



## CRISPR/Cas9 Technology and Applications in Plants

Emine Açar<sup>1,a,\*</sup>, Yıldız Aka Kaçar<sup>1,2,b</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Department, Institute of Applied and Natural Sciences, Cukurova University, 01330 Adana, Turkey

<sup>2</sup>Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Cukurova University, 01330 Adana, Turkey

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Review Article</i></p> <p>Received : 08/01/2020 Accepted : 15/10/2020</p> <p><b>Keywords:</b> CRISPR/Cas9 Genome Editing Modification Mutation Plant Breeding Techniques</p>	<p>In order to increase access to nutritious foods around the world, innovative technologies need to be developed and integrated into agricultural production systems. The new plant breeding techniques developed offer many advantages for making modifications in the plant genome. CRISPR/Cas9, one of the genome editing technologies, is an efficient system with high potential that allows the formation of target-oriented mutations in many agricultural products and allows the mutation of new and desired characters to be obtained through breeding programs without the use of foreign genetic elements. In this review, we have summarize the discovery, evaluation, functionality, genome editing studies of plants and the strong potentials of CRISPR/Cas9 technology for plant breeding.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 9(1): 1-6, 2021

## CRISPR/Cas9 Teknolojisi ve Bitkilerde CRISPR/Cas9 Uygulamaları

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Derleme Makale</i></p> <p>Geliş : 08/01/2020 Kabul : 15/10/2020</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> Bitki ıslahı teknikleri CRISPR/Cas9 Genom düzenleme Modifikasyon Mutasyon</p>	<p>Dünya genelinde besleyici gıdalara erişimi arttırmak için yenilikçi teknolojilerin geliştirilmesine ve tarımsal üretim sistemlerine entegre edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Geliştirilen bitki ıslahı teknikleri, bitki genomunda modifikasyonların oluşturulması için birçok avantaj sunmaktadır. Genom düzenleme teknolojilerinden CRISPR/Cas9, tarımsal ürünlerde hedef odaklı mutasyonların oluşumuna olanak tanıyarak, ıslah programları ile elde edilmek istenen arzu edilen yeni karakterlerin, yabancı genetik element kullanılmadan mutasyonuna olanak tanıyan büyük bir potansiyele sahip etkili bir sistemdir. Bu derlemede CRISPR/Cas9 teknolojisinin keşfi ve evrimi, fonksiyonelliği, bitkilerde yapılan genom düzenleme çalışmaları ve tekniğin bitki ıslahı için sahip olduğu güçlü potansiyelleri ve genom düzenleme teknolojilerinin bitki ıslahına kazandıracığı avantajlar genel bir perspektifle sunulmuştur.</p>

<sup>a</sup> [acaremine01@gmail.com](mailto:acaremine01@gmail.com)

<sup>b</sup> <http://orcid.org/0000-0001-9810-9626>

<sup>a</sup> [yildizakakar01@gmail.com](mailto:yildizakakar01@gmail.com)

<sup>b</sup> <http://orcid.org/0000-0001-5314-7952>



## Giriş

DNA'nın keşfi ile genom yapıları gizemli yolculuk Yeni Nesil Dizileme Teknolojileriyle çok farklı bir boyut kazanmıştır. İnsan Genom Projesi bu gizemli yolculuğa büyük katkılar sunmuş ve genom hakkında devasa bilgiler edinilmesine olanak tanımıştır (Dönmez ve ark., 2015). Elde edilen bilgiler hastalık nedeni olan genlerin tespitine, mutasyona uğramış genlerin bilinmesine, transpozon elementlerin fonksiyonlarının anlaşılmasına, transkripsiyon faktörlerinin (TF) dahil oldukları mekanizmaya ait gen veya gen ailelerinin belirlenmesine olanak tanımıştır (Yin ark., 2019). Sekans teknolojileri ile elde edilen devasa bilgiler, genom düzenleme teknolojilerinin hızla gelişmesine katkı sunmuştur. Çinko parmak proteinler (ZFNs; Zinc Finger Nuclease), TAL efektör nükleaz (Tallens; TAL efector nuclease) ve CRSPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) sistemleri genom modifikasyonlarında başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Hsu ve ark., 2014). ZFN ve TALEN'ler, hedef sekanslara özgü DNA bağlanma bölgelerine sahip nükleazlardır. Bu proteinler hedef sekanslara bağlanarak DNA'da kırıklar oluşturmaktadır Fakat ZNF ve TALEN sistemleri, hedef dışı kesim yapabilmeleri ve hedefe odaklanma frekanslarının düşük olması, sahip oldukları dezavantajlardan bazılarıdır (Barrangou, 2013). CRSPR/Cas9 sisteminin, hedef odaklı olması, özgün ve spesifik mutasyonlara olanak tanınması genom düzenleme alanına etkin bir boyut kazandırmıştır (Xing ve ark., 2014). CRSPR/Cas9, genomda düzenli olarak değişen kısa palindromik sekanları (CRSPR) ve CRSPR-RNAs (crRNAs) ile direkt ilişkili olan endonükleaz aktiviteye sahip Cas proteini kompleksinden oluşmaktadır. (Xing ve ark., 2014; Barrangou, 2013). CRSPR/Cas teknolojisi, birçok organizmada kullanılması mümkün olan ve Cas proteini gen, trans-aktivatör RNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) geni ve öncür crRNA (pre-crRNA) genlerini temel almaktadır (Belhaj ve ark., 2015) Oluşturulan bu kombinasyonla DNA'da istenen bölgelerde, tek veya çift zincir kırıkları oluşturulmakta ve hedeflenen mutasyonlar elde edilmektedir (Pauli ve ark., 2016; Yin ve ark., 2019; Xing ve ark., 2014).

## CRSPR/Cas9 Sisteminin Kökeni ve Evrimi

CRSPR ilk kez 1987 yılında, *E. coli* K12 genomunda ve *iap* genine yakın intergenik bölgede keşfedilmiş (Ishino ve ark., 1987) ve farklı prokaryotik organizmalarda da bu tekrar bölgelerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Mojica ve ark., 1995). Tespit edilen bu locusun, arke ve bakteri genomuna entegre olduğu anlaşılmıştır. 2002 yılında, tekrar locuslarının CRSPR-associated (Cas) genleri ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (Jansen ve ark., 2002). Daha sonra yapılan çalışmalarda bakteri genomlarının yaklaşık %50, arke genomlarının ise yaklaşık %87'sinin CRSPR sekanlarından oluştuğu anlaşılmıştır (Grissa ve ark., 2007; Demirci ve ark., 2018). İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalar, genomda tesadüfi olarak tekrarlayan sekanların, özellikle viral veya ekzogen kaynaklı plazmidlerle homoloji gösterdikleri saptanmıştır (Bolotin ve ark., 2005) Yapılan çalışmalarla CRSPR/Cas kompleksinin, immün sisteme adapte olduğu, ekzogen

kaynaklı genetik elemetlere karşı organizmayı koruduğu kanıtlanmış ve CRSPR/Cas sistemini oluşturan mekanizma aydınlatılmıştır (Brouns ve ark., 2008; Marraffini ve Sontheimer 2010; Barrangou, 2013).

## CRSPR/Cas9 Sistemi, Mekanizması ve Fonksiyonları

CRSPR/Cas9 sistemi bakteri ve arkelerin adaptif ümmün sistemleri için çok önemli fonksiyonlara sahiptir. Sistem hedef DNA'da çift zincir kırıkları oluşturmak için Cas9 ve sgRNA ile homoloji sağlayan kısa bir diziyeye aynı zamanda da bu dizinin 3' ucunda bir PAM (protospacer associated motif) bölgesine ihtiyaç duymaktadır. Cas9 enzimi PAM motiflerini tüm genom boyunca 3' ucundan 5' ucuna doğru taramakta ve gerekli şartlar sağlandığında hedef diziyi yine 3' ucundan 5' ucuna doğru keserek çift zincir DNA kırıkları oluşturmaktadır (Deltcheva ve ark., 2011). Oluşturulan kırıklar, Homolog olmayan uçların bağlanması (NHEJ) veya Homolog rekombinasyon (HR) sistemleri ile farklı biçimlerde tamir edilmektedir. DNA tamir işleminden sonra yeni nükleik asitlerin eklenmesi ya da mevcut olanlarının eksilmesi (insertions&deletions, indel) mümkün olmaktadır (Chen ve ark., 2019; Cong ve ark., 2013). Oluşan indel'ler, hedef genin mutasyonuna dolayısı ile aktivasyonunu yitirmesine neden olmaktadır. Sistem bu aktivasyonları üç safhada fonksiyonel hale getirmektedir. Bunlar adaptasyon, ekspresyon ve susturma safhalarıdır. Adaptasyon safhası, CRSPR dizilerinin oluşması için ekzojen genetik elementlerin tanınması aşamasıdır. Bu aşama önemlidir. Çünkü bu aşamada CRSPR dizilerini oluşturan spacer dizileri kronolojik olarak oluşturulmaktadır. Ekspresyon aşaması Cas geni ve öncür olarak kullanılacak pre-CRSPR'ların (CRSPR-RNA) eksprese edildiği aşamadır. Bu aşamada kullanılan Cas geni, pre-crRNA'dan, crRNA olgunlaştırması mekanizmasında görev almaktadır. Bu aşama kritiktir, çünkü her enfeksiyon sonucunda hedeflenen sekans bölgesine uygun crRNA ve Cas protein kompleksleri bu aşamada sentezlenmekte, kompleks hedef sekansa spesifik oluşturulmaktadır (Bortesi ve Fischer 2015; Demirci ve ark., 2018).

CRSPR/Cas sisteminde mevcut olan farklı tipler, işlevsel fonksiyonların çeşitliliğini ve potansiyel uygulamalardaki farklılıkları da barındırmaktadır. İlk uygulamalar endüstriyel amaçla kullanılan organizmaları kapsamıştır. Özellikle patojenik türler bu amaçla kullanılmıştır. CRSPR/Cas sisteminin transkripsiyonel regulasyonu *E. coli*'de ayrıntılı bir şekilde çalışılmış ve sistemin çalışma mekanizması ayrıntılı olarak aydınlatılmıştır (Deltcheva ve ark., 2011). Günümüzde birçok alanda farklı organizmaları kapsayan CRSPR/Cas9 uygulamaları mevcuttur. CRSPR/Cas lokusları yapısal olarak transkribe edilebilen ve crRNA transkripsiyonu ile sentezlenebilen bir sistem olması nedeni ile kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Deltcheva ve ark., 2011).

## Yeni Nesil Islah Teknolojileri

Bitki ıslahçıları her zaman biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı verim, kalite ve tolerans ile ilgili farklı fenotipik karakterler elde etmeyi arzulamışlardır.

Yüzyıllardır klasik ıslahta yeni karakterlerin elde edilmesi için melezleme ve mutasyon ıslahı tekniği kullanılmıştır. Fakat son yıllarda yaşanan küresel ısınma, dünya nüfus artışı ve özellikle tarım arazilerinin azalması klasik ıslah yöntemlerini yetersiz kılmıştır. Gıda endüstrisinde üretimi oluşturan girdilerin, tarımsal kaynaklı olması bu kısıtlamayı arttıran itici faktörlerden olmuştur (Chen ve ark., 2019). Klasik ıslahta birçok sınırlandırma mevcuttur. Örneğin heterozigotik durumlar, kendine uyumsuzluk ve poliploidli klasik ıslahı sınırlandıran ve ıslah sürecinin uzun zaman almasına neden olan faktörlerdir. Bir diğer sınırlandırma, nüfus artışından dolayı azalan tarım arazilerine karşın klasik ıslahın geniş arazilere ihtiyaç duymasıdır. Emek yoğun işlemler işçi maliyetlerini arttıran unsurları da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle yeni nesil ıslah tekniklerinin kullanılması zorunluluğu artmaktadır. Yeni nesil teknolojiler özellikle maliyetleri azaltan, geniş tarım arazilerine ihtiyaç duymayan, zaman kaybı yaşanmasına olanak tanımayan, kolay, hızlı ve sürdürülebilir tekniklerdir (Chen ve ark., 2019).

Klasik ıslahta melezleme ve mutasyon ıslahı ile elde edilen genotiplerde istenmeyen karakterlerin elimine edilmesi çok uzun yıllar almaktadır. Fakat yeni nesil ıslah teknikleri amaca yönelik kolay ve etkili teknikler sunmaktadır (Demirci ve ark., 2018; Shukla ve ark., 2009; Yin ve ark., 2019). Genom düzenleme teknikleri, ıslah süreci ile elde edilmek istenen yeni fenotiplerin veya istenmeyen karakterlerin mutasyonla fonksiyonsuz hale getirilmesi için kolay, etkin ve özgün teknikler sunmaktadır. Özellikle son yıllarda popüleritesi artan CRSPR/Cas9 tekniği, hedef odaklı modifikasyonların başarı ile oluşturulmasında kullanılan güçlü bir sistemdir (Chen ve ark., 2019). Hedef DNA'ya komplementer bir RNA molekülü ve RNA molekülü ile kompleks bir şekilde çalışan nükleaz aktivitesine sahip bir enzim, sitemin hızlı ve etkili çalışmasına olanak tanımakta aynı zamanda sistemi arzu edilebilir kılmaktadır (Chen ve ark., 2019). Bu nedenle son yıllarda bitki ıslahında yoğun olarak kullanılmakta ve uzun yıllar kullanılmaya devam edileceği tahmin edilmektedir. Yapılan literatür taramalarında her geçen gün CRSPR/Cas9 temelli çalışmaların hızla arttığı gözlenmiştir (Fan ve ark., 2015; Ma ve ark., 2015; Nomura ve ark., 2016; Zhao ve ark., 2016).

### Bitkilerde CRISPR/Cas9 Uygulamaları

CRSPR/Cas9 sistemi keşfedilmesinden bu yana birçok alanda farklı amaçlar için kullanılmıştır. Son yıllarda sistem, bitkilerde de başarılı bir şekilde kullanılmış ve çok farklı monokotil ve dikotil bitki türlerinde yapılan CRSPR/Cas9 çalışmaları bildirilmiştir (Ma ve ark., 2015). Günümüze kadar bitkilerde yürütülen CRISPR/Cas9 çalışmalarının büyük bir kısmı sistemin, seçilen bitki genomunun düzenlenmesinde fonksiyonelliğinin araştırılmasına, sistemin çalışma mekanizmasının anlaşılmasına veya sistemin optimizasyonuna yönelik olmuştur. Fakat son yıllarda farklı bitki türlerinde spesifik özellikleri manipüle etmek amacıyla, genom modifikasyonlarını içeren özgün uygulamalar yapılmıştır. Sistem şimdiye kadar *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Marchantia polymorpha*, *Citrus sinensis*, *Solanum lycopersicum*, *Brassica oleracea*,

*Cucumis sativus*, *Glycine max*, *Gossypium hirsutum*, *Hordeum vulgare*, *Lactuca sativa*, *Lotus japonicus* ve *Papaver somniferum* dahil birçok bitki türünde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Cai ve ark., 2015; Chandrasekaran ve ark., 2016; Fan ve ark., 2015; Jia ve Wang 2014b; Lawrenson ve ark., 2015; J.-F. Li ve ark., 2013; Shorinola ve ark., 2019; Shukla ve ark., 2009; Wang ve ark., 2017; Wang ve ark., 2014; Xu ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2017).

Bitkilerde CRSPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak yapılan ilk çalışmalarda model organizma olması nedeniyle *Arabidopsis thaliana* ve *Nicotiana benthamiana* kullanılmıştır. Bu bitkilerde yapılan çalışmalar, sistemin fonksiyonelliğinin anlaşılması ve mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik olmuştur. Yapılan çalışmalarda genellikle *PDS* (Phytoene desaturase sentase) geninin mutasyonu hedeflenmiştir. *PDS* geni, karotenoid biyosentez yolağında görev alan ve birçok biyosentez yolağıyla ilişkili olan önemli bir genidir (Wang ve ark., 2009). Özellikle klorofilin yapısında bulunan fitol halkasının ve plastokinon oluşumunun anahtar genlerindedir. Bu nedenle CRSPR/Cas9 temelli genom düzenleme çalışmalarında sistemin işlerliğinin test edilmesi ve mekanizmanın aydınlatılması amacıyla yaygın olarak kullanılmıştır (Fan ve ark., 2015; Kaur ve ark., 2018; Nishitani ve ark., 2016) Bitkilerde CRSPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak yapılan çalışmalarda %89 oranında *Arabidopsis thaliana* kullanılmıştır (Belhaj ve ark., 2013; Li ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2014).

Model organizmalar ile yapılan başarılı çalışmalar sonrasında sistem, dünya genelinde insan beslenmesinde temel besin kaynağı olan ve ekonomik değeri yüksek pirinç (*Oriza sativa*) ve ekmeklik buğdayda (*Triticum aestivum* L.) denenmiştir. Pirinçte gerçekleştirilen genom düzenleme çalışmalarının, %92'sini CRSPR/Cas9 temelli çalışmalar oluşturmaktadır (Belhaj ve ark., 2013). Yapılan çalışmaların bir kısmı, *ALS* (acetolactata synthase, *OsALS*), *BEIIa* (branching enzyme IIb), *MAP2* (mitogen-activated protein kinase) ve *EPSPs* genlerinin mutasyonuna yönelik çalışmalardır (Belhaj ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2014). Buğdayda *PDS*, *MLO* ve *NAC2* gibi bazı genlerde mutasyonların oluşturulması hedeflenmiştir. Buğdayda CRSPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak *MLO* geninde oluşturulan mutasyon sonucu sarı pas hastalığına dayanıklı bitkiler elde edildiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2014; Wang ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2016).

Spesifik karakterlerin mutasyonuna yönelik çalışmalar oldukça farklılık göstermektedir. Bitki ıslahında CRSPR/Cas9 teknolojisi ile hedeflenen yeni karakterlerin oluşturulması, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklı bitkilerin elde edilmesi, istenmeyen fonksiyonlara sahip karakterlerin inaktivasyonu ve özellikle fonksiyonu bilinmeyen genlerin fonksiyonlarının aydınlatılmasına yönelik çok başarılı çalışmalar bildirilmiştir. *Solanum tuberosum*'da patojen atağına karşı dayanıklılığın geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmada, *ALS* (Acetolactate Synthase1) geninde mutasyon oluşturulması hedeflenmiştir. CRSPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak *ALS* geninde mutasyon oluşturulmuş ve bitkinin *Geminivirüs* ataklarına karşı dayanıklılık kazandığı bildirilmiştir (Pan ve ark., 2016). *Cucumis sativus* L.'de yapılan çalışmada resesif *eIF4E* (eukaryotic translation initiation factor4E) geninde mutasyon

hedeflenmiştir. CRSPR/Cas9 sistemi kullanılarak *eIF4E*'nin N' ve C' terminallerinde nokta mutasyonlar (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) oluşturulmuş ve mutasyon görülen gene sahip bitkiler selekte edilerek geliştirilmiştir. Geliştirilen bitkilerde Kabak Sarı Mozaik Virüs (*Zucchini yellow mosaic virüs*, ZYMV) ve Papaya Halkalıleke Virüsü (*Papaya ring spot virüs*, PRSV-W) enfeksiyonlarına karşı dayanıklılık görüldüğü rapor edilmiştir (Chandrasekaran ve ark., 2016). Hastalık direncinin geliştirilmesine yönelik yapılan bir diğer çalışma, limon, portakal ve altıntopta yapılmıştır. *Xanthomonas citri* *subspecies citri* (Xcc) enfeksiyonu turuncgillerde önemli hasarlara neden olmaktadır. Hastalık etkenine karşı dayanıklılığın geliştirilmesi amacı ile Duncan altıntop çeşidinde, *PthA4* (PthA4 effector binding elements, EBE<sub>PthA4</sub>-CsLOBP) 'te promotor bölgesinde mutasyon hedeflenmiştir. Araştırma sonucunda promotor bölgelerinde mutasyon görülen bitkilerde hastalık etkenine karşı dayanıklılık görüldüğü ve bitkilerde oluşan dayanıklılığın temelinin mutasyon kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Jia ve ark., 2016). Valencia portakal çeşidinde CRSPR/Cas9 temelli araştırmada, *PDS1* geninin mutasyonu hedeflenmiş ve çalışma sonucunda *PDS1* geninde mutasyonların olduğu ve sistemin etkinliği teyit edilmiştir (Jia ve ark., 2016).

CRSPR/Cas9 ile bitkilerde, sekonder metabolit biyosentez yolağı ile ilişkili genlerde mutasyon hedeflenebilmektedir. Kardonnay üzüm çeşidinde Tartarik asit biyosentez düzeyinin değişimine yönelik mutasyon hedeflenmiştir. Çalışmada, çeşide ait hücre ve bitkiler kullanılmış ve CRSPR/Cas9 sistemi ile Tartarik asit biyosentez yolağında regülatif fonksiyona sahip *IdnDH* (L-idonate dehydrogenase gene, *IdnDH*) geninde mutasyon oluşturulmuştur. *IdnDH* geninde mutasyon görülen bitkilerde Tartarik asit birikimi tespit edilmiştir (Ren ve ark., 2016). Bir diğer çalışma mor havuçta (*Daucus carota* subsp. *carota* L) yapılmıştır. Çalışmada MYB transkripsiyon faktörü ailesine ait *MYB-13* geninde mutasyon hedeflenmiştir. *MYB-13* geni antosiyanin biyosentez yolağı ile ilişkili önemli bir genidir ve antosiyanin birikimini regüle etmektedir. Çalışma sonucunda *MYB-13* geninde mutasyon görülen mor havuç bitkisinde antosiyanin birikiminin arttığı ve bunun sonucu olarak havuç köklerinin renginin koyu mor renk aldığı bildirilmiştir (Xu ve Xiong 2019).

Bitkilerin biyotik ve abiyotik stres koşullarından hasar almadan veya minimum hasarla fizyolojik ve metabolik faaliyetlerini sürdürmesi için transkripsiyon faktörü (TF) genler regülasyon görevi yapmaktadırlar. CRSPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak hedeflenen genlerin pozitif veya negatif yönde regülasyonunu amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Domates (*Lycopersicon esculentum* L.)'te CRSPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak *PIF4* (phytochrome interacting factor, *SIPIF4*) geninde mutasyon hedeflenmiştir. *PIF* geni, fitokrom biyosentezinin regülasyonundan sorumlu *bHLH* (basic helix-loop-helix) transkripsiyon faktörü ailesine ait bir genidir. Yapılan çalışma sonucunda *PIF* geninde mutasyon oluşturulmuştur. Mutasyon görülen bitkilerde kimeralar gözlenmiştir (Pan ve ark., 2016). Yapılan bir diğer çalışmada, domateste *NPRI* (Nonexpressor of pathogenesis-related gene1, *NPRI*) geninin mutasyonuna yöneliktir. *NPR* geni, bitkilerde özellikle abiyotik strese

karşı regülasyondan sorumlu bir transkripsiyon faktörüdür. Bu gen patojen kaynaklı ataklarda savunma mekanizmasında regülatif rol oynayan önemli bir genidir. Aynı zamanda salisilik asit reseptörüdür. Araştırmada mutasyon sonucu inaktif hale gelen *NPRI* geninin, kuraklık stresine karşı bitkiye hassasiyet kazandırdığı ve negatif ekspresyon düzeyini uyararak stomatal aktiviteyi azalttığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2019). Elmada yapılan bir araştırmada, *Erwinia amylovora* bakterisinin neden olduğu Ateş yanıklığı hastalığına karşı bitkiye dayanıklılığın kazandırılmasıdır. Bu amaçla, bitkide hastalığa duyarlılık oluşturan *MdDIPM4* protein geninde mutasyon oluşturulmuştur. Mutasyon sonucu elde edilen bitkilerde %50-%80 oranında hastalığa hassasiyetin azaldığı bildirilmiştir (Pompili ve ark., 2019). Elma ve armutta yapılan bir diğer çalışma ise bitkilerde çiçeklenmeyi baskılayıcı fonksiyona sahip *TFL-1* (Terminale Flower-1) geninde mutasyon oluşturulmasıdır. Bu çalışmada *TFL* geninde oluşturulan mutasyon sonucunda bitkilerde, erken çiçeklenmenin görüldüğü tespit edilmiştir (Charrier ve ark., 2019). Üzümde (*Vitis vinifera*) yapılan çalışmalarda *PDS* ve *WRKY52* transkripsiyon faktörü geni mutasyonu amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarla *PDS* ve *WRKY52* geninde mutasyonlar oluşturulmuş, oluşturulan mutasyonlar fenotipte gözlenmiştir. Araştırma sonrasında *WRKY52* geninde biallelik mutasyonlar oluşmuş ve *WRKY52* geninde mutasyon görülen bitkilerin kurşuni küf (*Botrytis cinerea*.) hastalığına karşı dayanıklılık kazandığı tespit edilmiştir (Osakabe ve ark., 2018; Ren ve ark., 2016).

CRSPR/Cas9, işlevi bilinmeyen genlerin fonksiyonlarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalarda da başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Çilekte yapılan çalışmada *TM6 MADS-BOX* geninin fonksiyonun anlaşılması için CRSPR/Cas9 sistemi kullanılmıştır. *TM6* ve *AP3* (APETALA3) genleri, MAD-BOX transkripsiyon faktörü gen ailesine ait üyelerdir. Özellikle stamen ve pistil gelişiminde önemli fonksiyonlara sahip olan genlerde mutasyonlar oluşturulmuştur. Mutasyon görülen genlere sahip bitkilerde anter gelişiminin zayıfladığı, polen sayısında azalmaların olduğu belirtilmiştir (Martín-Pizarro ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarla, CRSPR/Cas9 teknolojisinin çok farklı amaç ve hedefler için kullanılabilecek güçlü bir potansiyel sunduğu görülmektedir.

## Sonuç

CRSPR/Cas9 teknolojisi, hedef odaklı, arzu edilen gen veya DNA lokuslarında *in vivo* olarak yüksek doğrulukla kırıklar oluşturabilen, ökaryotik hücrelerde uygulama kolaylığı sağlayan potansiyeli yüksek bir tekniktir. Tekniğin önemli özelliklerinden birisi de birçok hücre tipine adapte olabilen bir fonksiyona sahip olmasıdır. Bu da özellikle bitki ıslahına çok büyük katkılar sunmakta, bitki ıslahı ve ıslah programlarına değerli çalışmalar kazandırmaktadır. CRSPR/Cas9 teknolojisi özellikle bitki ıslahında kullanılacak etkili ve spesifik mutasyonların oluşturulmasına olanak tanımaktadır. Islah programlarının uzun zaman alması, klasik ıslah ile istenilen karakterlerin elde edilmesinin zor ve maliyetli olması CRSPR/Cas9 teknolojisini cazip kılmaktadır. Kısaca, bitki genom düzenleme çalışmaları için CRISPR/Cas9 sistemi, hızlı,

güvenilir, ucuz ve istenen dizilere uygun sgRNA dizaynına olanak tanınması nedeniyle de esnek bir platform sağlamaktadır.

## Kaynaklar

- Barrangou R. 2013. CRISPR-Cas systems and RNA guided interference. *Wiley Interdiscip, Reviews: RNA*, 4(3): 267-278.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V. 2013. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* 9(1) 1–10.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron N.J, Nekrasov V. 2015. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr. Opin. Biotechnology.*, *Food Biotechnology Plant Biotechnology*, 32: 76–84.
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich S.D. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8): 2551–2561
- Bortesi L, Fischer R. 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1): 41–52.
- Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJH, Snijders APL, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, Van der Oost J. 2008. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science*, 321(5891): 960–964.
- Cai Y, Chen L, Liu X, Sun S, Wu C, Jiang B, Han, T, Hou W. 2015. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Soybean Hairy Roots. *PLOS ONE*, 10(8): e0136064.
- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Sherman A, Arazi T, Gal-On A. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular Plant Pathology*, 17(7): 1140–1153.
- Charrier A, Vergne E, Dousset N, Richer A, Petiteau A, Chevreau E. 2019. Efficient Targeted Mutagenesis in Apple and First Time Edition of Pear Using the CRISPR-Cas9 System. *Frontiers Plant Science*, 10:40, 1-12
- Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. 2019. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annual Review of Plant Biology*, 70: 667–697.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiyang W, Marraffini L.A, Zhang F. 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121): 819–823.
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340): 602–607.
- Demirci Y, Zhang B, Unver T. 2018. CRISPR/Cas9: An RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing. *J. Cell. Physiology*, 233(3): 1844–1859.
- Dönmez D, Şimşek Ö, Aka Kaçar Y. 2015. Yeni nesil DNA dizileme teknolojileri ve bitkilerde kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(1): 30–37.
- Fan D, Liu T, Li C, Jiao B, Li S, Hou Y, Luo K. 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in Populus in the First Generation. *Scientific Reports* 5: 12217.
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. 2007. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 8(1): 172.
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F. 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6):1262–1278.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriology*, 169(12): 5429–5433.
- Jansen R, Embden JDA, Van Gastra W, Schouls LM. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiology*, 43(6): 1565–1575.
- Jia H, Orbovic V, Jones JB, Wang N. 2016. Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccΔpthA4:dCsLOB1.3 infection. *Plant Biotechnology Journal*, 14(5): 1291–1301.
- Jia H, Wang N. 2014a. Xcc-facilitated agroinfiltration of citrus leaves: a tool for rapid functional analysis of transgenes in citrus leaves. *Plant Cell Reports*, 33(12): 1993–2001.
- Jia H, Wang N. 2014b. Targeted Genome Editing of Sweet Orange Using Cas9/sgRNA. *PLOS ONE*, 9(4): e93806.
- Lawrenson T, Shorinola O, Stacey N, Li C, Østergaard, L, Patron N, Uauy C, Harwood W. 2015. Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biology*, 16(1): 1–13.
- Kaur N, Alok A, Shivani Kaur N, Pandey P, Awasthi P, Tiwari S. 2018. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome. *Functional & Integrative Genomics*, 18(1): 89–99.
- Li J.-F, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31(8): 688–691
- Li R, Liu C, Zhao R, Wang L, Chen L, Yu W, Zhang S, Sheng J, Shen L. 2019. CRISPR/Cas9-Mediated SINPR1 mutagenesis reduces tomato plant drought tolerance. *BMC Plant Biology*, 19(1): 1-13.
- Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Yan Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Yuanling Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu Y.-G. 2015. A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular Plant*, 8(8): 1274–1284.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. 2010. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 463(7280): 568–571.
- Martín-Pizarro C, Triviño JC, Posé D. 2019. Functional analysis of the TM6 MADS-box gene in the octoploid strawberry by CRISPR/Cas9-directed mutagenesis. *Journal of Experimental Botany.*, 70(3): 885–895.
- Mojica FJM, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. 1995. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular Microbiology*, 17(1): 85–93
- Nishitani C, Hirai N, Komori S, Wada M, Okada K, Osakabe K, Yamamoto T, Osakabe Y. 2016. Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 6(1): 1-8..
- Nomura T, Sakurai T, Osakabe Y, Osakabe K, Sakakibara H. 2016. Efficient and Heritable Targeted Mutagenesis in Mosses Using the CRISPR/Cas9 System. *Plant Cell Physiology*, 57(12): 2600–2610
- Osakabe Y, Liang Z, Ren C, Nishitani C, Osakabe K, Wada M, Komori S, Malnoy M, Velasco R, Poli M, Jung M.-H, Koo O.-J, Viola R, Kanchiswamy C.N. 2018. CRISPR–Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine. *Nature Protocol*, 13(12): 2844–2863
- Pan C, Ye L, Qin L, Liu X, He Y, Wang J, Chen L, Lu G. 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Scientific Reports*, 6: 24765
- Pauli C, Liu Y, Zhou F, Gerloff D, Rohde C, Mueller-Tidow C. 2016. A focused CRISPR/CAS9 screen identifies snoRNAs that are required for clonal growth of leukemia cells. *Oncology Research And Treatment*, 39: 143–143

- Pompili V, Cost LD, Piazza S, Pindo M, Malnoy M. 2019. Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system. *Plant Biotechnology Journal*, 18(3): 845-858.
- Ren C, Liu X, Zhang Z, Wang Y, Duan W, Li S, Liang Z. 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Scientific Reports*, 6: 32289
- Shorinola O, Kaye R, Golan G, Peleg Z, Kepinski S, Uauy C. 2019. Genetic Screening for Mutants with Altered Seminal Root Numbers in Hexaploid Wheat Using a High-Throughput Root Phenotyping Platform. *G3: Genes Genomes Genetics*, 9(9): 2799–2809
- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katibah GE, Zhifang G, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD. 2009. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using
- Wang M, Wang G, Ji J, Wang J. 2009. The effect of *pds* gene silencing on chloroplast pigment composition, thylakoid membrane structure and photosynthesis efficiency in tobacco plants. *Plant Science*, 177(3): 222–226.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J.-L. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, 32(9): 947–951
- Wang Y, Zong Y, Gao C. 2017. Targeted Mutagenesis in Hexaploid Bread Wheat Using the TALEN and CRISPR/Cas Systems. In *Wheat Biotechnology*, 169–185
- Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 14(1): 327
- Xu R.-F, Li H, Qin RY, Li J, Qiu CH, Yang YC, Ma H, Li L, Wei PC, Yang JB. 2015. Generation of inheritable and “transgene clean” targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 5: 11491
- Xu ZS, Feng K, Xiong AS. 2019. CRISPR/Cas9-Mediated Multiply Targeted Mutagenesis in Orange and Purple Carrot Plants. *Mol. Biotechnology*, 61(3): 191–199
- Yin Y, Hao H, Xu X, Shen L, Wu W, Zhang J, Li Q. 2019. Generation of an MC3R knock-out pig by CRISPR/Cas9 combined with somatic cell nuclear transfer (SCNT) technology. *Lipids Health Dis.*, 18(1): 1-8
- Zhang B, Li C, Unver T. 2017. A high-efficiency CRISPR/Cas9 system for targeted mutagenesis in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Scientific Reports*, 7: 43902
- Zhang Hui Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang Heng Xu N, Zhu J.-K. 2014. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6): 797–807
- Zhang Y, Liang Z, Zong Y, Wang Y, Liu J, Chen K, Qiu JL, Gao C. 2016. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature Communication*, 7(1): 1–8
- Zhao Y, Zhang C, Liu W, Gao W, Liu C, Song G, Li W-X, Mao L, Chen B, Xu Y, Li X, Xie C. 2016. An alternative strategy for targeted gene replacement in plants using a dual-sgRNA/Cas9 design. *Scientific Reports*, 6: 1-11