazın çıkarılması şeklinde bir mutasyon ve yanlış eşleşme (G>T) meydana gelmiştir. 9 No'lu örnekte ise 4 bazın çıkarılması şeklinde bir delesyon meydana gelmiştir.



6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında kullanılan Kırkağaç-637 ticari kavun çeşidinin tohum canlılık potansiyelini araştırmak için tetrazolium testi kullanılmıştır. Bu amaçla farklı yöntemler kullanılsa da en yaygın olarak kullanılan yöntem tetrazolium testidir. Tetrazolium testi, klasik çimlenme testine göre daha kısa sürede sonuçlar alınmasını sağlamaktadır. Aslında tetrazolium testi solunum aktivitesinin ölçüsüdür ve tohumlardaki yaşam belirtileri ya da metabolik aktiviteyi ortaya koymaktadır. Bu tez çalışması kapsamında yapılan canlılık testleri sonucu, rastgele seçilen 30 adet tohumdan sadece 1 tanesinin canlılık belirtisi göstermemesi kullanılan materyalin oldukça canlı olduğunu göstermektedir.

Çalışmada hedef bölge olarak ekzon 5 bölgesi kullanılmıştır. Bu durumun temelde iki nedeni vardır. İlk olarak CMV'ye karşı hassasiyet bölgesinin burada yer alması, ikincisi ise protein fonksiyonu için gerekli olan ekzon bölgelerinden biri olmasıdır. Gen fonksiyonunun ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmalarda açık okuma çerçevesinin (Open reading frame) hedeflenmesi istenilen bir durumdur. Ayrıca, genellikle genlerin nakavt edilmesine yönelik çalışmalarda dizayn edilen gRNA'ların proteinlerin N- ve C- uçlarına çok yakın olmaması istenilen bir diğer durumdur. Ancak çalışmada hedeflen bölge olan ekzon 5'in görece kısa boyutlu olması (Yaklaşık 118 bp) kimi zaman dezavantajlar oluşturmuştur. Örneğin hedef bölgenin dizilenmesi sırasında ve hedef bölgeye yönelik primer dizaynında ciddi sorunlar yaşanmıştır.

Çalışma materyalinin sterilizasyonu amacıyla çeşitli kimyasallar ve süreler (%70'lik etanol (a/h) çözeltisinde 2 ve 3 dk ve %20'lik NaOCl çözeltisinde 5, 10 ve 15 dk) kullanılmıştır. En yüksek çimlenme oranı ve en düşük kontaminasyon koşulları %70'lik etanolde 3 dk ve %20'lik NaOCl'de 15 dk süre bekletilmesiyle elde edilmiştir. Diğer koşullarda daha düşük kontaminasyon ya da daha yüksek çimlenme elde edilmesine rağmen her iki koşul için en iyi değerler bu şartlarda sağlanmıştır.

Rejenerasyon koşullarının belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA hormonları kullanılmıştır. Kavunda tür içi varyasyon rejenerasyon koşullarını önemli ölçüde etkilemekte, bu durum her bir çeşit için yeni bir rejenerasyon protokolü gerektirmektedir. (187) Farklı kavun varyetelerinde farklı oranlarda somatik embriyogenezis meydana geldiğini belirtmişler, ayrıca, bu farklılığın varyete düzeyinden

ziyade çeşit düzeyinde olduğunu belirtmişlerdir. (188) kavun bitkilerinde rejenerasyon yeteneğinin fizyolojik koşullardan ziyade genetik farklılıklardan kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Bu tez çalışmasında rejenerasyon amacıyla hipokotil ve kotiledonlar eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Ancak hipokotil eksplantlarında bulaştırma işleminden sonra ortamdaki *Agrobacterium* üremesi durdurulamamış ve etkin bir rejenerasyon sağlanamamıştır. Bu yüzden çalışma kotiledon eksplantları ile sürdürülmüştür. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda kavun bitkilerinde rejenerasyonun sağlanması amacıyla eksplant kaynağı olarak hipokotil (189), kotiledon (190), yaprak (191) ve kök (192) kısımları kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında bakteriyel seleksiyon amacıyla farklı konsantrasyonlarda kanamisin kullanılmıştır. Ancak, en iyi sonuçlar 100 mg/L konsantrasyonlarda elde edilmiştir. (193) tarafından yapılan bir çalışmada Kırkağaç kavunu materyalinde bakteriyel seleksiyon amacıyla 50, 75 ve 100 mg/L konsantrasyonlarda kanamisin kullanılmış ve en iyi seleksiyon 100 mg/L kanamisinin kullanıldığı koşullarda elde edilmiştir.

Dizilen örneklerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde toplam 9 örnekte başlıca delesyon şeklinde mutasyonların meydana geldiği görülmektedir. Sadece bir örnekte farklı olarak yanlış eşleşmenin de meydana geldiği görülmektedir. Mutasyonların meydana geldiği örneklerin tamamının aynı örnekler olması transformasyon işleminden kaynaklanmaktadır. Bu durum 1,2,3,4,5 ve 6. örneklerde transformasyon işleminin gerçekleşmediğini 7, 8 ve 9 no'lu örneklerde ise başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Her ne kadar bahsedilen örneklerin seçici besi yerinde belirli bir noktaya kadar sürgün oluşumu meydana gelmişse de, ilerleyen dönemlerde sürgünler ölmüştür. Mutasyonların meydana geldiği toplam 3 örnekte ise sürgün gelişimi devam etmiştir. Bu durum temel olarak plazmitin kendisinden gelen kanamisin dayanıklılığından kaynaklanmaktadır.

CRISPR/Cas sistemi, virüslere karşı bakteriyel savunma sisteminin bir parçası olarak ortaya çıkmıştır ve bu nedenle virüslere karşı doğal bir dirence sahiptir ve bu durum sistemin viral bitki patojenlerine yönelik yapılacak genetik manipülasyon çalışmalarında kullanımını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, oldukça basit olması, yüksek etkinliğe sahip olması ve çok yönlülüğü, CRISPR/Cas sistemini; ökaryotik sistemlerde genom düzenleme, gen düzenleme, nükleik asit hedefleme ve virüs direncine yönelik çalışmalar için benzeri görülmemiş bir araç haline getirmiştir (194, 195). Tam olarak incelenmemiş olmalarına

rağmen tamamen, hem ZFN'lerin hem de TALEN'lerin bitki virüslerinin replikasyonunu kısmen engellediği bilinmektedir, ancak bu nükleazları kullanarak in vivo viral genom kesimine yönelik rapor edilmiş bir çalışma bulunmamaktadır (196). Ayrıca hem ZFN'ler hem de TALEN'ler yalnızca DNA dizilerini hedef alacak şekilde tasarlanabilir ve bitki RNA virüslerinin genomlarını hedefleyemezler. CRISPR/Cas sisteminde ise, herhangi bir genomu (DNA veya RNA) hedeflemek için birden fazla CRISPR/Cas modülü kullanılabilir ve herhangi bir bitki virüsünü veya karışık virüs enfeksiyonlarını hedeflemek bu sistemlerle çok basittir (197). Benzer şekilde, bitki virüs yönetimi, ucuz, basit, spesifik ve sahada uygulanabilir olmalıdır. Ancak, şu anda kullanılan tüm teşhis araçları pahalıdır, karmaşıktır ve çiftçiler tarafından sahada uygulanabilir konumda değildir. CRISPR/Cas tabanlı teşhis araçları hala geliştirme aşamasında olsa da, yakında tarımsal olarak uygulanabilir bir teşhis sisteminin tüm gereksinimlerini karşılayacaktır (194).

CRISPR/Cas sistemi, bitkilerde virüslere karşı dayanıklılığın sağlanması amacıyla başarıyla kullanılmaktadır (198). Genel olarak, bitki virüslerini kontrol etmek için CRISPR/Cas teknolojisini kullanmanın iki ana stratejisi vardır. İlk yaklaşımda, istilacı virüslerin replikasyonunu ve enfeksiyonunu engellemek için viral genom hedeflenir ve etkisiz hale getirilir. İkinci yaklaşımda ise, bitki bağışıklığını arttırmak ve virüs istilasını engellemek için viral enfeksiyon/yaşam döngüsü için gerekli olan konakçı duyarlılık faktörleri manipüle edilir.

Streptococcus pyogenes Cas9 varyantının kullanıldığı orijinal CRISPR/Cas sistemi DNA'yı hedefler. Bu nedenle, CRISPR/Cas9 sistemi ilk olarak replikasyon aşamasındaki viral genomik DNA'yı hedefleyerek geminivirüsle mücadelede kullanılmıştır (199). Birbirinden bağımsız çalışan 3 grup tütün ve model bitki *Arabidopsis*'te CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak geminivirüs dayanıklılığı sağladıklarını bildirmişlerdir. Bu gruplar intergenik bölgeleri, viral replikasyon başlatıcı proteini ya da kılıf protein bölgelerini hedeflemişler ve elde edilen mutant hatlardaki hastalık semptomlarında önemli ölçüde azalma görülmüştür (200). Bu sistem, model organizmaların yanı sıra arpa gibi bitkilerde de uygulanmış ve Wheat dwarf virüsüne (WDV) karşı dayanıklılık sağlanmıştır (201). Ayrıca, çift sarmallı DNA virüsleri için de CRISPR/Cas9 sistemi kullanılmış ve *Arabidopsis*'te Karnabahar mozaik virüsünü (CaMV) inhibe etmede etkili olduğu gösterilmiştir (202).

RNA virüsleri, DNA virüslerine kıyasla ekinlerde daha ciddi kayıplara ve tarımsal üretimde çok büyük hasara neden olur. *Francisella novicida*'dan (FnCas9) Cas9,

Leptotrichia shahii'den (LshCas13a) veya *Leptotrichia wadei*'den (LwaCas13a) Cas13a gibi birkaç Cas protein varyantının kullanılması ile geliştirilen CRISPR/Cas sistemlerinin in vivo şartlarda RNA molekülünü başarıyla hedeflediği belirtilmiştir (91, 203). İlk durumda, FnCas9 ve bu bakteriden elde edilen sgRNA; CMV ve TMV'yi hedef alacak şekilde tasarlanmış, elde edilen mutant hatlarda zayıflamış hastalık semptomları gözlenlenmiştir (204). İlginç bir şekilde, FnCas9 varyantının kesim özelliğinin değil, ama bağlanma özelliğinin viral inhibüsyon için gerekli olduğu bildirilmiştir. Daha sonra, LshCas13a sistemi yeniden programlanmış ve bitkilerde RNA virüslerini kontrol etmek amacıyla kullanılmıştır. Bu bağlamda; FnCas9/CRISPR sistemi tütün ve patatesten potivirüs enfeksiyonunu engellemek için başarıyla kullanılmıştır (204). LshCas13a sistemi tütün mozaik virüsünün genomik RNA'sını ve pirinçte Southern rice black-streaked dwarf virüsünün (SRBSDV) ve Rice stripe mozaik virüsünün (RSMV) genomik RNA'sını hedeflemeye başarıyla kullanılmıştır. Bu çalışmalar, LshCas13a sisteminin +ssRNA, -ssRNA ve dsRNA gibi farklı RNA virüsü tiplerine karşı kullanılabileceğini göstermektedir. RNA genomlarını hedeflemek, spesifik olmayan RNA bölünmesine yol açabilmesine rağmen, konakçı genomik DNA'da aktarılabilir hedef dışı etkiye yol açmadığı için daha avantajlıdır. Ayrıca, viral genomik RNA'nın kesilmesi, bitkilerin RNAi sistemi tarafından da hedeflenecektir. Bu nedenle, RNA virüslerinin genomlarını mutasyona uğratacak olan CRISPR/Cas antiviral sistemden kaçma şansı oldukça azdır.

Enfeksiyonun ilerlemesi için virüsün; replikasyon, transkripsiyon, translasyon vb. işlemlere yardımcı olması için birçok konakçı faktörü toplaması gerekir. Bu özellik virüs enfeksiyonunu sınırlamak için potansiyel bir genom düzenleme hedefi sağlar. Örneğin, virüslerin virionlarında ribozom yoktur ve konak translasyon mekanizması viral protein sentezi için gereklidir. Bitkilerde ökaryotik başlatma faktörü 4E (eIF4E) ve izoformu (eIFiso4E), bazı virüslerin viral protein translasyonunu başlatması için gereklidir (205). Lellis, Kasschau (206) yapılan bir çalışmada, *Arabidopsis* eIF(iso)4E mutantının Şalgam mozaik virüsüne (TuMV) karşı direncinin arttığı rapor edilmiştir.

Bu tez çalışmasında da viral faktörün iletim demetleri aracılığıyla bitkinin üst kısımlarına taşınmasını engellemek amacıyla *cmVPS41* geninin 5 nolu ekzonu hedeflenmiştir. Çünkü bu gen viral faktörün taşınımından sorumlu olan bir pıpeptidin transkripsiyonundan sorumludur. Aslında, bitkilerde bu yöndeki çalışmalarda eIF4E gibi farklı gen ve gen grupları da hedeflenebilir. Ancak, bir genin birden fazla karakter üzerine etkili olabileceği düşünüldüğünde hedeflenen gende meydana gelen mutasyon fenotipte anormalliklere

neden olabilir ya da eIF4E gibi bitkiler de ölüme neden olabilir. Bu yüzden, hedeflenen gen ya da gen gruplarının olası etkileri dikkatlice incelenmelidir.

6.2. SONUÇ

Bu çalışmada Kırkağaç 637 ticari kavun çeşidinde CMV'ye karşı dayanıklılığın sağlanması amacıyla vps41 geninin 5 nolu ekzonunda mutasyonlar meydana getirerek genin fonksiyonunun ortadan kaldırılması (Knock out) amaçlanmıştır. Bu amaçla hedef bölgeye yönelik 2 tane sgRNA dizayn edilmiştir. CRISPR/Cas9 vektörü Agrobacterium aracılığıyla aktarılmıştır. Doku kültürü koşullarının optimize edilmesinden sonra eksplantlar ortama aktarılmıştır. Bu eksplantlar içerisinde hipokotil eksplantları büyüme düzenleyicilere cevap vermezken, kotiledon eksplantlarında rejenerasyon gerçekleşmiştir. Daha sonra uygun sürgün ve köklendirme ortamına aktarılan eksplantlarda mutasyon analizi yapılmıştır. Toplamda 3 tane bitkide transformasyonun başarıyla gerçekleştiği görülmüştür. Ancak, transformasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği bitkilerde fenotipik karakterizasyonun yapılması gerekmektedir. Ayrıca, bu mutasyonların yavru nesillere başarıyla aktarılıp aktarılmayacağının belirlenmesi için T1 jenerasyonunun yetiştirilip bu bitkilerde de mutasyon analizinin yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak bu tez çalışmasında CRISPR/Cas9 tabanlı genom düzenleme aracı bir şekilde kullanılarak mutant hatlar elde edilmiş ve bu sistemin kavun (*Cucumis melo* L.) bitkilerinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Edwardson J, Christie R. Cucumoviruses. CRC Handbook of viruses infecting legumes. 1991:293-319.
2. Sorri V, Watanabe K, Valkonen J. Predicted kinase-3a motif of a resistance gene analogue as a unique marker for virus resistance. Theoretical and Applied Genetics. 1999;99(1-2):164-70.
3. Sebastian P, Schaefer H, Telford IR, Renner SS. Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010;107(32):14269-73.
4. Endl J, Achigan-Dako EG, Pandey AK, Monforte AJ, Pico B, Schaefer H. Repeated domestication of melon (*Cucumis melo*) in Africa and Asia and a new close relative from India. American Journal of Botany. 2018;105(10):1662-71.
5. Manchali S, Chidambara Murthy KN, Patil BS. Nutritional composition and health benefits of various botanical types of melon (*Cucumis melo* L.). Plants. 2021;10(9):1755.
6. Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, González VM, et al. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109(29):11872-7.
7. Esteras C, Nuez F, Picó B, YiHong W, Behera T, Kole C. Genetic diversity studies in Cucurbits using molecular tools. Genetics, Genomics and Breeding of Cucurbits. 2011;2(1):140-98.
8. Kirkbride JH. Biosystematic monograph of the genus *Cucumis* (Cucurbitaceae): botanical identification of cucumbers and melons: Parkway Publishers, Inc.; 1993.
9. Fernández-Trujillo JP, Picó B, Garcia-Mas J, Álvarez JM, Monforte AJ. Breeding for fruit quality in melon. Breeding for fruit quality. 2011:261-78.
10. Robinson R. Decker-Walters. DS Cucurbits New York: CAB International. 1997.
11. Jeffrey C. Key to the Cucurbitaceae of west tropical Africa, with a guide to localities

- and little-known species. JW African Sci. Assoc. 9: 79-97. 1980. A review of the Cucurbitaceae. J Linn Soc, Bot. 1964;81:233-47.
12. Munger H, Robinson R. Nomenclature of Cucumis melo L. Cucurbit Genet Coop Rep. 1991;14:43-4.
 13. Pitrat M. Handbook of Crop Breeding Vol I. Vegetables. 2008.
 14. Zitter TA, Hopkins DL, Thomas CE. Compendium of cucurbit diseases: The American Phytopathological Society; 1996.
 15. Sevik M, Arli-Sokmen M. Viruses infecting cucurbits in Samsun, Turkey. Plant Disease. 2003;87(4):341-4.
 16. Ertunç F. Ankara ilinde kabaklarda enfeksiyon oluşturan viral etmenlerin teşhisi üzerine araştırmalar. AÜ Ziraat Fak Yay. 1992(1252).
 17. Doolittle SP. A new infectious mosaic disease of cucumber. Phytopathology. 1916;6(2):145-7.
 18. Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG, Francki RI. Cucumber mosaic virus. Advances in virus research. 41: Elsevier; 1992. p. 281-348.
 19. Rietveld K, Pleij C, Bosch L. Three-dimensional models of the tRNA-like 3' termini of some plant viral RNAs. The EMBO journal. 1983;2(7):1079-85.
 20. Habili N, Symons RH. Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. Nucleic acids research. 1989;17(23):9543-55.
 21. Gal-On A, Kaplan I, Roossinck MJ, Palukaitis P. The kinetics of infection of zucchini squash by cucumber mosaic virus indicate a function for RNA 1 in virus movement. Virology. 1994;205(1):280-9.
 22. Roossinck MJ, Palukaitis P. Rapid induction and severity of symptoms in zucchini squash (Cucurbita pepo) map to RNA 1 of cucumber mosaic virus. Mol Plant-Microbe Interact. 1990;3(1):188-92.
 23. Kim SH, Palukaitis P, Park YI. Phosphorylation of cucumber mosaic virus RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. The EMBO journal.

- 2002;21(9):2292-300.
24. Choi SK, Palukaitis P, Min BE, Lee MY, Choi JK, Ryu KH. Cucumber mosaic virus 2a polymerase and 3a movement proteins independently affect both virus movement and the timing of symptom development in zucchini squash. *Journal of general virology*. 2005;86(4):1213-22.
 25. Lucy AP, Guo HS, Li WX, Ding SW. Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *The EMBO Journal*. 2000;19(7):1672-80.
 26. Ji L-H, Ding S-W. The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2001;14(6):715-24.
 27. Vaquero C, Turner A, Demangeat G, Sanz A, Serra M, Roberts K, et al. The 3a protein from cucumber mosaic virus increases the gating capacity of plasmodesmata in transgenic tobacco plants. *Journal of General Virology*. 1994;75(11):3193-7.
 28. Ding B, Li Q, Nguyen L, Palukaitis P, Lucas WJ. Cucumber mosaic virus 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology*. 1995;207(2):345-53.
 29. Gallitelli D. The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus research*. 2000;71(1-2):9-21.
 30. Hsu H, Barzuna L, Hsu Y, Bliss W, Perry K. Identification and subgrouping of Cucumber mosaic virus with mouse monoclonal antibodies. *Phytopathology*. 2000;90(6):615-20.
 31. Guiu-Aragonés C, Díaz-Pendón JA, Martín-Hernández AM. Four sequence positions of the movement protein of Cucumber mosaic virus determine the virulence against cmv1-mediated resistance in melon. *Molecular plant pathology*. 2015;16(7):675-84.
 32. Guiu-Aragonés C, Sánchez-Pina MA, Díaz-Pendón JA, Peña EJ, Heinlein M, Martín-Hernández AM. cmv1 is a gate for Cucumber mosaic virus transport from bundle sheath cells to phloem in melon. *Molecular Plant Pathology*. 2016;17(6):973-

84.

33. Argyris JM, Pujol M, Martín-Hernández AM, Garcia-Mas J. Combined use of genetic and genomics resources to understand virus resistance and fruit quality traits in melon. *Physiologia plantarum*. 2015;155(1):4-11.
34. Diaz JA, Mallor C, Soria C, Camero R, Garzo E, Fereres A, et al. Potential sources of resistance for melon to nonpersistently aphid-borne viruses. *Plant Disease*. 2003;87(8):960-4.
35. Risser G, Pitrat M, Rode J, editors. Resistance of melon (*Cucumis melo* L.) to cucumber mosaic virus. *Annales de l'amélioration des plantes*; 1977.
36. Essafi A, Díaz-Pendón JA, Moriones E, Monforte AJ, Garcia-Mas J, Martín-Hernández AM. Dissection of the oligogenic resistance to Cucumber mosaic virus in the melon accession PI 161375. *Theoretical and applied genetics*. 2009;118(2):275-84.
37. Guiu-Aragonés C, Monforte AJ, Saladié M, Corrêa RX, Garcia-Mas J, Martín-Hernández AM. The complex resistance to cucumber mosaic cucumovirus (CMV) in the melon accession PI161375 is governed by one gene and at least two quantitative trait loci. *Molecular Breeding*. 2014;34(2):351-62.
38. Giner A, Pascual L, Bourgeois M, Gyetvai G, Rios P, Picó B, et al. A mutation in the melon Vacuolar Protein Sorting 41 prevents systemic infection of Cucumber mosaic virus. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-12.
39. Palukaitis P, García-Arenal F. Cucumoviruses. *Advances in virus research*. 2003;62:241-323.
40. Boualem A, Dogimont C, Bendahmane A. The battle for survival between viruses and their host plants. *Current opinion in virology*. 2016;17:32-8.
41. Nicaise V. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. *Frontiers in plant science*. 2014;5:660.
42. Moffett P. Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. *Advances in virus research*. 75: Elsevier; 2009. p. 1-229.

43. Padmanabhan MS, Dinesh-Kumar SP. The conformational and subcellular compartmental dance of plant NLRs during viral recognition and defense signaling. *Current opinion in microbiology*. 2014;20:55-61.
44. Yamaji Y, Maejima K, Komatsu K, Shiraishi T, Okano Y, Himeno M, et al. Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *The Plant Cell*. 2012;24(2):778-93.
45. Wang A, Krishnaswamy S. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Molecular plant pathology*. 2012;13(7):795-803.
46. Reise SP, Waller NG. Item response theory and clinical measurement. *Annual review of clinical psychology*. 2009;5:27-48.
47. Piron F, Nicolai M, Minoia S, Piednoir E, Moretti A, Salgues A, et al. An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses. *PloS one*. 2010;5(6):e11313.
48. Fraser R. The genetics of resistance to plant viruses. *Annual review of phytopathology*. 1990;28(1):179-200.
49. Truniger V, Aranda MA. Recessive resistance to plant viruses. *Advances in virus research*. 75: Elsevier; 2009. p. 119-231.
50. Hashimoto M, Neriya Y, Yamaji Y, Namba S. Recessive resistance to plant viruses: potential resistance genes beyond translation initiation factors. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1695.
51. Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular plant pathology*. 2016;17(7):1140-53.
52. Macovei A, Sevilla NR, Cantos C, Jonson GB, Slamet-Loedin I, Čermák T, et al. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to Rice tungro spherical virus. *Plant biotechnology journal*. 2018;16(11):1918-27.
53. Gomez MA, Lin ZD, Moll T, Chauhan RD, Hayden L, Renninger K, et al.

- Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF 4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant biotechnology journal*. 2019;17(2):421-34.
54. Pyott DE, Sheehan E, Molnar A. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Molecular plant pathology*. 2016;17(8):1276-88.
55. Bastet A, Zafirov D, Giovinazzo N, Guyon-Debast A, Nogu   F, Robaglia C, et al. Mimicking natural polymorphism in eIF 4E by CRISPR-Cas9 base editing is associated with resistance to potyviruses. *Plant Biotechnology Journal*. 2019;17(9):1736-50.
56. Sekine K-T, Nandi A, Ishihara T, Hase S, Ikegami M, Shah J, et al. Enhanced resistance to Cucumber mosaic virus in the *Arabidopsis thaliana* ssi2 mutant is mediated via an SA-independent mechanism. *Molecular plant-microbe interactions*. 2004;17(6):623-32.
57. Garcia-Ruiz H. Susceptibility genes to plant viruses. *Viruses* 10: 484. 2018.
58. Li F, Liu W, Zhou X. Pivoting plant immunity from theory to the field. *Sci China Life Sci*. 2019;62:1539-42.
59. Li F, Wang A. RNA-targeted antiviral immunity: more than just RNA silencing. *Trends in microbiology*. 2019;27(9):792-805.
60. Mäkinen K. Plant susceptibility genes as a source for potyvirus resistance. *Annals of Applied Biology*. 2020;176(2):122-9.
61. Li F, Yang X, Bisaro DM, Zhou X. The β C1 Protein of geminivirus–betasatellite complexes: a target and repressor of host defenses. *Molecular plant*. 2018;11(12):1424-6.
62. Zou L-J, Deng X-G, Han X-Y, Tan W-R, Zhu L-J, Xi D-H, et al. Role of transcription factor HAT1 in modulating *Arabidopsis thaliana* response to Cucumber mosaic virus. *Plant and Cell Physiology*. 2016;57(9):1879-89.
63. Yamanaka T, Ohta T, Takahashi M, Meshi T, Schmidt R, Dean C, et al. TOM1, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a

- putative transmembrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(18):10107-12.
64. Wang A. Dissecting the molecular network of virus-plant interactions: the complex roles of host factors. *Annual review of phytopathology*. 2015;53:45-66.
 65. Lozano-Durán R, Rosas-Díaz T, Luna AP, Bejarano ER. Identification of host genes involved in geminivirus infection using a reverse genetics approach. *PloS one*. 2011;6(7):e22383.
 66. Lõhmus A, Hafren A, Mäkinen K. Coat protein regulation by CK2, CPIP, HSP70, and CHIP is required for potato virus A replication and coat protein accumulation. *Journal of virology*. 2017;91(3):e01316-16.
 67. Demirci Y, Zhang B, Unver T. CRISPR/Cas9: an RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(3):1844-59.
 68. Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*. 2013;31(7):397-405.
 69. Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P, et al. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Current gene therapy*. 2011;11(1):11-27.
 70. Zhang B. CRISPR/Cas gene therapy. *Journal of Cellular Physiology*. 2021;236(4):2459-81.
 71. Yin K, Gao C, Qiu J-L. Progress and prospects in plant genome editing. *Nature plants*. 2017;3(8):17107.
 72. Gorbunova V, Levy AA. Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucleic acids research*. 1997;25(22):4650-7.
 73. Puchta H, Fauser F. Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *The Plant Journal*. 2014;78(5):727-41.
 74. Brookhouser N, Raman S, Potts C, Brafman D. May I cut in? Gene editing

- approaches in human induced pluripotent stem cells. *Cells*. 2017;6(1):5.
75. Bortesi L, Zhu C, Zischewski J, Perez L, Bassié L, Nadi R, et al. Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant biotechnology journal*. 2016;14(12):2203-16.
 76. Puchta H. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of Experimental Botany*. 2005;56(409):1-14.
 77. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*. 1987;169(12):5429-33.
 78. Jansen R, Embden JDv, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*. 2002;43(6):1565-75.
 79. Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic acids research*. 2002;30(2):482-96.
 80. Shan S, Soltis PS, Soltis DE, Yang B. Considerations in adapting CRISPR/Cas9 in nongenetic model plant systems. *Applications in plant sciences*. 2020;8(1):e11314.
 81. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(39):E2579-E86.
 82. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*. 2012;337(6096):816-21.
 83. Ran F, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015;520(7546):186-91.
 84. Hirano H, Gootenberg JS, Horii T, Abudayyeh OO, Kimura M, Hsu PD, et al. Structure and engineering of *Francisella novicida* Cas9. *Cell*. 2016;164(5):950-61.

85. Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu L-F, Sontheimer EJ, et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(39):15644-9.
86. Kim E, Koo T, Park SW, Kim D, Kim K, Cho H-Y, et al. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nature communications*. 2017;8(1):1-12.
87. Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;468(7320):67-71.
88. Magadán AH, Dupuis M-È, Villion M, Moineau S. Cleavage of phage DNA by the *Streptococcus thermophilus* CRISPR3-Cas system. *PloS one*. 2012;7(7):e40913.
89. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015;163(3):759-71.
90. Fonfara I, Richter H, Bratovič M, Le Rhun A, Charpentier E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*. 2016;532(7600):517-21.
91. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DB, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*. 2016;353(6299):aaf5573.
92. Harrington LB, Burstein D, Chen JS, Paez-Espino D, Ma E, Witte IP, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*. 2018;362(6416):839-42.
93. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*. 2015;523(7561):481-5.

94. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016;351(6268):84-8.
95. Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*. 2018;361(6408):1259-62.
96. Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*. 2018;556(7699):57-63.
97. Lee JK, Jeong E, Lee J, Jung M, Shin E, Kim Y-h, et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. *Nature communications*. 2018;9(1):1-10.
98. Casini A, Olivieri M, Petris G, Montagna C, Reginato G, Maule G, et al. A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. *Nature biotechnology*. 2018;36(3):265-71.
99. Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, Welch MM, Sousa AA, Harrington LB, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR–Cas9 targeting accuracy. *Nature*. 2017;550(7676):407-10.
100. Miller SM, Wang T, Randolph PB, Arbab M, Shen MW, Huang TP, et al. Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs. *Nature biotechnology*. 2020;38(4):471-81.
101. Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, Kleinstiver BP. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. *Science*. 2020;368(6488):290-6.
102. Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF, et al. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal*. 2018;16(4):902-10.
103. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*. 2020;18(2):67-83.

104. Chaudhuri A, Halder K, Datta A. Classification of CRISPR/Cas system and its application in tomato breeding. *Theoretical and Applied Genetics*. 2022;1-21.
105. Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual review of plant biology*. 2019;70:667-97.
106. Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. Targeted mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics*. 2014;41(2):63-8.
107. Lowder LG, Zhang D, Baltes NJ, Paul III JW, Tang X, Zheng X, et al. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant physiology*. 2015;169(2):971-85.
108. Sandhya D, Jogam P, Allini VR, Abbagani S, Alok A. The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2020;18(1):1-11.
109. Svitashv S, Young JK, Schwartz C, Gao H, Falco SC, Cigan AM. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant physiology*. 2015;169(2):931-45.
110. Andersson M, Turesson H, Olsson N, Fält AS, Ohlsson P, Gonzalez MN, et al. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiologia Plantarum*. 2018;164(4):378-84.
111. Xing H-L, Dong L, Wang Z-P, Zhang H-Y, Han C-Y, Liu B, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC plant biology*. 2014;14(1):1-12.
112. Liang G, Zhang H, Lou D, Yu D. Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Sci Rep* 6: 21451. 2016.
113. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935-49.
114. Oliveros JC, Franch M, Tabas-Madrid D, San-León D, Montoliu L, Cubas P, et al. Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for

- ENSEMBL genomes. *Nucleic acids research*. 2016;44(W1):W267-W71.
115. Stemmer M, Thumberger T, del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL. CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PloS one*. 2015;10(4):e0124633.
 116. Brazelton Jr VA, Zarecor S, Wright DA, Wang Y, Liu J, Chen K, et al. A quick guide to CRISPR sgRNA design tools. *GM crops & food*. 2015;6(4):266-76.
 117. Labun K, Montague TG, Gagnon JA, Thyme SB, Valen E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic acids research*. 2016;44(W1):W272-W6.
 118. Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic acids research*. 2014;42(W1):W401-W7.
 119. Heigwer F, Zhan T, Breinig M, Brügemann D, Boutros M. CRISPR library designer (CLD). 2016.
 120. Concordet J-P, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic acids research*. 2018;46(W1):W242-W5.
 121. Haeussler M, Schönig K, Eckert H, Eschstruth A, Mianné J, Renaud J-B, et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome biology*. 2016;17(1):1-12.
 122. Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*. 2015;31(7):1120-3.
 123. Xie X, Ma X, Zhu Q, Zeng D, Li G, Liu Y-G. CRISPR-GE: a convenient software toolkit for CRISPR-based genome editing. *Molecular plant*. 2017;10(9):1246-9.
 124. Prykhodzhiy SV, Rajan V, Gaston D, Berman JN. CRISPR multitargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences. *PloS one*. 2015;10(3):e0119372.

125. Lei Y, Lu L, Liu H-Y, Li S, Xing F, Chen L-L. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Molecular plant*. 2014;7(9):1494-6.
126. Liu H, Ding Y, Zhou Y, Jin W, Xie K, Chen L-L. CRISPR-P 2.0: an improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants. *Molecular plant*. 2017;10(3):530-2.
127. Sun J, Liu H, Liu J, Cheng S, Peng Y, Zhang Q, et al. CRISPR-Local: a local single-guide RNA (sgRNA) design tool for non-reference plant genomes. *Bioinformatics*. 2019;35(14):2501-3.
128. Minkenberg B, Zhang J, Xie K, Yang Y. CRISPR-PLANT v2: An online resource for highly specific guide RNA spacers based on improved off-target analysis. *Plant Biotechnology Journal*. 2019;17(1):5.
129. Yan M, Zhou SR, Xue HW. CRISPR Primer Designer: Design primers for knockout and chromosome imaging CRISPR-Cas system. *Journal of integrative plant biology*. 2015;57(7):613-7.
130. Bae S, Kweon J, Kim HS, Kim J-S. Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites. *Nature methods*. 2014;11(7):705-6.
131. Bae S, Park J, Kim J-S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*. 2014;30(10):1473-5.
132. Hwang G-H, Park J, Lim K, Kim S, Yu J, Yu E, et al. Web-based design and analysis tools for CRISPR base editing. *BMC bioinformatics*. 2018;19(1):1-7.
133. Park J, Bae S. Cpf1-Database: web-based genome-wide guide RNA library design for gene knockout screens using CRISPR-Cpf1. *Bioinformatics*. 2018;34(6):1077-9.
134. Park J, Bae S, Kim J-S. Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics*. 2015;31(24):4014-6.
135. Park J, Kim J-S, Bae S. Cas-Database: web-based genome-wide guide RNA library design for gene knockout screens using CRISPR-Cas9. *Bioinformatics*. 2016;32(13):2017-23.

136. Abadi S, Yan WX, Amar D, Mayrose I. A machine learning approach for predicting CRISPR-Cas9 cleavage efficiencies and patterns underlying its mechanism of action. *PLoS computational biology*. 2017;13(10):e1005807.
137. Zhu H, Liang C. CRISPR-DT: designing gRNAs for the CRISPR-Cpf1 system with improved target efficiency and specificity. *Bioinformatics*. 2019;35(16):2783-9.
138. Zhu H, Richmond E, Liang C. CRISPR-RT: a web application for designing CRISPR-C2c2 crRNA with improved target specificity. *Bioinformatics*. 2018;34(1):117-9.
139. Hough SH, Kancleris K, Brody L, Humphries-Kirilov N, Wolanski J, Dunaway K, et al. Guide Picker is a comprehensive design tool for visualizing and selecting guides for CRISPR experiments. *BMC bioinformatics*. 2017;18(1):1-10.
140. Heigwer F, Kerr G, Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nature methods*. 2014;11(2):122-3.
141. O'Brien A, Bailey TL. GT-Scan: identifying unique genomic targets. *Bioinformatics*. 2014;30(18):2673-5.
142. Rastogi A, Murik O, Bowler C, Tirichine L. PhytoCRISP-Ex: a web-based and stand-alone application to find specific target sequences for CRISPR/CAS editing. *BMC bioinformatics*. 2016;17(1):1-4.
143. Li R, Li R, Li X, Fu D, Zhu B, Tian H, et al. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant biotechnology journal*. 2018;16(2):415-27.
144. Čermák T, Curtin SJ, Gil-Humanes J, Čegan R, Kono TJ, Konečná E, et al. A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. *The Plant Cell*. 2017;29(6):1196-217.
145. Peng A, Chen S, Lei T, Xu L, He Y, Wu L, et al. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *Cs LOB 1* promoter in citrus. *Plant biotechnology journal*. 2017;15(12):1509-19.
146. Hussain B, Lucas SJ, Ozturk L, Budak H. Mapping QTLs conferring salt tolerance and micronutrient concentrations at seedling stage in wheat. *Scientific reports*.

2017;7(1):1-14.

147. Svitashhev S, Schwartz C, Lenderts B, Young JK, Mark Cigan A. Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature communications*. 2016;7(1):1-7.
148. Li C, Unver T, Zhang B. A high-efficiency CRISPR/Cas9 system for targeted mutagenesis in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Scientific reports*. 2017;7(1):1-10.
149. Klap C, Yeshayahou E, Bolger AM, Arazi T, Gupta SK, Shabtai S, et al. Tomato facultative parthenocarp results from Sl AGAMOUS-LIKE 6 loss of function. *Plant Biotechnology Journal*. 2017;15(5):634-47.
150. Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*. 2013;31(8):686-8.
151. Malzahn AA, Tang X, Lee K, Ren Q, Sretenovic S, Zhang Y, et al. Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and Arabidopsis. *BMC biology*. 2019;17(1):1-14.
152. Zhang B. MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *Journal of experimental botany*. 2015;66(7):1749-61.
153. Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, et al. ARGOS 8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant biotechnology journal*. 2017;15(2):207-16.
154. Chen S, Zhang N, Zhang Q, Zhou G, Tian H, Hussain S, et al. Genome editing to integrate seed size and abiotic stress tolerance traits in Arabidopsis reveals a role for DPA4 and SOD7 in the regulation of inflorescence architecture. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(11):2695.
155. Bouzroud S, Gasparini K, Hu G, Barbosa MAM, Rosa BL, Fahr M, et al. Down regulation and loss of auxin response factor 4 function using CRISPR/Cas9 alters plant growth, stomatal function and improves tomato tolerance to salinity and osmotic stress. *Genes*. 2020;11(3):272.
156. Cui Y, Jiang N, Xu Z, Xu Q. Heterotrimeric G protein are involved in the regulation

- of multiple agronomic traits and stress tolerance in rice. *BMC plant biology*. 2020;20(1):1-13.
157. Wang B, Xie G, Liu Z, He R, Han J, Huang S, et al. Mutagenesis reveals that the OsPPa6 gene is required for enhancing the alkaline tolerance in rice. *Frontiers in plant science*. 2019:759.
 158. Hükelhoven R, Panstruga R. Cell biology of the plant–powdery mildew interaction. *Current opinion in plant biology*. 2011;14(6):738-46.
 159. Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, et al. The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*. 1997;88(5):695-705.
 160. Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature biotechnology*. 2014;32(9):947-51.
 161. Nekrasov V, Wang C, Win J, Lanz C, Weigel D, Kamoun S. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-6.
 162. Zhang M, Liu Q, Yang X, Xu J, Liu G, Yao X, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of Clpsk1 in watermelon to confer resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant cell reports*. 2020;39(5):589-95.
 163. Kim Y-A, Moon H, Park C-J. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of Os8N3 in rice to confer resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Rice*. 2019;12(1):1-13.
 164. Wang F, Wang C, Liu P, Lei C, Hao W, Gao Y, et al. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. *PloS one*. 2016;11(4):e0154027.
 165. Ortigosa A, Gimenez-Ibanez S, Leonhardt N, Solano R. Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of Sl JAZ 2. *Plant biotechnology journal*. 2019;17(3):665-73.
 166. Wang L, Chen S, Peng A, Xie Z, He Y, Zou X. CRISPR/Cas9-mediated editing of CsWRKY22 reduces susceptibility to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in Wanjincheng

- orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Plant Biotechnology Reports*. 2019;13(5):501-10.
167. Zhang Z, Ge X, Luo X, Wang P, Fan Q, Hu G, et al. Simultaneous editing of two copies of Gh14-3-3d confers enhanced transgene-clean plant defense against *Verticillium dahliae* in allotetraploid upland cotton. *Frontiers in plant science*. 2018;9:842.
 168. Martyn R, Netzer D. Resistance to races 0, 1, and 2 of *Fusarium* wilt of watermelon in *Citrullus* sp. PI-296341-FR. *HortScience*. 1991;26(4):429-32.
 169. Yang B, Sugio A, White FF. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(27):10503-8.
 170. Li M, Li X, Zhou Z, Wu P, Fang M, Pan X, et al. Reassessment of the four yield-related genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in plant science*. 2016;7:377.
 171. Xu R, Yang Y, Qin R, Li H, Qiu C, Li L, et al. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *Journal of Genetics and Genomics= Yi chuan xue bao*. 2016;43(8):529-32.
 172. Li X, Wang Y, Chen S, Tian H, Fu D, Zhu B, et al. Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Frontiers in plant science*. 2018;9:559.
 173. Yang Q, Zhong X, Li Q, Lan J, Tang H, Qi P, et al. Mutation of the D-hordein gene by RNA-guided Cas9 targeted editing reducing the grain size and changing grain compositions in barley. *Food chemistry*. 2020;311:125892.
 174. Lyzenga WJ, Harrington M, Bekkaoui D, Wigness M, Hegedus DD, Rozwadowski KL. CRISPR/Cas9 editing of three CRUCIFERIN C homoeologues alters the seed protein profile in *Camelina sativa*. *BMC plant biology*. 2019;19(1):1-16.
 175. BAKTEMUR G, YILDIZ M, BÜYÜKALACA S, ABAK K. Kavunda (*Cucumis melo* L.) uyartılmış haploid embriyoların ayrılmasında kullanılabilecek yöntemler. *alatarım*. 2010:15.

176. Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in ecology & evolution*. 2004;19(10):535-44.
177. Kobayashi K, Sekine K-T, Nishiguchi M. Breakdown of plant virus resistance: can we predict and extend the durability of virus resistance? *Journal of general plant pathology*. 2014;80(4):327-36.
178. Edwardson JR, Christie RG. *CRC handbook of viruses infecting legumes*: CRC Press; 2018.
179. Roossinck MJ. Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology*. 2001;2(2):59-63.
180. Şevik M, Sökmen MA. Samsun ilinde kabakgil bitkilerinde görülen virüs hastalıkları. IX Türkiye Fitopatoloji Kongre Bildirileri. 2001;3(8):180-9.
181. Yılmaz M, Lecoq H, Abak K, Baloğlu S, Sarı N. Türkiye’de kabakgil sebze türlerinde zarar yapan virüsler. *Türkiye*. 1992;1:439-42.
182. Ertunç F. Ankara ilinde kabaklarda enfeksiyon oluşturan viral etmenin teşhisi üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. 1992;1252:13.
183. Kang B-C, Yeam I, Jahn MM. Genetics of plant virus resistance. *Annual review of phytopathology*. 2005;43(1):581-621.
184. Fraser R. The genetics of plant-virus interactions: implications for plant breeding. *Euphytica*. 1992;63(1):175-85.
185. Ohnishi S, Echizenya I, Yoshimoto E, Boumin K, Inukai T, Masuta C. Multigenic system controlling viral systemic infection determined by the interactions between Cucumber mosaic virus genes and quantitative trait loci of soybean cultivars. *Phytopathology*. 2011;101(5):575-82.
186. Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL. *Plant propagation: principles and practices*: Prentice-Hall Inc.; 1997.
187. Oridate T, Atsumi H, Ito S, Araki H. Genetic difference in somatic embryogenesis from seeds in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*.

1992;29(1):27-30.

188. Molina R, Nuez F. Correlated response of in vitro regeneration capacity from different source of explants in *Cucumis melo*. *Plant Cell Reports*. 1995;15(1):129-32.
189. Liborio Stipp LC, Januzzi Mendes BM, Stefano Piedade S, Martinelli Rodriguez AP. In vitro morphogenesis of *Cucumis melo* var. *inodorus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2001;65(1):81-9.
190. Moreno V, Garcia-Sogo M, Granell I, Garcia-Sogo B, Roig L. Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L., cv. 'Amarillo Oro'). *Plant cell, tissue and organ culture*. 1985;5(2):139-46.
191. Kathal R, Bhatnagar S, Bhojwani SS. Regeneration of plants from leaf explants of *Cucumis melo* cv. Pusa Sharbati. *Plant Cell Reports*. 1988;7(6):449-51.
192. Kathal R, Bhatnagar S, Bhojwani SS. Plant regeneration from the callus derived from root explants of *Cucumis melo* L. cv. Pusa sharbati. *Plant Science*. 1994;96(1-2):137-42.
193. Curuk S. Studies on in vitro Regeneration and Genetic Transformation in Some Mel-on (*Cucumis melo* L.) Cultivars: PhD thesis. Cukurova University Adana; 1999.
194. Aman R, Mahas A, Mahfouz M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies. *ACS synthetic biology*. 2020;9(6):1226-33.
195. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096.
196. Cheng X, Li F, Cai J, Chen W, Zhao N, Sun Y, et al. Artificial TALE as a convenient protein platform for engineering broad-spectrum resistance to begomoviruses. *Viruses*. 2015;7(8):4772-82.
197. Mahas A, Aman R, Mahfouz M. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants. *Genome biology*. 2019;20(1):1-16.
198. Ali Z, Aman R, Mahas A, Rao GS, Tehseen M, Marsic T, et al. iSCAN: An RT-LAMP-coupled CRISPR-Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS-

- CoV-2. Virus research. 2020;288:198129.
199. Mahas A, Mahfouz M. Engineering virus resistance via CRISPR–Cas systems. *Current opinion in virology*. 2018;32:1-8.
 200. Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali S, Tashkandi M, Mahfouz MM. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome biology*. 2015;16(1):1-11.
 201. Kis A, Hamar É, Tholt G, Bán R, Havelda Z. Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. *Plant biotechnology journal*. 2019;17(6):1004.
 202. Liu H, Soyars CL, Li J, Fei Q, He G, Peterson BA, et al. CRISPR/Cas9-mediated resistance to cauliflower mosaic virus. *Plant Direct*. 2018;2(3):e00047.
 203. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, et al. RNA targeting with CRISPR–Cas13. *Nature*. 2017;550(7675):280-4.
 204. Zhang T, Zheng Q, Yi X, An H, Zhao Y, Ma S, et al. Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. *Plant biotechnology journal*. 2018;16(8):1415-23.
 205. Sanfaçon H. Plant translation factors and virus resistance. *Viruses*. 2015;7(7):3392-419.
 206. Lellis AD, Kasschau KD, Whitham SA, Carrington JC. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF (iso) 4E during potyvirus infection. *Current Biology*. 2002;12(12):1046-51.

EKLER

Tez çalışması sırasında kullanılan sgRNA1 ve sgRNA2'yi içeren vektörlere ait diziler Ek-1'de ve çalışmada kullanılan kimyasal madde listesi Ek-2'de verilmiştir.



EK 1: sgRNA 1 ve 2'yi içeren pDIRECT_23C vektörüne ait dizi verileri

GTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT
TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGG
CAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA
AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAAC
CACGTTAAGGGATTTTGGTCATGCATTCTAGGTACTAAAACAATTCATCCAGTAAAATATAATA
TTTTATTTTCTCCCAATCAGGCTTGATCCCCAGTAAGTCAAAAAATAGCTCGACATACTGTTCTT
CCCCGATATCCTCCCTGATCGACCGGACGCAGAAGGCAATGTCATACCACTTGTCCGCCCTGCC
GCTTCTCCCAAGATCAATAAAGCCACTTACTTTGCCATCTTTCACAAAGATGTTGCTGTCTCCCA
GGTCGCCGTGGGAAAAGACAAGTTCCTCTTCGGGCTTTTCCGTCTTTAAAAAATCATACAGCTC
GCGCGGATCTTTAAATGGAGTGTCTTCTTCCCAGTTTTCGCAATCCACATCGGCCAGATCGTTAT
TCAGTAAGTAATCCAATTTCGGCTAAGCGGCTGTCTAAGCTATTTCGTATAGGGACAATCCGATAT
GTCGATGGAGTGAAAGAGCCTGATGCACTCCGCATACAGCTCGATAATCTTTTCAGGGCTTTGT
TCATCTTCATACTCTTCCGAGCAAAGGACGCCATCGGCCTCACTCATGAGCAGATTGCTCCAGC
CATCATGCCGTTCAAAGTGCAGGACCTTTGGAACAGGCAGCTTTCCTTCCAGCCATAGCATCAT
GTCCTTTTCCCGTTCACATCATAGGTGGTCCCTTTATACCGGCTGTCCGTCAATTTTAAATATAG
GTTTTCATTTTCTCCACCAGCTTATATACCTTAGCAGGAGACATTCCTTCCGTATCTTTTACGCA
GCGGTATTTTTTCGATCAGTTTTTTCAATTCCGGTGATATTCTCATTTTTAGCCATTTATTATTTCT
TCCTCTTTTCTACAGTATTTAAAGATACCCCAAGAAGCTAATTATAACAAGACGAACTCCAATT
CACTGTTCTTGCATTCTAAAACCTTAAATACCAGAAAACAGCTTTTCAAAGTTGTTTTCAAAG
TTGGCGTATAACATAGTATCGACGGAGCCGATTTTGAACCGCGGTGATCACAGGCAGCAACG
CTCTGTCATCGTTACAATCAACATGCTACCCTCCGCGAGATCATCCGTGTTTCAAACCCGGCAGC
TTAGTTGCCGTTCTTCCGAATAGCATCGGTAACATGAGCAAAGTCTGCCGCCTTACAACGGCTC
TCCCGCTGACGCCGTCCCGGACTGATGGGCTGCCTGTATCGAGTGGTGATTTTGTGCCGAGCTG
CCGTCGGGGAGCTGTTGGCTGGCTGGTGGCAGGATATATTGTGGTGTAACAAATTGACGCTT
AGACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTAATGTACTGAATTAACGCCGAATTAATTCCGG
GGATCTGGATTTTAGTACTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAGAAATTTTATTGATAGAAGTATTTT
ACAAATACAAATACATACTAAGGGTTTCTTATATGCTCAACACATGAGCGAAACCTATAGGAA
CCCTAATTCCTTATCTGGGAACTACTCACACATTATTATGGAGAACTCGAGTCAAATCTCGGT
GACGGGCAGGACCGGACGGGGCGGTACCGGCAGGCTGAAGTCCAGCTGCCAGAAACCCACGTC
ATGCCAGTTCCCGTGCTTGAAGCCGGCCGCCCGCAGCATGCCGCGGGGGGCATATCCGAGCGCC
TCGTGCATGCGCACGCTCGGGTCGTTGGGCAGCCCGATGACAGCGACCACGCTCTTGAAGCCCT
GTGCCTCCAGGGACTTCAGCAGATGGGTGTAGAGCGTGGAGCCCAGTCCCGTCCGCTGGTGGCG
GGGGCTGACGTACACGGTCGACTCGGCCGTCCAGTCGTAGGCGTTGCGTGCCTTCCAGGGGGCC
GCGTAGGCGATGCCGGCGACCTCGCCGTCCACCTCGGCGACGAGCCAGGGATAGCGCTCCCGC
AGACGGACGAGGTCGTCCGTCCACTCCTGCGGTTCTGCGGCTCGGTACGGAAGTTGACCGTGC
TTGTCTCGATGTAGTGTTGACGATGGTGCAGACCGCCGGCATGTCCGCCTCGGTGGCACGGCG
GATGTCCGCCGGGCGTCGTTCTGGGCTCATGGTAGACTCGAGAGAGATAGATTTGTAGAGAGA
GACTGGTGATTTACGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTT

GCGAAGGATAGTGGGATTGTGCGTCATCCCTTACGTCAGTGGAGATATCACATCAATCCACTTG
CTTTGAAGACGTGGTTGGAACGTCTTCTTTTTCCACGATGCTCCTCGTGGGTGGGGGTCCATCTT
TGGGACCACTGTCCGCAGAGGCATCTTGAACGATAGCCTTTCCTTTATCGCAATGATGGCATT
GTAGGTGCCACCTTCCTTTTCTACTGTCCTTTTGATGAAGTGACAGATAGCTGGGCAATGGAATC
CGAGGAGGTTTCCCGATATTACCCTTTGTTGAAAAGTCTCAATAGCCCTTTGGTCTTCTGAGACT
GTATCTTTGATATTCTTGGAGTAGACGAGAGTGTCTGCTCCACCATGTTTACATCAATCCACTT
GCTTTGAAGACGTGGTTGGAACGTCTTCTTTTTCCACGATGCTCCTCGTGGGTGGGGGTCCATCT
TTGGGACCACTGTCCGCAGAGGCATCTTGAACGATAGCCTTTCCTTTATCGCAATGATGGCATT
GTAGGTGCCACCTTCCTTTTCTACTGTCCTTTTGATGAAGTGACAGATAGCTGGGCAATGGAATC
CGAGGAGGTTTCCCGATATTACCCTTTGTTGAAAAGTCTCAATAGCCCTTTGGTCTTCTGAGACT
GTATCTTTGATATTCTTGGAGTAGACGAGAGTGTCTGCTCCACCATGTTGGCAAGCTGCTCTAG
CCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGGT
TTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGC
ACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT
TTCACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCGGCGCG
CCAGATTTGCCTTTTCAATTCAGAAAGAATGCTAACCACAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCA
GCAGGTATCATCAAGACGATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAATACCTTCCCAAGA
AGGTTAAAGATGCAGTCAAAAGATTGAGGACTAACTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATAT
TTCTCAAGATCAGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTACAAACCAAGGCA
AGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAAGGTAGTTCCCACTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAA
GATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCT
CTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTAC
TCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGG
GTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGT
GGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGA
TGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGA
AGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGAT
GACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGA
GAGAACACGGGGGACTCCTGCAGGAAAAATGGATCATTATCTTGATATTAGACTTAGACCTGAT
CCAGAATTTCCACCAGCTCAACTTATGTCTGTTCTTTTTGGAAAACCTTCATCAAGCTCTTGTTGC
TCAAGGAGGAGATAGAATTGGAGTTTCTTTTCTGATCTTGATGAATCAAGATCAAGACTTGA
GAAAGACTTAGAATTCATGCTTCTGCTGATGATCTTAGAGCTTTGCTTGCTAGACCTTGGCTTGA
AGGACTTAGAGATCATCTTCAATTTGGAGAACCAGCTGTTGTTCCACATCCAACCTCCTTATAGA
CAAGTTTCAAGAGTTCAAGCTAAATCTAATCCAGAAAGACTTAGAAGAAGACTTATGAGAAGA
CATGATCTTTCTGAAGAAGAAGCTAGAAAAAGAATTCCTGATACTGTTGCTAGAGCTTTGGATT
TGCCTTTTGTACACTTAGATCACAATCTACTGGACAACATTTTAGACTTTTTATTAGACATGGA
CCACTTCAAGTTACTGCTGAAGAAGGAGGATTTACTTGTTATGGACTTTCTAAGGGAGGTTTTGT
TCCTTGGTTTGGATCTGGAGCTACTAATTTTTCTCTTCTTAAGCAAGCTGGAGATGTTGAAGAAA
ATCCTGGACCCATGGATAAGAAGTACTCTATCGGACTCGATATCGGAACCTAACTCTGTGGGATG
GGCTGTGATCACCGATGAGTACAAGGTGCCATCTAAGAAGTTCAAGGTTCTCGGAAACACCGAT

AGGCACTCTATCAAGAAAAACCTTATCGGTGCTCTCCTCTTCGATTCTGGTGAAACTGCTGAGG
CTACCAGACTCAAGAGAACCGCTAGAAGAAGGTACACCAGAAGAAAGAACAGGATCTGCTACC
TCCAAGAGATCTTCTCTAACGAGATGGCTAAAGTGGATGATTCATTCTTCCACAGGCTCGAAGA
GTCATTCTCGTGGAAGAAGATAAGAAGCACGAGAGGCACCCTATCTTCGGAAACATCGTTGAT
GAGGTGGCATACCACGAGAAGTACCCTACTATCTACCACCTCAGAAAGAAGCTCGTTGATTCTA
CTGATAAGGCTGATCTCAGGCTCATCTACCTCGCTCTCGCTCACATGATCAAGTTCAGAGGACA
CTTCCTCATCGAGGGTGATCTCAACCCTGATAACTCTGATGTGGATAAGTTGTTTCATCCAGCTCG
TGCAGACCTACAACCAGCTTTTCGAAGAGAACCCTATCAACGCTTCAGGTGTGGATGCTAAGGC
TATCCTCTCTGCTAGGCTCTCTAAGTCAAGAAGGCTTGAGAACCCTCATTGCTCAGCTCCCTGGTG
AGAAGAAGAACGGACTTTTCGGAAACTTGATCGCTCTCTCTCTCGGACTCACCCCTAACTTCAA
GTCTAACTTCGATCTCGCTGAGGATGCAAAGCTCCAGCTCTCAAAGGATACCTACGATGATGAT
CTCGATAACCTCCTCGCTCAGATCGGAGATCAGTACGCTGATTTGTTCCCTCGCTGCTAAGAACCT
CTCTGATGCTATCCTCCTCAGTGATATCCTCAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCTCCACTC
TCAGCTTCTATGATCAAGAGATACGATGAGCACCACCAGGATCTCACACTTCTCAAGGCTCTTG
TTAGACAGCAGCTCCCAGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGATCAGTCTAAGAACGGATACGC
TGGTTACATCGATGGTGGTGCATCTCAAGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCTATCCTCGAG
AAGATGGATGGAACCGAGGAACCTCCTCGTGAAGCTCAATAGAGAGGATCTTCTCAGAAAGCAG
AGGACCTTCGATAACGGATCTATCCCTCATCAGATCCACCTCGGAGAGTTGCACGCTATCCTTA
GAAGGCAAGAGGATTTCTACCCATTCTCAAGGATAACAGGGAAAAGATTGAGAAGATTCTCA
CCTTCAGAATCCCTTACTACGTGGGACCTCTCGCTAGAGGAAACTCAAGATTCGCTTGGATGAC
CAGAAAGTCTGAGGAAACCATCACCCCTTGGAACCTTCGAAGAGGTGGTGGATAAGGGTGCTAG
TGCTCAGTCTTTCATCGAGAGGATGACCAACTTCGATAAGAACCCTTCCAAACGAGAAGGTGCTC
CCTAAGCACTCTTTGCTCTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGTTGACCAAGGTTAAGTACG
TGACCGAGGGAATGAGGAAGCCTGCTTTTTTGTGAGGTGAGCAAAAGAAGGCTATCGTTGATCT
CTTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAGCAGCTCAAAGAGGATTACTTCAAGAAAAT
CGAGTGCTTCGATTCAGTTGAGATTTCTGGTGTGAGGATAGGTTCAACGCATCTCTCGGAACCT
ACCACGATCTCCTCAAGATCATTAAGGATAAGGATTTCTTGAGATAACGAGGAAAACGAGGATA
TCTTGAGGATATCGTTCTTACCCTCACCCCTCTTTGAAGATAGAGAGATGATTGAAGAAAGGCT
CAAGACCTACGCTCATCTCTTCGATGATAAGGTGATGAAGCAGTTGAAGAGAAGAAGATACAC
TGGTTGGGGAAGGCTCTCAAGAAAGCTCATTAACGGAATCAGGGATAAGCAGTCTGGAAAGAC
AATCCTTGATTTCTCAAGTCTGATGGATTGCTAACAGAACTTCATGCAGCTCATCCACGATG
ATTCTCTCACCTTTAAAGAGGATATCCAGAAGGCTCAGGTTTCAGGACAGGGTGATAGTCTCCA
TGAGCATATCGCTAACCTCGCTGGATCTCCTGCAATCAAGAAGGGAATCCTCCAGACTGTGAAG
GTTGTGGATGAGTTGGTGAAGGTGATGGGAAGGCATAAGCCTGAGAACATCGTGATCGAAATG
GCTAGAGAGAACCAGACCTCAGAAGGGACAGAAGAACTCTAGGGAAAGGATGAAGAGGAT
CGAGGAAGGTATCAAAGAGCTTGATCTCAGATCCTCAAAGAGCACCCCTGTTGAGAACACTCA
GCTCCAGAATGAGAAGCTCTACCTCTACTACCTCCAGAACGGAAGGGATATGTATGTGGATCAA
GAGTTGGATATCAACAGGCTCTCTGATTACGATGTTGATCATATCGTGCCACAGTCATTCTTGAA
GGATGATTCTATCGATAACAAGGTGCTCACCAGGTCTGATAAGAACAGGGGTAAGAGTGATAA
CGTGCCAAGTGAAGAGGTTGTGAAGAAAATGAAGAACTATTGGAGGCAGCTCCTCAACGCTAA

GCTCATCACTCAGAGAAAGTTCGATAACTTGACTAAGGCTGAGAGGGGAGGACTCTCTGAATTG
GATAAGGCAGGATTCATCAAGAGGCAGCTTGTGGAACCAGGCAGATCACTAAGCACGTTGCA
CAGATCCTCGATTCTAGGATGAACACCAAGTACGATGAGAACGATAAGTTGATCAGGGAAAGTG
AAGGTTATCACCTCAAGTCAAAGCTCGTGTCTGATTTTCAGAAAGGATTTCCAATTCTACAAGG
TGAGGGAAATCAACAACTACCACCACGCTCACGATGCTTACCTTAACGCTGTTGTTGGAACCGC
TCTCATCAAGAAGTATCCTAAGCTCGAGTCAGAGTTCGTGTACGGTGATTACAAGGTGTACGAT
GTGAGGAAGATGATCGCTAAGTCTGAGCAAGAGATCGGAAAGGCTACCGCTAAGTATTTCTTCT
ACTCTAACATCATGAATTTCTTCAAGACCGAGATTACCTCGCTAACGGTGAGATCAGAAAGAG
GCCACTCATCGAGACAAACGGTGAAACAGGTGAGATCGTGTGGGATAAGGGAAGGGATTTTCGC
TACCGTTAGAAAGGTGCTCTCTATGCCACAGGTGAACATCGTTAAGAAAACCGAGGTGCAGAC
CGGTGGATTCTCTAAAGAGTCTATCCTCCCTAAGAGGAACTCTGATAAGCTCATTGCTAGGAAG
AAGGATTGGGACCTAAGAAATACGGTGGTTTTCGATTCTCCTACCGTGGCTTACTCTGTTCTCGT
TGTGGCTAAGGTTGAGAAGGGAAAGAGTAAGAAGCTCAAGTCTGTTAAGGAACTTCTCGGAAT
CACTATCATGGAAAGGTCATCTTTTCGAGAAGAACCCAATCGATTTCTCGAGGCTAAGGGATAC
AAAGAGGTTAAGAAGGATCTCATCATCAAGCTCCCAAAGTACTCACTCTTCGAACTCGAGAACG
GTAGAAAGAGGATGCTCGCTTCTGCTGGTGAGCTTCAAAAGGGAAACGAGCTTGCTCTCCCATC
TAAGTACGTAACTTTCTTTACCTCGCTTCTCACTACGAGAAGTTGAAGGGATCTCCAGAGATA
ACGAGCAGAAGCAACTTTTCGTTGAGCAGCACAAAGCACTACTTGGATGAGATCATCGAGCAGA
TCTCTGAGTTCTCTAAAAGGGTGATCCTCGCTGATGCAAACCTCGATAAGGTGTTGTCTGCTTAC
AACAAGCACAGAGATAAGCCTATCAGGGAACAGGCAGAGAACATCATCCATCTCTTCACCCTT
ACCAACCTCGGTGCTCCTGCTGCTTTCAAGTACTTCGATACAACCATCGATAGGAAGAGATACA
CCTCTACCAAAGAAGTGCTCGATGCTACCTCATCCATCAGTCTATCACTGGACTCTACGAGAC
TAGGATCGATCTCTCACAGCTCGGTGGTGATTCAAGGGCTGATCCTAAGAAGAAGAGGAAGGT
TTGACTCGAGATATGAAGATGAAGATGAAATATTTGGTGTGTCAAATAAAAAGCTTGTGTGCTT
AAGTTTGTGTTTTTTCTTGGCTTGTGTGTTATGAATTTGTGGCTTTTTCTAATATTAAATGAAT
GTAAGATCACATTATAATGAATAAACAAATGTTTCTATAATCCATTGTGAATGTTTTGTTGGATC
TCTTCTGCAGCATATAACTACTGTATGTGCTATGGTATGGACTATGGAATATGATTAAAGATAA
GGAGCTCCGGTGACGGACGGCGCGCCGAAGAGCTGGCAGACATACTGTCCCACAAATGAAGAT
GGAATCTGTAAAAGAAAACGCGTGAAATAATGCGTCTGACAAAGGTTAGGTGCGCTGCCTTTA
ATCAATACCAAAGTGGTCCCTACCACGATGGAAAACTGTGCAGTCGGTTTTGGCTTTTTCTGAC
GAACAAATAAGATTCGTGGCCGACAGGTGGGGGTCCACCATGTGAAGGCATCTTCAGACTCCA
ATAATGGAGCAATGACGTAAGGGCTTACGAAATAAGTAAGGGTAGTTTGGGAAATGTCCACTC
ACCCGTCAGTCTATAAATACTTAGCCCCCTCCCTCATTGTTAAGGGAGCAAAATCTCAGAGAGAT
AGTCCTAGAGAGAGAAAGAGAGCAAGTAGCCTAGAAGTAGTCAAGGCGGCGAAGTATTCAGG
CACGTGGCCAGGAAGAAGAAAAGCCAAGACGACGAAAACAGGTAAGAGCTAAGCTTCCTGCA
GGTTCCTGCGGTATAGGCAGCCGATGCCCTACCGGGTACAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
TTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGTTCCTGCGG
TATAGGCAGCTTGACATGCTCCCTTTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
TAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGTTCCTGCGGTATAGGCAGGTC
GATCGACAAGCTCGAGTTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAGGGAATTAGGGT

TCCTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAA
AATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAAATCCAGTACTAAAATCCAGATCCC
CCGAATTACCGGTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTAC
CCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGC
ACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTG
ATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAACTATCAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTA
AACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTATTAGAATAATCGGATATTTAAAAGGGCGTGAAAAGGTTTA
TCCGTTTCGTCCATTTGTATGTGCATGCCAACACAGGGTTCCCCTCGGGATCAAAGTACTTTGAT
CCAACCCCTCCGCTGCTATAGTGCAGTCGGCTTCTGACGTTCAGTGCAGCCGTCTTCTGAAAAC
GACATGTCGCACAAGTCCTAAGTTACGCGACAGGCTGCCGCCCTGCCCTTTTCTGCGGTTTTCT
TGTCGCGTGTTTTAGTCGCATAAAGTAGAATACTTGCGACTAGAACC GGAGACATTACGCCATG
AACAAGAGCGCCGCCGCTGGCCTGCTGGGCTATGCCCCGCGTCAGCACCGACGACCAGGACTTG
ACCAACCAACGGGCCGAAGTGCACGCGGCCGGCTGCACCAAGCTGTTTTCCGAGAAGATCACC
GGCACCAGGCGCGACCGCCCGGAGCTGGCCAGGATGCTTGACCACCTACGCCCTGGCGACGTT
GTGACAGTGACCAGGCTAGACCGCCTGGCCCGCAGCACCCGCGACCTACTGGACATTGCCGAG
CGCATCCAGGAGGCCGGCGCGGGCCTGCGTAGCCTGGCAGAGCCGTGGGCCGACACCACCACG
CCGGCCGGCCGCATGGTGTTGACCGTGTTTCGCCGGCATTGCCGAGTTCGAGCGTTCCCTAATCA
TCGACCGCACCCGGAGCGGGCGCGAGGCCGCCAAGGCCCGAGGCGTGAAGTTTGGCCCCCGCC
CTACCCTCACCCCGGCACAGATCGCGCACGCCCGCGAGCTGATCGACCAGGAAGGCCGCACCG
TGAAAGAGGCGGCTGCACTGCTTGGCGTGATCGCTCGACCTGTACCGCGCACTTGAGCGCAG
CGAGGAAGTGACGCCCACCGAGGCCAGGCGGCGCGGTGCCTTCCGTGAGGACGCATTGACCGA
GGCCGACGCCCTGGCGGCCCGCCGAGAATGAACGCCAAGAGGAACAAGCATGAAACCGCACCA
GGACGGCCAGGACGAACCGTTTTTTCATTACCGAAGAGATCGAGGCGGAGATGATCGCGGCCGG
GTACGTGTTTCGAGCCGCCCGCGCACGGCTCAACCGTGCGGCTGCATGAAATCCTGGCCGGTTTG
TCTGATGCCAAGCTGGCGGCCCTGGCCGGCCAGCTTGGCCGCTGAAGAAACCGAGCGCCGCCGT
CTAAAAAGGTGATGTGTATTTGAGTAAAACAGCTTGCGTCATGCGGTGCGTATATGATGC
GATGAGTAAATAAACAATAACGCAAGGGGAACGCATGAAGGTTATCGCTGTACTTAACCAGAA
AGGCGGGTCAGGCAAGACGACCATCGCAACCCATCTAGCCCGCGCCCTGCAACTCGCCGGGGC
CGATGTTCTGTAGTCGATTCCGATCCCCAGGGCAGTGCCCGCGATTGGGCGGCCGTGCGGGAA
GATCAACCGCTAACCGTTGTGCGCATCGACCGCCCGACGATTGACCGCGACGTGAAGGCCATCG
GCCGGCGGACTTCGTAGTGATCGACGGAGCGCCCCAGGCGGCGGACTTGCGTGTGTCCGCGAT
CAAGGCAGCCGACTTCGTGCTGATTCCGGTGACGCCAAGCCCTTACGACATATGGGCCACCGCC
GACCTGGTGGAGCTGGTTAAGCAGCGCATTGAGGTACGGATGGAAGGCTACAAGCGGCCTTT
GTCGTGTCGCGGGCGATCAAAGGCACGCGCATCGGCGGTGAGGTTGCCGAGGCGCTGGCCGGG
TACGAGCTGCCATTCTTGAGTCCCGTATCACGCAGCGCGTGAGCTACCCAGGCACTGCCGCCG
CCGGCACAACCGTTCTTGAATCAGAACCCGAGGGCGACGCTGCCCGCGAGGTCCAGGCGCTGG
CCGCTGAAATTAAATCAAACTCATTTGAGTTAATGAGGTAAAGAGAAAATGAGCAAAAGCAC
AAACACGCTAAGTGCCGGCCGTCCGAGCGCACGCAGCAGCAAGGCTGCAACGTTGGCCAGCCT
GGCAGACACGCCAGCCATGAAGCGGGTCAACTTTCAGTTGCCGGCGGAGGATCACACCAAGCT
GAAGATGTACGCGGTACGCCAAGGCAAGACCATTACCGAGCTGCTATCTGAATACATCGCGCA

GCTACCAGAGTAAATGAGCAAATGAATAAATGAGTAGATGAATTTTAGCGGCTAAAGGAGGCG
GCATGGAAAATCAAGAACAACCAGGCACCGACGCCGTGGAATGCCCCATGTGTGGAGGAACGG
GCGGTTGGCCAGGCGTAAGCGGCTGGGTTGCCTGCCGGCCCTGCAATGGCACTGGAACCCCCA
AGCCCCAGGAATCGGCGTGAGCGGTCGCAAACCATCCGGCCCCGGTACAAATCGGCGCGGCGCT
GGGTGATGACCTGGTGGAGAAGTTGAAGGCCGCGCAGGCCGCCAGCGGCAACGCATCGAGGC
AGAAGCACGCCCCGGTGAATCGTGGAAGCGGCCGCTGATCGAATCCGCAAAGAATCCCGGCA
ACCGCCGGCAGCCGGTGCGCCGTCGATTAGGAAGCCGCCCAAGGGCGACGAGCAACCAGATTT
TTTCGTTCCGATGCTCTATGACGTGGGCACCCGCGATAGTCGCAGCATCATGGACGTGGCCGTT
TTCCGTCTGTGGAAGCGTGACCGACGAGCTGGCGAGGTGATCCGCTACGAGCTTCCAGACGGGC
ACGTAGAGGTTTCCGCAGGGCCGGCCGGCATGGCCAGTGTGTGGGATTACGACCTGGTACTGAT
GGCGGTTTCCCATCTAACCGAATCCATGAACCGATACCGGGAAGGGAAGGGAGACAAGCCCGG
CCGCGTGTTCCGTCCACACGTTGCGGACGTACTCAAGTTCTGCCGGCGAGCCGATGGCGGAAAG
CAGAAAGACGACCTGGTAGAAACCTGCATTCCGTTAAACACCACGCACGTTGCCATGCAGCGT
ACGAAGAAGGCCAAGAACGGCCGCTGGTGACGGTATCCGAGGGTGAAGCCTTGATTAGCCGC
TACAAGATCGTAAAGAGCGAAACCGGGCGGCCGGAGTACATCGAGATCGAGCTAGCTGATTGG
ATGTACCGCGAGATCACAGAAGGCAAGAACCCGGACGTGCTGACGGTTCACCCCGATTACTTTT
TGATCGATCCCGGCATCGGCCGTTTTCTCTACCGCCTGGCACGCCGCGCCGAGGCAAGGCAGA
AGCCAGATGGTTGTTCAAGACGATCTACGAACGCAGTGGCAGCGCCGGAGAGTTCAAGAAGTT
CTGTTTACCGTGCGCAAGCTGATCGGGTCAAATGACCTGCCGGAGTACGATTTGAAGGAGGAG
GCGGGGCGAGGCTGGCCCGATCCTAGTCATGCGCTACCGCAACCTGATCGAGGGCGAAGCATCC
GCCGGTTCCTAATGTACGGAGCAGATGCTAGGGCAAATTGCCCTAGCAGGGGAAAAAGGTCGA
AAAGGCCTCTTTCTGTGGATAGCACGTACATTGGGAACCCAAAGCCGTACATTGGGAACCGGA
ACCCGTACATTGGGAACCCAAAGCCGTACATTGGGAACCGGTCACACATGTAAGTGAAGTAT
AAAAGAGAAAAAAGGCGATTTTTCCGCCTAAACTCTTTAAAACTTATTAATACTCTTAAACC
CGCCTGGCCTGTGCATAACTGTCTGGCCAGCGCACAGCCCAAGAGCTGCAAAAAGCGCCTACCC
TTCGGTTCGCTGCGCTCCCTACGCCCCGCCGCTTCGCGTTCGGCCTATCGCGGCCGCTGGCCGCTCA
AAAATGGCTGGCCTACGGCCAGGCAATCTACCAGGGCGCGGACAAGCCGCGCCGTCGCCACTC
GACCGCCGGCGCCACATCAAGGCACCCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTC
TGACACATGCAGTCCCGGAAACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAA
GCCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGT
AGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC
ACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCCCTCTT
CCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAC
TCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCA
AAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
CGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA
CTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC
GCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCT
GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGT

TCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGAC
TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTAT



EK 2: Çalışmada kullanılan kimyasallar ve tedarikçileri

Kimyasal Madde	Tedarikçi Firma
2,3,5 trifeniltetrazolium klorid (TTC)	Merck
Kloroform	Merck
Etanol	Merck
İzopropanol	Soldex
İzoamil alkol	Tekkim
Benzil Amino Purine	Sigma
Naftalin Asetik Asit	HIMEDIA
Sefuroksim Sodyum	Deva
Kanamisin	NZYTEch
Sükroz	Merck
Bitki Agar	Duchefa
Murashige and Skoog	Phytotech

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Serdar ALTINTAŞ

Anadili: Türkçe

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Özel Murat Koleji (2002-2005)

Lisans: Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2007-2013)

Yüksek Lisans: Siirt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim dalı (2014-2016)

Yayınlar ve Bildiriler

SCI-SSCI veya SCI Expanded Kapsamındaki Yayınları

1. Altıntaş Serdar, İnal Behcet (2022). Gene expression analyses of some transposons, physiological and morphological changes in melon cultivars exposed to drought stress. The journal of animal and plant sciences, 32, Doi: 10.36899/JAPS.2022.4.0513 (Yayın No: 7703632)
2. Altıntaş Serdar, Özrenk Koray, Çelik Ferit (2021). Genetic Characterization of Edible Fig (Ficus carica L.) Genotypes Grown in Siirt Region Based on Trnl-F Region*. Journal of Biological & Environmental Sciences (Yayın No: 6918539)
3. Karataş Merve Dilek, Hazrati Nahid, Yüksel Özmen Canan, Altıntaş Serdar, Akçay Mehmet Emin, Ergül Ali (2021). Identification of S-Allele Based Self-incompatibility of Turkish Pear Gene Resources. Tarım Bilimleri Dergisi, Doi: 10.15832/ankutbd.823872 (Yayın No: 7703698)
4. Erez Mehmet Emre, İnal Behcet, Karipçin Muhemet Zeki, Altıntaş Serdar (2020). Physiological and gene-expression variation in watermelon (citrullus lanatus l.)

- cultivars exposed to drought stress. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 89(2) (Yayın No: 6275196)
5. Altıntaş Serdar, Pakyürek Mine, Şensoy Suat, Erez Mehmet Emre, İnal Behçet (2019). Genetic Diversity among Some Asparagus Species using rDNA ITS, cpDNA trnL Intron Sequence and Screening for Antioxidant Activity. *Polish Journal of Environmental Studies*, 28(4), 2049-2055., Doi: 10.15244/pjoes/89979 (Yayın No: 4860144)
 6. Fidan Mehmet, Erez Mehmet Emre, İnal Behçet, Pınar Süleyman Mesut, Altıntaş Serdar (2018). Antioxidant Capacity and Phlogenetic Analyses of Twenty Native Grape Cultivars in Siirt Province. *Cellular and Molecular Biology*, 64(7) (Yayın No: 4485869)
 7. Özrenk Koray, Erez Mehmet Emre, İnal Behçet, Altıntaş Serdar (2018). The Comparision of Phenolic Compounds Content, Antioxidant Capacity and Molecular Analyses of Some Selected Turkish Pear Genotypes. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(1), 584-589. (Yayın No: 4485854)
 8. İnal Behçet, Özrenk Koray, Erez Mehmet Emre, Altıntaş Serdar (2017). The Comparison of Total Phenolic Content, Antioxidant Capacity and Molecular Analysis of some Selected Turkish Apple (*Malus Spp.*) Genotypes. *Applied Ecology and Environmental Research*, 15(4), 2035-2044., Doi: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1504_20352044 (Yayın No: 3692978)
 9. Muhammet Çağrı Oğuz, Merve Dilek Karataş, Ezgi Oğuz, Muhammad Mujtaba, Serdar Altıntaş, Ali Ergül (2021). The Comparison of Regeneration from Root Node Explants in Solanaceae. *Pol. J. Environ. Stud.* Vol. 30, No. 5 (2021), 1-10.

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Şahin Murat, Eşitken Ahmet, Pırlak Lütfi, Altıntaş Serdar, Turan Metin (2019). Effect of dn1 bacterial strain applied by different methods on some morphological

- characteristics of Strawberry Cv. San Andreas (Fragaria X Ananassa Duch.). Agrofor International Journal, 4(1), 57-64. (Yayın No: 5838193)
2. Altıntaş Serdar, İnal Behcet (2016). Bitkilerde vernalizasyon olgusunun altında yatan doğal bir sezgi epigenetik. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 4(11), 973-980. (Yayın No: 3385086)
 3. İnal Behcet, Özrenk Koray, Altıntaş Serdar (2016). Meyve Gelişimi ve Olgunlaşmasında Rol oynayan Düzenleyici Aktörler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 26(2), 288-299. (Yayın No: 3385240)
 4. Erez Mehmet Emre, Fidan Mehmet, Pınar Süleyman Mesut, İnal Behcet, Kaya Yılmaz, Altıntaş Serdar (2017). Siirt ilinde yetiştirilen bazı üzüm çeşitlerinin tanımlanması ve kalite değerlerinin belirlenmesi. Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi, 4(1), 31-42., Doi: doi: 10.19159/tutad.300606 (Kontrol No: 3691224)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

1. Güreli Cumali, Özrenk Koray, Altıntaş Serdar, İnal Behcet (2019). Bazı trabzon hurması (dispyros kaki l.) genotiplerinin its ve cpdna trnl-f gen bölgeleri kullanılarak moleküler karakterizasyonun yapılması. INTERNATIONAL CONFERENCE ON AGRICULTURE AND RURAL DEVELOPMENT-II (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:5494590)
2. Altıntaş Serdar, Gök Mesut, İnal Behcet (2019). Rheum ribes bitkisinde şeker içeriğinin analiz edilmesi. ULUSLARARASI TARIM ve KIRSAL KALKINMA KONGRESİ (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:5493818)
3. Erez Mehmet Emre, Karipçin Muhemet Zeki, İnal Behcet, Altıntaş Serdar (2017). Title: ABA Related Genes Expression and Biochemical Changes Response to Drought in Watermelon. 6th International Congress on Molecular Biology and Biotechnology (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3726694)

4. Erez Mehmet Emre, Özrenk Koray, İnal Behcet, Altıntaş Serdar (2017). Effect of Different Alignment Methods on Phylogenetic Tree Topography. Uluslararası Mühendislik, Fen Bilimleri, Eğitim ve Teknoloji Konferansı (IMESET'17 Bitlis) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3693069)
5. Şahin Murat, Eşitken Ahmet, Pırlak Lütfi, Altıntaş Serdar (2017). Effects of Mulch Treatments on Lateral Branching and Fruit Characteristics of *Prunus avium* "Sweet Heart". International Conference on Agriculture, Forest, Food Science and Technologies, 1, 106-106. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3900158)
6. Şahin Murat, Eşitken Ahmet, Pırlak Lütfi, Altıntaş Serdar (2017). Effects of Mulch Treatments on Lateral Branching and Fruit Characteristics of *Prunus avium* "Sweet Heart. International conference on agriculture, forest, food sciences and technologies (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3796804)
7. Altıntaş Serdar, Pakyürek Mine, Şensoy Suat, Erez Mehmet Emre, İnal Behcet (2017). Assesment of genetic diversity among some *Asparagus* species using rDNA ITS and screening for total phenolic content. International Semposium on Biodiversity and Edible Wild Species (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3693091)

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

1. Muhammet Çağrı Oğuz, Merve Dilek Karataş, Ezgi Oğuz, Muhammad Mujtaba, Serdar Altıntaş, Ali Ergül (2021). The Comparison of Regeneration from Root Node Explants in Solanaceae. Pol. J. Environ. Stud. Vol. 30, No. 5 (2021), 1-10.
2. Karataş Merve Dilek, Hazrati Nahid, Yüksel Özmen Canan, Altıntaş Serdar, Akçay Mehmet Emin, Ergül Ali (2021). Identification of S-Allele Based Self-incompatibility of Turkish Pear Gene Resources. Tarım Bilimleri Dergisi, Doi: 10.15832/ankutbd.823872 (Yayın No: 7703698)

Original Research

The Comparison of Regeneration from Root Node Explants in *Solanaceae*

Muhammet Çağrı Oğuz¹, Merve Dilek Karataş², Ezgi Oğuz¹,
Muhammad Mujtaba¹, Serdar Altıntaş³, Ali Ergül^{1*}

¹Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara 06110, Turkey

²Van Yüzüncü Yıl University, Department of Agricultural Biotechnology, Van, Turkey

³Süleyman Demirel University Agricultural Biotechnology Department, Siirt, Turkey

Received: 8 September 2020

Accepted: 13 November 2020

Abstract

Tissue culture techniques in tomato, pepper and eggplant are important for the development of disease-resistant and high yielding varieties, which require a suitable regeneration protocol. Although shoot regeneration has been achieved by using different explants and cytokinin doses in *Solanaceae* species, very few studies have reported *in vitro* regeneration using root tissues. The current study is the first report to compare direct shoot regeneration capabilities using root node explants in three *Solanaceae* species (tomato, pepper, and eggplant) under three cytokinins (BAP, TDZ, and GA3) hormone. Plantlets were regenerated from the root node explants of tomato, pepper and eggplant in the media containing 0, 0.5, 1, 1.5 and 2mg/L of BAP, TDZ and GA3. Results revealed that the shoot regeneration of root node explants varied according to the species, cytokinins (BAP, TDZ and GA3) and doses of hormones. Among the species, the best shoot regeneration was observed in tomato followed by eggplant and pepper plants. While the shoot length was statistically significant in tomato, it was observed to be insignificant in pepper and eggplant. The highest number of root regeneration and root length was observed in tomatoes. The results obtained from the study will contribute to the development of successful/reproducible tissue culture protocols from roots node explants.

Keywords: *Solanaceae*, root node explants, regeneration, tomato, eggplant, pepper

Introduction

Successful/reproducible tissue culture protocols are required to determine the action mechanism of plant hormones on cellular differentiation, organ formation, somatic embryogenesis, direct regeneration, secondary metabolite/alkaloid production in plant

tissue during regeneration [1-3]. Besides, successful *in vitro* regeneration optimizations are an important step for studying somaclonal variations, *in vitro* mutations, herbicide tolerance, diploid induction, secondary metabolite production, economically important transgenic plant production and the development of somatic hybrids require an effective regeneration protocol [4-6]. Regeneration capability of different tissues depends on species, cultivar and genotype, cellular structure and cellular action mechanisms of

plant hormones [7]. Like other families, in *Solanaceae*, there is a huge potential in terms of protocol optimization for regeneration with maximum yield (shoots and roots).

Solanaceae contains about 4000 species of economically and ecologically important family presenting a large number of model plants, genetic resources, secondary metabolites, medically and chemically active substances [8]. In terms of environmental importance on agriculture, it has been reported that secondary metabolites and plant extracts obtained from plants belonging to the family *Solanaceae* can provide a protective effect against bacteria, fungi, harmful plant insects and abiotic damages [9, 10]. On the other hand; biotechnological studies in *Solanaceae* species were primarily focused on tomato and wild relatives (*Solanum* genus, former genus *Lycopersicon*) followed by eggplant (genus *Solanum*) and pepper species (genus *Capiscum*) [11, 12]. In pepper (*Capiscum annuum*) the regeneration experiments have been carried out following different tissue culture techniques such as direct organogenesis, axillary proliferation, axillary meristem, indirect somatic embryogenesis using zygotic embryo, cotyledon, hypocotyl, and leaf explants [13-18]. However, no study has been reported regarding the regeneration in pepper using root as explant.

As in other plants, in tomato (*Solanum lycopersicum*), abiotic stresses such as drought, salinity, and biotic environmental stresses like pathogens, insects and fungi are the main limiting factors in a plant's growth and productivity [19]. Tomato tissue culture studies which are important for biotechnological applications such as the determination of molecular mechanisms of these stresses and obtaining tolerant individuals have been performed largely by using cotyledon, hypocotyl, and leaf explants. However, few studies reported tomato regeneration using root explants [20-24]. Eggplant (*Solanum melongena*) belongs to *Solanaceae* and grown in tropical and semi-tropical climates. Issues like a genetic mismatch between species and infertility of varieties have prevented the development of tolerant varieties against biotic and abiotic damages. To overcome breeding problems in eggplant, advanced biotechnological methods such as tissue culture and plant genetic engineering instead of conventional methods increase the success rate [25]. Eggplant direct shoot regeneration studies were mainly carried out using cotyledon, hypocotyl, and leaf explants. Unlike other explants, stable optimization of direct shoot formation with root explants has not been reported [26-29].

The current study was designed to investigate and develop an optimized regeneration protocol using root node explants in pepper, tomato, and eggplants. Besides, comparative analysis of shoot growth and root elongation using root nodes was performed for the first time with a view to identify the regenerants with superior performance.

Material and Methods:

Plant Material

In the current study, Ilica pepper (P-Ilica), H2274 tomato (T- H2274) and Aydın Black eggplant (EP- Aydın Black) cultivars were used as materials.

Seed Sterilization

Seeds were pretreated with water for 2 hr. to remove the protective chemical coating. Surface sterilization of seeds was carried out using 25% commercial bleach and a few drops of Tween 20 in the laminar cabin for 15 min. Afterward, the surface sterilization process was completed by washing the seeds 5 times (5 min) with distilled water. Sterile seeds were sown on media after drying on blotter paper.

In vitro Regeneration

Sterilized seeds were germinated on MS media [30] containing 4.44 g/L MS salts (Caisson labs, Smithfield, USA), 30 g/L sucrose and 5 g/L agar (Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands) at 24°C in dark for 3 days. Germinated seedlings were incubated in a growth cabinet for 15 days at 25°C and under 16/8 h photoperiod. Root node explants isolated from *in vitro* grown seedlings were transferred to a liquid medium containing MS + Kinetin (Kin) (4 mg/L). After 24 hr explants were transferred to regeneration media containing different concentrations of cytokinins. Regeneration medium (MS: 4.43 g/L, sucrose: 30 g/L, plant agar: 7 g/L) containing different concentrations of BAP (MS-B) (Sigma, Missouri-USA) (0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 mg/L), TDZ (MS-T) (Sigma, Missouri-USA) (0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 mg/L) and GA₃ (MS-G) (Sigma, Missouri-USA) (0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 mg/L). Five explants were cultivated in each magenta box and the experiment was performed in five replications. The Magentas were incubated in a growth chamber at 24°C under the 8/16 hr photoperiod. Regeneration efficiencies were evaluated after 3rd week.

Plant Acclimatization

Plants with root development observed were transferred to mixtures containing 2:1 sterilized peat: perlite. Young seedlings were transferred to flowerpots, covered with transparent bags and incubated at 50% humidity at 25±2°C until well-developed regenerates were obtained.

Statistical Analysis

All statistical analyses were done using the IBM SPSS Statistics 22.0 program according to the randomized plot design. Mean values were compared

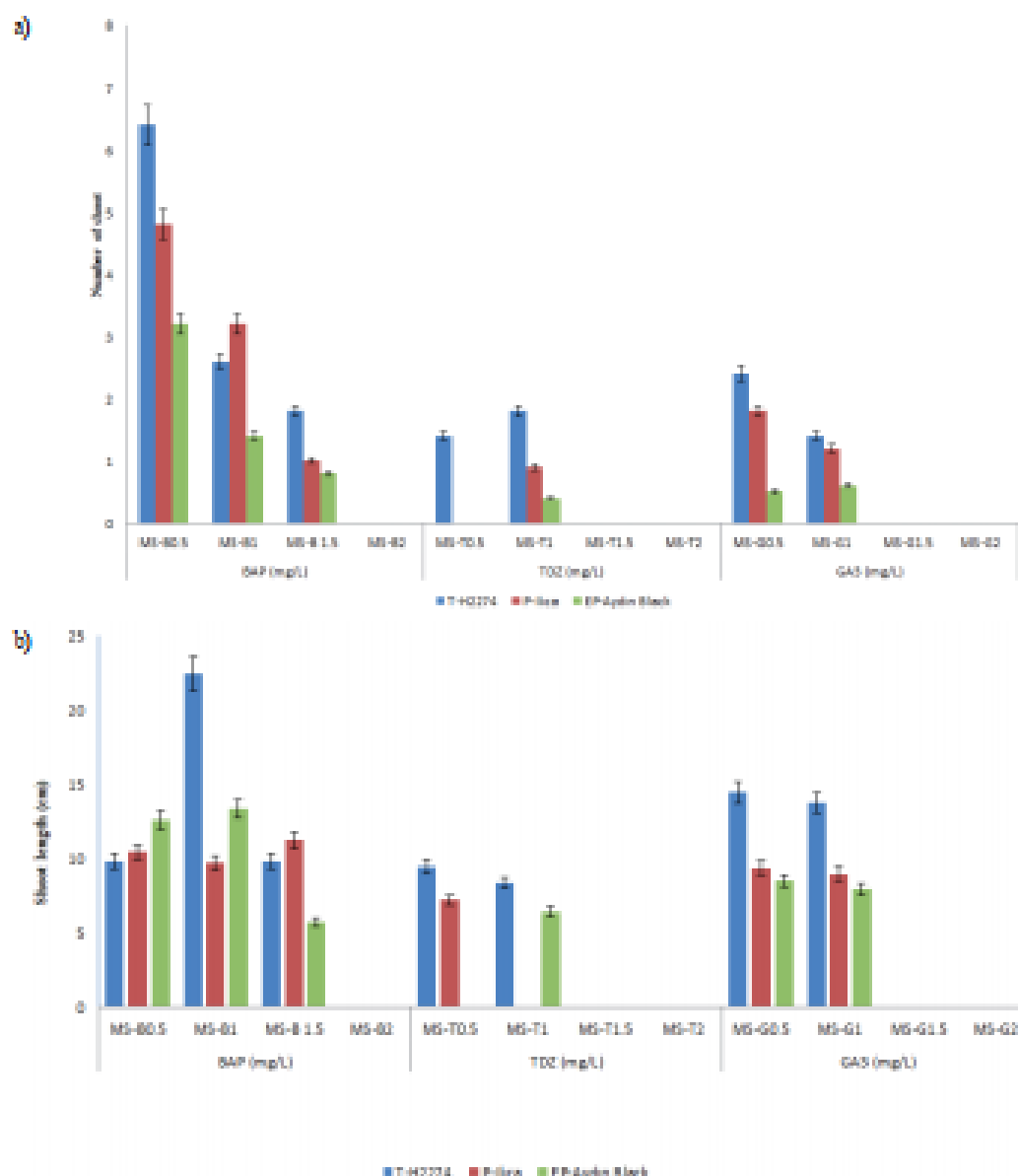


Fig. 1. a) number of shoot regeneration from root node explant; b) shoot length from root node explant.

by ANOVA followed by Tukey posthoc test at 0.05 level of significance.

Results

Shoot Regeneration

In the current study, three types of cytokinin hormones were applied (MS-B, MS-G and MS-T) to determine their effects on shoot formation in T- H2274, P-Ilica and EP- Aydın Black. Maximum shoots regeneration was observed from MS-B (Fig. 3b; Fig. 4c; Fig. 5d). Among the MS-B concentrations,

the best shoot formation was recorded for MS-B0.5 followed by MS-B1 and MS-B1.5. No shoot formation was observed in the medium containing MS-B2, while callus formation occurred in the same media (Fig. 1a). In media containing MS-B0.5, the highest shoot number was obtained from T- H2274 with 6.4 per explant followed by EP- Aydın Black with 3.2 and P-Ilica with 3.2. In media MS-B1, the highest numbers of shoots were obtained from EP-Aydın Black with 3.2 followed by T-H2274 with 2.6 and P-Ilica with 1.4 (shoot/per explant). In MS-B1.5, 1.8 shoots were obtained from T- H2274, 1 shoot from EP- Aydın Black and 0.8 shoot from P-Ilica (Fig. 1a).

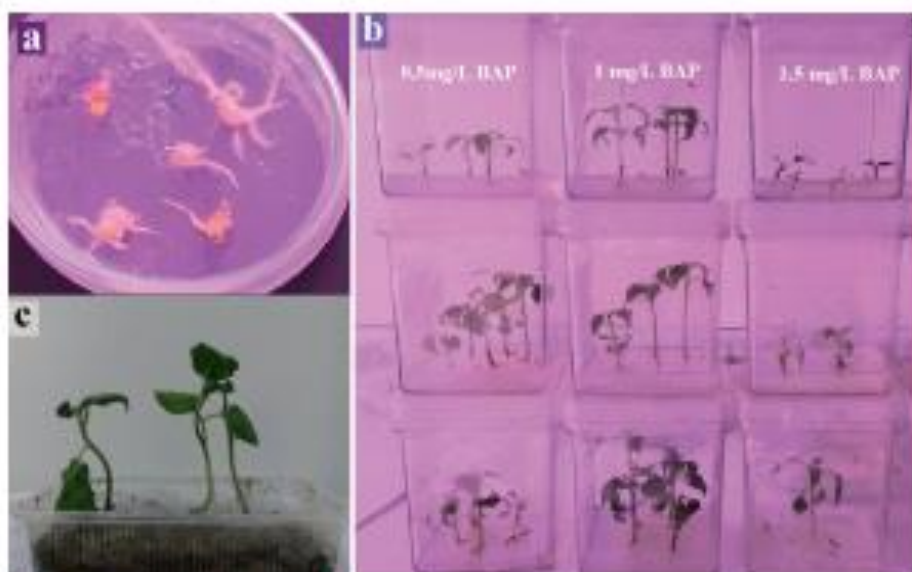


Fig. 3. *in vitro* plant regeneration from root node explant in pepper
 a) pepper explants have root development in cytokinin media; b) shoot development was observed in media with different BAP;
 c) development of regenerant plants in acclimatization environments

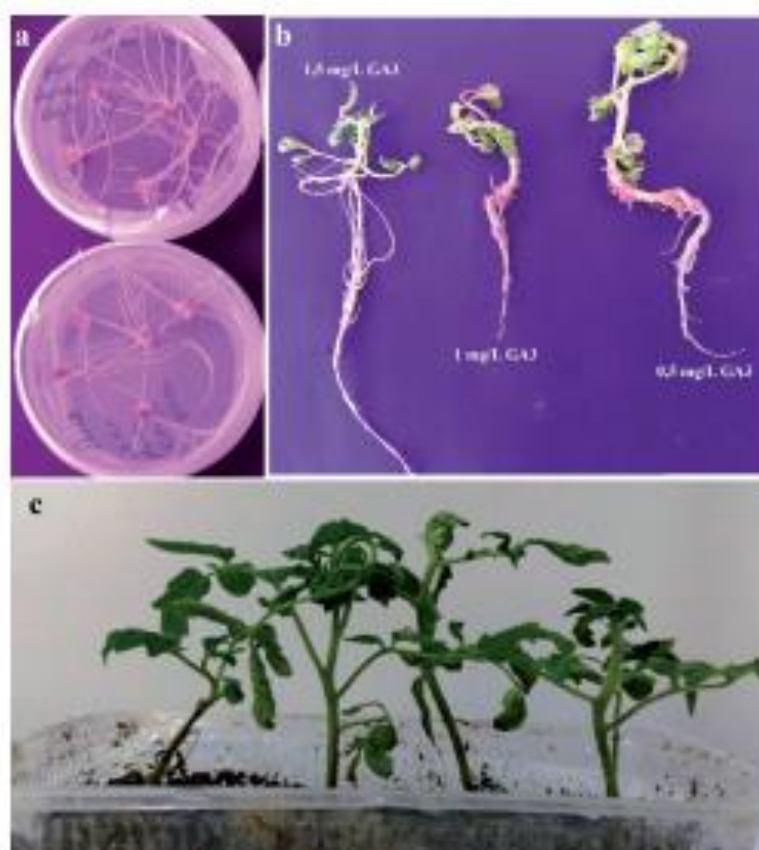


Fig. 4. *in vitro* plant regeneration from root node explant in tomato
 a) root elongation of tomato root node explants in media containing GA3; b) tomato explants have completed the shoot and root
 regeneration. c) development of regenerant plants in acclimatization environments

root node explants with direct organogenesis without the formation of callus. Also, the root node explants isolated from young seedlings were kept in liquid MS media containing 4 mg/L Kin for 24 hr. in the dark and then planted in the media as per experimental design. An inducing factor is essential for the regeneration of tissue or cells isolated from the plant. Although the inducer required for organogenesis is later removed from the environment after a certain period, the growth and development that have started to continue [33].

In our study, we used a high dose of Kinetin for pre-treatment. This treatment was thought to have a positive effect on the formation of shoots from the root node explants. Although many biotechnological studies have been carried out in tomato using root explants, nodal explants and roots are rarely used for shoot regeneration. Besides, these studies did not proceed beyond the experimental dimension [34, 35]. Compared with eggplant and pepper, the tomato has been identified as the most responsive to shoot regeneration from root nodes. In this study, because of its high conversion potential, the root node explant was used for shoot formation in tomato, pepper and eggplants.

Pepper's success rate and speed in *in vitro* regeneration are closely related to genotypic features. Genotypically, regeneration is relatively slow and difficult compared to other members of *Solanaceae* [36]. Although pepper performs efficiently during organogenesis induction in the cytokinin-containing medium, the necessity of an auxin-containing medium for root formation has been reported [17]. In the regeneration study conducted, it was thought that the shoot and root emerging from the existing root explant will provide a significant advantage in the regeneration rate.

A high degree of self-pollination and lack of proper genetic resources in tomatoes is a major problem for breeding. Therefore, genetic diversity is gradually decreasing [37]. It is of great importance to obtain new varieties that help eliminate incompatibility problems between regeneration protocols and *Solanaceae* species introduced in the current study.

Considering these results, it has been revealed that different plant species have a different rate of regeneration even from a similar explant. Several species of *Solanaceae* family are the target model species for studying the mechanisms and hormonal interactions that become active in regeneration. Rashid and Bel [23] reported the use of a hypocotyl explant in tomato, and according to their results, the formation of shoot per explant lasted approximately 8 weeks. The highest shoot was obtained from the medium containing 0.5 mg/L BAP + KIN with an average of 3.87. On the other hand, in the current study, a higher regeneration rate was achieved by using root node explants than the hypocotyl. Besides, the lack of an additional rooting step kept the success rate of the procedure even higher and consequently making it a suitable protocol for the tested plants. Jehan and Hassanein [35], reported

the somatic embryogenesis from tomato nodal explant and achieved successful results in BAP containing media (2 mg/L BAP - 8.00 number of shoot/explant). Also, it has been reported that the media containing 1 mg/L IAA for rooting gave the best results and rooting occurred without auxin supplementation. In our study, in addition to obtaining similar values (0.5 mg/L BAP - 6.4 of shoot/explant) from root node explants at low BAP levels, root organogenesis occurred in auxin-free media. According to the reported shoot regeneration in eggplant using root explant [26], obtained shoot regeneration from the calluses using MS media with high BAP content. An additional intervention was needed for rooting from the shoots they obtain in the study. In our study, shoot regeneration was carried out as a result of direct organogenesis. Besides, an additional rooting phase was not needed as the shoots performed well during root formation. Similarly, a few researchers had reported obtaining rooting from different eggplant explants in an IBA containing media [38]. According to the report in eggplant regeneration from callus, obtained shoot (average 0.2) in containing a high amount of cytokinin medium [29]. However, in the current study, averages of 4.8 shoots were regenerated in the MS-B0.5 medium with direct organogenesis (without callus). The high regeneration rate in our case can be ascribed to the pre-treatment of explants with high concentrations of KIN for 1 day, which activated the cytokinin response in the tissues.

The current study can be considered the first report for successful direct organogenesis using a root node explant in pepper. In this way, a plant with stable genetic features was obtained for use in biotechnological studies. The number of shoots regeneration from root node explants, in pepper, was observed to be lower than tomato and eggplant. This can be due to the difference in the reaction mechanism of the species. It is thought that this study will contribute in terms of hormone-cell interactions in tissue culture studies, regeneration ability of different tissues and development of successful transgenic plant protocols. In the current study, callus formation was observed after the pre-treatment of the explants with Kin before transferring to high cytokinin containing media. However, no shoot formation was recorded from these explants. Callus formation can occur in the presence of pathogen infection, tissue injury, high auxin, or equal auxin-cytokinin hormones in the environment [39]. The callus formation in the root node explant (grown in high cytokinin media) is due to the endogenous auxin in the plant. It has been reported that calluses obtained from the root and hypocotyl explants have many of the structural features of the lateral root meristem [40]. It is predicted that new plants to be produced by using callus-derived callus obtained in our study will cause an increase in its development due to the strong plant nutrient absorption feature of the side root meristem.

Root Development

In the study carried out to analyze the endogenous hormones in the plant, the amount of total endogenous cytokinin on the shoots was determined 1.4 times more than the roots. Roots were reported to have higher IAA content than shoots [41]. Free cytokinins in the plant are carried from root to shoots [42]. On the other hand, auxin in the plant is produced in leaf tips [43] and stored in tissues close to the root [44]. In the absence of auxin, regardless of the number of cytokinins in the medium, it has been reported that tomato explants form adventitious roots, due to the accumulation of high independent endogenous auxin in hypocotyl and root cut regions [45, 46]. In our study, high *de novo* root regeneration was observed especially in tomato which can be linked to the endogenous auxin level. Similarly, Blakesley [42], reported that the ratio of free IAA to total IAA in the root region of young shoots was higher than the older shoots where rooting has failed. In the current result, it is thought that root regeneration is stimulated by changing the cytokinin balance in young explants. With this viewpoint, this change in cytokinin level resulted in the activation of bound endogenous IAA in tissues and consequently stimulation of root regeneration in eggplant and tomato. It was further reported that the continuous application of an inducer is not required for the continuation of organogenesis and root elongation [33]. Besides, it has been reported that organogenesis and root elongation may be caused regardless of the ambient oxide in the medium, by the activation of genetic indicators due to cutting off the explant [47]. The low root regeneration of the pepper explant may be due to the lack of total IAA and free IAA. Also, activation of the genes responsible for auxin transport may cause this condition [48]. Orlńska and Nowaczyk; in their regeneration study conducted in pepper, they reported that rhizogenesis formation was observed in the auxin-containing media despite the absence of leafy shoots [17]. Blautia et al; in an *in vitro* regeneration study conducted with cotyledon using hypocotyl explants, it was reported that root formation was observed 7-8 weeks after transfer of the obtained shoots to the auxin-containing/non-auxin media [49]. In our study, it is clear that there is an increase in the rate of root regeneration with the occurrence of root development in the early stages of regeneration with the root node explant selected.

The roots obtained from the root node explant in tomato and eggplant were formed as a result of *de novo* organogenesis. Reported that a similar study [30], *de novo* organogenesis occurred by re-activating the root tissue obtained from the root explant of the already existing meristematic tissue without the formation of callus. Jehan and Hassanein [35] investigated the effect of tomatoes explant position (horizontal or vertical) in the media. Results revealed that root organogenesis occurred in the explant placed vertically in auxin-free media while no organogenesis reported in horizontally placed explants. In addition to the other issues discussed

in our study, the fact that the root node explants are placed vertically in the media is thought to cause *de novo* root formation by allowing the endogenous auxin hormone in the tissue to move to the lower part of the explant.

From a different perspective, It has been reported that the transport of auxin and cytokinin stopped in this region after the root tissue has been cut and the healing path has been activated [51]. It has also been noted that after the root explant is isolated from the plant, there are genetically significant similarities between leaf and root vein development on this tissue [51]. When considered from this perspective, it is thought that, together with all other possibilities, genetic induction may also be involved in *in vitro* regeneration obtained from root tissue.

Conclusion

The current study was conducted to investigate the regenerative capabilities from root node explants of three different *Solanaceae*. Shoot regeneration was successfully performed using the root explant. Among the species, the best shoot regeneration rate was recorded for tomato, pepper, and eggplant respectively. Among the cytokinin hormones, the most effective hormone in shoot regeneration was determined as 0.5 mg/L BAP. The shoot length of the newly regenerated plants varied according to the plant species and cytokinin content. For the *Solanaceae* species, the best hormone in terms of root development and length was determined as GA3. The best root development and elongation ability were observed in tomato, eggplant, and pepper respectively. This study reveals important results that can be targeted in determining hormonal changes in root and shoot regeneration. For these reasons, the current successful and effective regeneration method will serve important issues such as determining physiological, morphological, and molecular changes in root and shoot regeneration.

Author Contribution Statement

AE and MÇO designed and outlined the research. MÇO and MDK conducted the experiments. EO, MM, SA and MÇO analyzed the data, drafted and edited the manuscript and analyzed the data.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Canan Yüksel Özmen for her technical support in tissue culture studies.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability

The data from the study were presented in the text and tables and figures.

References

- GUBIS J., LAJCHOVÁ Z., FARAGÓ L., JUREKOVÁ Z. Effect of growth regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Biologia-Bentislava*, 59 (3), 405, 2004.
- SHARMA P., SRIVASTAVA D. In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyls tissues of tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Solan Vaj). *Vegetas*, 27 (3), 151, 2014.
- DEB G., SULTANA S., BHUIYAN M.S.U., SARKER K.K., PAPRY A.S. In vitro plant regeneration of wild eggplant (*Solanum sisymbriifolium*) to produce large number of rootstocks for tomato grafting. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*, 2, 65, 2019.
- CHAUDHURI K., GHOSH B., JHA S. The root: a potential new source of competent cells for high-frequency regeneration in *Tylophora indica*. 22 (10), 731, 2004.
- HEGDE V., PARTAP P.S., YADAV R.C. In vitro regeneration of *Capsicum* (*Capsicum annuum* L.) from cotyledon explants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6 (5), 225, 2017.
- OO P.C., LEE Z.H., CHIN C.K., SUBRAMANIAM S., CHEW, B.L. Shoot induction in White Eggplant (*Solanum melongena* L. Cv. Bulat Putih) using 6-Benzylaminopurine and Kinetin. *Tropical life sciences research*, 29 (2), 119, 2018.
- POCKOVSKA M., TRAJKOVA E., KOLEVA GUDEVA L. Evaluation of androgenic competence of different pepper, tomato and eggplant genotypes. in *Book of Proceedings/X International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2019"*. Faculty of Agriculture, East Sarajevo, Bosnia & Herzegovina. 525, 2019.
- CHOWAŃSKI S., ADAMSKI Z., MARCINIAK P., ROŚŃSKI G., BŐYÖKGÜZEL E., BŐYÖKGÜZEL K., BUFO S.A. A review of bioinsecticidal activity of Solanaceae alkaloids. *Toxins*, 8 (3), 60, 2016.
- SERNA F.J., CORREA I.A. Extractos de hojas de tomate *Lycopersicon esculentum* como fagoinhibidores de *Altia cephalotes*. 21 (3), 142, 2003.
- SAMUELS J. Biodiversity of food species of the Solanaceae family: a preliminary taxonomic inventory of subfamily Solanoideae. *Resources*. 4 (2), 277, 2015.
- GEBHARDT C. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. *Theoretical and Applied Genetics*, 129 (12), 2281, 2016.
- BUI H.H., SERRA V., PAGÈS L. Root system development and architecture in various genotypes of the Solanaceae family. *Botany*. 93 (8), 465, 2015.
- KHAN H., SIDDIQUE I., ANIS M. Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. 50 (4), 789, 2006.
- DO REGO E.R., DO RÉGO M.M., FINGER F.L. Production and breeding of chilli peppers (*Capsicum* spp.). Springer. 2016.
- GROZEVA S., TODOROVA V. In vitro regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.) and characterization of plant-regenerants. *Electronic Journal of Biology*. 11 (1), 17, 2015.
- HEIDARI-ZEFREH A.A., SHARIATPANAH M.E., MOUSAVI A., KALATEJARI S. Enhancement of microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) using putrescine and ascorbic acid. *Protoplasma*. 256 (1), 13, 2019.
- ORLINSKA M., NOWACZYK P. In vitro plant regeneration of 4 *Capsicum* spp. genotypes using different explant types. *Turkish Journal of Biology*. 39 (1), 60, 2015.
- KIM H., LIM J. Leaf-induced callus formation in two cultivars: hot pepper 'CM334' and bell pepper 'Dempsey'. *Plant signaling & behavior*. 14 (7), 1604016, 2019.
- DU Y.D., CAO H.X., LIU S.Q., GU X.B., CAO Y.X. Response of yield, quality, water and nitrogen use efficiency of tomato to different levels of water and nitrogen under drip irrigation in Northwestern China. *Journal of integrative agriculture*. 16 (5), 1153, 2017.
- MOGHAIEB R.E., SANBOKA H., FUJITA K. Plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). 45 (3), 639, 1999.
- VIKRAM, G., SRIKANTH, K., SWAMY, B. Effect of plant growth regulators on in vitro organogenesis in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.). 1 (4), 263, 2011.
- MAMIDALA P., NANNA M.B. Effect of genotype, explant source and medium on in vitro regeneration of tomato. 3, 45, 2011.
- RASHID R., BAL S.S. Effect of hormones on direct shoot regeneration in hypocotyl explants of tomato. 2 (1), 70, 2010.
- PERES L.E., MORGANTE P.G., VECCHI C., KRAUS J.E., VAN SLUYS M.A. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. 65 (1), 37, 2001.
- SHIVARAJ G., RAO S. Rapid and efficient plant regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from cotyledonary leaf explants. 2011.
- FRANKLIN G., SHEEBA C., LAKSHMI SITA G. Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants *Plant*. 2004.
- SARKER R.H., YESMIN S., HOQUE M.I. Multiple shoot formation in eggplant (*Solanum melongena* L.). 16 (1), 53, 2006.
- MIR K.A., DHATT A.S., SANDHU I.S., GOSAL S.S. Genotype, explant and culture medium effects on somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). 49 (3), 182, 2008.
- RAY B.P., HASSAN L., SARKER K. In vitro cultivation and regeneration of *Solanum Melongena* (L.) using stem, root and leaf explants. 1 (1), 49, 2011.
- MURASHIGE T., SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15 (3), 473, 1962.
- EVANS D., BRAVO J. Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants, in *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*. Springer. 73, 1986.
- SRIVATANAKUL M., PARK S.H., SANDERS J.R., SALAS M.G., SMITH R.H. Multiple shoot regeneration of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system. 19 (12), 1165, 2000.
- MOHNEN D. Novel experimental systems for determining cellular competence and determination, in *Biology of adventitious root formation*. Springer. 87, 1994.

34. BHATIA P., ASHWATH N., SENARATNA T., MIDMORE D. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). 78 (1), 1, 2004.
35. JEHAN S., HASSANEIN A., Hormonal requirements trigger different organogenic pathways on tomato nodal explants. 4 (11), 2118, 2013.
36. KUMAR S. A review on ethno-medicinal properties and plant tissue culture of high value solanaceous plants. *J. Phyto. Res* 30 (2), 63, 2017.
37. SHARMA U., SINGH P., RAJ N.P. Regeneration study in *Solanum lycopersicum*.
38. SIDHU M., DHATT A., SIDHU G. Plant regeneration in eggplant (*Solanum melongena* L.): A review. 13 (6), 714, 2014.
39. IKEUCHI M., SUGIMOTO K., IWASE A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. 25 (9), 3159, 2013.
40. ATTA R., LAURENS L., BOUCHERON-DUBUISSON E., GUIVARCH A., CARNERO E., GIRAUDAT-PAUTOT V., CHRIQUI D. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. 57 (4), 626, 2009.
41. TRIFUNOVIĆ-MOMČILOV M., MOTYKA V., DRAGIČEVIĆ LČ., PETRIĆ M., JEVREMOVIĆ S., MALBECK J., SUBOTIĆ A. Endogenous phytohormones in spontaneously regenerated *Centaurea erythraea* Rafn. plants grown in vitro. *Journal of Plant Growth Regulation* 35 (2), 543, 2016.
42. BLAKESLEY D. Auxin metabolism and adventitious root initiation, in *Biology of adventitious root formation*. Springer, 143, 1994.
43. ALONI R., SCHWALM K., LANGHANS M., ULLRICH C.J. Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primerdium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta*. 216 (5), 841, 2003.
44. SCARPELLA E., MARCOS D., FRIML J., BERLETH T. Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes & development* 20 (8), 1015, 2006.
45. ASHAKIRAN K., SIVANKALYANI V., JAYANTHI M., GOVINDASAMY V., GIRIJA S. Genotype specific shoots regeneration from different explants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) using TDZ. 1 (2), 107, 2011.
46. KUROHA T., KATO H., ASAMI T., YOSHIDA S., KAMADA H., SATOH S. A trans-zeatin riboside in root xylem sap negatively regulates adventitious root formation on cucumber hypocotyle. 53 (378), 2193, 2002.
47. MARHAVÝ P., MONTESINOS J.C., ABUZEINEH A., VAN DAMME D., VERMEER J.E., DUCLERCQ J., BENKOVÁ, E. Targeted cell elimination reveals an auxin-guided biphasic mode of lateral root initiation. 30 (4), 471, 2016.
48. HEISLER M.G., HAMANT O., KRUPINSKI P., UYTTEWAAL M., OHNO C., JÖNSSON H., MEYEROWITZ E.M. Alignment between PIN1 polarity and microtubule orientation in the shoot apical meristem reveals a tight coupling between morphogenesis and auxin transport. *PLoS biology*. 8 (10), 2010.
49. BHUTIA K.L., MEETEI N., KHANNA V. In vitro direct regeneration of Dalle Khursani (*Capiscum annum*) from salicylic acid treated explants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7 (2), 1008, 2018.
50. ZELCER A., SOFERMAN O., IZHAR S. Shoot regeneration in root cultures of Solanaceae. 2 (5), 252, 1983.
51. MELNYK C.W. Plant grafting: insights into tissue regeneration. *Regeneration*. 4 (1), 3, 2017.



Identification of S-Allele Based Self-incompatibility of Turkish Pear Gene Resources

Merve Dilek KARATAŞ^a, Nahid HAZRATI^b, Ezgi OĞUZ^b, Canan YÜKSEL ÖZMEN^b,
Serdar ALTINTAŞ^c, M. Emin AKÇAY^d, Ali ERGÜL^{b*}

^aFan Yüzüncü Yıl University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, 65080 Fatsa, Van TURKEY

^bAnkara University, Biotechnology Institute, 06115 Keçiören, Ankara-TURKEY

^cSakarya University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, 54100 Sakarya, TURKEY

^dRepublic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, Atatürk Horticultural Central Research Institute, Yalova, TURKEY

ARTICLE INFO

Research Article

Corresponding Author: Ali ERGÜL,

Received: 10 November 2020 / Revised: 09 April 2021 / Accepted: 11 April 2021 / Online: 25 March 2022

ABSTRACT

Self-incompatibility is considered to be a growth-limiting factor in fruit plants. In species with hermaphrodite flowers, S-locus (S-allele) has been accepted to control self-incompatibility, and the genetic control of this locus is provided by multiple genes (alleles). Pear (*Pyrus communis* L.) belongs to the Pomaceae family from the Rosaceae family and is found to have great genetic potential in terms of ecological features in Turkey. To protect these cultivation features, national garden collections have been established across the country and Atatürk Horticultural Central Research Institute-Yalova collection is considered as genes bank. Identification of the different features of this collection (fruit quality, stress tolerance, self-incompatibility, grafting incompatibility, etc.) is of great importance for its utilization in pear breeding and cultivation. However, to our knowledge, this collection has not been characterized

for self-incompatibility trait. In the current study, PCR (Polymerase Chain Reaction)-based amplification of the S-allele regions (S_1 , S_2 , S_3 , S_4) causing the self-incompatibility in 180 pear genotypes obtained from the national pear germplasm was investigated by molecular biological methods based on the comparison of amplified products. In 180 pear genotypes, the S_4 allele was the most prevalent one with 63% frequency, while the S_1 allele was the least common allele with a rate of 4%. In allele combinations, the S_1 - S_4 allele combination was the most common allele combination with a rate of 18%, and bilateral allele combinations (S_1 - S_2 - S_3 and S_1 - S_2 - S_4) were observed at a rate of 1%. Findings of the current research will enable the classification of the materials and the analyzed material is likely to be used in breeding studies as well as pear cultivation.

Keywords: Pear genotypes, self-incompatibility, S-allele, PCR amplification

© Ankara University, Faculty of Agriculture

1. Introduction

Pear (*Pyrus communis* L.), is common fruit grown in almost all moderate climates especially in Europe and Asia. In Turkey, Anatolia area is considered as the homeland and/or diversity centre for many fruit trees. About 640 different pear genotypes have been found in the country. To protect these gene sources, local nominated genotypes in different eco-geographical regions have been collected and protected within this area (Akçay et al. 2014).

Self-incompatibility (SI) in flower-bearing plants is known as a failure in self-fertilization, which may be controlled genetically. Self-incompatibility is known as an unfavourable feature in successful fertilization and fruit set. This phenomenon has been found in more than 100 plant families and has been reported in nearly 40% of plant species (Igic et al. 2008) involving some major crop plants like pome, potato, canola, cocoa, olive, stone fruits, coffee, etc. and/or wild relatives of the mentioned crops. In the majority of plants, genetic control of self-incompatibility is done by a single multiallelic locus named S-locus however, control of the systems by two or more loci in some crops like grasses has also been identified (De Nettancourt 2001). Determinants of both female and male specificity which their products are expected to interact and operate the function of self or non-self-distinction are encoded by the S-locus (Iwano & Takayama 2012; Muñoz-Sanz et al. 2020).

Depending on the function time of the gene in the stamen, most SI types can be categorized as gametophytic or sporophytic. In sporophytic self-incompatibility (SSI), determination of the SI phenotype is defined by the diploid genotype of parental or pollen-donor plant (sporophyte) and in gametophytic SI (GSI), the SI phenotype is determined by the pollen gametophytic haploid genotype (gametophyte) (Hiscock & Tabah 2003). At the molecular level, three mechanisms of the SI have been identified. In *Brassicaceae*, sporophytic self-incompatibility (SSI) has been identified while two separate types of gametophytic self-incompatibility (GSI) including S-RNase-based SI widely elucidated in *Solanaceae* and *Rosaceae*, and the Papaver based system relating to the programmed cell death (PCD) (Muñoz-Sanz et al. 2020).

In GSI which is considered to be the most prevalent type of SI, the cross becomes completely compatible when the male parent (haploid pollen genome) and female parent (diploid pistil genome) contain entirely disparate *S*-genotypes without any common *S*-allele (for instance $S_1S_2 \times S_3S_4$). In case one *S*-allele is shared by the parents (for instance $S_1S_2 \times S_1S_3$), proceeding of the pollen tube containing the similar allele is inhibited by pistil and consequently, the cross is considered to be semi-compatible. Accordingly, in case the same *S*-alleles are carried by the parents at the self-incompatibility locus (for instance $S_1S_2 \times S_1S_2$), growth of the pollen cannot be happened on stigma. In other words, in case pistil-pollen couples do not include the same alleles, include at least one similar allele, or include several alleles, full compatibility, semi-compatibility or incompatibility is encountered, respectively. In crosses with the semi-compatible behaviour, half of the existing pollens are inhibited and could affect the yield and fruit set significantly, for example in Japanese plums, European pears and apple (Schneider et al. 2003; Zisovich et al. 2005; Goldway et al. 2008; Sapir et al. 2008). Results of the incompatibility are observed in minimum seed set and consequently, higher rates of small fruit formation, and yield loss.

Though GSI system applies similar genes in different taxa to specify the pollen rejection system, the mechanism elaboration differs significantly. Moreover, in all families, at least two linked genes or often more, are involved in *S*-locus consisting of a set of pollen-expressing *SFBB* genes (*S*-locus *F*-Box *Brothers*) and a pistil-expressed *S*-*RNase* gene. Pistil-expressed glycoproteins which show ribonuclease activity are encoded by *S*-*RNase* and they function as extremely selective cytotoxins which result in inhibition of pollens germination and growth when pollen single *S*-haplotype corresponds to one of the diploid pistil *S*-haplotypes (Sanzol & Robbins 2008; Gao et al. 2015; Claessen et al. 2019; Muñoz-Sanz et al. 2020). Another is an *F*-box protein gene which is distinctly expressed in pollen, is named *SFB* or *SLF* according to the family (De Franceschi et al. 2012; Bagheri & Ershadi 2019; Muñoz-Sanz et al. 2020).

Ability to predict the genomic structure of the pear *S*-locus has been performed using BAC cloning and sequencing in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) (Sassa et al. 2007). This was the first study to reveal the existence of several *SFBB* genes surrounding the *S*-*RNase*. Comparing the genomic sequence surrounding the *S2*- and *S4*-*RNases*, elucidated meaningful changes in the orientation and position of the *SFBB* genes in pear *S*-haplotypes compared to the *S*-*RNase* gene (Okada et al. 2011; Claessen et al. 2019).

In *Rosaceae* and *Solanaceae*, *S*-haplotypes have 16 to 20 *SLF* gene sequences which collectively contribute to SI function of the pollen (Kubo et al. 2010; Kakui et al. 2011; Williams et al. 2014; Muñoz-Sanz et al. 2020). Sequence alignment of the *S*-*RNase* amino acid revealed five regions with the conserved characteristics (i.e. C1, C2, C3, C4, and C5) along with a highly variable region. In addition, a highly polymorphic intron located between the C2 and C3, is found in the hyper variable region (De Franceschi et al. 2012; Bagheri & Ershadi 2019).

2D-PAGE (Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis) technique has been used to determine mentioned *S*-genotypes earlier. Despite being a fast technique, it is not preferred by plant breeders because it is not a reliable and easy method (Ishimizu et al. 1996). In the following years, PCR technique was applied to identify protected nucleotide sequences of *S*-*RNase*. Zuccherelli et al. (2002) isolated 2 *S*-allele DNA fragments in Japanese pear and proved that their sequences are similar to that of databank sequences. Among them, 6 *S*-allele fragments (S_a , S_b , S_c , S_d , S_e and S_f) have been cloned and sequenced. Using these alleles, the *S*-allele genotyping was performed in 10 pear genotypes (Bartlett, Cascade, Doyennedum Comice, Abbé Fétel, Beurré Hardy, Passe Crassane, Conférence, Beurré Bose, Max Red Bartlett, Eleta Morettini), and the molecular data obtained were confirmed by field crossing results. In the study, PCR based *S*-allele genotyping at molecular level has been shown to be more fast and valid method for European pears.

A similar result was reported by Sanzol & Robbins (2008), that partially *S*-genotyped European pear cultivars and semi compatible test-crosses of these cultivars resulted in the identification of 14 *S*-alleles (S_1 to S_{14}) at the phenotypic level and allele-specific PCR led to the distinction across *S*-*RNases* that yielded amplification products with similar size using appropriate primers. The authors concluded that these two procedures presented a system for discrimination of all fourteen *S*-alleles in European pear at the molecular level.

Although self-pollination could have occurred in pear, the commercial-scale production depends on the existence of at least two simultaneously flowering compatible cultivars to enable appropriate and effective cross-fertilization so, exploiting of self and inter-compatible cultivars are important for economic fruit set (Zisovich et al. 2010; Goldway et al. 2012). In addition, in last decades, repeated use of scant numbers of cultivars in fruit breeding programs led to increase in cross-incompatibility property as well as a narrow genetic base in new pear varieties (Sanzol & Herrero 2002; Bagheri & Ershadi 2019). In this point of view, identification of the *S*-genotypes of the given species is important for revealing the species and inter-species fertilization biology to proper utilization in breeding programs (Quinet et al. 2014).

Although the incompatibility has been investigated in many pear germplasms, no findings relating to the self-compatibility/incompatibility have been encountered in genotypes of Turkey. In this paper, we evaluated the *S*-allele profiles of the pear genotypes of Turkey national collection in terms of fertilization biology.

2. Material and Methods

2.1 Plant material

180 pear (*Pyrus communis* L.) genotypes were obtained from the Atatürk Horticultural Central Research Institute, Yalova, Turkey, as plant material (Supplementary Table 1).

Table 1- Primer sequences for allele-specific PCR

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')	PCR product size
<i>PyrusS₁**</i>	atgtatgagctacagccctg	tccacagtgccctgttg	367bp
<i>PyrusS₂*</i>	gttggtggcctcaacagacg	gtgtaccctaaagagactgc	347bp
<i>PyrusS₃**</i>	tcacccagaaatggcactatgc	ccagtgcccttgatctccaa	352bp
<i>PyrusS₄**</i>	gtcatgacgggtttatcccc	ccaactggccttgaatgat	218bp

*: Ishimizu et al. (1999); **: Nashima et al. (2015)

2.2 Polymerase chain reactions (PCR)

Genomic DNA was isolated from the pear leaves according to Lefort et al. (1998). Determination of the DNA quantity was performed using Nanodrop ND-100 spectrophotometer and extracted DNA was checked on 1% agarose gel.

Allele-specific primers were applied for identifying the single alleles (*S₁*, *S₂*, *S₃*, *S₄*). Nucleotide sequences of *PyrusS₁*, *PyrusS₂*, *PyrusS₃*, and *PyrusS₄* primers were obtained according to Ishimizu et al. (1999) and Nashima et al. (2015), respectively (Table 1). Optimization of PCR (BioRad T100™) was conducted for used primers as follows: 5X PCR reaction buffer, 25 mM MgCl₂, 100 μM dNTP, 5 pmol primer, 5U Taq polymerase and 50-250 ng of genomic DNA was performed at a total volume of 15 μL. Negative control was conducted for controlling each PCR contamination. PCR program was performed as follows; 3 minutes pre-denaturation at 94 °C, 10 cycles (94 °C 1 min; 65 °C 1 min 45s; 72 °C 2 min; reducing the annealing temperature by 1 °C each cycle), 20 cycles (94 °C 1 min; 50 °C 1 min 45s; 72 °C 2 min) and final extension was performed at 72 °C for 10 minutes.

2.3. Evaluation of S-alleles according to band profiles

Amplified PCR products were separated by 2% agarose gel electrophoresis along with DNA marker (Solis BioDYNE) in 100 V for 1 hour and thereafter, DNA bands were visualized using a visualization system (Gene Genius Bio Imaging System) (Figure 1).

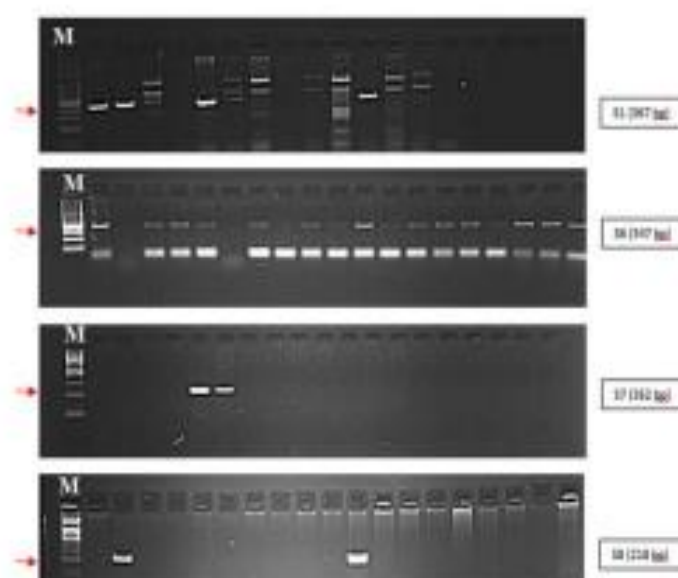


Figure 1- Examples of S-allele-specific PCR amplification images (*S₁*, *S₂*, *S₃* and *S₄* respectively). M: 100bp DNA ladder

After agarose gel visualization, genotypes with 367 bp (base pairs) in *PyrusS₁* primer, 347 bp in *PyrusS₂* primer, 352 bp in *PyrusS₃* primer, and 718 bp in *PyrusS₄* primer were considered self-incompatible for the relevant *S*-alleles. Allele distribution features determined by Broothaerts et al. (1996) and Ishimizu et al. (1999) have been considered in evaluation of the results.

Among four *S*-alleles, genotypes with at least one-two of which were accepted as semi-compatible, genotypes without amplified fragments were introduced as compatible, and the genotypes with three *S*-alleles are considered to be incompatible.

3. Results and Discussion

By identifying self-incompatibility in genotypes at molecular levels using *S*-alleles, findings of the pear gene resources have been revealed in Turkey (Supplementary Table 1).

3.1. Relationship of compatibility and genetic similarity

Two homonyms of Yalova pear genotypes named “Göksulu (Malatya)” and “Göksulu” (Akçay et al. 2014), showed to possess no similar *S*-alleles and were determined to be semi-compatible.

According to Akçay et al. (2014), “150 887 (1-5)” and “240 887 (3-3)” genotypes with a similarity rate of 91.7% were observed to contain same *S* allele (*S₆*). Also, in “Bey Armudu” and “16” genotypes, with 91.7% similarity, the first genotype contained *S₄* allele while the other one was identified to be whole compatible (Supplementary Table 1).

3.2. Relationship of compatibility and triploidy

In a trial, genetic analyses using 18 SSR loci in 11 pear genotypes revealed presence of three alleles in 4-10 loci, and these genotypes have been identified as potential triploid genotypes (Akçay et al. 2014). In the current study, high variation of SSR alleles detected earlier, was not observed in incompatibility alleles and the *S₆* allele was the most observed allele in these triploid incompatible genotypes and while there was no incompatibility allele observed in other 5 genotypes (A 2411, E. Buzbağ, A 2407, 265 GF AE, 140 887 (2-2)) the rest showed at least one incompatible allele (Table 2).

Table 2- Self-incompatibility states of triploid genotypes in SSR analyses

<i>Triploids pear genotypes in SSR analysis</i>	<i>Incompatibility allele</i>	<i>PCR based- Incompatibility status</i>
190 887 (3-7)	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible
140 887 (2-1)	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible
A 2412	<i>S₇S₆</i>	Semi-compatible
A 2404	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible
A 2401	<i>S₆S₇</i>	Semi-compatible
A 2411	-	Compatible
E. Buzbağ	-	Compatible
A 2407	-	Compatible
265 GF AE	-	Compatible
140 887 (2-2)	-	Compatible

Table 3- *S*-Alleles, self-incompatibility cases and numbers

<i>S allele</i>	<i>Number of genotypes</i>	<i>PCR based-Incompatibility status</i>
<i>S₆S₆</i>	60	Semi-compatible
<i>S₆S₇</i>	4	Semi-compatible
<i>S₆S₈</i>	2	Semi-compatible
<i>S₇S₇</i>	5	Semi-compatible
<i>S₈S₈</i>	3	Semi-compatible
<i>S₇S₁</i>	14	Semi-compatible
<i>S₇S₆</i>	33	Semi-compatible
-	46	Compatible
<i>S₇S₆S₈</i>	2	Incompatible
<i>S₇S₆S₇</i>	2	Incompatible

To improve the knowledge of self-incompatibility and its relations to many new pear genotypes, we elucidated *S*-genotype of 180 pear genotypes and arranged them based on their *S*-*RNase* alleles in 10 incompatibility groups (Table 3). Our results revealed incompatibility relations among a great number of pear genotypes in Turkey with unknown previous pollination requirements. These findings of given genotypes will be beneficial for indicating the potential of fertilization and fruit set, establishing the isolated gardens, and selecting as pollinizer.

In this research, four different *S*-alleles (S_1 , S_2 , S_3 , S_4) whose primers have been identified in similar work (Kim et al. 2002; Nashima et al. 2015) were optimized and band size of 180 pear genotypes was determined. 130 out of 180 genotypes which contained at least one *S*-allele were identified as semi-compatible. From the rest, 4 of which containing three *S*-allele were determined as incompatible. In 46 genotypes, it was not observed any *S*-allele and being different from the others, they were identified as compatible genotypes (Table 3).

S_4 allele was observed with 63% rate followed by S_1 with 28% rate. S_3 was the less observed *S*-allele with 4% rate. The highest bilateral *S*-allele combination was observed in S_1 - S_4 (18%), and the highest trilateral combinations were S_1 - S_4 - S_2 and S_1 - S_4 - S_3 (1%). Quadripartite combination was not observed in any genotype.

In terms of S_1 , S_2 , S_3 , and S_4 alleles, 46 genotypes (25%) contained none of them, 91 genotypes (50%) contained one of them, 39 genotypes (21%) contained two of them, and 4 genotypes (2%) contained three of them. No genotype containing all of the mentioned alleles was observed (Table 3).

Similar to our work, 14 Japanese pear genotypes were investigated using 11 *S*-alleles including S_1 , S_2 , S_3 , and S_4 alleles, and these alleles are applicable effectively for rapid identification of *S*-genotypes in similar pear breeding studies, and marker-assisted selection (MAS) performing (Nashima et al. 2015). Low sequence similarity of allele introns (average 43%) and high polymorphism in exon regions have been shown as the causes of high performance features of these *S*-alleles (Nashima et al. 2015). Nashima et al. (2015) identified existence of peculiar amplification (especially between 55-61 °C) through various PCR optimization trials of the S_1 , S_2 , S_3 , and S_4 primers, and observed undesirable fragments on agarose gel in all primer pairs under 100 bp. In our research, these primers were similarly optimized using Touch Down PCR (Td between 55-65 °C) program and some non-specific band was observed among PCR products.

Nowadays, *S*-allele genotyping trials at molecular level have been accelerated. Up until now, *S*-allele cloning and sequencing has been performed in about 26 European pear genotypes. In addition, genotyping of *S*-*RNase* genes in more than 150 pear genotypes has been carried out (Sanzol & Herrero 2002; Zuccherelli et al. 2002; Zisovich et al. 2004; Sanzol et al. 2006; Takasaki et al. 2006; Sanzol & Robbins 2008; Goldway et al. 2009; Sanzol 2009 a, b; Nashima et al. 2015).

In our study, since the high numbers of genotypes possess S_4 allele, so this allele was chosen as the prevalent one. The high ratio of genotypes bearing the S_4 allele (112 out of 180 genotypes) in comparison to genotypes bearing S_1 and other two alleles, could be explained by a plausible hypothesis that the S_4 -locus is linked to another gene or genes encoding an important trait for pear cultivation or quality so, it could be mentioned that the S_4 allele involved a selective preference during breeding. A previous study on European pears revealed that certain *S*-alleles have considerably more frequency, and selection for commercial traits was proposed to describe this result. In this regard, Sanzol & Robbins (2008) noted that the majority of selected offspring of “Williams Bon Chrétien” cultivar with *PcS101* and *PcS102* *S*-alleles comprised the *PcS101* allele rather than the *PcS102* allele. The authors suggested that the *PcS101* allele is of interest throughout selection. In addition, genetic analyses of species belonging to distant taxa are quite consistent with this feasibility (Burke et al. 2002; Gandhi et al. 2005). Nevertheless, it could be mentioned that the high use of certain genotypes as parent in breeding programs could also be one of the reasons for the abundance of certain alleles.

In our study, Williams cultivar was employed as a reference genotype and displayed an incompatible feature similar to previous studies (Sanzol & Herrero 2002). *S*-allele-specific PCR analysis (S_1 , S_2 , S_3 and S_4 , respectively) are given in Figure 1 and the Williams cultivar representing reference genotype with known *S*-*RNases* (S_1S_4), gave the expected PCR products corresponding to each allele and after electrophoresis, the higher frequency of S_4 allele was sensibly distinct among studied genotypes (Figure 1). Orcheski & Brown (2012) noted that, since specific reference cultivars are often used as parent in breeding programs of new cultivars so, their related *S*-alleles are found frequently in new developed commercial cultivars.

In the current study, three alleles were found in the four genotypes, namely ‘E2480 Kızıl Bıldırcın’ and ‘E 2481 Kaymak’ from Central Anatolian region and ‘21’ and ‘52’ from Marmara regions using these primers (Supplementary Table 1). According to 46 self-compatible genotypes, considering the proportion of regional samples, the highest proportion (40%) with 13 out of 32 genotypes was assigned to the Marmara region and the lowest percentage with 3 out of 24 genotypes (12% of the region samples) allocated to the Central Anatolian region so, more attention should be paid to contrivance, regarding the commercial production and orchard design in this region. The results confirmed that the self-incompatibility feature tends to

increase in species, which is contrary to the former reports indicating that most cultivars were compatible (Mehlenbacher et al. 1991; Herrera et al. 2018).

Although much progress has been gained in understanding how the SI system works, many points of ambiguity remain still unclear. It has been recently illustrated that the *Pyrus* SI response begins with the uptake of the *S-RNase* protein from the style transmitter tissue by the pollen tube in a non-allelic specific manner. The entry of both non-self and self *S-RNases* into the pollen tube, support that the process of self-recognition takes place inside the pollen tube and subsequently results in inhibition of the non-self *S-RNases* activity (Goldraij et al. 2006; De Franceschi et al. 2012; Meng et al. 2014a; Meng et al. 2014b; Williams et al. 2015). In *Malus* and *Pyrus* species, the simultaneous attendance of multiple *SFBB* genes on the *S*-locus as the pollen *S*-detectors (Sassa et al. 2007) indicates that each of the *SFBB* proteins may detect one or more non-self *S-RNases*, targeting them for proteasome degradation (De Franceschi et al. 2012).

The recognition system has been proposed to occur via two models for GSI in *Pyrus* species. In the first model, the *SFBB* protein which identifies specifically the self *S-RNase*, relinquishing the self *S-RNase* intact to reject extension of the incompatible (self) pollen tube while mark all non-self *S-RNases* (Williams et al. 2015). In the second model which functions in the non-self-recognition way, the multiplex *SFBBs* that each distinguish and target a subset or unique non-self *S-RNases*, resulted in *S-RNase* decomposition so, the self *S-RNases* which are not prohibited led to the inhibition of self-incompatible pollen growth (Kubo et al. 2010).

It should be noted that in nature, true rejection of pollen is not only controlled genetically but also is affected by various external agents, like the environmental factors and pollination grade resulting in selfed seeds in self-incompatible varieties (Visser & Mareucci 1984). Interestingly, in cases where pollination occurs by non-self pollen, the evolvement possibility of ovule or fruit is higher than in case of self-pollination, which indicates the attendance of additional post-zygotic inhibitors that inhibit the selfed seed formation (Martin & Lee 1993). It is concluded that this abortion could be caused by recessive homozygous alleles combination or accumulation of low alleles that occur as a result of self-fertilization (Pannell & Labouche 2013) or due to the lower intake strength of plant sap for energy attainment.

Similarly, crosses between two semi-compatible lines could also lead to adversities. In semi-compatible crosses, half of the pollens bearing certain *S*-genotype are inhibited, resulting in a limited number of possible *S*-genotype compositions in the progeny. This "artificial selection" significantly affects the diversity of *S*-alleles, leading to a reduction in biological and genetic diversity as well as the loss of interesting traits in pear cultivars (Claessen et al. 2019).

According to the contents, examination of the pear SI mechanism reveals that in most commercial cultivars, the fruit set is highly depend on cross-pollination and successful fertilization. For these reasons, incompatibility is a system that nature has developed to prevent the accumulation of adverse homozygous allele damages and to provide a way to create varieties with diverse characteristics while maintaining viability over the years.

4. Conclusions

S-genotyping has made it possible to classify cultivars in relevant incompatibility groups considering their compatibility relations. Self-incompatibility is displayed when the pollen genotype corresponds to one of the pistil *S*-alleles. Therefore, self-incompatible lines bearing the similar *S*-alleles by classification in the identic incompatibility category, are considered to be inter-incompatible, while lines from other categories containing at least one different *S*-allele are accepted to be inter-compatible (Muñoz-Sanz et al. 2017).

It should be noted that standardization of the *S*-alleles identification criteria is essential in various laboratories, including the full sequencing of *S* alleles and utilization of the identic primer pairs. This will lead to easy *S*-allele identification without confusion and will provide valuable information for pear breeders (Herrera et al. 2018). Obtained results in this study make it possible to organize the incompatibility relationships between pear genotypes with former unknown pollination knowledge and provide the possibility to select suitable parents in designing new crosses in pear production and breeding programs. Besides, this work could be helpful for other *Rosaceae* fruit products with the same challenges encountered by pear.

References

- Akçay M E, Burak M, Kızan K, Yüksel Özmen C, Muta F, Bakır M, Ayanoğlu H & Ergül A (2014). Genetic analysis of Anatolian pear germplasm by simple sequence repeats. *Annals of Applied Biology* 164: 441-452. <https://doi.org/10.1111/aab.12113>
- Bagheri M & Ershadi A (2019). Self-incompatibility alleles in Iranian pear cultivars. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 27:101672. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101672>
- Broothaerts W, Verdoodt L, Keulemans J, Janssens GA & Broekaert WF (1996). The self-incompatibility gene in apple and determination of the *S*-genotype of apple cultivars by PCR. *Acta Horticulturae* 423: 103-109. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1996.423.13>
- Burke JM, Tang S, Knapp S & Rieseberg L H (2002). Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics* 162: 1257-1267

- Classen H, Keulemans W, Van de Poel B & De Storme N (2019). Finding a Compatible Partner: Self-Incompatibility in European Pear (*Pyrus communis*): Molecular Control, Genetic Determination, and Impact on Fertilization and Fruit Set. *Frontiers in Plant Science* 10: 407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00407>
- De Nettancourt D (2001). Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).
- De Franceschi P, Dondini L & Sanz J (2012). Molecular bases and evolutionary dynamics of self-incompatibility in the *Pyraceae*. *Journal of Experimental Botany* 63: 4015-4032. <https://doi.org/10.1093/jxb/err108>
- Gandhi S D, Heesacker A F, Freeman C A, Argyris J, Bradford K & Knapp S J (2005). The self-incompatibility locus (*S*) and quantitative trait loci for self-pollination and seed dormancy in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 619-629. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-1934-7>
- Gao C, Yuan D Y, Yang Y, Wang B F, Liu D M & Zou F (2015). Pollen tube growth and double fertilization in *Camellia oleifera*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 140:1218. <https://doi.org/10.21273/JASHS.140.1.12>
- Goldraj A, Kondo K, Lee C B, Hancock C N, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Philips T E, Cruz-Garcia F & McClure B (2006). Compartmentalization of *S-RNase* and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* 439: 805-810. <https://doi.org/10.1038/nature04491>
- Goldway M, Stern R, Zisovich A, Raz A, Sapir G, Schneider & Nyska R (2012). The self-incompatibility system in *Rosaceae*: agricultural and genetic aspects. *Acta Horticulturae* 967: 77-82. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.967.7>
- Goldway M, Takasaki T, Sanz J, Mota M, Zisovich A H, Stern R A & Sansavini S (2009). Renumbering the *S-RNase* alleles of European pears (*Pyrus communis* L.) and cloning the *S109 RNase* allele. *Scientia Horticulturae* 119: 417-422. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.027>
- Goldway M, Zisovich A, Raz A & Stern R A (2008). Understanding the gametophytic self-incompatibility system and its impact on European pear (*Pyrus communis* L.) cultivation. *Acta Horticulturae* 800: 109-118. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.800.9>
- Herrera S, Rodrigo J, Hormaza J I & Lora J (2018). Identification of self-incompatibility alleles by specific PCR analysis and *S-RNase* sequencing in apricot. *International Journal of Molecular Sciences* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19113612>
- Hancock S J & Tabah D A (2003). The different mechanisms of sporophytic self incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 358: 1037-1045. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1297>
- Igic B, Lande R & Kohn J R (2008). Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *International Journal of Plant Sciences* 169: 93-104. <https://doi.org/10.1086/523362>
- Ishimizu T, Inoue K, Shimomura M, Saito T, Terai O & Norioka S (1999). PCR-based method for identifying the *S*-genotypes of Japanese pear cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98(6): 961-967. <https://doi.org/10.1007/s001220051156>
- Ishimizu T, Sato Y, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakamichi T & Sakiyama F (1996). Identification and partial amino acid sequences of seven *S-RNases* associated with self-incompatibility of the Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *Journal of Biochemistry* 120: 326-334. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021417>
- Iwano M & Takayama S (2012). Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.09.003>
- Kakui H, Kato M, Ushijima K, Kitaguchi M, Kato S & Sassa H (2011). Sequence divergence and loss-of-function phenotypes of *S* locus *F-box* brother genes are consistent with non-self recognition by multiple pollen determinants in self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *The Plant Journal* 68: 1028-1038. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.04752.x>
- Kim H T, Hinta Y & Nou I S (2002). Identification of self incompatibility alleles by *S-RNase* sequencing and PCR-RFLP analysis in Korean-bred pear (*Pyrus pyrifolia*) strains. *Acta Horticulturae* 587:467-476. <https://doi.org/10.1016/ActaHortic.2002.587.61>
- Kubo K, Entani T, Tanaka A, Wang N, Fields A M, Hua Z, Toyoda M, Kawashima S, Ando T, Isogi A, Kao T & Takaya S (2010). Collaborative non-self recognition system in *S-RNase*-based self-incompatibility. *Science* 330: 796-799. <https://doi.org/10.1126/science.1195243>
- Lefort F, Lally M, Thompson D & Douglas G C (1998). Morphological traits microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (*Q. Robur* L.) at Tullyally, Ireland. *Silvae Genetica* 47: 5-6
- Martin M E & Lee T D (1993). Self pollination and resource availability affect ovule abortion in *Cassia fasciculata* (*Cassipiniaceae*). *Oecologia* 94: 503-509. <https://doi.org/10.1007/BF00566965>
- Mehlenbacher S A, Cocu V & Hough F L (1991). Apricots (*Prunus*). *Acta Horticulturae* 290: 65-110 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1991.290.3>
- Meng D, Gu Z, Li W, Wang A, Yuan H, Yang Q & Li T (2014a). Apple MdABCF assists in the transportation of *S-RNase* into pollen tubes. *Plant Journal* 78: 990-1002. <https://doi.org/10.1111/tpj.12524>
- Meng D, Gu Z, Yuan H, Wang A, Li W, Yang Q, Zhu Y, Li T (2014b). The microtubule cytoskeleton and pollen tube golgi vesicle system are required for in vitro *S-RNase* internalization and genetic self-incompatibility in apple. *Plant & Cell Physiology* 55: 977-989. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu031>
- Muñoz-Sanz J V, Zuriaga E, Cruz-García F, McClure B & Romero C (2020) Self-(In)compatibility Systems: Target Traits for Crop-Production, Plant Breeding, and Biotechnology. *Frontiers Plant Science* 11: 195. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00195>
- Muñoz-Sanz J V, Zuriaga E, López I, Badenes M L & Romero C (2017). Self-(in)compatibility in apricot germplasm is controlled by two major loci, *S* and *M*. *BMC Plant Biology* 17: 82. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1027-1>
- Nashima K, Terakami S, Nishio S, Kunihisa M, Nishitani C, Saito T & Yamamoto T (2015). *S*-genotype identification based on allele-specific PCR in Japanese pear. *Breeding science* 65(3): 208-215. <https://doi.org/10.1270/jbbs.65.208>
- Okada K, Tanaka N, Taguchi T, Ichikawa T, Sawamura Y, Nakamichi T & Takeshi T Y (2011). Related polymorphic *F-box* protein genes between haplotypes clustering in the BAC contig sequences around the *S-RNase* of Japanese pear. *Journal of Experimental Botany* 62: 1887-1902. <https://doi.org/10.1093/jxb/err381>
- Orzechowski B & Brown S (2012). A grower's guide to self and cross incompatibility in apple. *New York Fruit Quarterly* 20: 25-28.
- Pannell J R & Labouche A M (2013). The incidence and selection of multiple mating in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 368: 20120051. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0051>
- Quinet M, Keleşem S, Raupé O & Jacquemart A L (2014). *S*-genotype characterization of 13 North Western European pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 165: 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.023>
- Sanz J (2009a). Pistil-function break down in a new *S*-allele of European pear, *S21*, confers self-compatibility. *Plant Cell Reports* 28: 457-467. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0645-3>
- Sanz J (2009b). Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases in European pear cultivars and development of PCR detection for 20 alleles. *Tree Genetics Genomes* 5: 393-405. <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0194-5>

- Sanzol J & Herrero M (2002). Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Euphytica* 128:325-331. <https://doi.org/10.1023/A:1021213905461>
- Sanzol J & Robbins T P (2008). Combined analysis of *S* alleles in European pear by pollinations and PCR based *S*-genotyping: correlation between *S* phenotypes and *S*-RNAse genotype. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133: 213-224. <https://doi.org/10.21273/JASHS.133.2.213>
- Sanzol J, Sutherland B G & Robbins T P (2006). Identification and characterization of genomic DNA sequences of the *S*-ribonuclease gene associated with self-incompatibility alleles *S*-1 to *S*-5 in European pear. *Plant Breeding* 125: 513-518. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2006.01269.x>
- Sapir G, Stern R A, Shafir S & Goldway M (2008). *S*-RNAse based Sgenotyping of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and its implication on the assortment of cultivar couples in the orchard. *Scientia Horticulturae* 118: 8-13 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.004>
- Sassa H, Kakui H, Miyamoto M, Suzuki Y, Hanada T, Ushijima K, Kusaba M, Hirano H & Koba T (2007). *S* locus *F*-bar brothers: multiple and pollen-specific *F*-bar genes with *S* haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear. *Genetics* 175: 1869-1881. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.068858>
- Schneider D, Stern R A & Goldway M (2005). A comparison between semi and fully compatible apple pollinators grown under suboptimal conditions. *HortScience* 40: 1280-1282. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.5.1280>
- Takasaki T, Moriya Y, Okada K, Yamamoto K, Iwanami H, Bessho H & Nakanishi T (2006). cDNA cloning of nine *S* alleles and establishment of a PCR-RFLP system for genotyping European pear cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1543-1552. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0257-7>
- Visser T & Mareucci M C (1984). The interaction between compatible and self-incompatible pollen of apple and pear as influenced by their ratio in the pollen cloud. *Euphytica* 33: 699-704. <https://doi.org/10.1007/BF00021897>
- Williams J S, Der J P, de Pampillis C W & Kao T-H (2014). Transcriptome analysis reveals the same 17 *S*-Locus *F*-bar genes in two haplotypes of the self-incompatibility locus of *Petunia inflata*. *Plant cells* 26: 2873-2888. <https://doi.org/10.1105/pc.114.126920>
- Williams J S, Wu L, Li S, Sun P & Kao T-H (2015). Insight into *S*-RNAse-based self-incompatibility in *Petunia*: recent findings and future directions. *Frontiers in Plant Science* 6: 41. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00041>
- Zisovich A H, Raz A, Stern R A & Goldway M (2010) Syrian pear (*Pyrus syriaca*) as a pollinator for European pear (*Pyrus communis*) cultivars. *Scientia Horticulturae* 125(3): 256-262. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.01>
- Zisovich A H, Stern R A, Shafir S & Goldway M (2004). Identification of seven *S*-alleles from the European pear (*Pyrus communis* L.) and the determination of compatibility among cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 101-106. <https://doi.org/10.1080/14620316.2004.11511720>
- Zisovich A H, Stern R A, Shafir S & Goldway M (2005). Fertilisation efficiency of semi and fully-compatible European pear (*Pyrus communis*) cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 80: 143-146. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.11511906>
- Zuccherelli S, Tassinari P, Bessothaerts W, Tartarini S, Dondini L & Sansavini S (2002). *S*-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). *Sexual Plant Reproduction* 15(3): 153-158. <https://doi.org/10.1007/s00497-002-0145-5>

Supplementary Table 1- *S*-allele compositions of pear cultivars

No.	Cultivar name	<i>S</i> -Genotype	PCR based- Compatibility status	Region
1	190 887 (3-2)	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Unknown
2	190 887 (3-1)	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Aegean
3	240 887 (3-1)	-	Compatible	Aegean
4	22	-	Compatible	Marmara
5	38	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Marmara
6	A-48	-	Compatible	Unknown
7	133	<i>S₁S₆</i>	Semi-compatible	Marmara
8	200 GFAE	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Black Sea
9	207 BF(G)	-	Compatible	Black Sea
10	221 GFAE (G)	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Black Sea
11	223 GFAE (G)	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Black Sea
12	A-2406	<i>S₁S₆</i>	Semi-compatible	Unknown
13	Andavay	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Black Sea
14	Bağ (G)	-	Compatible	Black Sea
15	Bal Armut (Malatya)	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Unknown
16	Bey Armudu	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Unknown
17	Çankaya1	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Unknown
18	Çennet (G)	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Black Sea
19	E 2473 Cinci	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Central Anatolian
20	E 2501 Eğrişap	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Central Anatolian
21	E 2507 Pamukap	<i>S₁S₁</i>	Semi-compatible	Central Anatolian
22	E Rize	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Unknown
23	Fakaz (G)	<i>S₁S₆</i>	Semi-compatible	Black Sea
24	Gündüphan (G)	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible	Black Sea
25	Gürpınar (G)	<i>S₁S₆</i>	Semi-compatible	Black Sea
26	İğnesi (Malatya)	<i>S₁S₁</i>	Semi-compatible	Unknown
27	İncir (Malatya)	-	Compatible	Unknown
28	Kantarcı	<i>S₁S₁</i>	Semi-compatible	Black Sea

Supplementary Table 1 (Continue)- S-allele compositions of pear cultivars

No.	Cultivar name	S-Genotype	PCR based- Compatibility status	Region
29	Karagöynük	-	Compatible	Marmara
30	Karpuz	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Black Sea
31	Kiraz	S ₃ S ₃	Semi-compatible	Black Sea
32	Küpdiken (Malatya)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
33	Küre (G)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Black Sea
34	Laliye	S ₃ S ₃	Semi-compatible	Marmara
35	Malatya Limon	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Unknown
36	Mis (G)	S ₃ S ₃	Semi-compatible	Black Sea
37	Turşu (G)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Black Sea
38	174W (G) D.dAngulume	S ₃ S ₃	Semi-compatible	Unknown
39	E Santa Maria	-	Compatible	Unknown
40	Williams	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Unknown
41	Akça	S ₃ S ₃	Semi-compatible	Marmara
42	E. Buzbağ	-	Compatible	Marmara
43	Çiçek	-	Compatible	Marmara
44	Göksoğlu	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Marmara
45	Göksoğlu (Malatya)	S ₃ S ₃	Semi-compatible	Marmara
46	Malatya (Malatya)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
47	205 AF (G)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Black Sea
48	188 BK (G)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Black Sea
49	130 887 (1-3)	S ₃ S ₃	Semi-compatible	Unknown
50	130 887 (3-7)	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Unknown
51	140 887 (1-1)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
52	140 887 (2-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
53	150 887 (1-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
54	150 887 (1-5)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
55	150 887 (2-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
56	172 887 (2-2)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
57	190 887 (2-6)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
58	180 887 (4-3)a	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
59	180 887 (9-7)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
60	190 887 (3-3)	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Unknown
61	190 887 (3-5)	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Aegean
62	190 887 (3-7)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
63	190 887 (4-1)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
64	190 887 (6-2)	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Aegean
65	200 887 (2-1)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
66	200 887 (2-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
67	200 887 (2-4)	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Aegean
68	200 887 (11-6)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
69	210 887 (2-2)	S ₃ S ₃	Semi-compatible	Aegean
70	210 887 (2-3)	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Aegean
71	210 887 (4-4)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
72	210 887 (4-6)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
73	220 887 (2-3)	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Aegean
74	220 887 (3-3)	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Aegean
75	230 887 (3-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
76	240 887 (3-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
77	A33	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Unknown
78	A 129	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Unknown
79	A 2401	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
80	A 2407	-	Compatible	Unknown
81	A 2409	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Unknown
82	A 2411	-	Compatible	Unknown
83	A 2412	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Aegean
84	E 2470 Kokmuş Armut	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
85	E 2444 Arpa	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
86	E 2462 Baldırcın	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
87	E2480 Kızı Baldırcın	S ₃ S ₆ S ₆	Incompatible	Central Anatolian
88	E 2481 Kaymak	S ₃ S ₆ S ₆	Incompatible	Central Anatolian
89	E 2493 Kışık Şalgam	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
90	E 2516	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
91	E 2539 Baymaz	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
92	E 2540 Dalkıran	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Unknown
93	E 2542 Ağa	S ₃ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
94	E 2547 Armut	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian

Supplementary Table 1 (Continue)- S-allele compositions of pear cultivars

No.	Cultivar name	S-Genotype	PCR based- Compatibility status	Region
95	E 2556 Hocaol	-	Compatible	Unknown
96	E 2557 Mustafaibey	S_6S_9	Semi-compatible	Central Anatolian
97	E Ankara	S_6S_9	Semi-compatible	Central Anatolian
98	E Giresun	S_6S_9	Semi-compatible	Central Anatolian
99	10	S_6S_9	Semi-compatible	Marmara
100	13	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
101	14	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
102	18	S_6S_9	Semi-compatible	Marmara
103	19	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
104	20	S_6S_9	Semi-compatible	Marmara
105	21	$S_7S_6S_9$	Incompatible	Marmara
106	30	S_6S_9	Semi-compatible	Marmara
107	37b	S_6S_9	Semi-compatible	Marmara
108	41	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
109	43	S_6S_9	Semi-compatible	Marmara
110	136	-	Compatible	Marmara
111	139	S_6S_9	Semi-compatible	Marmara
112	231 BC	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
113	P5-9	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
114	P5-23	-	Compatible	Unknown
115	Thompson (Malatya)	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
116	Andee Desportes	-	Compatible	Unknown
117	150 887 (1-1)	-	Compatible	Aegean
118	E 2545	-	Compatible	Unknown
119	140 887 (2-5)	-	Compatible	Unknown
120	140 887 (2-2)	S_6S_7	Semi-compatible	Aegean
121	E 2533 Sarı Armut	-	Compatible	Central Anatolian
122	E 509 Kış Armutu	-	Compatible	Central Anatolian
123	E 224 K. Armut	S_6S_9	Semi-compatible	Central Anatolian
124	52	$S_6S_6S_7$	Incompatible	Marmara
125	200 887 (2-1)b	-	Compatible	Aegean
126	210 887 (4-5)	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
127	P5 11	-	Compatible	Unknown
128	64	-	Compatible	Marmara
129	44	-	Compatible	Marmara
130	134	-	Compatible	Marmara
131	E 2537 Bulap	S_6S_9	Semi-compatible	Central Anatolian
132	220 887 (3-1)	-	Compatible	Unknown
133	213 GFAE	-	Compatible	Karadeniz
134	236 GFAE	-	Compatible	Karadeniz
135	A 2404	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
136	190 887 (3-6)	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
137	31	S_6S_9	Semi-compatible	Marmara
138	190 887 (2-3)	S_6S_9	Semi-compatible	Aegean
139	16	-	Compatible	Marmara
140	P5-2	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
141	14	-	Compatible	Unknown
142	A 129	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
143	P 522	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
144	A 2410	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
145	E 2462 Boldırcın	-	Compatible	Central Anatolian
146	E 2480 Kızı Boldırcın	S_6S_9	Semi-compatible	Mediterranean
147	E 2542 Ağa	S_6S_9	Semi-compatible	Central Anatolian
148	150 887 (3-1)	-	Compatible	Aegean
149	21	-	Compatible	Marmara
150	190 887 (1-1)	-	Compatible	Aegean
151	200 887 (2-1)	S_6S_9	Semi-compatible	Aegean
152	E Ankara	S_6S_9	Semi-compatible	Central Anatolian
153	220 887 (2-3)	S_6S_9	Semi-compatible	Aegean
154	Giresun	S_6S_9	Semi-compatible	Unknown
155	150 887 (1-1)	S_6S_9	Semi-compatible	Aegean
156	240 887 (3-2)	S_6S_9	Semi-compatible	Aegean
157	200 887 (2-1)a	-	Compatible	Aegean
158	140 887 (2-1)	S_6S_9	Semi-compatible	Aegean
159	140 887 (2-2)	-	Compatible	Aegean
160	265 GFAE	-	Compatible	Karadeniz

Supplementary Table 1 (Continue)- S-allele compositions of pear cultivars

No.	Cultivar name	S-Genotype	PCR based- Compatibility status	Region
161	E 2533 Sani Aemut	SaSa	Semi-compatible	Central Anatolian
162	E 2509 K. Aemut	SaSa	Semi-compatible	Unknown
163	190 887 (3-4)	SaSa	Semi-compatible	Unknown
164	200 887 (2-1)b	-	Compatible	Aegean
165	E 2525 Elçi Aemut	SaSa	Semi-compatible	Central Anatolian
166	44	SaSa	Semi-compatible	Marmara
167	134	SaSa	Semi-compatible	Marmara
168	E 2537 Bulap	SaSa	Semi-compatible	Central Anatolian
169	220 887 (3-1)	SaSa	Semi-compatible	Unknown
170	235 P	-	Compatible	Unknown
171	A 2404	-	Compatible	Unknown
172	31	SaSa	Semi-compatible	Marmara
173	M 2404	-	Compatible	Unknown
174	190 887 (2-3)	SaSa	Semi-compatible	Aegean
175	180 887 (4-3)b	SaSa	Semi-compatible	Aegean
176	220 887 (4-1)	SaSa	Semi-compatible	Aegean
177	45	-	Compatible	Marmara
178	32	-	Compatible	Marmara
179	138	-	Compatible	Marmara
180	A 135	-	Compatible	Unknown



© 2022 by the author(s). Published by Ankara University, Faculty of Agriculture, Ankara, Turkey. This is an Open Access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

