T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

DOMATESTE KÜLLEME HASTALIK ETMENİ *Oidium lycopersici*'YE KARŞI CRISPR-CAS9 TABANLI GEN DÜZENLEME PROTOKOLÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Emine KOCAKAYA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Haziran 2026

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

DOMATESTE KÜLLEME HASTALIK ETMENİ *Oidium lycopersici*'YE KARŞI CRISPR-CAS9 TABANLI GEN DÜZENLEME PROTOKOLÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Emine KOCAKAYA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Haziran 2026

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOMATESTE KÜLLEME HASTALIK ETMENİ *Oidium lycopersici*'YE KARŞI CRISPR-CAS9 TABANLI GEN DÜZENLEME PROTOKOLÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Emine KOCAKAYA

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2025-6949 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2026

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Domateste Külleme Hastalık Etmeni *Oidium lycopersici*'ye Karşı CRISPR-CAS9 Tabanlı Gen Düzenleme Protokolünün Geliştirilmesi

Emine KOCAKAYA

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 12/06/2026 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özer ÇALIŞ (Danışman)

Prof. Dr. Ş. Evrim ARICI ŞENKAYNAĞI

Doç. Dr. Hakan FİDAN

ÖZET

DOMATESTE KÜLLEME HASTALIK ETMENİ *Oidium lycopersici*'YE KARŞI CRISPR-CAS9 TABANLI GEN DÜZENLEME PROTOKOLÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Emine KOCAKAYA

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özer Çalış

Haziran 2026; 68 sayfa

Domates dünya genelinde en fazla yetiştirilen sebzelerden birisidir. *Solanaceae* familyasının en önemli üyeleri arasına girmekte olup, dünyada 4 milyon hektardan fazla alanda yetiştiriciliği yapılmaktadır. Domates yetiştiriciliği Türkiye'de Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgelerinde yoğun bir şekilde yapılmaktadır. Özellikle örtü altı sebze yetiştiriciliği yapılan Antalya ve çevresinde ciddi verim ve kalite düşüşlerine biyotik etmenler başta olmak üzere çeşitli hastalıklarla karşı karşıya kalmaktadır. Bu hastalıkların en başında külleme hastalığı gelmektedir. Külleme hastalığı *Oidium lycopersici* fungal etmeni tarafından meydana gelmekte ve domateste önemli verim ve kalite kayıplarına yol açmaktadır. Külleme ile mücadelede kullanılan fungisit uygulamaları sürdürülebilir bir çözüm teşkil etmemektedir. Küllemeye karşı dayanıklı ve tolerant çeşitlerin geliştirilmesi bu hastalık ile mücadelede en etkili ve çevre dostu bir yöntem olmaktadır. Küllemeye karşı dayanıklılık mekanizmalarının bilinmesi dayanıklı domates çeşitleri geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Bu çalışmada, domateste külleme hastalığına karşı hassaslıkla ilişkili olan *MLO1* geninin CRISPR-CAS9 sistemi kullanılarak hedeflenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında *MLO1* geninin birinci ekzon bölgesine yönelik rehber RNA (gRNA) tasarlanmış ve tasarlanan gRNA dizileri CRISPR-CAS9 vektörü olan pHEE401E plazmidine GoldenGate klonlama yöntemi ile aktarılmıştır. Elde edilen rekombinant plazmidler önce *Escherichia coli* hücrelerine transformasyon yoluyla aktarılmış, ardından koloni PCR analizleri ile doğrulanmıştır. Doğrulanan plazmidler daha sonra elektroporasyon yöntemi kullanılarak *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerine aktarılmıştır. Böylece domates bitkilerinde *MLO1* geninin düzenlenmesine yönelik CRISPR-CAS9 tabanlı gen düzenleme sistem başarıyla oluşturulmuştur. Elde edilen bu genetik konstraktın kullanılmasıyla transgenik olmayan klasik ıslahla elde edilmiş gibi dayanıklı kokteyl domates çeşitlerinin üretimi yapılabilecektir.

ANAHTAR KELİMELER: CRISPR-CAS9, Dayanıklılık, Domates, *MLO1*

JÜRİ: Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Prof. Dr. Ş. Evrim ARICI ŞENKAYNAĞI

Doç. Dr. Hakan FİDAN

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A CRISPR-CAS9 BASED GENE EDITING PROTOCOL AGAINST THE POWDERY MILDEW DISEASE AGENT *Oidium lycopersici* IN TOMATO

Emine KOCAKAYA

MSc Thesis in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

June 2026; 68 pages

Tomatoes are one of the most widely cultivated vegetables worldwide. They are among the most important members of the Solanaceae family and are grown on more than 4 million hectares globally. Tomato cultivation in Turkey is concentrated in the Marmara, Aegean, and Mediterranean regions. Especially in Antalya and its surroundings, where greenhouse vegetable cultivation is common, significant yield and quality reductions are faced due to various diseases, primarily biotic factors. The most prominent of these diseases is powdery mildew. Caused by the fungal agent *Oidium lycopersici*, powdery mildew leads to significant yield and quality losses in tomatoes. Fungicide applications used to combat powdery mildew are not a sustainable solution. Developing powdery mildew-resistant and tolerant varieties is the most effective and environmentally friendly method of combating this disease. Understanding the resistance mechanisms to powdery mildew contributes to the development of resistant tomato varieties. This study aimed to target the *MLO1* gene, which is associated with susceptibility to powdery mildew in tomatoes, using the CRISPR-CAS9 system. In this study, a guide RNA (gRNA) targeting the first exon region of the *MLO1* gene was designed, and the designed gRNA sequences were transferred to the pHEE401E plasmid, a CRISPR-CAS9 vector, using the GoldenGate cloning method. The resulting recombinant plasmids were first transferred to *Escherichia coli* cells via transformation and then verified by colony PCR analysis. The verified plasmids were then transferred to *Agrobacterium tumefaciens* cells using the electroporation method. Thus, a CRISPR-CAS9-based gene editing system for the regulation of the *MLO1* gene in tomato plants was successfully created. Using this genetic construct, it will be possible to produce resistant cocktail tomato varieties that are similar to those obtained through classical breeding without being transgenic.

KEYWORDS: CRISPR/CAS9, Resistance, Tomato, *MLO*

COMMITTEE: Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Prof. Dr. Ş. Evrim ARICI ŞENKAYNAĞI

Assoc. Prof. Dr. Hakan FİDAN

ÖNSÖZ

Tezimde domates üretiminde ciddi verim ve kalite düşüşlerine neden olan külleme etmeni olan *Oidium lycopersiciye* karşı dayanıklılığın geliştirilmesine yönelik çalışılmıştır. Özellikle örtü altı sebze yetiştiriciliğinin yapıldığı Akdeniz bölgesi içinde olan Antalya'da *O.lycopercisi* üretimi sınırlandırmaktadır. Böylece çevre dostu tarım için kalıcı ve uygulanabilir çözüm arayışlarını zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle yakın zamanda bitki ıslahında CRISPR/CAS9 genom düzenleme teknolojisinin, domates bitkilerinde külleme hastalıklarına dayanıklılık kazandırma potansiyelinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesi sürecinde bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren her koşulda yanımda olduğunu maddi manevi hissettiren sayın danışmanım Prof. Dr. Özer ÇALIŞ hocama ve çalışmalarımı gerçekleştirmem için laboratuvarını kullanmamıza izin veren, bilgi deneyimlerini paylaştığı için değerli Doç. Dr. Hakan FİDAN hocama teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen gerektiğinde çalışmalarımda yardımcı olan, bilgilerini paylaşan ve manevi desteklerinden dolayı Abdul Razak AHMED 'a ve tüm eğitim hayatımda olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da maddi/manevi desteğini eksik etmeyen haklarını asla ödeyemeyeceğim başta canım dedem Abdullah Vural'a , anneannem Ümmügülsüm VURAL'a, annem Gülizar KOCAKAYA'ya , babam Mehmet KOCAKAYA'ya ve her konuda sabırla beni dinleyen yanımda olduğunu her daim hissettiren canım nişanlım Furkan Selim ER'e sonsuz teşekkür ederim. Son olarak tüm hayatım boyunca benim yanımda olan, aldığım kararları destekleyen, benimle bu yüksek lisans eğitimime birlikte devam ettiğim sadece bu çalışma sürecinde değil tüm hayatım boyunca beni cesaretlendirip moral veren yanımdan hiç ayrılmayan diğer yarım canım ikizim Gülsüm KOCAKAYA'ya sonsuz teşekkür ederim. Bu tez çalışmasının bundan sonraki çalışmalara katkı sağlamasını temenni ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
ÖNSÖZ iii
AKADEMİK BEYAN vi
SİMGELER VE KISALTMALAR vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1 GİRİŞ 1
2 KAYNAK TARAMASI 5
2.1 Külleme Hastalığı 5
2.2 Hastalık Etmeni *Oidium lycopersici* 8
2.3 Genom Düzenleme Teknolojileri 10
2.3.1 Meganükleazlar 10
2.3.2 Çinko Parmak Nükleazlar(ZFN) 10
2.3.3 Transkripsiyon Aktivatör-Benzeri Efektör Nükleazlar(TALEN) 11
2.3.4 Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar .....
(CRISPR/Cas) Sistemleri 12
2.4 *MLO* Genleri ve Külleme Hastalığı ile İlişkisi 13
2.4.1 Domateste *SlMLO* Genleri 14
3 MATERYAL VE METOT 18
3.1 Materyal 18
3.1.1 Bitki Materyali 18
3.1.2 Kullanılan Besi ortamları 18
3.2 METOT 20
3.2.1 Domates Bitkisinden DNA izolasyonu 20
3.2.2 *SlMLO* Genlerinin Domates Bitkisinde Doğrulanması 21
3.2.3 gRNA Tasarımı ve Konstrakt Oluşturulması 22
3.3 GoldenGate Reaksiyonu 25
3.4 Heat-shock ile Plasmidin *E.coli* DH5alpha'ya aktarılması 26
3.5 Koloni PCR 26

3.6 Plazmid izolasyonu 27
3.7 *Agrobacterium* EHA105 Bakterisi Aracılığı İle Gen Aktarımı 28
3.7.1 *Agrobacterium tumefaciens* Competent Cell Hazırlama ve .....
Elektroporasyonu İşlemi 28
3.7.2 Elektroporasyon ile Plasmidin Elektrokompatent *Agrobacterium* .....
EHA105 Irkına Aktarılması 29
4 BULGULAR 31
4.1 *SlMLO* Genlerinin Domates Bitkisinde Doğrulanması 31
4.2 GoldenGate Reaksiyonu 32
4.3 Heat-shock ile Plasmidin *E.coli* DH5α'ya Aktarılması 33
4.4 Koloni PCR 34
4.5 Plazmid İzolasyonu 35
4.6 Elektroporasyon ile Plasmidin Elektrokompatent *Agrobacterium* .....
EHA 105 Irkına Aktarılması 36
6 SONUÇLAR 42
7 KAYNAKLAR 44
8 EKLER 51
EK1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları..... 51
EK 2. Tezde kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları 52
Ek 3. Tez çalışmasında kullanılan kitler 53
ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "CRISPR-CAS9 Tarafından Oluşturulan Dayanıklılık Mekanizmasının Külleme Hastalık Etmeni *Oidium lycopersici*'ye Karşı Domateste Geliştirilmesi" adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

12/06/2026

Emine KOCAKAYA

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µl	: Mikrolitre
Bp	: Baz çifti
G	: Gram
Kb	: Kilo baz çifti (1000 bp)
C°	: Santigrat derece
KV	: Kilovolt
V	: Hacim
Mg	: Miligram
Ml	: Mililitre
L	: Litre
mM	: Milimolar
pH	: Asit–baz derecesi
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
Dk	: Dakika
Ng	: Nonogram
F	: Forward
R	: Reverse
µM	: Mikrometre
.	: Ondalık ayıraç
S	: Saniye

Kısaltmalar

CAS9	CRISPR İlişkili Protein 9

CRISPR	: Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Polindromik Tekrarlar
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
CTAB	: Setiltrimetilamonyum-bromür
dsDNA	: Çift sarmallı DNA (double-stranded DNA)
gRNA	: Guide RNA (Kılavuz RNA)
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
LB	: Luria-Bertani (besi ortamı)
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NSP	: Nüklear Shuttle Protein
ORF	: Açık Okuma Çerçeveleri
S geni	: Susceptibility gene (Hassaslık geni)
qPCR	: Quantitative PCR (Gerçek zamanlı PCR)
R geni	: Resistance gene (Dayanıklılık geni)
RNA	: Ribonükleik Asit
Mlo	: *Mildew Resistance Locus O* (Dayanıklılık geni)
MLO	: *Mildew Resistance Locus O* (Hassaslık geni)
Slmlo	: Mutasyona uğratılmış *Solanum lycopersicum Mildew Resistance Locus O geni*
SLMLO1	: *Solanum lycopersicum Mildew Resistance Locus O geni*

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya Sebze üretiminin türlere göre dağılımı 2
Şekil 1.2. İllerin Türkiye sebze üretimindeki payları 2
Şekil 2.1. *Oidium neolycopersici*'nin belirtileri ve mikroskobik görüntüsü.....7
Şekil 2.2. ZFN (Çinko Parmak Nükleaz) sisteminin hedef DNA bölgesine bağlanma.....
ve kesim mekanizmasının şematik gösterimi.....11
Şekil 3.1. *SlMLO1* geninin şematize edilmiş hali ve bu geni hedeflemek için .....
oluşturulacak T-DNA yapısı 24
Şekil 3.2. *SlMLO* gen bölgelerini hedeflemek üzere tasarlanmış gRNA .....
aktarılacağı .pHEE401E vektörüne ait fiziksel yapı şeması
.....25
Şekil 4.1. F1 domates çeşidinin ana (A) ve baba (B) ebeveyn hatlarında *SlMLO* .....
gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR analizi sonucu .....
elde edilen agaroz jel görüntüsü. PCR amplifikasyonu sonucunda hedef gen .....
bölgelerine karşılık gelen bantların varlığı ile genin her iki ebeveyn hattında da .....
bulunduğu doğrulanmıştır. 31
Şekil 4.2. GoldenGate klonlama yöntemi aşamaları.....32
Şekil 4.3. Isı şoku (heat-shock) transformasyonu sonrası kanamisin içeren LB .....
agar ortamında gelişen, pHEE401E plazmidini taşıyan *E. coli* DH5α kolonileri.....33
Şekil 4.4. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü ve .....
koloni seçimi 34
Şekil 4.5. PCR analizi ile pozitif olduğu belirlenen kolonilerin, kanamisin içeren LB.....
broth ortamına aktarılması 35
Şekil 4.6. Plazmid izolasyonu ve Qubit cihazında plazmid yoğunluk ölçümü.....35
Şekil 4.7. Plazmid içerisine klonlanan gRNA bölgelerinin, Sanger dizileme yöntemi .....
ile doğrulanmasına ait kromatogram çıktıları 36
Şekil 4.8. Plazmid DNA'nın elektroporasyon yöntemi ile *Agrobacterium* .....
tumefaciens EHA105 ırkına aktarılması 37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Domates külleme hastalık etmeni *Oidium neolycopersici* taksonomisi 6
Çizelge 2.2. Domates külleme hastalık etmeni *Oidium lycopersici* taksonomisi 8
Çizelge 3.1. Luria Bertani (LB) agar besiyeri için gereken bileşenler 19
Çizelge 3.2. Ortamlarda kullanılan antibiyotikler ve Yoğunlukları 19
Çizelge 3.3. Polimeraz Zincir Amplifikasyonları için kullanılacak olan sarf ..... bileşenleri ve hacimleri 21
Çizelge 3.4. PCR amplifikasyonu koşulları 22
Çizelge 3.5. *SlMLO* genlerine ait gen bölgelerinin domates çeşidinde varlığını ..... ortaya koyabilmek için dizayn edilen spesifik primer dizilimleri.....22
Çizelge 3.6. Dizayn edilen gRNA dizilimleri On-target, Off-target ..... analiz sonuçları ve *SlMLO1* üzerindeki pozisyonları. Ok işareti yönleri gRNA yönünü işaret etmektedir 23
Çizelge 3.7. gRNA hedef bölgelerinin doğrulanması amacıyla, ilgili gen bölgelerine ..... özgü primerler tasarlanmıştır. Bu primerlere ait dizilimler, beklenen erime ..... sıcaklıkları (Tm) ve amplifikasyon sonucu oluşması öngörülen ürün boyutları.....24
Çizelge 3.8. GoldenGate klonlama reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve reaksiyon hacimleri.....26
Çizelge 3.9. GoldenGate reaksiyonu'nun döngü koşulları 26
Çizelge 3.10. Koloni PCR bileşenleri ve hacimleri 27
Çizelge 3.11. PCR amplifikasyonu için kullanılan koşullar 27

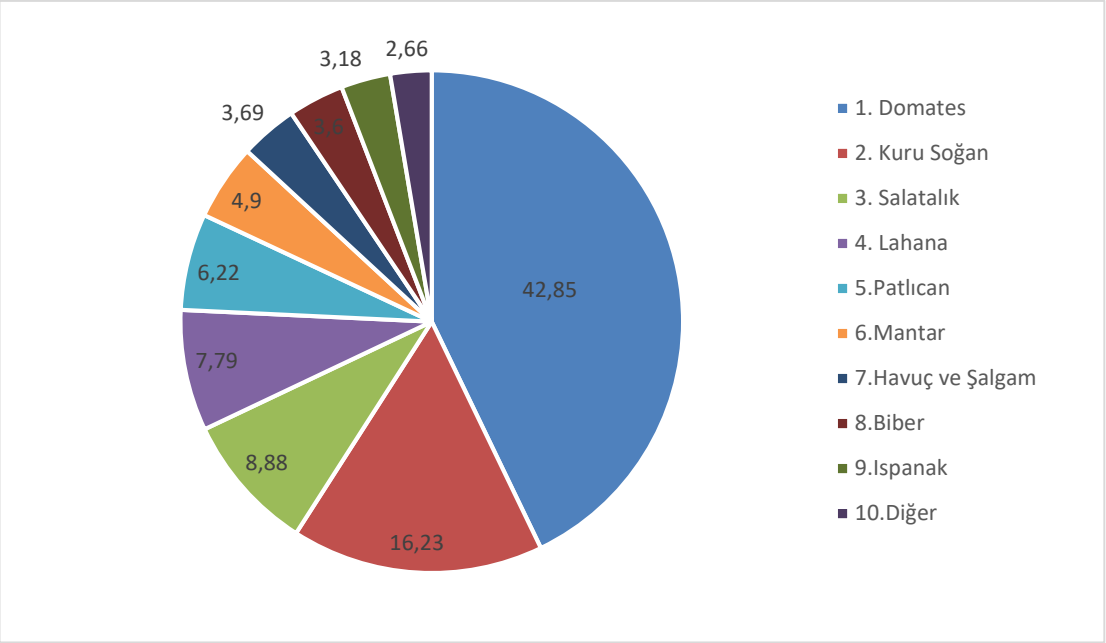
1 GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), dünya genelinde hem üretim miktarı hem de tüketim açısından büyük öneme sahip sebze türlerinden biridir. Kendine döllenme özelliği gösteren bu bitki, *Solanaceae* familyası içerisinde yer almakta olup diploid kromozom sayısı 2n = 24'tür (Salim vd. 2020). Domates; A ve C vitaminleri, potasyum ve likopen gibi çok sayıda yararlı bileşen açısından zengin bir sebzedir. Günlük beslenmede domatese yer verilmesi, kalp-damar sisteminin korunmasına yardımcı olmakta, bazı kanser türlerine karşı koruyucu etki gösterebilmekte ve sindirim sisteminin düzenli çalışmasını desteklemektedir. Ayrıca domateste bulunan antioksidan maddeler, hücre yaşlanmasını yavaşlatıcı etki göstererek cilt sağlığının korunmasına da katkı sağlamaktadır (Story vd. 2010).

Türkiye, Çin, Hindistan, ABD ve Mısır uzun yıllardır dünya domates üretiminde öne çıkan ülkeler arasında yer almaktadır. Küresel ölçekte domates üretimi yaklaşık 183 milyon ton seviyesindedir. Bu üretimde Çin, yaklaşık 65 milyon ton ile ilk sırada bulunurken, Hindistan 21 milyon tonluk üretimiyle ikinci sırada yer almaktadır. Türkiye ise yıllık yaklaşık 13 milyon tonluk üretim miktarıyla dünyada üçüncü büyük domates üreticisi konumundadır (Aksoy ve Kaymak 2024).

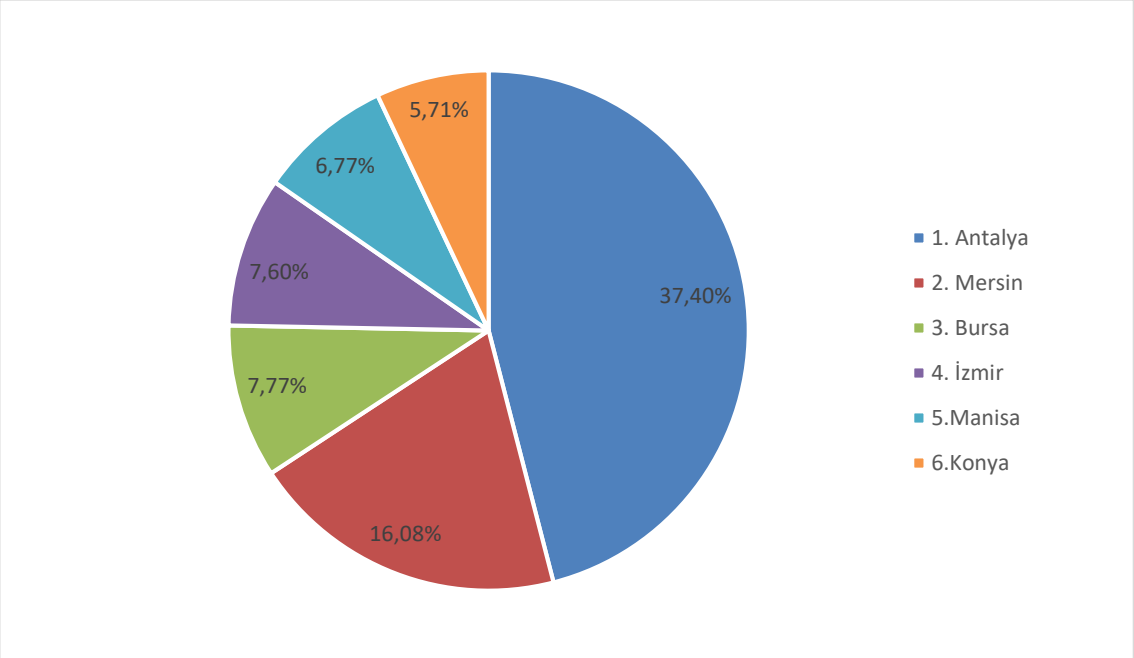
Örtü altı sebze yetiştiriciliği; ekonomik katkı sağlaması ve istihdam yaratmasının yanı sıra, yıl boyunca taze sebzeye erişim imkânı sunması nedeniyle önemli bir üretim sistemidir. Geniş bir örtüaltı üretime sahip olan ülkemizde bu faaliyetler; cam ve plastik seralar ile alçak ve yüksek tünel yapıları altında gerçekleştirilmektedir. Nüfus artışı ve tüketici beklentilerindeki çeşitlenme göz önünde bulundurulduğunda, örtü altı sebze üretiminin sürdürülebilirliğinin sağlanması için temel amaç; yüksek ürün kalitesinin elde edilmesi ve özellikle son yıllarda giderek önem kazanan insan sağlığı ile çevresel faktörleri gözeten üretim anlayışının benimsenmesi olmalıdır. Seracılığın temel yapısını iklim özellikleri oluşturmaktadır. Türkiye, sahip olduğu iklimsel ve ekolojik çeşitlilik sayesinde sebze ve meyve üretimi açısından dünya genelinde öne çıkan ülkeler arasında yer almaktadır. Ülkemizde örtü altı yetiştiricilik uygulamaları ilk olarak 1940'lı yıllarda Antalya ve çevresinde başlamış, özellikle 1960 yılından itibaren geçen süreçte hem üretim alanı hem de yetiştirilen ürün çeşitliliği bakımından istikrarlı bir gelişme göstermiştir (Ersoy 2005). Türkiye'deki toplam örtü altı üretiminin yaklaşık %95'ini sebze türleri oluştururken, meyve üretiminin payı %5 düzeyinde kalmaktadır. Örtü altı sebze yetiştiriciliğinde ise domates, üretim miktarı ve yaygınlığı bakımından ilk sırada yer almaktadır (Yıkılmazsoy 2022).

Dünya sebze üretimi 1.129.721.680 tondur. Bitki türlerine göre dünya sebze üretim dağılımı şekil1.1'de verilmiştir. Üç yıllık ortalamaya (2018-2019-2020) göre en fazla üretimi yapılan sebze türü domatestir. Domatesi sırasıyla kuru soğan, salatalık, lahana ve patlıcan takip etmektedir (Karipçin vd. 2022).



Şekil 1.1. Dünya Sebze üretiminin türlere göre dağılımı (Karipçin vd. 2022).

Örtü altı sebze yetiştiriciliği, üretimin yoğun olarak yapıldığı bölgelerde daha yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Ancak işletmelerin çoğunlukla küçük ölçekli ve dağınık yapıda olması, üretimde istenen verim düzeyine ulaşılmasını zorlaştırmaktadır. Türkiye'de sebze üretiminin ticari boyutta öne çıktığı iller arasında Antalya, Mersin, Bursa, İzmir, Manisa, Konya, Ankara, Çanakkale, Muğla ve Balıkesir yer almaktadır. Bu iller içinde Antalya, sebze üretiminin en yoğun gerçekleştirildiği il konumundadır. İllerin Türkiye sebze üretimindeki payları şekil 1.2 de verilmiştir.



Şekil 1.2. İllerin Türkiye sebze üretimindeki payları (TUİK 2022).

Domates, dünya genelinde en yaygın olarak üretilen ve ekonomik değeri yüksek sebze türleri arasında yer almaktadır. Bitkinin kökeni, Peru ve Ekvator'un da dâhil olduğu Güney Amerika bölgesidir. Domatesin tarımsal üretime alınması ilk olarak Meksika'da gerçekleşmiş, Yeni Dünya'nın keşfinden sonra ise Amerika'dan Avrupa'ya ve buradan da dünyanın farklı bölgelerine yayılmıştır. Türkiye'de domates yetiştiriciliği 1900'lü yılların başlarında Adana'da başlamıştır. Ülkemizde örtü altı sebze yetiştiriciliği 1950'li yıllarda ortaya çıkmış, 1990'lı yıllara kadar sınırlı bir gelişme göstermiştir. Ancak 1990'lı yıllardan itibaren bu üretim şekli hızla artış göstermiştir. Örtü altı sebze üretiminde türler karşılaştırıldığında, en yüksek üretim payının domatese ait olduğu görülmektedir. Domates, kısa yetişme süresine rağmen yüksek verim potansiyeline sahip olması nedeniyle her geçen yıl üretim ve tüketim miktarı artan önemli bir ticari üründür. Ayrıca içerdiği vitaminler, mineraller, amino asitler, şekerler ve lifler sayesinde insan beslenmesi açısından değerli bir gıda kaynağıdır. Meyvesi tüketilen sebzeler arasında domates, en fazla tüketilen türlerden biridir. Türkiye genelinde domates yetiştiriciliği yapılmasına rağmen, örtü altı domates üretimi ağırlıklı olarak Ege, Akdeniz ve Marmara bölgelerinde yoğunlaşmıştır (Öztekin 2003).

Domates, ılıman ile sıcak iklim koşullarında yetişen bir sebze türüdür ve düşük sıcaklıklara karşı oldukça hassastır. Yetiştirme sürecinde sıcaklığın –2 °C seviyelerine düşmesi bitkide ciddi zararlar meydana getirir ve çoğu zaman bitkinin tamamen kaybına yol açmaktadır. Sıcaklık 14 °C'nin altına indiğinde meyvelerin olgunlaşması yavaşlar ve buna bağlı olarak verimde azalma görülmektedir. Bitkinin sağlıklı gelişimi için en uygun sıcaklık aralığı 22–26 °C'dir. Sıcaklığın 15 °C'nin altına veya 35 °C'nin üzerine çıkması, çiçeklenme ve meyve tutumu üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Ayrıca, gündüz ve gece sıcaklıkları arasındaki farkın 8–12 °C olması bitkinin gelişimi açısından ideal kabul edilirken, 11 °C'nin altındaki sıcaklıklarda çiçeklenme gerçekleşebilse de tozlanma ve döllenme süreçlerinde ciddi sorunlar ortaya çıkmaktadır. Sağlıklı bir tozlanma ve döllenmenin sağlanabilmesi için ortam sıcaklığının en az 16–17 °C seviyelerinde olması gerekmektedir (Özkaplan ve Balkaya 2019).

Dünyamız ve ülkemiz için önemli olan domates yetiştiriciliğini olumsuz etkileyen hastalıklar bulunmaktadır. Bunları fizyolojik ve patojen kaynaklı hastalıklar olarak ikiye ayırabiliriz. Bunlardan fizyolojik kaynaklı kayıplar; çevre şartları, fazla sulama ve gübrelemeden oluşurken fungal, viral ve bakteriyel patojenlerden meydana gelen biyotik kaynaklı kayıplar daha çok önemlidir. En önemli fungal hastalıklar arasında domates küllemesi (*O. lycopercisi*), kurşuni küf *(Botrytis cinera*), erken yaprak yanıklığı (*Alternaria solani*), Domates mildiyösü (*Phytophthora infestans*) gibi bitkinin üst aksamını enfekte eden fungal etmenler gelmektedir (Polat 2024).

Oidium lycopersici, domateste külleme hastalığına neden olan obligat biyotrofik fungal etmenlerden biridir. Hastalık ilk olarak sera domateslerinde tanımlanmış ve zamanla dünyanın birçok domates üretim bölgesinde ekonomik öneme sahip bir patojen haline gelmiştir. Enfeksiyon sonucunda yaprak yüzeyinde beyaz, unumsu misel tabakaları oluşmakta, hastalığın ilerleyen dönemlerinde yapraklarda sararma, kuruma ve erken yaprak dökümü meydana gelmektedir. Bu durum bitkinin fotosentetik kapasitesini azaltarak verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır (Marois vd.2001).

Patojen özellikle yapraklar, yaprak sapları ve yeşil bitki aksamı üzerinde gelişmekte, meyvelerde ise genellikle doğrudan belirti oluşturmamaktadır. Şiddetli

enfeksiyon koşullarında hastalık odakları birleşerek geniş alanlara yayılabilmekte ve bitkinin gelişimini önemli ölçüde sınırlandırabilmektedir (Jacob vd. 2008).

Bu çalışmanın amacı, domateste külleme hastalığına neden olan *Oidium lycopersici* etmenine karşı genetik olarak dayanıklılık elde etmektir. Külleme hastalığı, özellikle verim ve ürün kalitesi üzerinde olumsuz etkiler oluşturan yaygın bir problem olup, mevcut kimyasal ve genetik mücadele yöntemleri uzun vadede yeterli koruma sağlayamamaktadır. Bu nedenle, hastalığa hassaslıkla ilişkili genlerin hedeflenmesi önemli bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Hastalığa karşı kimyasal mücadele yaygın olarak kullanılsa da çevresel ve ekonomik açıdan sürdürülebilir çözümlere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda CRISPR-CAS9 gibi gen düzenleme teknolojileri, bitkilerde hastalıklara dayanıklılık kazandırmada etkili yöntemler olarak öne çıkmıştır. Domateste külleme hastalığına hassaslık sağlayan *MLO1* genini CRISPR-CAS9 sistemi ile hedefleyerek gen düzenlemesine uygun bir konstrüksiyon oluşturmak, *MLO1* geninin birinci ekzonuna yönelik gRNA tasarlamak, tasarlanan gRNA'yı pHEE401E vektörüne klonlamak ve elde edilen konstrüksiyonu *E. coli* ile *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerine aktarmaktır. Bu çalışma, ileride külleme hastalığına dayanıklı domates çeşitlerinin geliştirilmesine temel oluşturmayı hedeflemektedir. Bu kapsamda çalışmada, domateste hassaslık genlerinden biri olan *SlMLO1* geni hedef alınmıştır. CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi kullanılarak bu gende spesifik mutasyonlar hedeflenmiş ve gen fonksiyonunun baskılanması yoluyla bitkide külleme etmenine karşı dayanıklı bitkiler geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2 KAYNAK TARAMASI

2.1 Külleme Hastalığı

Külleme hastalığı (*Powdery Mildew*) domates başta olmak üzere birçok bitkinin yetiştiriciliğinde önemli verim kayıplarına neden olan önemli bir fungal hastalıktır. Hastalık *Fungi* alemi , *Ascomycota* şubesi, *Erysiphales* takımına ait obligat parazit funguslardır (Tümay ve Özgenen Özkaya 2020). Bu nedenle yaşayabilmeleri için canlı bir konukçuya ihtiyaç duymaktadırlar. Domateste külleme hastalığı uzun yıllardır dünyada ve Türkiye'de bilinen bir hastalık etmeni fungustur (Ozan ve Maden 2006).

Ilıman bölgelerde sık rastlanan külleme hastalığı hem tarımsal üretimde hem de bahçecilikte süreklilik gösteren önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır(Katar 2024). Dünya genelinde binlerce bitki türü, yüzlerce farklı külleme etmeni fungusun konukçusu durumundadır. Bu hastalık; arpa, buğday, domates, bezelye, salatalık ve kavun gibi temel tarım ürünlerinin yanı sıra elma, üzüm, şeftali ve çilek gibi meyve türlerinde de yaygın olarak görülmektedir. Aynı zamanda biber gibi sebzeler, petunya ve gül gibi süs bitkileri ile tütün gibi ekonomik değeri yüksek bitkiler de külleme hastalığından etkilenebilmektedir (Alp vd. 2011).

Külleme hastalığı, bitki dokularını yüzeyden enfekte eden ve fotosentez kapasitesini azaltan obligat parazit bir fungal etmen hastalığıdır. Külleme hastalığının başlangıç kaynağını, enfekte bitki artıklarında kışı geçiren miselyum yapıları ve konidiosporlar oluşturmaktadır. İlkbahar döneminde sıcaklığın 15 ºC'nin üzerine yükselmesi ve gece ile gündüz arasındaki sıcaklık farkının artmasıyla birlikte sporlar çimlenerek aktif duruma geçmektedir. Hastalığın ilk belirtileri genellikle yaşlı yaprakların üst yüzeyinde küçük beyaz lekeler şeklinde ortaya çıkmaktadır. Zamanla bu lekeler birleşerek geniş alanlara yayılır ve yapraklar da sararma, kuruma ve erken dökülmelerine neden olmaktadır. Yoğun enfeksiyon da yaprak renginin sararmasından kaynaklı fotosentez azalmakta, bitki gelişiminde gerilemeler ve verim kayıpları meydana gelmektedir. Külleme enfeksiyonları, özellikle tahıllarda verim ve kaliteyi düşürerek ciddi ekonomik kayıplara yol açabilmektedir. Bu hastalığa karşı geliştirilen dayanıklılık mekanizmaları arasında yer alan kantitatif dayanıklılık ile ırka özgü dayanıklı çoğu zaman yeterli düzeyde koruma sağlayamaz ya da zamanla etkinliğini yitirmektedir. Bu durum, daha uzun süre etkili olabilecek ve geniş etki alanına sahip dayanıklılık yaklaşımlarının geliştirilmesini gerekli kılmaktadır (Mieslerova ve Lebeda 1999).

Domates yetiştiriciliğinde bugüne kadar külleme hastalığına neden olan üç külleme türü saptanmıştır. Bu türlerden iki tanesi (*O lycopersici* ve *Oidium neolycopersici*) son zamanlarda domateste yaygınlık göstermiştir. Diğer tür, *Leveillula taurica* ise diğer konukçularıyla beraber domateste çok eskiden beri bilinmektedir (Ozan ve Maden 2006). Domates bitkilerinde yeni bir külleme hastalığının ortaya çıktığı 1970'lerin son dönemlerinde ilk olarak Japonya ve Avustralya'da rapor edilmiştir (van der Beek vd. 1994). Daha sonraki yıllarda benzer hastalık belirtileri Avrupa'nın farklı bölgelerinde ve Kuzey Amerika'da da kaydedilmiştir (Seifi vd. 2014).

Kiss vd. (2005), söz konusu hastalığın domates üretiminde önemli ekonomik kayıplara yol açtığı vurgulanmış ve etmen çoğunlukla *Oidium* cinsine ait bir anamorf olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, bu patojenin genellikle sıcak iklim koşullarında yaygın olan *Leveillula taurica*'dan morfolojik ve epidemiyolojik açıdan belirgin şekilde farklı olduğu belirtilmiştir.

Başlangıçta *Erysiphe orontii*'nin anamorf formu olarak değerlendirilmiştir. Ancak daha sonra yapılan morfolojik incelemeler sonucunda bu fungusun *O. lycopersicum* olarak ayrı bir tür olduğu anlaşılmıştır. Söz konusu fungusun eşeyli evresinin bilinmemesi ve morfolojik özelliklerine ilişkin bulguların tutarsızlık göstermesi, bu yeni külleme etmeninin farklı araştırmalarda *O. lycopersici, Erysiphe orontii* veya *E. cichoracearum* adlarıyla tanımlanmasına yol açmıştır (Yıkılmazsoy vd. 2022). Bu patojen, fide döneminden itibaren olgun bitkilere kadar birçok domates çeşidinde hastalık oluşturabilmekte ve sera ile tarla koşullarında yaygın şekilde görülmektedir. Ayrıca patlıcan, tütün, patates ve bazı yabancı ot türlerinin de bu fungus tarafından enfekte edilebildiği bildirilmiştir (Jacob vd. 2008).Domates külleme hastalık etmeni *O.neolycopersici* taksonomisi çizelge 2.1 de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Domates külleme hastalık etmeni *Oidium neolycopersici* taksonomisi

Alem	*Fungi*
Bölüm	*Ascomycota*
Alt Bölüm	*Pezizomycotina*
Sınıf	*Leotimycetes*
Takım	*Erysiphales*
Familya	*Eriysiphaceae*
Cins	*Oidium*
Tür	*Oidium neolycopersici*

O. neolycopersici, bitki yüzeyinde gelişen ince, saydam hiflere ve dik duran konidioforlara sahip olup, konidileri tek tek oluşan, oval ya da fıçı biçiminde yapılardan oluşmaktadır. Bu sporlar kısa zincirler halinde bulunabilse de çoğunlukla tek tek yayılmaktadır. Rüzgârın, sporların bitkiden bitkiye taşınmasında temel etken olduğu, düşük rüzgâr hızlarında ise yalancı konidiaspor zincirlerinin oluştuğu gösterilmiştir. *O. neolycopersici*'nin belirtileri ve mikroskobik görüntüsü şekil 2.1 de verilmiştir.



Şekil 2.1. *Oidium neolycopersici*'nin belirtileri ve mikroskobik görüntüsü

Miselyal yapı açık renkli ve narin olup esas olarak yaprağın üst kısmında yayılım göstermekte, ancak bazı durumlarda yaprağın alt yüzeyine ve gövdeye de ilerleyebilmektedir. Hifler renksiz, bölümlü ve 4–8 µm kalınlığındadır. Appressoriumlar belirgin şekilde gelişmiş olup çoğunlukla çok loplu ya da düzensiz loplu yapıdadır; nadir olarak meme ucu görünümünde, karşılıklı ya da dağınık konumlanmış halde gözlenmektedir. Konidioforlar dikey doğrultuda uzanmakta ve 58–115 µm arasında değişen uzunluklara sahip olup ortalama 91,5 µm ölçülmüştür. Ayak hücreleri çoğunlukla düzgün silindirik yapıda olmakla birlikte bazı örneklerde orta bölümde genişleme, taban kısmında ise daralma göstermektedir; uzunlukları 29–74 µm (ortalama 42,4 µm) arasında değişmektedir. Ayak hücresini izleyen kısım, bir ya da iki kısa hücreden veya benzer uzunlukta tek bir hücreden oluşmaktadır (Jacob vd. 2008).

Konidiler genellikle tek tek meydana gelmekte, ancak bağıl nem oranının yükseldiği koşullarda 2–6 birimden oluşan yalancı zincirler oluşturabilmektedir. Bu yapılar 22–46 × 10–20 µm (ortalama 33,5 × 13,7 µm) boyutlarında olup elips, yumurta ya da fıçı benzeri şekiller sergilemektedir ve fibrozin cisimciği içermemektedir. Çim tüpü konidinin uç ya da yan bölümünden gelişmekte; düz ya da hafif eğimli, uç kısmı genişlemiş ve loplu yapı göstermekte, çok ender olarak sade formda bulunmaktadır. Çim tüpünün çapı, başlangıç noktasından ileriye doğru giderek artmaktadır (Ozan ve Maden 2006).

O. neolycopersici, dünya genelinde özellikle sera koşullarında yetiştirilen domatesler için ciddi bir risk oluşturmaktadır. Son yıllarda açık alanda yetiştirilen domateslerde de görülme sıklığı belirgin biçimde artmıştır. Bunun yanı sıra, domates üzerinde gelişebilen geniş konukçu yeteneğine sahip bir külleme etmeni olarak değerlendirilmektedir. Hastalık, yaprakların üst yüzeyinde unumsu beyaz lekelerin ortaya çıkmasıyla karakterizedir. Fungus yaprakların alt yüzeyi, yaprak sapları ve çanak yaprak halkası üzerinde de gelişim gösterebilmekte, ancak meyve dokularını enfekte etmemektedir. Şiddetli enfeksiyon durumlarında yapraklarda sararma, erken yaşlanma belirtileri ile birlikte meyve iriliği ve kalitesinde belirgin azalmalar meydana gelmektedir (Ozan ve Maden 2006).

2.2 Hastalık Etmeni *Oidium lycopersici*

O. lycopersici'nin domates üretim alanlarında görülmeye başlanması yeni bir süreçtir. İlk kayıtlar 1970'li yılların sonlarına dayanmakta olup, hastalık başlangıçta sınırlı bölgelerde rapor edilmiştir. Ancak ilerleyen yıllarda patojenin farklı coğrafyalara yayılmasıyla birlikte Avrupa ve Kuzey Amerika başta olmak üzere birçok bölgede önemli bir sorun haline geldiği bildirilmektedir. Özellikle seralarda oluşturulan stabil sıcaklık ve nem koşulları, etmenin yayılışını kolaylaştıran temel faktörler arasında yer almaktadır (Lebeda ve Mieslerova 2000). Domates külleme hastalık etmeni *O. lycopersici* taksonomisi çizelge 2.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Domates külleme hastalık etmeni *Oidium lycopersici* taksonomisi

Alem	*Fungi*
Bölüm	*Ascomycota*
Alt Bölüm	*Pezizomycotina*
Sınıf	*Leotimycetes*
Takım	*Erysiphales*
Familya	*Erysiphaceae*
Cins	*Oidium*
Tür	*Oidium lycopersici*

Hastalık belirtileri genellikle yaprakların üst yüzeyinde ortaya çıkmakta ve beyaz-gri renkte, tozumsu bir görünümle karakterize edilmektedir. Enfeksiyon ilerledikçe yaprak dokularında kloroz meydana gelmekte, bunu nekroz ve erken yaprak dökümü izlemektedir. Bu durum bitkinin fotosentez kapasitesini sınırlandırarak gelişme geriliğine ve sonuçta verim azalmasına neden olmaktadır. Şiddetli enfeksiyon koşullarında bitkiler zayıflamakta ve pazarlanabilir ürün miktarı belirgin şekilde düşmektedir (Lebeda ve Mieslerova 2000).

Taksonomik açıdan *O. lycopersici*'nin sınıflandırılması uzun süre belirsizlik taşımıştır. Etmenin eşeysel evresinin (teleomorf) gözlenememesi, klasik tanı yöntemlerinin yetersiz kalmasına neden olmuştur. Bununla birlikte, morfolojik yapılar üzerinde yapılan ayrıntılı incelemeler ve mikroskobik analizler sonucunda patojenin *Erysiphales* takımı içerisinde yer aldığı ve *Erysiphe* cinsine yakın özellikler gösterdiği ortaya konmuştur. Bu bulgular, etmenin sistematik konumunun belirlenmesine önemli katkılar sağlamıştır (Lebeda ve Mieslerova 2000).

Koloniler, yaprakların hem alt hem de üst yüzeylerinde, ayrıca yaprak sapları, gövde dokuları ve domatesin çanak yaprak halkası üzerinde gelişim göstermektedir. Miselyum bazı örneklerde yoğun ve belirgin beyaz görünüm sergilerken, bazı durumlarda ise oldukça seyrek yapıda olup aşırı hassaslık sonucu oluşan nekrotik alanlarla birlikte görülmektedir. Hifler düz ya da hafif dalgalı formda, 4–6 µm kalınlığında olup hücre uzunlukları 51–66 µm arasında değişmektedir. Miselyal appressoriumlar iyi gelişmiş olup genellikle basit meme ucu şeklinde ya da çok zayıf loplu yapıdadır; tek tek bulunabildikleri gibi sekize kadar appressoriumun oluşturduğu demetler halinde de düzenlenebilmektedir (Ozan ve Maden 2006).

Konidioforlar, ana hücreye orta kısımdan bağlanmakta; uzunlukları orta ya da oldukça uzun olabilmektedir. Bazal septum, 15–45 µm mesafede yer almakta, konidiofor gövdesi çoğunlukla tek ve uzun bir hücreden (95–180 µm) oluşmakta, nadiren iki hücreli yapı göstermektedir. Bazal hücre genellikle 80 µm'den daha uzun olup aşağıya doğru daralmaktadır. Dip bölmenin genişliği 9–10 µm, apikal bölmenin genişliği ise 10–12 µm olarak ölçülmüştür. Konidiler, üç ila beş birimden oluşan zincirler halinde meydana gelmekte, kenar çizgileri dalgalı görünüm sergilemekte ve fibrozin cisimciği içermemektedir (Lindhout vd. 1993).

Bu patojenin neden olduğu hastalıkta, yaprak yüzeylerinde beyaz tozumsu lekeler ortaya çıkmaktadır. Salgının şiddetlendiği durumlarda, bu belirtiler gövde, yaprak sapı ve çanak yapraklara da yayılabilir; ancak meyveler genellikle etkilenmez. Bu yönüyle, yalnızca yapraklarda enfeksiyon oluşturan *L. taurica*'dan farklılık gösterir. Yoğun enfeksiyonlarda lezyonlar birleşerek bitkinin fotosentez kapasitesini düşürür ve genel gelişimini olumsuz etkiler. Hastalık özellikle sera üretiminde yaygın olup, son yıllarda açık tarla domateslerinde de önem kazanmaktadır. *O. neolycopersici*'nin konukçu yelpazesi oldukça geniştir ve birçok *Solanaceae* ve *Cucurbitaceae* türünü de içerecek şekilde 13 bitki familyasından 60'tan fazla bitkide hastalık oluşturabildiği bildirilmiştir (Longone vd. 2020).

Domates türlerinde bu patojene karşı farklı dayanıklılık mekanizmaları bulunmaktadır. Enfeksiyonun erken dönemlerinde, dayanıklı ve hassas genotipler arasında spor çimlenmesi ve enfeksiyon ipliği gelişimi bakımından belirgin farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Domateste en yaygın savunma tepkisi, patojenin giriş yaptığı hücrelerin hızlı şekilde ölmesiyle enfeksiyonun sınırlandırıldığı hipersensitif reaksiyondur (Jacob vd. 2008). Bu külleme hastalık etmeni *O. lycopersici* Dünya 'da ve Türkiye'de açık ve örtü altı sebze yetiştiriciği yapılan alanlarda önemli bir fungustur (Mieslerova ve Lebeda 1999).

Bu külleme etmenine karşı mücadele edilmezse ürün kayıpları %100 ulaşabilmektedir. Bu fungusa karşı kimyasal mücadele yapılabilmektedir. Ancak hastalık ve zararlılarla mücadelede yoğun şekilde kullanılan kimyasal girdiler çiftçinin cebine yük olmakta, insan sağlığını tehdit etmekte, çevre kirliliğine neden olmakta, toprağı bağımlı hale getirmekte ve en önemlisi bu fungus fungisite direnç kazanmaktadır. Bu durum çevre dostu tarım uygulamalarının önemini her geçen gün daha da artırmaktadır (Yavuz 2010).

Bu bağlamda, son yıllarda geliştirilen genom düzenleme teknolojileri olan Meganükleazlar, Zinc Finger Nucleases (ZFN), Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN) ve özellikle CRISPR-CAS9 sistemleri, bitkilerin hastalıklara karşı dayanıklılığını artırmada yenilikçi bir yaklaşım sunmaktadır (Demirdöğen vd. 2025).

2.3 Genom Düzenleme Teknolojileri

2.3.1 Meganükleazlar

Meganükleazlar, genom düzenlemede kullanılan ilk enzim gruplarından biridir. Bu enzimler; ökaryotlar, bakteriler ve arkeler dahil olmak üzere birçok canlı grubunda tespit edilmiş olup, çoğunlukla sınıf I intronlar ve inteinler tarafından kodlanmaktadır. Hücrede yalnızca çekirdek genomdan değil aynı zamanda mitokondri ve kloroplast genomlarından da sentezlenebilmektedir. Yapısal olarak meganükleazlar, genellikle her biri yaklaşık 160-200 amino asit uzunluğunda iki alt birimden oluşan homodimerik proteinlerdir. Bu enzimler, 12 ile 40 baz çifti arasında değişen uzun ve özgül DNA dizilerini tanıyabilme yeteneğine sahiptir. Hedef diziyi tanıdıktan sonra DNA üzerinde çift zincir kırığı oluşturarak hücrenin doğal onarım mekanizmalarını aktive etmektedirler (Tröder ve Zevnik 2022).

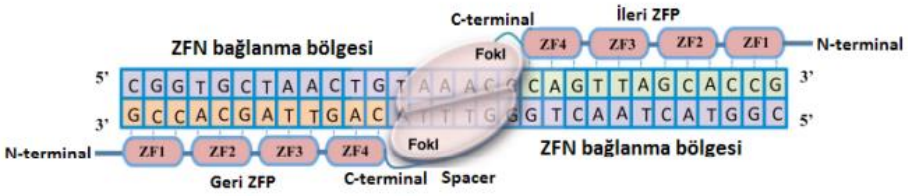
Tanıma bölgelerinin uzun olması, meganükleazların genom üzerinde oldukça sınırlı sayıda hedefe sahip olmasına yol açmaktadır. Bu durum, genomda istenmeyen kesimlerin azalması açısından bir avantaj sağlarken, istenilen her hedef bölge için uygun bir meganükleaz bulunamaması nedeniyle uygulama alanını önemli ölçüde sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, her ne kadar genom düzenleme teknolojilerinin temelini oluştursalar da tasarım esnekliklerinin düşük olması sebebiyle günümüzde yerlerini daha programlanabilir sistemlere bırakmışlardır (Tröder ve Zevnik 2022).

2.3.2 Çinko parmak nükleazlar (Zinc Finger Nuklease) (ZFN)

Çinko parmak nükleazlar, hedef DNA dizilerinde kesim yapabilmek için tasarlanmış yapay endonükleazlardır. Bu sistem, DNA'ya bağlanan çinko parmak (ZFN) protein motifleri ile kesimden sorumlu olan FokI nükleaz domaininin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Çinko parmak motifi ilk kez *Xenopus laevis*'te tanımlanmış ve DNA'yı tanıma yeteneği nedeniyle genom düzenleme çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Akbudak ve Kontbay 2017). Her bir çinko parmak modülü, belirli bir üçlü nükleotid dizisini tanıyabilen yaklaşık 23 amino asitlik bir yapıdan oluşmaktadır. Birden fazla ZF modülünün art arda dizilmesiyle, hedeflenen gen bölgesine özgü DNA bağlanma alanları oluşturulabilmektedir (Şekil 2.2.).

Bu bağlanma domaini, katalitik aktiviteyi sağlayan FokI enzimi ile birleştirildiğinde fonksiyonel ZFN yapısı elde edilmektedir (De Pater vd. 2009).

FokI enzimi tek başına kesim yapamadığı için dimer oluşturması gerekir. Bu nedenle hedef bölgede karşılıklı iki ZFN tasarlanır. Bu iki protein, DNA'nın zıt zincirlerine bağlanarak FokI domainlerinin bir araya gelmesini sağlar ve böylece çift iplikli DNA kırığı oluşturulur. Kesim sonrası oluşan hasar, hücrenin doğal NHEJ veya HR onarım mekanizmaları ile düzeltilir ve bu süreçte hedef bölgede genetik değişiklik meydana gelmektedir (Tufan ve Keleş 2019).ZFN sisteminde özgüllük; sol ve sağ ZF bağlanma bölgeleri ile bu iki bölge arasındaki "spacer" (ara dizi) uzunluğunun birlikte etkisiyle sağlanmaktadır. Ancak her hedef gen için yeni ZFN proteinlerinin tasarlanması gerekliliği, yöntemin en önemli dezavantajlarından birisidir. Ayrıca teorik olarak tüm üçlü nükleotid kombinasyonlarını tanıyabilecek ZF motifleri bulunmasına rağmen, pratikte bu kombinasyonların tamamı henüz üretilememiştir. Bu durum, ZFN sisteminin kullanım alanını sınırlayan faktörlerden biri olarak değerlendirilmektedir (Tufan ve Keleş 2019). ZFN (Çinko Parmak Nükleaz) sisteminin hedef DNA bölgesine bağlanma ve kesim mekanizmasının şematik gösterimi Şekil 2.2 de verilmiştir.



Şekil 2.2. ZFN (Çinko Parmak Nükleaz) sisteminin hedef DNA bölgesine bağlanma ve kesim mekanizmasının şematik gösterimi

2.3.3 Transkripsiyon Aktivatör-Benzeri Efektör Nükleazlar (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) (TALEN)

Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN), çalışma prensibi bakımından çinko parmak nükleazlara (ZFN) benzerlik göstermektedir. Bu sistemde kesici enzim bölgesi olarak FokI, DNA'yı tanıyan bölüm olarak ise TALEN proteinleri görev yapmaktadır. TALEN proteinleri, bitki patojeni olan *Xanthomonas* cinsi bakterilerden izole edilmiştir (Malzahn vd.2017).

Xanthomonas patojeni, bitki hücrelerine efektör proteinleri aktarmak amacıyla Tip III salgılama sistemi kullanmaktadır. Bu efektör proteinlerden bazıları, hücre çekirdeğine yönelerek konukçu bitkide hassaslık genlerini aktive eden promotör bölgelerine bağlanmaktadır. TALEN proteinleri, yüksek derecede korunmuş ve her biri 33–39 amino asitten oluşan tekrar dizilerine sahiptir. Bu tekrarların 12. ve 13. pozisyonlarındaki amino asitler değişkenlik göstermektedir ve bu bölge tekrar değişken çift kalıntısı olarak adlandırılmaktadır. Tekrar değişken çift kalıntısı, TALEN

proteinlerinin hangi DNA bazına bağlanacağını belirleyen temel faktördür (Tufan ve Keleş 2019).

Bu yapıda 12. amino asit, nükleotitle olan bağın kararlılığını artırırken, 13. amino asit ise hedef bazın tanınmasında görev almaktadır. Her bir DNA bazı için özgül RVD eşleşmeleri bulunmaktadır**.** Genom düzenleme amacıyla, TALEN proteinleri hedef DNA dizisine uygun şekilde birleştirilerek özgül bir bağlanma bölgesi oluşturulur (Topçu ve Duran 2021).

TALEN dizilerinin, bağlanacakları DNA bölgesinde mutlaka bir timin (T) bazı ile başlaması gerekmektedir**.** Bu tanıma domeyni, FokI endonükleazının kesim bölgesi ile birleştirilerek işlevsel hale getirilir. ZFN sisteminde olduğu gibi, FokI enzimi yalnızca dimer formunda aktif olduğundan, her hedef DNA bölgesi için iki ayrı TALEN tasarlanması gerekmektedir (Malzahn vd. 2017).

Ancak her hedef için yeni TALEN üretimi yapılması hem maliyeti artırmakta hem de sürecin uzamasına yol açmaktadır. Bu sınırlamayı azaltmak amacıyla tek zincirli TALEN (single-chain TALEN; scTALEN) yaklaşımı geliştirilmiştir. Bu yöntemde, tek bir TALEN dizisine iki adet FokI kesim domeyni bağlanarak hedef DNA bölgesinde çift iplikli kırık oluşturulması sağlanmaktadır. Böylece sistem daha ekonomik ve pratik hale gelmektedir. TALEN tabanlı genom düzenleme çalışmaları; *Arabidopsis*, pirinç, tütün ve *Brachypodium* gibi model bitkilerin yanı sıra, arpa ve mısır gibi tarımsal açıdan önemli türlerde de başarıyla uygulanmaktadır (Osborn vd. 2013).

2.3.4 Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (CRISPR/CAS) Sistemleri

Düzenli aralıklarla kümelenmiş palindromik tekrarlar anlamına gelen CRISPR-CAS9, biyomedikal araştırmalarda büyük bir dönüşüm yaratan bir genom düzenleme teknolojisidir (Redman vd. 2016). Canlılar, virüsler ve diğer zararlı mikroorganizmalarla sürekli bir mücadele içindedir. Bu karşılıklı savaş sürecinde, konukçu canlılar hayatta kalabilmek için iki farklı savunma sistemleri geliştirmiştir. Doğuştan gelen dayanıklılık, mikroorganizmaların genel yapılarını tanıyabilen ve genetik olarak önceden programlanmış savunma mekanizmalarını içermektedir. Kazanılmış dayanıklılık ise daha önce karşılaşılan etkenlere karşı özel yanıtlar oluşturan ve hafıza geliştirebilen sistemleri kapsamaktadır. CRISPR-CAS9 sistemi, bakterilerin virüslere karşı oluşturduğu edinilmiş bir dayanıklılık mekanizmasıdır (Ji vd. 2015).

Ishino ve çalışma arkadaşları 1987 yılında, *E. coli* bakterisinde alkali fosfataz izoenzim dönüşümünden sorumlu olan *iap* genini klonlayıp dizilediklerinde, bu genin alt kısmında tekrar eden kısa DNA dizileri fark etmişlerdir. Bu tekrar dizilerinin, birbirinden farklı fakat benzer uzunlukta kısa dizilerle, yani spacer bölgeleriyle ayrıldığı görülmüştür. Sonraki çalışmalarda bu yapılar birçok bakteri ve arkede de tespit edilmiştir (Barrangou. ve Horvath, 2017).

Bu tekrar dizilerine 2002 yılında CRISPR adı verilmiştir. Daha sonra bu bölgelerin hemen yanında kümelenmiş CAS genleri keşfedilmiştir. 2005 yılı itibarıyla bu sistemin bakterinin genomuna nasıl girdiği ve doğal dayanıklılıkta nasıl görev yaptığı

büyük ölçüde anlaşılmıştır (Jansen vd. 2002).

CRISPR-CAS9 sistemleri, dizilimi yapılan bakteri genomlarının yaklaşık %45'inde, arke genomlarının ise %85'inde bulunmaktadır. Bu sistemde yer alan CRISPR dizileri, geçmişte karşılaşılan patojenlere ait kısa DNA parçalarını spacer olarak saklamaktadır (Bortesi vd. 2016). Bu sayede hücre, daha önce karşılaştığı tehditleri tanıyabilmektedir. Spacer dizileri, CRISPR tekrarları arasında yer alan ve yabancı DNA kökenli kısa parçalardır. CRISPR-Cas sisteminde bulunan CAS proteinleri, savunma mekanizmasının çalışmasını sağlamaktadır. Yani hedef DNA'nın tanınması, kesilmesi ve etkisiz hale getirilmesi bu proteinler aracılığıyla gerçekleşir (Karaca ve İnce 2018).

CRISPR-CAS9 teknolojisinin moleküler temellerinin aydınlatılmasıyla birlikte, bu sistem yalnızca prokaryotlara ait bir savunma mekanizması olarak değil, aynı zamanda bitki genomunun hassas ve yönlendirilmiş biçimde düzenlenmesini sağlayan güçlü bir biyoteknolojik araç olarak değerlendirilmeye başlanmıştır (Heigwer vd. 2014). Klasik ıslah yaklaşımlarında karşılaşılan uzun geliştirme süreleri ve istenmeyen genlerin birlikte taşınması gibi kısıtlamalar, CRISPR temelli genom düzenleme yöntemlerine olan ilgiyi önemli ölçüde artırmıştır. Bu teknoloji sayesinde bitkilerde belirli gen bölgeleri doğrudan hedeflenebilmekte; zararlı gen fonksiyonları devre dışı bırakılabilmekte ya da arzu edilen özellikler kazandırılabilmektedir (Hu vd. 2024). Son yıllarda yürütülen araştırmalar, CRISPR/CAS9 sisteminin hem model bitkilerde hem de tarımsal değeri yüksek türlerde yüksek başarıyla uygulanabildiğini ortaya koymuştur. CRISPR-CAS9 teknolojisinin bitki biyoteknolojisindeki en yaygın uygulama alanlarından biri, bitkilerin hastalık etmenlerine karşı dayanıklılığının artırılmasıdır (Cong vd. 2013). Bu stratejide çoğunlukla, patojenlerin enfeksiyon sürecinde kullandığı ve bitkide hassaslık oluşturan genler hedef alınarak etkisiz hâle getirilmektedir. Böylece bitki, hastalığa karşı daha dayanıklı bir fenotip kazanabilmektedir (Doench vd. 2016).

2.4 *MLO* Genleri ve Külleme Hastalığı ile İlişkisi

Mildew Locus O (MLO) geni bitkiler de külleme hastalığına karşı hassaslıkta sorumlu olan gen ailelerinden birisidir (Tek vd. 2022). *MLO* gen ailesi konukçu hücrenin duvarında yedi transmembran yapısından oluşan bir protein olarak yer alan bitkilere özgü proteinleri kodlayan ve bu proteinler kalsiyum ve kalmodulin bağımlı sinyal iletim süreçlerinde görev alan proteinleri kodlayan bir gendir (Li ve Xiao 2025). İlk olarak arpa da tanımlanmış olup bitki patojen etkileşiminde önemli rol oynamıştır (Çalış 2011). *MLO* genlerindeki mutasyonlar, özellikle de külleme hastalığına karşı dayanıklılığın oluşmasında önemli rol oynamaktadır (Kusch ve Panstruga 2017). Bu dayanıklılık tipi geniş spektrumlu, resesif (çekinik) karakterli olması nedeniyle önemli bir yer edinmiştir (Reinstädler vd. 2010). Bitkilerde *MLO* geni temelli dayanıklılık ilk olarak arpa çeşitlerinde ticari olarak değerlendirilmiş olup ancak bazı türlerde yaprak nekrozu ve verim azlığı gibi olumsuzluklar gözlenmiştir (Pavan vd. 2010). Daha sonra bu olumsuzlukların büyük çoğunluğu giderilmiştir. Ayrıca *MLO* dayanıklılık mekanizmasının sadece arpada değil, domates başta olmak üzere buğday ve diğer bitkilerde de etkili olduğu belirtilmiştir. Domateste ise bu genler genellikle *S. lycopersicum Mildew Locus O* (*SlMLO*) şeklinde adlandırılmıştır (Bai vd. 2008). Son

yıllar da moleküler ve biyoteknoloji alanındaki gelişmeler sayesinde *MLO* genleri üzerinde detaylı çalışmalar yapılmıştır.

Özellikle CRISPR-CAS9 teknolojisinin kullanılmasıyla *MLO* gen bölgelerinde mutasyonlar oluşturulabilmekte ve külleme hastalığına dayanıklı bitkiler yetiştirilmektedir (Dreiseitl 2024).

2.4.1 Domateste *SlMLO* Genleri

Domateste tanımlanan çeşitli *SlMLO* genleri bulunmaktadır. Bunlardan özellikle *SlMLO1, SlMLO5* ve *SlMLO8* genlerinin külleme hastalığı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Pozharskiy vd. 2022). Bu genlerde mutasyon oluşturarak bitkide külleme etmenine karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Zheng vd. 2016). Domateste *SlMLO* gen ailesi, özellikle *Oidium lycopersici* tarafından oluşturulan külleme hastalığı ile ilişkili olarak yoğun olarak çalışılmıştır (Bhalerao vd. 2025). *SlMLO* genlerinin bazı üyelerinin fonksiyon kaybı durumunda bitkide küllemeye karşı kalıcı ve geniş spektrumlu dayanıklılık oluşturmaktadır (Çalış 2011).

O. neolycopersici etmeni tarafından oluşturulan külleme hastalığı hem sera hem de tarla koşullarında yetiştirilen domateslerde ciddi verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu patojene karşı dayanıklılığın, *MLO* genlerinin işlev kaybına uğratılmasıyla sağlanabildiği daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada araştırmacılar, domateste bulunan *SlMLO2* genini hedef alarak CRISPR-CAS9 sistemi ile doğal mutasyonlara benzer küçük delesyonlar oluşturmayı başarmışlardır. Bu amaçla, PAM dizileri ve hedef özgüllüğü dikkate alınarak 947 adet aday kılavuz RNA tasarlanmış, bunlar arasından off-target riski düşük olan 60 tanesi detaylı analiz için seçilmiştir. Yapılan biyoinformatik değerlendirmeler sonucunda, en uygun özelliklere sahip ilk beş gRNA belirlenmiş ve bu dizilerin, doğada bulunan *ol-2* mutasyonuna benzer genetik değişimler oluşturabilecek kapasitede olduğu tespit edilmiştir. Bu şekilde elde edilen mutasyonların, domateste külleme etmenine karşı dayanıklılık sağladığı bildirilmiştir (Prajapati ve Nain 2021).

Hıyar yetiştiriciliği, kök-ur nematodu *Meloidogyne incognita* nedeniyle önemli ölçüde zarar görmektedir. Bu zararlıya karşı doğal dayanıklılık kaynağının bulunmaması, klasik ıslah yöntemlerini yetersiz hale getirmektedir. Bu nedenle, bitkide hastalığa yatkınlığı artıran genlerin hedeflenerek etkisizleştirilmesi, dayanıklılık kazandırmada yenilikçi bir yaklaşım olarak değerlendirilmiştir (Wang vd. 2018). Bu çalışmada, hıyar *M. incognita* ile etkileşimde rol oynayan klade V *MLO* genleri araştırılmıştır. Deney sonuçları, model bitki olan *Arabidopsis thaliana*'da bu gen grubuna ait mutantların nematoda karşı daha dayanıklı olduğunu ortaya koymuştur (Consonni vd. 2006). Hıyar genomunda üç adet klade V *MLO* geni tanımlanmıştır: *CsaMLO1, CsaMLO8* ve *CsaMLO11*. Nematod inokulasyonundan sonra bu genlerin ifade düzeylerinin belirgin biçimde arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca bu genlerin, *Arabidopsis* mutantlarında yüksek düzeyde ifade edilmesi, bitkinin yeniden hassas hale gelmesine neden olmuştur. Hıyarda söz konusu genlerin susturulması ya da CRISPR ile mutasyona uğratılması, kök-ur nematoduna karşı hassaslığı önemli ölçüde azaltmıştır (Schouten vd. 2014).

Gen düzenlenmiş bitkiler, yabani tip ile benzer morfoloji ve meyve özellikleri göstermiştir. Bazı tekli ve çiftli mutant hatlarında verimde azalma görülsede, $M8^1$ ve $M8^2$ hatlarında herhangi bir kayıp tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, klade V *MLO* genlerinin hıyarda *M. incognita* için hassasiyet faktörleri olduğu belirlenmiştir. Bu genler arasında *CsaMLO8*, hem dayanıklılık sağlaması hem de verim kaybına yol açmaması nedeniyle, ıslah çalışmaları için en uygun aday gen olarak öne çıkmaktadır (Xie vd. 2025).

Capsicum annuum türünde bulunan *Mildew Locus O* (CaMLO2) geni, sera koşullarında yetiştirilen biberlerde yaygın olarak görülen külleme gibi fungal hastalıklarına karşı bitkinin savunma sisteminde önemli bir rol oynamaktadır (Büschges vd. 1997). Son yıllarda genom düzenleme alanında yaşanan gelişmeler, özellikle CRISPR-CAS9 teknolojisi sayesinde, bitkilerde hastalık dayanıklılık oluşturmada ve tarımsal özellikleri geliştirmede daha önce mümkün olmayan fırsatlar sunmuştur (R ve HS 2017). Bununla birlikte, CRISPR tabanlı uygulamaların biber çeşitlerinde kullanımı hâlâ sınırlıdır ve bitkilerin yeniden oluşturulması (rejenerasyon) süreci zorlayıcı olmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmada, doğrulanmış *CaMLO2* hedefli gen düzenleme sisteminin, altı farklı ticari acı biber çeşidinde kullanılabilirliğini inceleyerek bu sınırlamaları aşmayı amaçlamıştır (Kim vd. 2020).

Daha önce yüksek verim sağladığı bildirilen CAS9/CaMLO2 sgRNA1-RNP sistemi ile düşük etkinlik gösteren CAS9/CaMLO2 sgRNA2-RNP sistemi, bu çalışmada "Dempsey" tatlı biber ve "CM334" acı biber çeşitlerinden seçilen altı ticari acı biber çeşidine uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, tüm çeşitlerde sgRNA1 kullanımıyla %6,3 ile %17,7 arasında değişen gen düzenleme oranları elde edilmiştir. Buna karşılık, sgRNA2 ile hiçbir gen düzenleme başarısı gözlenmemiştir. Bu durum, sgRNA1'in hedef gen üzerinde daha etkili olduğunu açıkça göstermektedir (Kim vd. 2020).

Bu bulgular, doğrulanmış CAS9/CaMLO2 sgRNA1-RNP sisteminin, genetik yapısı farklı olan çeşitli *C. annuum* türlerinde *CaMLO2* lokusunda etkili ve güvenilir bir gen düzenleme yöntemi sunduğunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak bu çalışma, CaMLO2 geninin hedeflenmesi yoluyla hastalıklara karşı daha dayanıklı biber çeşitlerinin geliştirilmesi için güçlü bir genom düzenleme yaklaşımı sunmaktadır (Park ve Kim 2023).

Bitkilerde hastalığa hassaslıkla ilişkili genlerin hedeflenmesi, dayanıklılık geliştirmede etkili bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Bu kapsamda CRISPR-CAS9 teknolojisi, savunma tepkisini baskılayan düzenleyici unsurların veya hassaslık genlerinin işlevsiz hale getirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Külleme hastalığında önemli bir hassaslık lokusu olan *MLO* geni, birçok bitki türünde fungal enfeksiyonlarına karşı direnç elde etmek için sıklıkla modifiye edilen genlerden biridir. Domateste birden fazla *MLO* homologu bulunmakta olup, bunlar arasında özellikle *SlMLO1* geni külleme etmenine karşı hassaslıkla ilişkilendirilmiştir. Bu genin genom düzenleme yöntemleriyle devre dışı bırakılması sonucu, yabancı DNA içermeyen ve doğal mutasyonlara benzer delesyonlar taşıyan dayanıklı hatlar geliştirilmiştir. Ayrıca *SlMLO1* geninin hedeflenmesiyle oluşturulan mutant bireylerin, külleme etmeni *Oidium lycopersici*'ye karşı dayanıklılık gösterdiği ve belirgin olumsuz fenotipik değişiklikler sergilemediği bildirilmiştir (Shawky vd. 2024)

Külleme hastalığı, birçok bitki türünde olduğu gibi hıyarda da önemli verim kayıplarına neden olan yaygın bir fungal hastalıktır. Bu hastalığa karşı geliştirilen dayanıklı mekanizmalarının genetik temeli oldukça karmaşık olup, çoğunlukla birden fazla genin etkileşimini içermektedir. Özellikle *MLO* gen ailesinin, külleme hastalığına karşı hassaslık ve dayanıklılık süreçlerinde kritik rol oynadığı bilinmektedir (Zhou vd. 2013).

Önceki çalışmalar, *MLO* genlerinin fonksiyon kaybına uğramasının bitkilerde küllemeye karşı dayanıklılığı artırabildiğini ortaya koymuştur. Ancak bu dayanıklılık mekanizmasının yalnızca tek bir sinyal yolu üzerinden işlemediği; hipersensitif hücre ölümü reaksiyonu (HR), hücre duvarı güçlendirmesi ve papilla oluşumu gibi farklı savunma tepkilerinin de sürece dahil olduğu bildirilmiştir (Nie vd. 2015).

Bu kapsamda gerçekleştirilen çalışmalarda, CRISPR-CAS9 gen düzenleme teknolojisi kullanılarak hıyarda *CsaMLO1, CsaMLO8* ve *CsaMLO11* genlerinde hedefli mutasyonlar oluşturulmuştur (Tek vd. 2022). Elde edilen bulgular, bu genlerin bitkinin savunma mekanizmalarını baskılayıcı (negatif düzenleyici) şekilde işlev gördüğünü ve enfeksiyonun farklı aşamalarında farklı roller üstlendiğini göstermektedir (Berg vd. 2015).

Özellikle *CsaMLO8* geninin fonksiyon kaybının, patojenin bitkiye girişini sınırlayan enfeksiyon öncesi savunma mekanizmalarıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, *CsaMLO1* ve *CsaMLO11* genlerinin daha çok enfeksiyon sonrası savunma süreçlerinde etkili olduğu ve bu genlerin birlikte mutasyona uğratılmasının hipersensitif hücre ölümü temelli dayanıklılığı artırabileceği ifade edilmektedir (Serrano vd. 2014).

Sonuç olarak, *MLO* genlerinin farklı üyelerinin külleme hastalığına karşı savunmada özgül roller üstlendiği ve CRISPR-CAS9 gibi modern biyoteknolojik yaklaşımların, bu genlerin hedeflenmesi yoluyla dayanıklı bitki çeşitlerinin geliştirilmesinde önemli bir potansiyele sahip olduğu vurgulanmaktadır (Tek vd. 2022).

CRISPR-CAS9 teknolojisi kullanılarak, yabani domates bitkisinde birden fazla genin (*PSY1, MYB12* ve *SGR1*) aynı anda susturulmasıyla yeşil meyveli hatlar oluşturulmuştur. Daha sonra bu hatlar yabani tip bitkilerle geri çaprazlanarak BC1F1 nesli elde edilmiş, ardından bu bireylerin kendilenmesi ile BC1F2 popülasyonu oluşturulmuştur. Yapılan gen susturma işlemlerinin, meyve verimi ve kalite gibi temel tarımsal özellikler üzerinde belirgin bir değişikliğe yol açmadan, esas olarak meyve pigmentlerinin biyosentezi ve birikimi üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Bu yaklaşımın, farklı genler tarafından kontrol edilen diğer fenotiplerin geliştirilmesinde de uygulanabilir olduğu ve bitki ıslahı açısından önemli bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışma, çoklu gen düzenleme stratejilerinin diğer bahçe bitkilerinin geliştirilmesinde de referans olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Yang vd. 2023).

Bu çalışmada, yabani domateste doğal olarak bulunan ve külleme patojeni *Oidium neolycopersici*'ye dayanıklılık sağlayan *OL-2* mutasyonunu modelleyerek, kültür domateste *SlMLO1* genine yönelik CRISPR/CAS9 tabanlı gRNA tasarımı ve taraması gerçekleştirilmiştir. *SlMLO1* geni 15 ekzon ve 14 intron içerir; mutant *OL-2* formunda 7. ekzon üzerinde 19 bp'lik bir delesyon bulunmakta ve bu çerçeve kayması mutasyonu

proteinin işlevini kaybetmesine yol açmaktadır. Yapısal modelleme, *OL-2* mutant proteininin bazı transmembran ve sitoplazmik bölgelerinin eksik olduğunu göstermektedir; bu da II ve III alanlarının patojene hassaslık için kritik olabileceğini düşündürmektedir. CRISPIR platformu ile 20 CAS9 varyantı için toplam 947 aday gRNA belirlenmiş ve her varyantın en yüksek skorlu üç gRNA'sı olmak üzere 60 gRNA, ileri değerlendirme için seçilmiştir (Prajapati ve Nain 2021).

Domates, dünya genelinde yaygın olarak tüketilen bir sebzedir. Domateste sarı yaprak kıvırcıklığı virüsü (TYLCV) ve *Oidium* türü funguslar, sırasıyla sarı yaprak kıvrıcıklığı ve külleme hastalığına yol açarak ürün verimini düşürmekte ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Birçok ticari domates çeşidi, TYLCV ve küllemeye hassaslığı artıran genleri (*SlPelo* ve *SlMLO1*) taşımaktadır. CRISPR-CAS9 sistemi, bu hassaslık genlerini hedef alarak hastalıklara dayanıklı bitkiler geliştirmek için etkili bir yöntem sunmaktadır. Bu çalışmada, elit domates çeşidi BN-86'da *SlPelo* ve *SlMLO1* genlerine müdahale edilerek çift alelli mutasyonlar oluşturulmuştur. Sonuçlar, *SlPelo* mutantlarında TYLCV birikiminin azaldığını, *SlMLO1* mutant hatlarda ise küllemeye karşı tam dayanıklılık sağlandığını göstermiştir. Bu bulgular, CRISPR-CAS9'un domateste patojenlere dayanıklı çeşitler geliştirmede etkin bir araç olduğunu doğrulamaktadır (Prajapati ve Nain 2021).

CRISPR-CAS9, bitkilerde özellik geliştirmek için güçlü bir araçtır; ancak karpuz ve kavunda mutasyon verimliliğini artırmak zor olmuştur. Bu çalışmada, kavunda f*itoen* d*esatürase (PDS)* genini hedeflemek için dört farklı sgRNA ekspresyon kaseti içeren CRISPR sistemleri tasarlanmıştır. Vektörler *Agrobacterium* aracılığıyla bitkilere aktarılmıştır (Xin vd. 2022). Fenotipik ve genotipik analizler, Pol II promotörü ile yönlendirilen tRNA ve Csy4 ara parçalarına sahip sistemlerin mutasyon verimliliğini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (%25–43). Özellikle, Csy4 sistemi ile üretilen mutasyonların çoğu, iki hedef bölge arasında büyük DNA silinmelerini içermektedir. Karpuzda ise Csy4 sistemi %41 civarında düzenleme verimliliği sağlamış ve fidelerin çoğunda büyük parçalar silinmiştir. Analizler, kavun fidelerinin heterozigot, üç alelli ve kimerik mutasyonlar gösterdiğini, karpuz fidelerinin ise bazı homozigot mutasyonlar içerdiğini ortaya koymuştur. Pol II promotörü kullanımı, Pol III'e kıyasla kavunda CRISPR verimliliğini en çok artırmış ve karpuzda da etkili olmuştur (Wang vd. 2024)

CRISPR-CAS9 sistemi kullanılarak *CaERF28* geninde yapılan tek transkript modifikasyonu, biberde (*C. annuum*) antraknoz dayanıklılığını önemli ölçüde artırmıştır. Bu hastalık, tropikal ve subtropikal bölgelerde verim kaybına yol açan ciddi bir problemdir ve geleneksel yöntemlerle kontrolü sınırlı başarı göstermiştir. Pol II promotörü ile yönlendirilen Cas9-sgRNA-RZ yapısı, Arka Lohit biber genotipinde CaERF28'i hedef almış ve yüksek verimlilikle (%72–86) mutasyon oluşturmuştur. Mutant hatlar homozigot olarak sonraki nesillere aktarılmış, T-DNA ve marker içermeyen hatlarda dayanıklı, spor sayısı ve fungus büyümesinin azalması ile savunma genlerinin indüklenmiş ekspresyonu ile doğrulanmıştır. Bu sonuçlar, CaERF28'in CRISPR tabanlı düzenlemesinin biberde antraknoz dayanıklılık kazandırmada hızlı, güvenli ve etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir (Mishra vd. 2021).

3 MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Bu araştırmada, domateste külleme hastalığına karşı dayanıklılık geliştirme amacıyla seçilen yerli bir domates çeşidine (Komutan) ait ebeveyn hatlar bitkisel materyal olarak kullanılmıştır. Moleküler düzeyde gerçekleştirilen çalışmalarda hedef gen olarak *SlMLO1* geni dikkate alınmış ve bu gene yönelik genomik DNA analizleri yürütülmüştür. Bakteriyel çoğaltım ve klonlama aşamalarında *Escherichia coli* DH5α (Catalog ID:CC-123) ırkından tercih edilmiş, bitki transformasyon uygulamalarında ise *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (AddGene Catalog ID:CC-225) ırkından yararlanılmıştır. CRISPR-CAS9 temelli gen düzenleme çalışmalarında, hedef bölgelere özgü olarak tasarlanan kılavuz RNA (gRNA) dizilerini içeren pHEE401E binari vektör sistemi kullanılmıştır. Moleküler analiz süreçlerinde PCR amplifikasyonu, agaroz jel elektroforezi ve DNA saflaştırma basamakları uygulanmış; bu işlemler için gerekli kimyasal reaktifler ve laboratuvar ekipmanları standart protokollere uygun şekilde kullanılmıştır.

3.1.1 Bitki Materyali

Çalışmada bitki materyali olarak, külleme hastalığına hassas olduğu bilinen ticari kokteyl F1 domates çeşidinin ebeveyn hatları seçilmiştir. Transformasyon uygulamalarında kullanılmak üzere saf hat özelliği taşıyan ebeveynler A (ana) ve B (baba) hatları olarak adlandırılmıştır. İlgili kokteyl domates çeşide ait ebeveyn tohumları temin edilmiş, çimlenme işlemleri kontrollü koşullarda gerçekleştirilmiş ve fide gelişimi sonrasında bitkilerden toplam genomik DNA elde edilmiştir.

3.1.2 Kullanılan Besi ortamları

3.1.2.1 Luria Bertani (LB) Agar Ortamı

Besi ortamı LB moleküler mikrobiyoloji çalışmalarında yaygın olarak tercih edilmektedir. *Escherichia coli*'nin *in-vitro* koşullarında rekombinant suşların elde edilmesinde kullanılan en dikkat çekici bakteri izolatıdır. LB agar besiyerinin hazırlanması amacıyla 10 g Sodyum klorür (NaCl) ,12 g agar, ve 5 g maya özütü hassas terazide ölçümü yapılarak tartılmıştır. Ölçülen maddeler 1 litrelik cam erlene aktarılmış ve karışımın hacmi saf su ilavesiyle toplam 1 litreye çıkarılmıştır. LB agar besiyeri için gereken bileşenler çizelge 3.1 de verilmiştir. Bu çözeltinin pH'sı 7.0'ye ayarlanmıştır. Bu değer 1N NaOH ve 1 N HCL çözeltileri ile istenilen pH aralığının ayarlanma olasılığı vardır. Hazırlanan ortam 121 C°'de 20 dakika otoklav edilerek steril bir şekilde Petri kutularına dökülmüştür. Transformant *Escherichia coli* hücrelerinin çoğaltımı için hazırlanan ortamların içerisine kanamisin antibiyotiği katılarak Petri kaplarına dökülmüştür.

3.1.2.2 LB sıvı Hazırlanışı

Transformasyon aşaması gerçekleştikten sonra kanamisin içeren LB agar ortamında çoğalan *E. coli* bakterilerin PCR ile doğrulaması gerçekleştikten sonra doğru kabul edilen istenilen konsrakta sahip bakteri hücrelerinden tek koloniler seçilerek LB sıvı ortamı içerisinde çoğaltımı sağlanmıştır.

Çizelge 3.1. Luria Bertani (LB) agar besiyeri için gereken bileşenler

İçerik	**Miktar**
NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Maya Özütü (Yeast Extract)	5 g
Agar	12 g
Saf su	1 Litre'ye tamamlanır.

Çizelge 3.2. Ortamlarda kullanılan antibiyotikler ve Yoğunlukları

Antibiyotik Türü	**Kullanım Amacı**	**Çözücü**	**Stok konsantrasyonu(mg/ml)**	**Çalışma konsantrasyonları (mg/L)**
Rifampisin	*Agrobacterium* suşlarının seçilmesi ve kontaminasyonun önlenmesi amacıyla kullanılmıştır.	Methanol	50	25
Kanamisin	Transformasyon sonrası transgenik bitki ve bakterilerin seçilmesi amacıyla kullanılmıştır.	Distile su	50	50

3.1.2.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Bakteri Suşları ve Plasmid

Gen aktarımı çalışmalarında *E. coli* DH5α (AddGene Catalog ID: CC-123) plazmid DNA'sının çoğaltılması, korunması ve klonlanması işlemlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılmış olup, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Catalog ID:CC-225) bakteri ırkları rekombinant plazmidin bitki hücrelerine aktarılmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Gen klonlama ve transformasyon işlemlerinde pHEE401E plazmidi (Addgene ID:71287) CRISPR-CAS9 sistemini bitkiye taşımak için kullanılmıştır. Hedef gene ait sgRNA dizilerini ve CAS9 proteinini içerdiği için bitkide gen düzenleme yapılmasını sağlamaktadır.

3.1.2.4 Kimyasallar ve Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar EK 1'de gösterilirken çalışmalarda kullanılan cihazlar EK 2'de gösterilmiştir.

3.2 METOT

3.2.1 Domates Bitkisinden DNA izolasyonu

Domates bitkisinden genomik DNA izolasyonu için CTAB yöntemi uygulanmıştır. CTAB'nin açılımı Cetyltrimethylammonium Bromide olup, bitki dokularından yüksek saflıkta DNA elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan etkili bir yöntemdir. Bitki hücreleri kalın bir hücre duvarına sahiptir ve yüksek oranda polisakkarit ile fenolik bileşik içermektedir. Bu maddeler DNA saflaştırma işlemini zorlaştırmaktadır. CTAB yöntemi, bu istenmeyen bileşenleri uzaklaştırarak kaliteli ve saf DNA elde edilmesini sağlamaktadır(Aboul-Maaty ve Oraby, 2019).

Toplam nükleik asit izolasyonu için hazırlanan CTAB çözeltisi, her 5 mL için 25 µL β-merkaptopetanol içerecek şekilde hazırlanmıştır. Kullanılacak örnek sayısına göre gerekli hacim hesaplanarak CTAB çözeltisi her seferde taze olarak hazırlanmıştır. DNA izolasyonunda takip edilen aşamalar aşağıda verilmiştir.

1- Öğütülecek bitki örnekleri Ependorf tüplere yaklaşık 100 mg olacak şekilde alınmış ve her tüpe 150 µL CTAB tamponu eklenerek örnekler ezilmiştir.

2- Homojen hale gelen örneklere 350 µL daha CTAB tamponu eklenmiş ve toplam hacim 500 µL olacak şekilde tamamlanmıştır.

3- Tüpler 65 °C termomikserde 1–2 saat inkübe edilmiştir.

4- Toplam hacim 500 µL olduğu için tüplere eşit hacimde (500 µL) kloroform eklenmiş ve 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

5- Santrifüj sonrası oluşan üst faz (süpernatant) dikkatlice alınarak yeni ependorf tüplere aktarılmıştır.

6- Alınan süpernatant hacmi kadar izopropanol ilave edilmiştir.

7- Numuneler, DNA çökelmesini sağlamak amacıyla –20 °C'de bir gece bekletilmiştir.

8- Numuneler ertesi gün 13.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

9- Tüplere 500 µL soğuk %70 etanol ilave edilmiştir.

10- Örnekler 13.000 rpm'de 5 dakika tekrar santrifüj edilmiş ve tüp içerisindeki sıvı tamamen uzaklaştırılmıştır.

11- Ethanolün tamamen uçması için tüpler 40–60 dakika boyunca kurutma kâğıdı üzerinde oda sıcaklığında bekletilmiştir.

12- Kuruyan peletler çözdürülmek üzere her tüpe 50–150 µL steril saf su eklenmiştir. Elde edilen DNA lar -20 ºC derin dondurucuda kullanılıncaya kadar saklanmaktadır.

3.2.2 *SlMLO1* Genlerinin Domates Bitkisinde Doğrulanması

Domates bitkisinde *Oidium lycopersici* etmenine karşı hassaslık faktörleri ile ilişkili olan *SlMLO* genleri geniş bir literatür taraması sonucunda belirlenmiştir. National Center for Biotechnology Information (NCBI) sisteminde sırasıyla NC-090803.1 accession no ile tanımlanan bu genlere ait genomik sekanslar elde edilmiştir.

Optimum erime sıcaklığına ve %GC'ye sahip primerler çalışmamızda kullanım için araştırılmıştır. Bu primerler daha sonra 100 µM (0.1 nmol/ul) primer stokları elde etmek için saf suda çözdürülmüştür. Daha sonra, 100 µM primer stoklarının 1: 10 oranında seyreltilmesiyle 10 µM konsantrasyonda çalışma primerleri ortaya çıkarılmıştır. Dizayn edilen bu primerlerle PCR işlemi gerçekleştirilmiş olup bu işlemler sırasında *MLO*/F 5'-AATGCAGATAATATTGCTAGTTGGC-3' ve *MLO*/R 5'-AGGGTACCTGAAAGAGTACAAAGTT-3' primer çiftleri kullanılmıştır. Burada PCR ürünleri sekanslama için kullanılacağından PCR solüsyonunun toplam hacmi 10.5 µl olarak hesap edilmiştir (Green vd. 2019).

DNA izolasyonu yapılan örneklerde istediğimiz gen bölgesini taşıyıp taşımadığının tespiti için tasarlanan primerler ile PCR kurulmuştur. Bu PCR ürünleri sekanslama için kullanılacağından PCR solüsyonunun toplam hacmi 50 µl olarak hesaplanmıştır. Bu primer çiftleri PCR sonrası agaroz jelde yürütülerek istenilen gen bölgelerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. PCR bileşenleri ve hacimleri çizelge 3.3 'de gösterilmiştir. PCR reaksiyonunun koşulları çizelge 3.4 'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Polimeraz Zincir Amplifikasyonları için kullanılan sarf bileşenleri ve hacimleri

PCR Bileşenleri	Eklenen Hacimler
Xpert Fast Hotstart Mastermix(2x) with dye	6.25µl
Forward primer	1.00 µl
Reverse primer	1.00 µl
Su	2.25 µl
Kalıp DNA	2.00 µl
Toplam	10.50 µl

Çizelge 3.4. PCR amplifikasyonu koşulları

Aşama	**Ön Denaturasyon**	**Denaturasyon**	**Annealing (Bağlanma)**	**Extension (Uzama)**	**Son Uzama**
Sıcaklık	95 ºC	95 ºC	59 ºC	72 ºC	72 ºC
Süre(dk)	3 dk	15 sn	15 sn	15 sn	3 dk
Döngü Sayısı	1	× 30			1

Çizelge 3.5. *SlMLO* genlerine ait gen bölgelerinin kokteyl domates çeşidinde varlığını ortaya koyabilmek için dizayn edilen spesifik primer dizilimleri

Primer	**Beklenen Tm Değeri**	**Ürün Boyutu (Bp)**
MLO/R	59 ºC	200
MLO/F		

3.2.3 gRNA Tasarımı ve Konstrakt Oluşturulması

Bu çalışmada, *SlMLO* genlerinin CRISPR-CAS9 sistemi ile hedefe yönelik olarak düzenlenebilmesi için öncelikle uygun kılavuz RNA (sgRNA) dizileri belirlenmiştir. Tasarlanan bu diziler temel alınarak gen aktarımında kullanılacak vektör sistemleri oluşturulmuştur. Rekombinant DNA yapılarının elde edilmesinde GoldenGate klonlama yaklaşımı tercih edilmiştir. Elde edilen plazmid konstraktları başlangıçta *Escherichia coli* hücrelerine aktarılmış ve burada çoğaltılarak doğrulanmıştır. Doğrulama işlemlerinin ardından uygun bulunan yapılar, bitki transformasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere *Agrobacterium* türlerine transfer edilmiştir. Bu süreçler, çalışmanın moleküler düzeyde yürütülen temel metodolojik basamaklarını oluşturmaktadır.

3.2.3.1 gRNA Tasarımı

Bu çalışmada hedef gen olan *SlMLO1*'ye ait referans dizisi, Phytozome v14 veri tabanından Solyc04G001288 erişim numarası kullanılarak temin edilmiştir. Kromozom 4 üzerinde konumlanan bu gene ait dizide, ekzon bölgeleri belirlenerek işaretlenmiştir

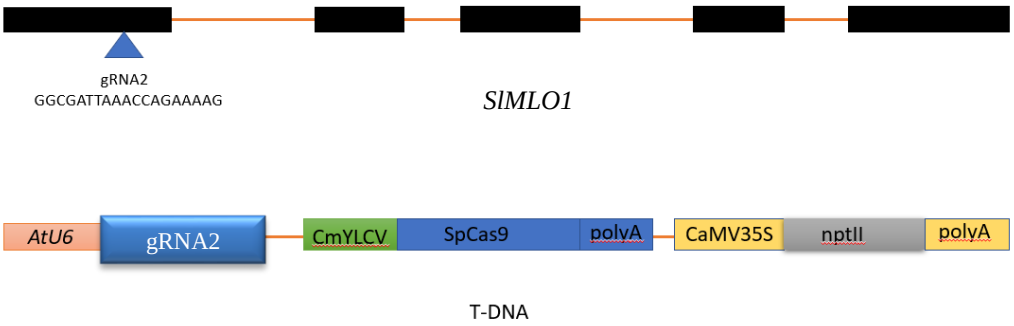
Elde edilen nükleotid dizisi, kılavuz RNA tasarımı amacıyla Benchling CRISPR analiz platformuna yüklenmiştir. Oluşturulan aday gRNA dizileri; ilk ekzona yönelmesi, yüksek hedefleme doğruluğu (on-target skoru), düşük olası yan hedef etkisi (off-target) ve uygun serbest enerji değerlerine sahip olması gibi kriterler dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda seçilen gRNA dizileri çizelge 3.6 'da sunulmuştur (Hsu vd. 2013).

Çizelge 3.6. Dizayn edilen gRNA dizilimleri, On-Target, Off-Target analiz sonuçları ve *SlMLO1* üzerindeki pozisyonları. Ok işareti yönleri gRNA yönünü işaret etmektedir

gRNA	Dizilim	Gen Üzerindeki Pozisyon
gRNA2	GGCGATTAAACCAGAAAAG	126-145
On-Target	46.2	
Off-Target	54.1	

3.2.3.2 CRISPR/CAS9 Vektörünün Elde Edilmesi

SlMLO1 geninde CRISPR-CAS9 yöntemiyle, mutasyon oluşumunu teşvik etmek için gerekli bileşenleri içeren vektör klonlama yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Weber et al., 2011). Seçilen gRNA'ler *BsaI* tanıma bölgesi eklenerek hem sense hem de antisense olacak şekilde sentezleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu sentetik oligonükleotidler birbirinin komplementer dizilerine sahip olmuştur ve diziler 1 µM olacak şekilde seyreltikten sonra aynı tüpte birleştirilmiştir. Bu sayede tek sarmallı gRNA oligonükleotidleri, çift sarmallı hale getirilmiştir. Bu işlem her bir gRNA için de yapılmıştır. Daha sonra bu diziler, gRNA uyumlu giriş plazmidine aynı enzim ile aktarılmıştır. GoldenGate klonlama reaksiyonlarının optimizasyonu amacıyla farklı enzim ve DNA konsantrasyonları denenmiştir. Yapılan ön denemeler sonucunda en yüksek klonlama veriminin elde edildiği reaksiyon koşulları belirlenmiş ve sonraki çalışmalarda bu koşullar kullanılmıştır. Reaksiyon için, 1 µL gRNA, 1 µL gRNA uyumlu plazmid (80 ng/µL), 1.5 µL T4 DNA ligase buffer, 1 µL T4 DNA ligase, 1.5 µL bsaI, 8 µL nükleaz içermeyen su kullanılmıştır. Reaksiyon sırasıyla, 37 C'de 3 dakika, 16 C'de 5 dakika olacak şekilde 40 döngü ve 80 C'de 5 dakika enzim inaktivasyonu için thermocycler da inkübe edilmiştir. Elde edilen GoldenGate ürünü *E. coli* DH5a içerisinde heatshock yöntemiyle daha önce tarif edildiği gibi aktarılmıştır (Froger ve Hall 2007). Daha sonra hücreler 50 µg/ml Kanamisin ve mavi/beyaz taramayla seçilmiştir. Plazmidler, beyaz hücrelerin seçilip sıvı LB besiyerinde çoğaltılması sonrasında izole edilmiştir. Bu sayede AtU6:gRNA1: gRNA1 yapısı elde edilmiştir. Daha sonra gRNA ifade kaseti, CmYLCV: CAS9: polyA ve CaMV35S: nptII:polyA kasetleriyle, GoldenGate klonlama yöntemiyle birleştirilmiştir. Bu işlem için aynı reaksiyon bu plazmidler ile kurulup klonlama işleminde *BsaI* enzimi kullanılmıştır. Elde edilen ligasyon ürünü DH5α'da çoğaltılıp, plazmid izole edildikten sonra kesim enzimi ve NGS ile doğrulanmıştır. Elde edilecek T-DNA yapısı Şekil 3.1'de gösterilmiştir (Engler vd. 2014).



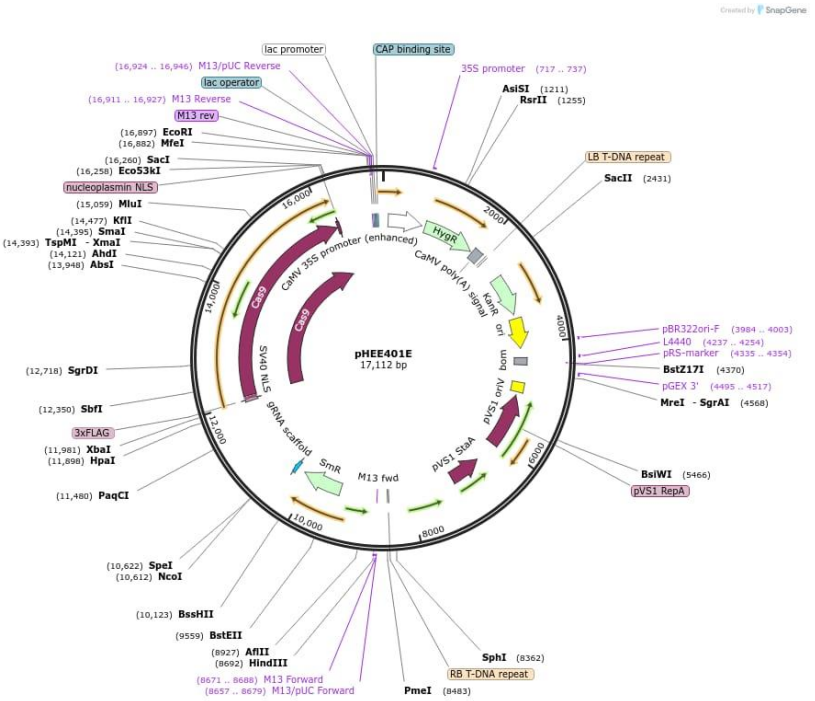
Şekil 3.1. *SlMLO1* geninin şematize edilmiş hali ve bu geni hedeflemek için oluşturulan CRISPR-CAS9 gen düzenleme sistemine yerleştirilen T-DNA yapısı. AtU6: *Arabidopsis thaliana* promoterı, gRNA2: Rehber RNA2 sekansı, CmYLCV: Cestrum yellow leaf curling virus (CmYLCV) promoterı genellikle doku kültür için tercih edilir, SpCas9: Plazmid içerisindeki CAS9 sekansı, polyA: polyadenylation sekansı, CaMV35S: Cauliflower mosaic virus 35 S promoterı, nptII: seçici marker olarak neomycin phosphotransferase II geninden oluşmaktadır.

Çizelge 3.7. gRNA hedef bölgelerinin doğrulanması amacıyla, ilgili gen bölgelerine özgü primerler tasarlanmıştır. Bu primerlere ait dizilimler, beklenen erime sıcaklıkları (Melting Temperature: Tm) ve amplifikasyon sonucu oluşması öngörülen ürün boyutları

Primer	**pHEE401E -F**	**pHEE401E -R**
Beklenen Tm Değeri	59 °C	59 °C
Ürün Boyutu (Bp)	574	574
Kullanım Amacı	pHEE401E plazmidinin ligasyon sonrası kontrolü	pHEE401E plazmidinin ligasyon sonrası kontrolü

3.2.3.3 Plazmid Hakkında Temel Bilgiler

Bu çalışmada, ticari olarak temin edilen pHEE401E (Addgene ID:71287) binari vektörü kullanılmıştır. Söz konusu plazmid, daha önce *E. coli* DH5α ırklarına aktarılmıştır. Transformasyon sonrası elde edilen bakteriyel hücreler, uygun konsantrasyonlarda antibiyotik içeren LB besiyerinde çoğaltılarak kültüre edilmiştir. Çalışmada kullanılan plazmid, SnapGene yazılımı kullanılarak tasarlanmış ve hedef gen bölgelerine özgü rehber RNA (gRNA) dizileri plazmid yapısına entegre edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *SlMLO* gen bölgelerini hedeflemek üzere tasarlanmış gRNA aktarılacağı pHEE401E vektörüne ait fiziksel yapı şeması.

3.3 GoldenGate Reaksiyonu

Çizelge 3.8'de belirtilen PCR bileşenleri kullanılarak gRNA hedef bölgesi amplifiye edilmiştir. Bu basamağın temel amacı, gRNA dizilerinin plazmid vektöre aktarımına uygun hale getirilmesidir. *SlMLO* 1-1F ve *SlMLO* 1-1C primerleri tek iplikli yapıda olduklarından, bu işlem sırasında sentetik oligonükleotidlerin birbirine tamamlayıcı diziler oluşturması sağlanmıştır. Her iki primer 1 µM olacak şekilde seyreltilmiş ve aynı tüp içerisinde birleştirilmiştir. Böylece tek zincirli gRNA oligonükleotidleri çift zincirli forma dönüştürülmüştür. Primerlerden her biri 1 µl alınarak 48 µl saf su ile karıştırılmış ve karışım 95°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, çift sarmal oluşumunun tamamlanması amacıyla oda sıcaklığında yaklaşık 20 dakika bekletilmiştir (Nekrasov vd. 2017).

Çizelge 3.8. GoldenGate klonlama reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve reaksiyon hacimleri

Kompotentler	**Su**	**Oligo**	**T4 Ligase buffer**	**T4 Ligase**	**Kesim Enzimi Bsa1**	**Plazmid**
Hacimler	5,50 µl	2.00 µl	0.50 µl	0.50 µl	0.50 µl	1.00 µl

Çizelge 3.9. GoldenGate reaksiyonu'nun döngü koşulları

Sıcaklık	37 °C	16 °C	37 °C	80 °C
Zaman	7 dk	5 dk	7 dk	10 dk
Döngü	×35			

3.4 Heat-shock ile Plasmidin *E.coli* DH5α'ya aktarılması

Bu işlemin amacı, GoldenGate klonlama yöntemi ile elde edilen ve promotör, gRNA ile terminatör bölgelerini içeren rekombinant pHEE401E plazmidinin çoğaltılmasıdır. Bu kapsamda, GoldenGate reaksiyonu sonucunda elde edilen plazmid DNA ile 100 µl kompetent *E.coli* hücreleri buz üzerinde çözdürülmüştür. PCR işlemi sonrası elde edilen plazmid DNA'nın tamamı transformasyon için kullanılmıştır. Kompetent hücreler çözdürüldükten sonra plazmid DNA ile 1,5 ml'lik steril Ependorf tüplerinde karıştırılmış ve buz üzerinde yaklaşık 25 dakika inkübe edilmiştir. Ardından hücreler 42 °C'de 30 saniye süreyle ısı şokuna tabi tutulmuş ve hemen sonrasında tekrar buz üzerinde 5 dakika bekletilmiştir. Isı şoku sonrasında tüplere aseptik koşullarda 900 µl LB sıvı besiyeri eklenmiş ve hücreler 37 °C'de, 300 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde 1,5–2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Üst fazın yaklaşık 900 µl'lik kısmı uzaklaştırılmış ve pelet yeniden süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu, kanamisin içeren LB agar besiyerlerine yayma yöntemi ile ekilmiş ve petriler ters çevrilerek 37 °C'de 16–24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Green vd. 2020).

3.5 Koloni PCR

Isı şoku (heat-shock) yöntemi ile plazmid aktarımı gerçekleştirilen hücrelerin ekildiği petriler, bir gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün oluşan koloniler gözlemlenmiş ve transformasyonun doğrulanması amacıyla koloni PCR analizi uygulanmıştır.

Çizelge 3.10. Koloni PCR bileşenleri ve hacimleri

PCR Bileşenleri	**Xpert Fast Hotstart Mastermix (2x) with dye**	**Su**	**Forward primer**	**Reverse primer**	**Koloni**	**Toplam**
Eklenen Hacimler	6.25µl	2.25 µl	1.00 µl	1.00 µl	2.00 µl	10.50 µl

Koloni PCR analizi sonucunda doğrulanan pozitif koloniler, petrilerden steril pipet ucu yardımıyla alınarak falkon tüplerine aktarılmıştır. Bu koloniler, 5 mL LB sıvı besiyeri ve 5 µl kanamisin antibiyotiği içeren ortamlarda kültüre edilerek 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jel elektroforezinde 70 V'de yürütülmüş ve hedef DNA bantlarının varlığı doğrulanmıştır. Jel elektroforezi sonucunda beklenen büyüklükte bant veren koloniler arasından seçilen uygun koloni, 100 µl'lik steril pipet ucu yardımıyla alınarak 5 mL LB besiyeri ve 5 µl kanamisin (50 mg/mL) içeren ortama inoküle edilmiştir. Kültürler, 37 °C'de 300 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde 12–16 saat büyütülmüştür.

Çizelge 3.11. PCR amplifikasyonu için kullanılan koşullar

Sıcaklık	**95 °C**	**95 °C**	**59 °C**	**72 °C**	**72 °C**	**4 °C**
Süre (Dk)	3 dk	15 sn	15 sn	15 sn	3 dk	∞
Döngü Sayısı	1	×30			1	1

3.6 Plazmid izolasyonu

Plazmid izolasyonu, bakteriler içerisinde bulunan plazmid DNA'sının saf ve kullanılabilir şekilde elde edilmesi amacıyla gerçekleştirilen bir işlemdir. Bu işlem sırasında bakteriyel hücreler parçalanarak plazmid DNA genomik DNA ve diğer hücresel bileşenlerden ayrılır. Elde edilen plazmid DNA, moleküler biyoloji çalışmalarında klonlama, PCR, sekanslama ve gen aktarımı gibi uygulamalarda kullanılmaktadır (Birnboim vd. 1979).

1) Falkon tüplerde çoğaltılan plazmid içeren *E. coli* kültürleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj işlemi sonucunda bakteriyel hücreler tüpün dibinde pelet (çökelti) formunda toplanır.

2) Supernatant atılır.

3) Pelet üzerine 250 µL Resuspension Solution eklenir ve hücrelerin tamamen süspanse olması için vortex ile homojenizasyon sağlanır.

4) 250 µL Lysis Solution eklenir ve hücrelerin tamamen parçalanmasını sağlamak amacıyla tüp 4–6 kez nazikçe ters çevrilerek karıştırılır.

5) 350 µL Neutralization Solution eklenir ve karışımın homojen hale gelmesi için tüp nazikçe karıştırılır. Ardından süspansiyon ependorf tüplere aktarılır ve çökelmenin tam olarak gerçekleşmesi için bekletilir.

6) 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapılır.

7) Santrifüj işlemi sonrası elde edilen süpernatant, özel filtreli ependorf tüplere aktarılır ve filtrasyon işleminin gerçekleşmesi sağlanır.

8) 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj uygulanır. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant filtre membranından geçerek alt tüpte toplanır.

9) 500 µL Wash Solution tüplere ilave edilir ve 1 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası filtrenin alt kısmında biriken sıvı uzaklaştırılır.

10) Tekrar 500 µl Wash solition tüplere ilave edilir.1 dk santrifüj yapılır.

11) 50 µL Elution Buffer eklenir ve 2 dakika beklenir. Ardından 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılır.

12) Bu aşamadan sonra filtreli kısım atılır ve alt tüpte toplanan sıvı kullanılarak sonraki işlemler gerçekleştirilir.

13) Qubit cihazı ile yoğunlukları ölçülmüştür

Plazmid izolasyonunun ardından elde edilen DNA'nın doğruluğunu kontrol etmek amacıyla tekrar PCR analizi yapılır. Elde edilen ürünler, bir teknoloji firmasından hizmet alınarak Sanger sekanslama yöntemi ile dizilemeye gönderilir. Sekans analiz sonuçları değerlendirildiğinde, hedef insertlerin plazmid içerisine doğru şekilde klonlandığı doğrulanmıştır.

3.7 *Agrobacterium* EHA105 Bakterisi Aracılığı ile Gen Aktarımı

3.7.1 *Agrobacterium tumefaciens* competent cell hazırlama ve elektroporasyonu işlemi

E. coli'de çoğaltılan ve sekanslama ile doğrulanan konstrakt, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ırkına elektroporasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Bu işlem

öncesinde EHA105 ırkına ait kompetent hücrelerin hazırlanması için aşağıdaki protokol uygulanmıştır (Wise vd. 2006).

Kompetent *A. tumefaciens* hatlarının elde edilmesi amacıyla, 50 mg/L rifampisin içeren LB agar besiyerine ekim yapılmış ve 28 °C'de inkübasyon sonucunda koloniler geliştirilmiştir. Elde edilen kolonilerden tek koloni seçilerek, yine rifampisin içeren 10 mL sıvı LB besiyerine sahip 50 mL Falcon tüpe aktarılmış ve 28°C'de bir gece boyunca çalkalamalı inkübasyonda çoğaltılmıştır.

Bu kültürden 5 mL alınarak 50 mL LB besiyeri içeren 300 mL'lik erlene aktarılmış ve uygun inkübasyon koşullarında OD_{600} = 0.4 Absorbans değerine ulaşıncaya kadar yaklaşık 2–3 saat boyunca hücrelerin çoğalması sağlanmıştır. Hücreler daha sonra 50 mL'lik Falcon tüplere aktarılmış ve buz üzerinde 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 4 °C'de 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Oluşan bakteri peletleri 10 mL 0.1 M $CaCl_2$ çözeltisi içerisinde yeniden süspanse edilmiş ve buz üzerinde 30 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin ardından tekrar santrifüj işlemi uygulanmış ve hücreler 2 ml soğuk 0.1 M $CaCl_2$ ve %15 gliserol içeren çözeltide yeniden süspanse edilmiştir. Son aşamada hücre süspansiyonu 1.5 mL'lik Ependorf tüplerine 50 µL olacak şekilde paylaştırılmış ve ileride kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7.2 Elektroporasyon ile Plasmidin Elektrokompatent *Agrobacterium* EHA105 Irkına Aktarılması

Elektroporasyon yöntemi ile *A.* tumefaciens *EHA105* ırkına aktarılacak olan pHEE401E plazmidi, transformasyon öncesinde spektrofotometre kullanılarak 60 ng/µl konsantrasyona ayarlanmıştır. Bu işlem öncesinde, *Agrobacterium tuemefaciens EHA105* kompetan hücre eldesi için ilgili protokol uygulanmıştır.

Hazırlanan *A. tumefaciens* kültürleri -80 °C'de saklandıktan sonra kullanım öncesinde buz üzerinde çözdürülmüştür.

GoldenGate klonlama yöntemi ile elde edilen pHEE401E plazmidi, steril 1.5 ml'lik Ependorf tüplerine 10 µl hacminde aktarılmış ve elektroporasyon işlemi öncesine kadar buz üzerinde muhafaza edilmiştir.

Buz üzerinde tutulan 40 µl elektrokompetan *Agrobacterium tumefaciens EHA105* hücre süspansiyonu, 10 µl plazmid içeren ependorf tüpüne ilave edilerek toplam hacim 50 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Hazırlanan hücre süspansiyonu, elektroporasyon işlemi için küvete aktarılmıştır.

Süspansiyon, elektrotların bulunduğu elektroporasyon küvetine hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice yerleştirilmiş ve küvetin kapağı kapatılmıştır. Küvetin dış yüzeyi kurulanarak Biorad marka Gene Pulser Xcell cihazının elektroporasyon haznesine yerleştirilmiştir. 4 milisaniye süre ve 2.5 kV gerilim değerleri uygulanarak

elektroporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrasında küvet içerisine 950 µl LB Broth eklenmiş ve hücre süspansiyonu steril kabin içerisinde ependorf tüpe aktarılmıştır.

Ependorf tüp 28 °C'de çalkalayıcı inkübatörde 2–3 saat inkübe edilmiştir. Ardından 12.000 rpm'de 1,5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj sonrası oluşan süpernatantın 700 µl'si steril kabin içerisinde uzaklaştırılmış, kalan hacim içerisindeki pelet dikkatlice resüspanse edilmiştir.

Kanamisin (50 mg/L) ve rifampisin (25 mg/L) içeren LB agar besiyerlerine her bir örnekten 100 µl olacak şekilde ekim yapılmış ve plaklar 28 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Yeterli koloni büyüklüğüne ulaşan koloniler, steril pipet ucu yardımıyla alınarak kanamisin (50 mg/L) ve rifampisin (25 mg/L) içeren 5 ml LB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. PCR ile doğrulaması yapılan koloniler, 37 °C'de 12–16 saat boyunca 225 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

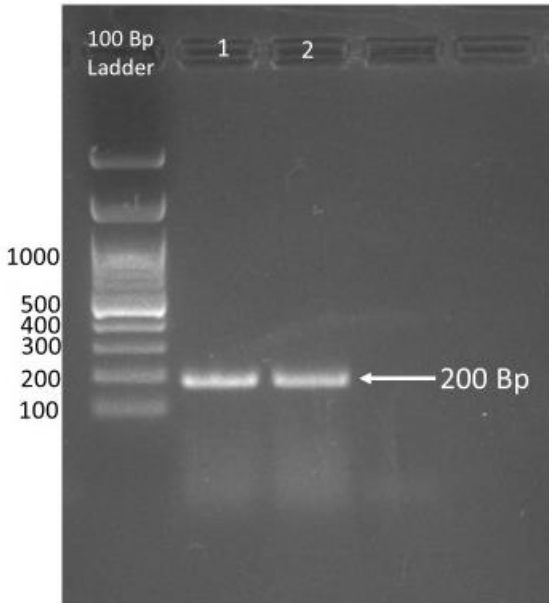
Uzun süreli saklama amacıyla kültürün OD600 değeri 0.6 hücre yoğunluğuna ulaşıncaya kadar spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Ardından 500 µl kültür ile 500 µl %40 (v/v) steril gliserol karıştırılarak 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmış ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Elektroporasyon işlemi sonrasında, transformant plazmidin *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ırkına başarılı bir şekilde aktarılıp aktarılmadığını doğrulamak amacıyla pHEE401E/F ve pHEE401E/R primer çiftleri kullanılarak koloni PCR analizi gerçekleştirilmiştir.

4 BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 *SlMLO* Genlerinin Domates Bitkisinde Doğrulanması

Geniş kapsamlı literatür taraması sonucunda belirlenen *SlMLO* genlerinin, tez çalışmasında kullanılan F1 ticari kokteyl domates çeşidinin hem anne hem de baba hatlarında bulunup bulunmadığını ve tasarlanan gRNA dizilerinin hedef bölgelerini doğrulamak amacıyla PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. NCBI veri tabanından elde edilen NC_090803.1 accession numarasına sahip genomik sekanslar temel alınarak, ilgili genlere özgü primerler tasarlanmış ve belirlenen PCR koşulları ile reaksiyonlar kurulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri %1,5 agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiş ve bu gen için yaklaşık 200 bp büyüklüğünde bantlar gözlenmiştir (Şekil 4.1). Böylece ilgili genlerin hem anne hem de baba hatlarında varlığı doğrulanmıştır. PCR ürünleri 50 µl hacime ayarlanarak biyoteknoloji firmasına gönderilmiş ve Sanger sekanslama yöntemi ile dizileme sonuçları temin edilmiştir. Elde edilen sekans verileri doğrultusunda, çalışmada kullanılacak gRNA hedef bölgeleri netleştirilmiştir.



Şekil 4.1. F1 domates çeşidinin ana (1) ve baba (2) ebeveyn hatlarında *SlMLO* gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR analizi sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. PCR amplifikasyonu sonucunda hedef gen bölgelerine karşılık 200 Bp büyüklüğünde *MLO1* geninin varlığı her iki ebeveyn hattında ortaya konmuştur.

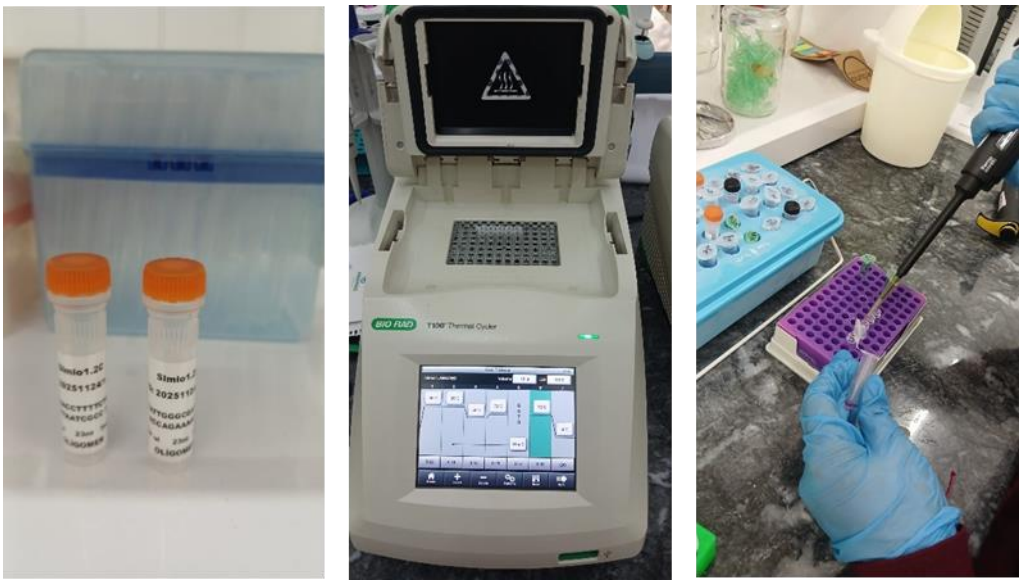
Bu çalışma kapsamında, elde edilen gen dizileri NCBI veri tabanında yer alan referans sekanslarla karşılaştırılarak olası tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) açısından değerlendirilmiştir. Sanger sekanslama sonuçlarına göre analiz edilen bölgelerde herhangi bir SNP veya dizilim varyasyonu tespit edilmemiştir. Bu bulgular, *SlMLO* gen dizilerinin NCBI veri tabanındaki referans dizilerle uyumlu olduğunu göstermektedir. CRISPR-CAS9 çalışmalarında, gRNA'ların hedef DNA bölgelerine doğru ve özgül şekilde bağlanmasının doğrulanması, CAS9 aracılı kesim etkinliği ve sistemin özgüllüğünün güvence altına alınması açısından kritik bir kalite kontrol aşamasıdır. Bu nedenle, hedef bölgelerin sekans düzeyinde doğrulanması deneysel sürecin önemli bir

parçası olarak gerçekleştirilmiştir. Nitekim ana ve baba hatlardan elde edilen DNA sekansları içerisindeki *SlMLO* geninin (Şekil 3.1) varlığı ortaya konmuş burada uygun rehber, hedef RNA lar ile palindromik sekans belirlenmiştir.

Bu çalışmada hedef gen bölgelerinde herhangi bir varyasyonun tespit edilmemesi, tasarlanan gRNA dizilerinin her iki ebeveyn hattında da özgül olarak bağlanabileceğini ve elde edilecek mutasyonların CRISPR-CAS9 sistemine bağlı olarak oluşacağını göstermektedir. Ayrıca *SlMLO* gen dizilerinin referans genom ile tam uyum göstermesi, CRISPR-CAS9 aracılığıyla bu genlerin hedeflenmesinin güvenilirliğini artırmakta ve ilerleyen generasyonlarda elde edilecek fenotipik değişimlerin daha doğru şekilde yorumlanmasına olanak sağlamaktadır.

4.2 GoldenGate© Reaksiyonu

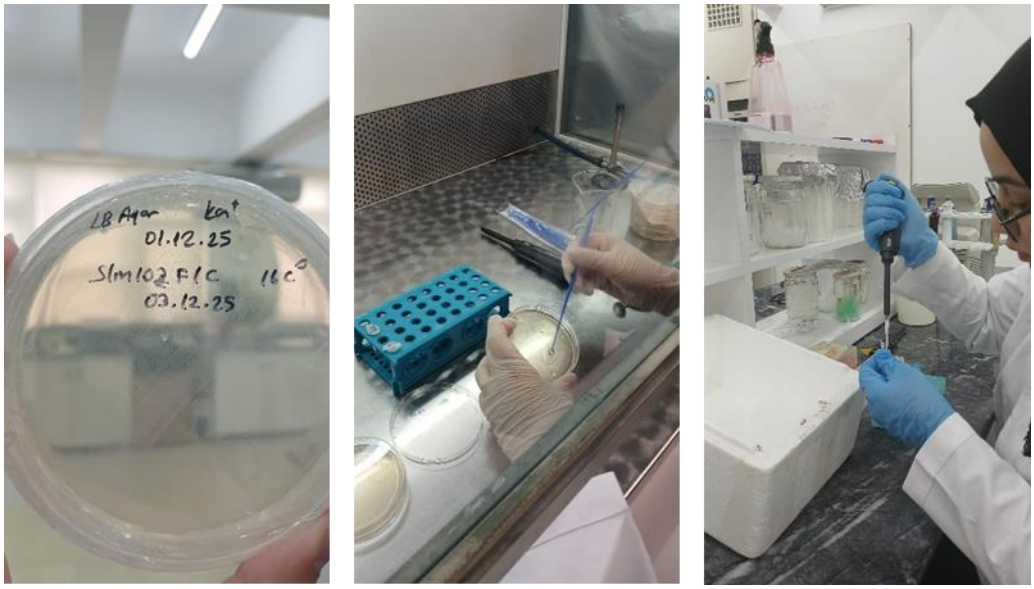
Yukarıda belirtilen koşullar ve konsantrasyonlar doğrultusunda GoldenGate klonlama reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşama, CRISPR-CAS9 sisteminin etkinliği açısından kritik bir basamak olarak değerlendirilmektedir. Çalışmada GoldenGate klonlama yöntemi kullanılarak çoklu gRNA dizilerinin uygun bir konstrüksiyon içerisinde başarıyla birleştirildiği belirlenmiştir. İlk aşamada, *SlMLO* 1-2F ve *SlMLO* 1-2C primerleri tek sarmallı yapıda olduklarından, gerçekleştirilen işlem ile sentetik oligonükleotitlerin birbirine komplementer hale gelmesi sağlanmıştır. PCR reaksiyon karışımı; 5.5 µl saf su, 1 µl plazmid DNA, 2 µl oligonükleotit, 0.5 µl T4 ligaz tamponu, 0.5 µl restriksiyon enzimi ve 0.5 µl T4 ligaz enzimi içerecek şekilde hazırlanmış ve uygun PCR koşullarında reaksiyon yürütülmüştür. Reaksiyon sonucunda hedef *SlMLO* genine yönelik gRNA dizilerini taşıyan CRISPR-CAS9 konstrüksiyonu elde edilmiştir. Elde edilen bu konstrüksiyonlar, çalışmanın sonraki basamaklarında kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.



Şekil 4.2. GoldenGate klonlama yöntemi aşamaları

4.3 Heat-shock ile Plasmidin *E.coli* DH5α'ya Aktarılması

GoldenGate klonlama reaksiyonu sonucunda elde edilen rekombinant plazmid, ısı şoku (heat-shock) yöntemi kullanılarak *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon işlemine geçilmeden önce, bakteri hücrelerinin seçilimi için kullanılacak olan kanamisin antibiyotiğinin etkinliği belirli koşullar altında test edilerek doğrulanmıştır. Transformasyon sonrasında, pHEE401E plazmidini taşıyan hücreler kanamisine karşı dayanıklılık kazandığından, yalnızca bu plazmidi başarıyla almış bakteriler seçici besiyerinde gelişim gösterebilmiştir. Kanamisin içeren LB agar ortamında gözlenen koloni oluşumu, plazmidin bakteriye başarılı bir şekilde aktarıldığını ve ekspresyon için uygun şekilde taşındığını göstermektedir.



Şekil 4.3. Isı şoku (heat-shock) transformasyonu sonrası kanamisin içeren LB besi ortamında gelişen, pHEE401E plazmidini taşıyan *E. coli* DH5α kolonileri

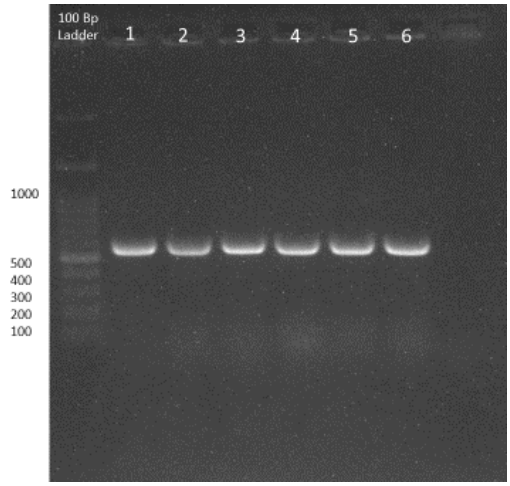
Isı şoku (heat-shock) transformasyonu sonrasında, pHEE401E plazmidinin kanamisin dayanıklılık geni taşıması sayesinde yalnızca bu plazmidi içeren transformant hücrelerin kanamisin ilaveli LB agar ortamında çoğalabildiği gözlemlenmiştir. Bu durum, plazmidin *E. coli* DH5α hücrelerine doğru ve kararlı bir şekilde aktarıldığını göstermektedir. DH5α ırkının düşük rekombinasyon aktivitesine sahip olması ve yüksek plazmid stabilitesi sunması, klonlama sonrası plazmid çoğaltımında bu ırkın tercih edilmesinin başlıca nedenlerinden biridir.

Sonuç olarak, GoldenGate klonlama ile elde edilen pHEE401E plazmidinin *E. coli* DH5α hücrelerine başarılı bir şekilde transfer edilmesi hem klonlama aşamasının hem de transformasyon sürecinin etkinliğini ortaya koymaktadır. Elde edilen transformant koloniler, sonraki aşamalarda gerçekleştirilecek plazmid izolasyonu, restriksiyon analizi ve sekans doğrulama çalışmaları için güvenilir ve uygun bir başlangıç materyali oluşturmaktadır.

Elde edilen bulgular, çoklu gRNA içeren kompleks CRISPR-CAS9 konstrüksiyonlarının bakteriyel sistemlerde çoğaltılmasında heat-shock transformasyon yönteminin etkili ve tekrarlanabilir bir yöntem olduğunu göstermektedir.

4.4 Koloni PCR

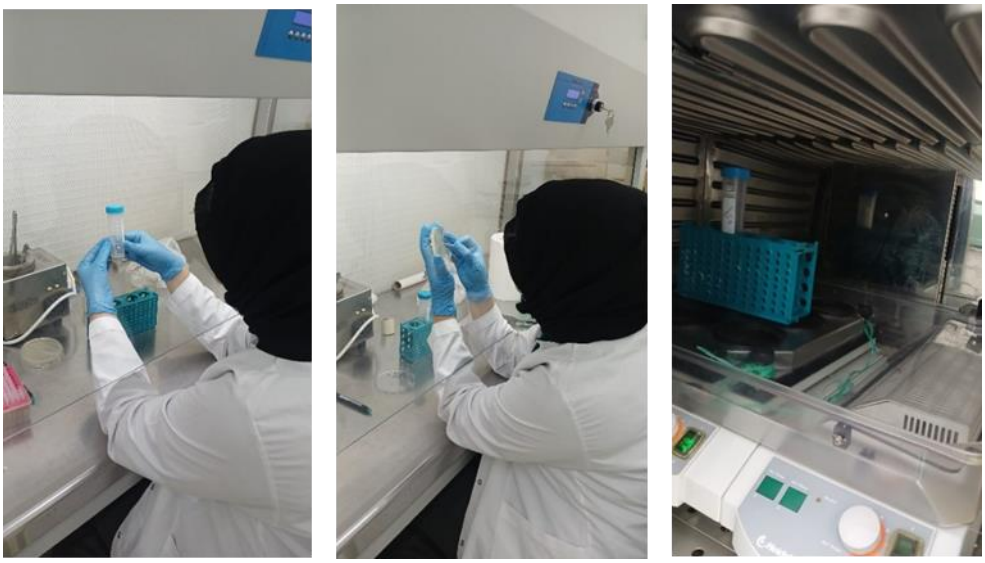
Heat-shock yöntemi ile *E. coli* transformasyonu sonrasında, pHEE401E plazmid yapısında aktarılması hedeflenen insertlerin varlığını doğrulamak amacıyla, kanamisin içeren LB agar ortamında gelişen tek kolonilerden seçilen örneklerden PCR yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jel elektroforezinde 70 V'da yürütülmüştür. Analiz sonucunda, hedeflenen bölgede yaklaşık 500 bp büyüklüğünde bant elde edilmesiyle kolonilerin doğruluğu teyit edilmiştir.



Şekil 4.4. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. Seçilen 6 *E.coli* kolonisi spesifik primerlerle beklenen büyüklükte bant oluşturmuştur.

Koloniler 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonucunda gelişimi gözlenen ve varlığı doğrulanan koloniler, steril 100 µl'lik pipet ucu kullanılarak 5 µl kanamisin içeren 5 ml LB sıvı besiyerine aktarılmıştır. Steril falcon tüplere alınan bu kültürler, 37°C'de 300 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 24 saat süreyle çoğaltılmıştır. Koloni PCR yöntemi, rekombinant plazmidlerin hızlı ve doğrudan şekilde doğrulanmasına imkân sağlaması nedeniyle klonlama çalışmalarında yaygın olarak tercih edilmektedir.

Elde edilen bant uzunluğunun beklenen fragment boyutu ile uyumlu olması, insert DNA'nın vektör içerisine doğru yönde ve bütünlüğü korunarak aktarıldığını göstermektedir. DNA'nın varlığının doğrulanmasından sonra ideal büyüklükteki pozitif koloniler 100 µl'lik pipet ucu ile alınarak 5 µl kanamisin (50 mg/mL) içeren 5 mL LB ortamına eklenmiştir. Kültürler, hava girişini tamamen engellemeyecek biçimde gevşek kapatılmış kapaklı tüplerde hazırlanmış ve 37°C'de, 225 rpm hızında çalışan çalkalamalı inkübatörde 12–16 saat boyunca gelişmeye bırakılmıştır. Uzun dönem muhafaza işlemleri için kültür yoğunluğu düzenli olarak spektrofotometrede ölçülmüş ve OD600 değeri 0.6 seviyesine ulaştığında işlem sonlandırılmıştır. Ardından 500 µL bakteri kültürü ile eşit hacimde (%40) steril gliserol karıştırılmış, hazırlanan karışım 1.5 mL hacmindeki Ependorf tüplerine aktarılmış ve −80 °C'de depolanmıştır.



Şekil 4.5. PCR analizi ile pozitif olduğu belirlenen kolonilerin, kanamisin içeren LB broth ortamına aktarılması

4.5 Plazmid İzolasyonu

Isı şoku yöntemi kullanılarak bakterilere aktarılan plazmidlerin çoğaltılmasının ardından plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla GeneJET Plasmid Miniprep Kit kullanılmıştır. İzolasyon sonucunda elde edilen plazmid DNA'ları, uygun primerler aracılığıyla PCR analizine tabi tutulmuştur. PCR işlemi belirlenen koşullar doğrultusunda yürütülmüştür. Elde edilen amplifikasyon ürünleri, doğrulama amacıyla analiz edilmiştir. Son aşamada doğrulanan örnekler, dizi analizi için ilgili firmaya gönderilmiş ve Sanger sekanslama yöntemi ile incelenmiştir. Sanger sekanslama sonucunda elde edilen nükleotid dizileri veri tabanında bulunan hedef gen dizileri ile karşılaştırılmış ve hedef bölgenin doğru şekilde klonlandığı doğrulanmıştır.



Şekil 4.6. Plazmid izolasyonu ve Qubit cihazında plazmid yoğunluk ölçümü

4.6 Elektroporasyon ile Plasmidin Elektrokompatent Agrobacterium EHA105 Irkına Aktarılması

Elektroporasyon yöntemi kullanılarak plazmid DNA, elektrokompetan *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ırkına aktarılmıştır. Bu işlem öncesinde, plazmidin çoğaltılması amacıyla E. coli DH5α ırkına ısı şoku yöntemi ile transformasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından plazmid DNA izolasyonu, GeneJET Plasmid Miniprep Kit kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen plazmidlerin içerdiği insert bölgelerinin doğruluğunu teyit etmek amacıyla, pHEE401E vektörüne özgü primer çiftleri kullanılarak PCR analizi uygulanmıştır. PCR reaksiyonları, ilgili çizelgelerde belirtilen koşullar doğrultusunda yürütülmüştür. Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri, dizi analizi için yetkili bir firmaya gönderilmiş ve Sanger sekanslama yöntemi ile analiz edilmiştir. Sekans verilerinin değerlendirilmesi sonucunda, hedef gen parçalarının plazmid yapısına doğru şekilde klonlandığı doğrulanmıştır.

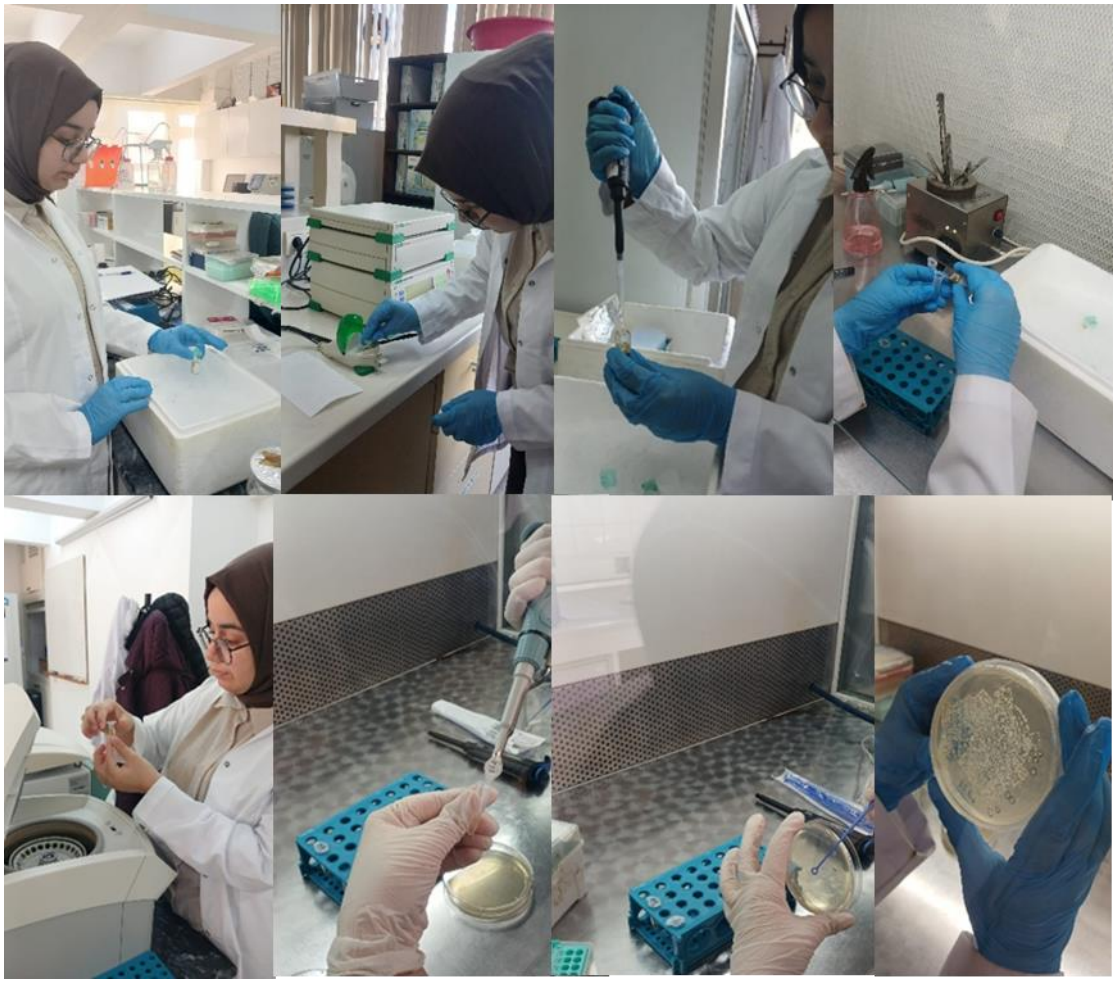


Şekil 4.7. Plazmid içerisine klonlanan gRNA bölgelerinin, Sanger dizileme yöntemi ile doğrulanmasına ait kromatogram çıktıları

Yukarıda elektroporasyon yönteminde açıklanan uygulamalar doğrultusunda kompetent hale getirilen *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ırkına, 2.5 kV voltaj ve 4 milisaniye süre ayarlarında çalışan Gene Pulser Xcell cihazı kullanılarak elektroporasyon uygulanmıştır. Elektroporasyon öncesinde, aktarımı gerçekleştirilecek olan pHEE401E plazmidinin konsantrasyonu spektrofotometrik ölçüm ile 60 ng düzeyine ayarlanmıştır.

Elektroporasyon sonrasında elde edilen transformant hücreler Ependorf tüplere alınmış ve 28 °C'de 2–3 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak kanamisin (50 mg/L) ve rifampisin (25 mg/L) içeren LB agar besiyerine yayma ekim yapılmıştır. 28 °C'de 48 saatlik inkübasyonun ardından yoğun koloni oluşumu gözlenmiş ve bu durum elektroporasyon işleminin başarılı olduğunu göstermiştir.

Yeterli büyüklüğe ulaşan koloniler steril pipet ucu yardımıyla seçilerek, kanamisin (50 mg/L) ve rifampisin (25 mg/L) içeren 5 ml LB sıvı besiyerine aktarılmıştır. PCR analizi ile doğrulanan koloniler, 37 °C'de 225 rpm hızında çalkalamalı inkübatörde 12–16 saat süreyle çoğaltılmıştır. Uzun süreli muhafaza amacıyla, kültür yoğunluğu OD_{600} = 0.6 değerine ulaşıncaya kadar spektrofotometrik ölçümler yapılmış, ardından 500 µl bakteri kültürü ile 500 µl %40 steril gliserol karıştırılarak 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınmış ve -80 °C'de saklanmıştır.



Şekil 4.8. Plazmid DNA'nın elektroporasyon yöntemi ile *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ırkına aktarılması

Elektroporasyon işlemi sonrasında transformant plazmidin *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ırkına başarılı bir şekilde aktarılıp aktarılmadığını belirlemek amacıyla pHEE401E/F ve pHEE401E/R primer çifti kullanılarak koloni PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jel elektroforezinde 70 V'da yürütülmüştür. Analiz sonucunda, incelenen 15 koloniden 5'inde hedef bölgede yaklaşık 200 bp büyüklüğünde bant elde edilerek insert DNA varlığı doğrulanmıştır

Bu çalışmada elde edilen bulgular, domateste külleme hastalığına karşı dayanıklılık geliştirilmesine yönelik gelecekte yapılacak genom düzenleme çalışmalarına önemli bir temel oluşturmaktadır. Çalışma kapsamında *SlMLO* gen bölgesini hedefleyen CRISPR-CAS9 konstraktının başarıyla oluşturulması, plazmid doğrulamalarının gerçekleştirilmesi ve *Agrobacterium* aracılı aktarım basamaklarının başarılı şekilde tamamlanması, ilerleyen süreçte transgenik veya gen düzenlenmiş dayanıklı domates hatlarının geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Özellikle sera yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan *Oidium lycopersici* etmenine karşı dayanıklı çeşitlerin

geliştirilmesi, kimyasal fungisit kullanımını azaltarak daha sürdürülebilir ve çevre dostu üretim sistemlerinin oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

Çalışmanın ilk aşamasında hedef gen olarak *SlMLO1* geni seçilmiştir. *MLO* genleri bitkilerde külleme etmenlerinin bitki hücrelerine girişini kolaylaştıran hassaslık genleri olarak bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar, *SlMLO1* geninin işlev kaybına uğratılması durumunda domateste külleme hastalığına karşı dayanıklılık oluştuğunu göstermiştir. Bu nedenle dayanıklılık genlerini aktarmak yerine hassaslık geninin etkisiz hale getirilmesi daha kalıcı ve etkili bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca bu yöntem, klasik ıslah çalışmalarında görülen uzun seleksiyon süreçlerini azaltma potansiyeline sahiptir.

gRNA tasarımı aşaması CRISPR-CAS9 sisteminin en kritik basamaklarından biridir. Bu çalışmada hedef bölge olarak *SlMLO1* geninin birinci ekzonu seçilmiştir. Birinci ekzonun tercih edilmesinin temel nedeni, bu bölgede meydana gelen mutasyonların genellikle proteinin erken dönemde işlev kaybetmesine neden olmasıdır. Hedef bölgenin genin başlangıç kısmında bulunması, oluşacak delesyon veya insersiyonların tüm proteinin yapısını bozma olasılığını artırmaktadır. Literatürde de fonksiyon kaybı oluşturmak amacıyla genlerin erken ekzonlarının hedeflenmesinin daha başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir.

Tasarlanan gRNA'nın kesim verimliliği ve off-target riski değerlendirilmiştir. Gen düzenleme çalışmalarında yüksek kesim verimliliği hedef bölgede mutasyon oluşma ihtimalini artırırken, düşük off-target riski genomun diğer bölgelerinde istenmeyen değişikliklerin meydana gelmesini engellemektedir. Bu nedenle gRNA seçiminde yalnızca hedef bölgeye bağlanabilen dizilerin tercih edilmesi büyük önem taşımaktadır. Off-target etkilerinin azaltılması, ileride elde edilecek bitkilerde fenotipik değişikliklerin yalnızca hedef gen düzenlemesinden kaynaklandığının gösterilebilmesi açısından da gereklidir.

gRNA dizilerinin CRISPR-CAS9 vektörüne aktarılmasında GoldenGate klonlama yöntemi kullanılmıştır. GoldenGate klonlama son yıllarda bitki biyoteknolojisi çalışmalarında yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemin en önemli avantajlarından biri Tip IIS restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA parçalarının belirli bir yönde ve yüksek doğrulukla birleştirilebilmesidir. Geleneksel restriksiyon ligasyon yöntemlerine kıyasla daha hızlı sonuç vermesi ve aynı anda birden fazla DNA parçasının klonlanabilmesine olanak sağlaması önemli avantajlar sunmaktadır. Çalışmada kullanılan *BsaI* enzimi hedef bölgeleri tanıyarak uygun yapışkan uçların oluşmasını sağlamış, T4 DNA ligaz ise oluşan DNA parçalarının birleştirilmesinde görev almıştır. Bu sayede gRNA dizileri başarıyla vektöre aktarılmıştır.

GoldenGate klonlama sonrasında rekombinant plazmidlerin çoğaltılması amacıyla *E. coli* hücreleri kullanılmıştır. *E. coli* moleküler biyoloji çalışmalarında hızlı çoğalması, kolay kültüre alınabilmesi ve yüksek miktarda plazmid üretimine olanak sağlaması nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu çalışmada plazmid aktarımı heat shock yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Heat shock uygulaması sırasında hücre zarında geçici geçirgenlik artışı meydana gelmekte ve plazmid DNA'nın hücre içerisine

girmesi sağlanmaktadır. Bu yöntem ekonomik olması ve özel ekipman gerektirmemesi nedeniyle yaygın kullanılmaktadır. Elde edilen koloniler plazmid taşıyan hücrelerin başarıyla seçildiğini göstermiştir.

Transformasyon sonrasında plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmid izolasyonu, klonlama işleminin doğrulanması ve sonraki aşamalarda kullanılacak yüksek saflıkta DNA'nın elde edilmesi açısından kritik öneme sahiptir. İzolasyon sırasında uygulanan alkali lizis yöntemi bakteriyel hücrelerin parçalanmasını sağlarken kromozomal DNA ve proteinlerin ortamdan uzaklaştırılmasına olanak tanımaktadır. Elde edilen plazmidlerin uygun kalitede olması sonraki PCR ve transformasyon basamaklarının başarısını doğrudan etkilemektedir.

Rekombinant plazmidlerin doğrulanmasının ardından plazmidler *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle aktarılmıştır. *Agrobacterium*, bitki transformasyonunda en yaygın kullanılan bakteridir ve yabancı DNA'yı bitki hücrelerine doğal olarak aktarabilme yeteneğine sahiptir. Elektroporasyon yöntemi, hücrelere kısa süreli yüksek voltaj uygulanarak zar üzerinde geçici porlar oluşturulması esasına dayanmaktadır. Bu yöntem özellikle büyük plazmidlerin aktarımında yüksek verim sağlamaktadır. Çalışmada elektroporasyonun tercih edilmesi, CRISPR-CAS9 taşıyan vektörlerin *Agrobacterium* hücrelerine etkin şekilde aktarılmasını sağlamıştır.

Bu çalışmada bitki transformasyonu ve mutasyon analizleri gerçekleştirilmemiş olmakla birlikte, elde edilen sonuçlar sonraki aşamalar için sağlam bir temel oluşturmuştur. Gelecekte yapılacak çalışmalarda *Agrobacterium* aracılı transformasyonla domates bitkilerine gen aktarılması, hedef bölgelerin sekans analizi ile doğrulanması ve elde edilen bitkilerin külleme hastalığına karşı dayanıklılıklarının değerlendirilmesi gerekmektedir. Özellikle *SlMLO1* geninde oluşacak mutasyonların fenotipik etkilerinin ortaya konulması, çalışmanın nihai amacına ulaşması açısından büyük önem taşımaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma *SlMLO1* geninin CRISPR-CAS9 sistemi ile *Slmlo1* mutasyonuna oluşturacak tüm moleküler hazırlık aşamalarının başarıyla tamamlandığını göstermektedir. Elde edilen bulgular, gelecekte külleme hastalığına dayanıklı domates çeşitlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecek önemli bir altyapı oluşturmuştur.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda, oluşturulan CRISPR-CAS9 konstraktlarının domates bitkilerine aktarılması ve rejenerasyon basamaklarının tamamlanması gerekmektedir. Daha sonra elde edilen bitkilerde hedef gen bölgelerinde meydana gelen mutasyonların moleküler düzeyde doğrulanması önem taşımaktadır. Özellikle sekans analizleri ile indel mutasyonlarının belirlenmesi, hedef dışı (off-target) değişimlerin incelenmesi ve mutasyonların kalıtımsal stabilitesinin araştırılması gereklidir. Bunun yanında geliştirilen mutant hatların *Oidium lycopersici* enfeksiyonuna karşı fenotipik olarak test edilmesi, dayanıklılık düzeylerinin belirlenmesi açısından önemli olacaktır. Kontrollü sera koşullarında ve daha sonra tarla denemelerinde gerçekleştirilecek patojen inokulasyon çalışmaları ile mutant bitkilerin hastalık şiddeti, verim ve kalite özellikleri ayrıntılı olarak değerlendirilmelidir.

Literatürde *MLO* genlerinin işlev kaybının külleme hastalığına karşı geniş spektrumlu dayanıklılık sağladığı birçok çalışmada bildirilmiştir. Özellikle arpa

bitkisinde tanımlanan *mlo* dayanıklılığı, uzun yıllardır dayanıklılığını koruyan en başarılı örneklerden biri olarak kabul edilmektedir. Domateste ise *SlMLO1* geninin CRISPR-CAS9 sistemi ile hedeflenmesi sonucunda külleme hastalığına karşı dayanıklı mutant bireylerin elde edildiği belirtilmiştir. Shawky ve ark. (2024) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *SlMLO1* geninde oluşturulan küçük delesyonların bitkide belirgin morfolojik bozukluk oluşturmadan dayanıklılık sağladığı bildirilmiştir. Benzer şekilde Prajapati (2021), *SlMLO* gen bölgelerini hedefleyen gRNA tasarımları ile doğal mutasyonlara benzer değişikliklerin oluşturulabileceğini ve bu yaklaşımın külleme hastalığına karşı etkili sonuç verdiğini belirtmiştir. Bu çalışmada elde edilen moleküler doğrulama sonuçları da söz konusu araştırmalarla paralellik göstermektedir.

Bununla birlikte, gelecekte yalnızca tek bir *MLO* geninin değil, birden fazla *SlMLO* geninin birlikte hedeflenmesi daha güçlü ve kalıcı dayanıklılık mekanizmalarının geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Çünkü bazı çalışmalarda farklı *MLO* homologlarının birlikte görev aldığı ve tek gen mutasyonlarının bazı durumlarda yeterli koruma sağlamadığı belirtilmektedir. Özellikle *SlMLO1, SlMLO5* ve *SlMLO8* genlerinin birlikte değerlendirilmesi, çoklu gen düzenleme stratejileri açısından önemli olabilir. CRISPR/Cas9 teknolojisinin aynı anda birden fazla hedef bölgeyi düzenleyebilme özelliği, bu yaklaşımın uygulanabilirliğini artırmaktadır.

Ayrıca ilerleyen çalışmalarda yalnızca hastalık dayanıklılığı değil, gen düzenleme sonrası bitkilerde meydana gelebilecek olası fizyolojik değişimlerin de incelenmesi gerekmektedir. Bazı *mlo* mutantlarında yaprak nekrozu, gelişme geriliği veya verim kaybı gibi istenmeyen etkiler görülebildiği literatürde bildirilmektedir. Bu nedenle geliştirilecek mutant hatların agronomik özelliklerinin ayrıntılı şekilde değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Dayanıklılık ile yüksek verim ve kaliteli ürün özelliklerinin korunması, genom düzenleme çalışmalarının tarımsal uygulamalara aktarılabilmesi açısından kritik bir basamaktır.

Son yıllarda CRISPR-CAS9 teknolojisinin yalnızca domates değil; biber, hıyar, buğday ve pirinç gibi birçok bitki türünde başarılı şekilde uygulanması, bu yöntemin bitki hastalıkları ile mücadelede güçlü bir araç olduğunu göstermektedir. Özellikle fungisit kullanımının azaltılması, çevre ve insan sağlığının korunması ile sürdürülebilir tarım uygulamalarının desteklenmesi açısından genom düzenleme teknolojileri büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma da gelecekte geliştirilecek külleme hastalığına dayanıklı domates çeşitleri için önemli bir başlangıç niteliği taşımaktadır.

5 SONUÇLAR

Oidium lycopersici, domates başta olmak üzere birçok sebze ve meyve türünde ciddi verim ve kalite kayıplarına neden olan önemli bir fungal hastalık etmenidir. Bu külleme hastalıklarıyla mücadelede kullanılan fungisitlerin hem insan sağlığına zararlı etkileri hem de hastalıklara dayanıklılık kazandırmasından dolayı yeni alternatifler geliştirilmiştir. Bu alternatiflerin en başında da dayanıklı çeşit geliştirmek gelmektedir. Külleme hastalığına karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, sürdürülebilir bitki üretimi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, domateste hastalık ile ilişkili olduğu bilinen *MLO* genlerinin hedeflenmesi amacıyla CRISPR-CAS9 genom düzenleme teknolojisinden yararlanılmıştır. Özellikle *SlMLO1* gen bölgesinde mutasyon oluşturularak külleme hastalığına karşı dayanıklılık geliştirilmesi hedeflenmiştir. Literatürde *MLO* genlerinin inaktivasyonunun birçok bitki türünde külleme hastalığına karşı kalıcı ve geniş spektrumlu dayanıklılık sağladığı bildirilmektedir.

Çalışmanın ilk aşamasında *SlMLO1* geninin birinci ekzon bölgesine yönelik gRNA tasarımı gerçekleştirilmiş ve hedef bölgenin kesim verimliliği ile off-target riski değerlendirilerek uygun gRNA dizisi belirlenmiştir. Tasarlanan gRNA dizilerine ait oligonükleotidler sentezlenmiş ve GoldenGate klonlama yöntemi kullanılarak pHEE401E vektörüne aktarılmıştır. Klonlama işlemi sonrasında rekombinant plazmidler kompetan *E. coli* hücrelerine heat shock yöntemi ile aktarılmıştır. Antibiyotik içeren besiyerlerinde elde edilen koloniler, transformasyon işleminin başarılı olduğunu göstermiştir. Transformasyon sonrasında seçilen kolonilerden plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen plazmidler koloni PCR analizleri ile doğrulanmıştır. PCR sonuçlarında beklenen büyüklükte bantların elde edilmesi, gRNA dizisinin hedef vektöre başarıyla klonlandığını göstermiştir.

Doğrulanan rekombinant plazmidler daha sonra *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Elektroporasyon sonrasında antibiyotik seçilimi altında gelişen koloniler, plazmid aktarımının başarılı şekilde gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Böylece CRISPR-CAS9 sistemini taşıyan rekombinant vektörün hem *E.coli* hem de *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerine aktarımı başarıyla tamamlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, *SlMLO1* geninin hedeflenmesine yönelik moleküler klonlama ve transformasyon basamaklarının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Çalışma kapsamında tasarlanan gRNA dizileri kullanılarak CRISPR-CAS9 sistemi etkin bir şekilde uygulanmış, *Agrobacterium* aracılı transformasyon yöntemi ile hedef gen bölgelerinde düzenlemeler gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonrası elde edilen hatlarda yapılan koloni PCR analizleri, gen bölgesi amplifikasyonları ve sekans doğrulama çalışmaları sonucunda bazı bitkilerde hedef *MLO* bölgesinde mutasyonların meydana geldiği belirlenmiştir. Elde edilen moleküler bulgular, kullanılan CRISPR-CAS9 sisteminin domates genomunda başarılı bir şekilde çalıştığını ve hedef gen üzerinde etkili düzenlemeler oluşturabildiğini göstermiştir.

Bu çalışmadan elde edilen genetik CRISPR-CAS9 gen düzenleme sistemiyle *SlMLO1* geni *Slmlo1* gen mutasyon oluşumunu sağlayacaktır. Elde edilen rekombinant *Agrobacterium* kolonileri ileride gerçekleştirilecek gen aktarımı çalışmalarında kullanılabilecek niteliktedir. Sonuç olarak çalışma, külleme hastalığına dayanıklı domates bitkilerinin geliştirilmesine yönelik sonraki araştırmalar için gerekli moleküler altyapının oluşturulduğunu ortaya koymuştur.

Araştırma sonucunda elde edilen veriler, *MLO* genlerinin baskılanmasının *Oidium lycopersici* enfeksiyonuna karşı bitkinin savunma mekanizmalarını güçlendirebileceğini ve hastalık gelişimini sınırlandırabileceğini ortaya koymuştur. Bu durum, CRISPR-CAS9 tabanlı genom düzenleme çalışmalarının bitki hastalıklarına karşı dayanıklı çeşit geliştirilmesinde önemli bir biyoteknolojik araç olduğunu desteklemektedir. Ayrıca çalışmadan elde edilen sonuçlar, literatürde bildirilen benzer çalışmalar ile uyum göstermekte olup, domateste genetik dayanıklılık ıslahı açısından umut verici bulgular sunmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma, CRISPR-CAS9 teknolojisinin domateste külleme hastalığına karşı dayanıklılık geliştirilmesinde etkili ve uygulanabilir bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. Hedef *MLO* genlerinde oluşturulan mutasyonların, gelecekte hastalığa dayanıklı domates çeşitlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, elde edilen mutant hatların fenotipik özelliklerinin detaylı olarak incelenmesi, farklı çevre koşullarındaki performanslarının değerlendirilmesi ve hastalık dayanıklılık düzeylerinin kapsamlı şekilde test edilmesi gerekmektedir. Ayrıca ilerleyen çalışmalarda farklı *MLO* gen aile üyelerinin birlikte hedeflenmesi ile daha güçlü ve kalıcı dayanıklılık mekanizmalarının geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

6 KAYNAKLAR

Aboul-Maaty, N.A-F., & Oraby, H. .-S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, *43*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1

Akbudak, M. A., &, Kontbay, K. (2017). Yeni Nesil Genom Düzenleme Teknikleri: ZFN, TALEN, CRISPR'lar ve Bitkilerde Kullanımı. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, *26*(1), 111–126. https://doi.org/10.21566/tarbitderg.323614

Aksoy, A., &, Kaymak, H. (2024). Tomato Production Quantity Estimates for 2023-2027 With Arima Model: Evidence From Leading Producing Countries Including Turkey. *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*, *24*(3), 2024. https://managementjournal.usamv.ro/pdf/vol.24_3/Art4.pdf

ALP, Ş., ONAT, İ., &, KUPIK, M. (2011). Süs bitkileri üretim teknikleri ve bakim istekleri. In *Baçıvanlık El Kitabı*.

Bai, Y., Pavan, S., Zheng, Z., Zappel, N. F., Reinstädler, A., Lotti, C., De Giovanni, C., Ricciardi, L., Lindhout, P., Visser, R., Theres, K., &,Panstruga, R. (2008). Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of Mlo function. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *21*(1), 30–39. https://doi.org/10.1094/MPMI-21-1-0030

Barrangou, R., &, Horvath, P. (2017). A decade of discovery: CRISPR functions and applications. *Nature Microbiology*, *2*(7), 1–9. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.92

Berg, J. A., Appiano, M., Santillán Martínez, M., Hermans, F. W. K., Vriezen, W. H., Visser, R. G. F., Bai, Y., &, Schouten, H. J. (2015). A transposable element insertion in the susceptibility gene *CsaMLO8* results in hypocotyl resistance to powdery mildew in cucumber. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 243. https://doi.org/10.1186/s12870-015-0635-x

Bhalerao, S., Okoń, S., Rai, M., Jadhav, P., &,Prokisch, J. (2025). Recent Advances in the CRISPR/Cas9 Technology for Engineering Disease Resistance in Plants. *Acta Agrobotanica*, *78*, 2–31. https://doi.org/10.5586/aa/201389

Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research, 7(6), 1513–1523. https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513

Bortesi, L., Zhu, C., Zischewski, J., Perez, L., Bassié, L., Nadi, R., Forni, G., Lade, S. B., Soto, E., Jin, X., Medina, V., Villorbina, G., Muñoz, P., Farré, G., Fischer, R., Twyman, R. M., Capell, T., Christou, P., & Schillberg, S. (2016). Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnology Journal*, *14*(12), 2203–2216. https://doi.org/10.1111/pbi.12634

Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., Van Daelen, R., Van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Töpsch, S., Vos, P.,

Salamini, F., &,Schulze-Lefert, P. (1997). The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, *88*(5), 695–705. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81912-1

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Hsu, P. ., Wu, X., Jiang, W., &, & Marraffini, L. A. (2013). Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. Science (New York, N.Y.). *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6121), 819–823. https://doi.org/10.1126/science.1231143.Multiplex

Consonni, C., Humphry, M. E., Hartmann, H. A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., Vogel, J., Lipka, V., Kemmerling, B., Schulze-Lefert, P., Somerville, S.C., &, Panstruga, R. (2006). Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature Genetics*, *38*(6), 716–720. https://doi.org/10.1038/ng1806

Çalış, Ö. (2011). Bitki Dayanıklılık Genleri ve Proteinleri Özer ÇALIŞ. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, *4*(2), 1–9. www.nobel.gen.tr

De Pater, S., Neuteboom, L. W., Pinas, J. E., Hooykaas, P.J.J., &, Van Der Zaal, B. J. (2009). ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in Arabidopsis through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnology Journal*, *7*(8), 821–835. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00446.x

Demirdöğen, A., Ataseven, Y., Arısoy, H., &, Olhan, E. (2025). *Türkiye Ziraat Mühendisliği X. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1*.

Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., &, Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, *34*(2), 184–191. https://doi.org/10.1038/nbt.3437

Dreiseitl, A. (2024). *Mlo*-Mediated Broad-Spectrum and Durable Resistance against Powdery Mildews and Its Current and Future Applications. *Plants*, *13*(1), 1–8. https://doi.org/10.3390/plants13010138

Engler, C., Youles, M., Gruetzner, R., Ehnert, T. M., Werner, S., Jones, J. D., & Marillonnet, S. (2014). A goldenGate modular cloning toolbox for plants. *ACS synthetic biology*, *3*(11), 839-843.

Ersoy, A. (2005). Örtüalti yetiştiriciliğinde gelişmeler. *Türkiye Ziraat Mühendisleri VI. Teknik Kongresi Bildirileri*, 609–627.

Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2019*(6), pdb-top095109.

Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). The Inoue method for preparation and transformation of competent Escherichia coli: "Ultracompetent" cells. Cold Spring Harbor Protocols, 2020(6), pdb.prot101196. https://doi.org/10.1101/pdb.prot101196

Heigwer, F., Kerr, G., &,Boutros, M. (2014). E-CRISP: Fast CRISPR target site identification. *Nature Methods*, *11*(2), 122–123. https://doi.org/10.1038/nmeth.2812

Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, *31*(9), 827-832.

Hu, H., Yu, F., Bhutia, K. L., Kumari, S., &, Anjani, K. (2024). *In CRISPR and Plant Functional Genomics*.

Jacob, D., Rav David, D., Sztjenberg, A., &,Elad, Y. (2008a). Conditions for development of powdery mildew of tomato caused by *Oidium neolycopersici*. *Phytopathology*, *98*(3), 270–281. https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-3-0270

Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W., &, Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, *43*(6), 1565–1575. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x

Ji, X., Zhang, H., Zhang, Y., Wang, Y., &, Gao, C. (2015). Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nature Plants*, *1*(10), 15144. https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2015.144

Karaca, M., &,İnce, A. G. (2018). New Generation Plant Breeding Methods (Molecular Plant Breeding) Some Advantages & Disadvantages. *Reserach Journal of Agricultural Sciences*, *11*(1), 39–49.

Karipçin, M. Z., Gülser, F., Kabaş, A., &, Selvi, K. Ç. (2022). Sebzecilikte farkli yaklaşimlar.

KATAR. (2024). Ziraat, orman ve su ürünleri alaninda akademik çalişmalar

Kim, H., Choi, J., &, Won, K. H. (2020). A stable DNA-free screening system for CRISPR/RNPs-mediated gene editing in hot and sweet cultivars of *Capsicum annum*. *BMC Plant Biology*, *20*(1), 449. https://doi.org/10.1186/s12870-020-02665-0

Kiss, L., Takamatsu, S., &, Cunnington, J. H. (2005). Molecular identification of *Oidium neolycopersici* as the causal agent of the recent tomato powdery mildew epidemics in North America. *Plant Disease*, *89*(5), 491–496. https://doi.org/10.1094/PD-89-0491

Kusch, S., &,Panstruga, R. (2017). Mlo-based resistance: An apparently universal "weapon" to defeat powdery mildew disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *30*(3), 179–189. https://doi.org/10.1094/MPMI-12-16-0255-CR

Lebeda, A., &,Mıeslerova, B. (2000). Case Study of Host-Pathogen Interaction: Tomato (*Lycopersicon* spp.) Tomato Powdery Mildew (*Oidium lycopersici*). *Plant Protection Science*, 156–162.

Li, P., &, Xiao, S. (2025). Diverse Functions of Plant MLO Proteins: From Mystery to Elucidation. *Annual Review of Phytopathology*, *63*(1), 147–173.

https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-030625-035800

Lindhout, P., Pet, G., &, van der Beek, H. (1993). Screening wild Lycopersicon species for resistance to powdery mildew (*Oidium lycoperiscum*). *Euphytica*, *21*(4), 339–343. https://doi.org/10.1007/BF00023771

Longone, V., Aguado, G., Pisi, G., D'Innocenzo, S., &, Uliarte, M. (2020). *Estudio preliminar de uso de compuestos biorracionales para el control de oidiopsis (Leveillula taurica (Lév.) Arn.) en pimiento bajo cubierta*. 13–17.

Malzahn, A., Lowder, L., &, Qi, Y. (2017). Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell and Bioscience*, *7*(1), 21. https://doi.org/10.1186/s13578-017-0148-4

Marois, J. J., Momol, M. T., Kimbrough, J. W., Hochmuth, R. C., & Dankers, W. (2001). First report of powdery mildew on greenhouse tomatoes caused by *Oidium neolycopersici* in Florida. *Plant Disease*, *85*(12), 1292-1292.

Mieslerova, B., & Lebeda, A. (1999). (1999). Taxonomy , distribution and biology of the tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*) / Taxonomie , Verbreitung und Biologie des Echten Mehltaus (*Oidium lycopersici*) an Tomaten Author (s): B . Mieslerová and A . Lebeda Source : Zeitschrift für Pflan. *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, *May 2026*, 140–157.

Mishra, R., Mohanty, J. N., Mahanty, B., &, Joshi, R. K. (2021). A single transcript CRISPR/Cas9 mediated mutagenesis of CaERF28 confers anthracnose resistance in chilli pepper (*Capsicum annum* L.). *Planta*, *254*(5), 1–17. https://doi.org/10.1007/s00425-021-03660-x

Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D., & Kamoun, S. (2017). Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. Scientific Reports, 7(1), 482.

Nie, J., Wang, Y., He, H., Guo, C., Zhu, W., Pan, J., Li, D., Lian, H., Pan, J., &, & Cai, R. (2015). Loss-of-function mutations in CsMLO1 confer durable powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in Plant Science*, *6*, 1155. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01155

Optimized score from Doench, Fusi et al. (2016). This score is optimized for 20bp guides with NGG PAMs.Score is from 0-100. Higher is better

Osborn, M. J., Starker, C. G., McElroy, A. N., Webber, B. R., Riddle, M. J., Xia, L., Defeo, A. P., Gabriel, R., Schmidt, M., Von Kalle, C., Carlson, D. F., Maeder, M. L., Joung, J. K., Wagner, J. E., Voytas, D. F., Blazar, B.R., &, Tolar, J. (2013). TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Molecular Therapy*, *21*(6), 1151–1159. https://doi.org/10.1038/mt.2013.56

Ozan, S., &,MADEN, S. (2006). DOMATESTE GÖRÜLEN KÜLLEME HASTALIK ETMENLERİ. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, *20*(38), 126–135.

Özkaplan, M., &, Balkaya, A. (2019). Işık ve sıcaklığın topraksız tarım koşullarında

salkım domatesin meyve kalitesine etkisi. *Anadolu Journal of Agricultural Sciences*, *34*(3), 227–238. https://doi.org/10.7161/omuanajas.551680

Öztekin, G. (2003). Topraksız Tarımda Besin Solüsyonunun Dezenfeksiyonu. In *EÜ Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü* (Vol. 2, Issue 2).

Park, J.H., &, Kim, H. (2023). Harnessing CRISPR/Cas9 for Enhanced Disease Resistance in Hot Peppers: A Comparative Study on *CaMLO2*-Gene-Editing Efficiency across Six Cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(23), 16775. https://doi.org/10.3390/ijms242316775

Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R.G.F., &, Bai, Y. (2010). Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding*, *25*(1), 1–12. https://doi.org/10.1007/s11032-009-9323-6

Polat, A. (2024). *BİTKİ KORUMADA MODERN YAKLAŞIMLAR 1*.

Pozharskiy, A., Kostyukova, V., Nizamdinova, G., Kalendar, R., &, Gritsenko, D. (2022). *MLO* Proteins from Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and Related Species in the Broad Phylogenetic Context. *Plants*, *11*(12). https://doi.org/10.3390/plants11121588

Prajapati, A., &, Nain, V. (2021). Screening of CRISPR/Cas9 gRNA for mimicking Powdery Mildew resistant *MLO ol-2* mutant. *Bioinformation*, *17*(6), 637–645. https://doi.org/10.6026/97320630017637

R, C., &, HS, A. (2017). Resistance-Gene-Mediated Defense Responses against Biotic Stresses in the Crop Model Plant Tomato. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, *08*(2), 1000404. https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000404

Redman, M., King, A., Watson, C., &, King, D. (2016). What is CRISPR/Cas9? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, *101*(4), 213–215. https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310459

Reinstädler, A., Müller, J., Czembor, J. H., Piffanelli, P., &, Panstruga, R. (2010). Novel induced mlo mutant alleles in combination with site-directed mutagenesis reveal functionally important domains in the heptahelical barley *Mlo* protein. *BMC Plant Biology*, *10*(1), 31. https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-31

Salim, M. M. R., Rashid, M. H., Hossain, M.M., &, Zakaria, M. (2020). Morphological characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *19*(3), 233–240. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2018.11.001

Schouten, H. J., Krauskopf, J., Visser, R.G.F., &, Bai, Y. (2014). Identification of candidate genes required for susceptibility to powdery or downy mildew in cucumber. *Euphytica*, *200*(3), 475–486. https://doi.org/10.1007/s10681-014-1216-z

Seifi, A., Gao, D., Zheng, Z., Pavan, S., Faino, L., Visser, R. G. F., Wolters, A.M.A., &, Bai, Y. (2014). Genetics and molecular mechanisms of resistance to powdery mildews in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. *European Journal*

of Plant Pathology, *138*(3), 641–665. https://doi.org/10.1007/s10658-013-0314-4

Serrano, I., Gu, Y., Qi, D., Dubiella, U., &, Innes, R. W. (2014). The arabidopsis EDR1 protein kinase negatively regulates the ATL1 e3 ubiquitin ligase to suppress cell death. *The Plant Cell*, *26*(11), 4532–4546. https://doi.org/10.1105/tpc.114.131540

Shawky, A., Hatawsh, A., Al-saadi, N., Farzan, R., &, Eltawy, N. (2024). Revolutionizing Tomato Cultivation : CRISPR / Cas9 Mediated. *Plants*, *13*(16), 2269.

Story, E. N., Kopec, R. E., Schwartz, S.J., &, Keith Harris, G. (2010). An update on the health effects of tomato lycopene. *Annual Review of Food Science and Technology*, *1*(1), 189–210. https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124120

Specificity score from Hsu et al. (2013).Score is from 0-100. Higher is better.

Tek, M. I., Calis, O., Fidan, H., Shah, M. D., Celik, S., & Wani, S. H. (2022). CRISPR/Cas9 based mlo-mediated resistance against Podosphaera xanthii in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in Plant Science*, *13*(December), 1–12. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1081506

Topçu, İ., &,Duran, T. (2021). (2021). *Gen Düzenleme Teknolojileri Tarihi*. 5–13.

Tröder, S.E., &, Zevnik, B. (2022). History of genome editing: From meganucleases to CRISPR. *Laboratory Animals*, *56*(1), 60–68. https://doi.org/10.1177/0023677221994613

Tufan, F., &, Keleş, E. . (2019). Genom Düzenleme Teknolojileri ve Bitkilerdeki Uygulamaları. *Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 2019,* 113–133. https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/682225

TÜİK. 2022. Türkiye İstatistik Kurumu Resmi sitesi sayfası, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) (tuik.gov.tr), Erişim tarihi: 18.05.2026.

Tümay, A., &, Özgenen Özkaya, H. (2020). Antalya İlinin Bazı İlçelerindeki Sebze Alanlarında Bulunan Külleme Türlerinin Belirlenmesi. *Cukurova University, Agriculture Faculty*, *1*(35), 1–14. https://doi.org/10.36846/cjafs.2020.13

van der Beek, J. G., Pet, G., &, Lindhout, P. (1994). Resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon hirsutum* is controlled by an incompletely-dominant gene *Ol-1* on chromosome 6. *Theoretical and Applied Genetics*, *89*(4), 467–473. https://doi.org/10.1007/BF00225382

Wang, X., Bao, K., Reddy, U. K., Bai, Y., Hammar, S. A., Jiao, C., Wehner, T. C., Ramírez-Madera, A. O., Weng, Y., Grumet, R., &, Fei, Z. (2018). The USDA cucumber (*Cucumis sativus* L.) collection: genetic diversity, population structure, genome-wide association studies, and core collection development. *Horticulture Research*, 5. https://doi.org/10.1038/s41438-018-0080-8

Wang, Z., Wan, L., Ren, J., Zhang, N., Zeng, H., Wei, J., &,Tang, M. (2024). Improving the Genome Editing Efficiency of CRISPR/CAS9 in Melon and Watermelon. *Cells*, *13*(21). https://doi.org/10.3390/cells13211782

Wise, A. A., Liu, Z., & Binns, A. N. (2006). Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. Methods in Molecular Biology, 343, 43–53. https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:43

Xie, X., Ling, J., Dong, S., Zhai, M., Lu, J., Zhao, J., Yang, X., Dong, X., Li, Y., &, Visser, R. G. F., Bai, Y., Mao, Z., Zhang, S., & Xie, B. (2025). *Clade V MLO* Genes Are Negative Modulators of Cucumber Defence Response to Meloidogyne incognita. *Molecular Plant Pathology*, *26*(4), e70078. https://doi.org/10.1111/mpp.70078

Xin, T., Tian, H., Ma, Y., Wang, S., Yang, L., Li, X., Zhang, M., Chen, C., Wang, H., &, Li, H., Xu, J., Huang, S., & Yang, X. (2022). Targeted creation of new mutants with compact plant architecture using CRISPR/Cas9 genome editing by an optimized genetic transformation procedure in cucurbit plants. *Horticulture Research*, *9*(April). https://doi.org/10.1093/hr/uhab086

Yang, T., Ali, M., Lin, L., Li, P., He, H., Zhu, Q., Sun, C., Wu, N., Zhang, X., Huang, T., Li, C. B., Li, C., &, Deng, L. (2023). Recoloring tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex gene editing. *Horticulture Research*, *10*(1). https://doi.org/10.1093/hr/uhac214

Yavuz, B. (2010). Samsun'da Yaygın Olarak Kullanılan Pestisitlerin Sağlığa ve Çevreye Etkileri / The Health and Environmental Effects Of The Pesticides Commonly Used In Samsun. *Alınteri Zirai Bilimler Dergisi*, *19*(2), 28–35.

Yikilmazsoy, G. (2022). Reseacrh Article The Journal of Turkish Phytopathology Research on the Determination of Some Tomato Cultivars Reactions to *Oidium neolycopersici* and the Disease Control. *The Journal of Turkish Phytopathology*, *51*(2), 31–37.

Yıkılmazsoy, G., &, Çetinkaya, N. (2022). Research on the Determination of Some Tomato Cultivars Reactions to Oidium neolycopersici and the Disease Control. *The Journal of Turkish Phytopathology*, *51*(2), 31–37. https://dergipark.org.tr/en/pub/fitopatoloji/issue/73000/1083945

Zheng, Z., Appiano, M., Pavan, S., Bracuto, V., Ricciardi, L., Visser, R. G. F., Wolters, A.M.A., &, Bai, Y. (2016). Genome-wide study of the tomato *SlMLO* gene family and its functional characterization in response to the powdery mildew fungus *oidium neolycopersici*. *Frontiers in Plant Science*, *7*(APR2016), 380. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00380

Zhou, S. J., Jing, Z., & Shi, J. L. (2013). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the MLO gene family in *Cucumis sativus*. *Genetics and Molecular Research*, *12*(4), 6565–6578. https://doi.org/10.4238/2013.December.11.8

7 EKLER

Ek 1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

Cihaz Adı	Kullanım Amacı
Hassas Terazi	Tartım, uygulamalarında
Vorteks	Vorteks, karıştırma, çökeltme, işlemleri için kullanılacaktır.
Mini Satnrifüj	Klonlama, PCR ve DNA İzolasyonu işlemlerinin uygulanması sırasında kullanılacaktır
Elektroforez Jel Görüntüleme Sistemi	Jellerin görüntülenmesi, DNA analizleri
Derin Dondurucu	PCR, Vector, *Agrobacterium*, Kesim enzimleri, DNA ve RNA sarflarının uzun süreli saklanması
Mikro Dalga Fırın	Jel hazırlama,
Tissue Lyser	DNA izolasyonu yapımında
Kabin	Steril olarak besi ortamlarını hazır elde etme, bakteri ve fungal organizmalar üzerinde izolasyonlar,
Otoklav	Çalışmalarda kullanılacak ortamların hazırlanması ve malzemelerin sterilizasyonunda aktif bir şekilde kullanılır.
Buz Makinesi	PCR çalışmalarında ve klonlama esnasında heatshock uygulamalarında
Su Banyosu	DNA izolasyonu için kullanılacaktır.
İnkübatör	Bakterilerin geliştirilmesi için uygun ortam,

Spektrofotometre	DNA, miktarlarının belirlenmesi, *A. tumefaciens* OD_{600} değerinin ölçülmesi
Santrifuj	Santrifüj
pH metre	pH ölçümü
saf su arıtma cihazı	Saf su üretimi

EK 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları

Kimyasal Adı	**Kullanım Amacı**
DNA ladder (1 kb)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
CTAB	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
50 X TAE Buffer (1 lt'lik)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
DNA ladder (100bp)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Etil Alkol (%99'lik-5 lt)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Primerler (100 nmol)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Kesim enzimi (BsaI)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
T4 DNA ligase Enzim (5 U/µl) 5x1,000 Units	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
β-Merkaptoetanol	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Dream Taq Green Master Mix	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Agar (1 kg)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Agarose (1 kg)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
LB (Luria-Bertani) broth besi ortamı (1kg)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Gene JET Plasmid Miniprep Kit 50 preps	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Kanamisin	Klonlama çalışmalarında

Ek 3. Tez çalışmasında kullanılan kitler

Kitin Adı	GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific ® Cat No: K0502)
Kullanım Amacı	Bakteri hücresinden plasmidin izolasyonu

ÖZGEÇMİŞ



Emine KOCAKAYA

eminekocakaya.4346@gmail.com

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2024-2026	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,Bitki Koruma Anabilim Dalı,Antalya
Lisans 2020-2024	Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü ,Kayseri

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Stajer 2023	Antalya Zirai Karantina Müdürlüğü