T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

DOMATESTE KÜLLEME HASTALIK ETMENİ *Leveillula taurica*'YA KARŞI CRISPR-CAS9 TABANLI GEN DÜZENLEME PROTOKOLÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Gülsüm KOCAKAYA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Haziran 2026

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

DOMATESTE KÜLLEME HASTALIK ETMENİ *Leveillula taurica*'YA KARŞI CRISPR-CAS9 TABANLI GEN DÜZENLEME PROTOKOLÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Gülsüm 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 *Leveillula taurica*'YA KARŞI CRISPR-CAS9 TABANLI GEN DÜZENLEME PROTOKOLÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Gülsüm KOCAKAYA

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2025-6941 no'lu proje ile desteklenmiştir.

HAZİRAN 2026

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOMATESTE KÜLLEME HASTALIK ETMENİ *Leveillula taurica*'YA KARŞI CRISPR-CAS9 TABANLI GEN DÜZENLEME PROTOKOLÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Gülsüm KOCAKAYA

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Prof. Dr. Ş. Evrim ARICI ŞENKAYNAĞI

Assoc.Prof. Dr. Hakan FİDAN

ÖZET

DOMATESTE KÜLLEME HASTALIK ETMENİ *leveillula taurica'*YA KARŞI CRISPR-CAS9 TABANLI GEN DÜZENLEME PROTOKOLÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Gülsüm KOCAKAYA

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Haziran 2026; 46 sayfa

Dünyada en yaygın yetiştiriciliği yapılan sebzelerden birisi domates (*Solanum lycopersicum)* olup *Solanaceae* familyasında yer almaktadır. Sevilerek tüketilen domatesin ekim alanları her yıl genişlemeye devam etmektedir. Ancak ekonomik olarak önemli bu sebzenin üretimini kısıtlayan fungal hastalıklar bulunmakta olup bu fungal hastalıkların en başında külleme hastalığına sebep olan *Leveillula taurica* gelmektedir. Obligat patojen fungusun kontrolü için en iyi yöntem dayanıklı domates çeşitlerini geliştirmektir. Bu çalışmanın amacı külleme hastalık etmeni *L. taurica* ya genetik olarak dayanıklı salkım domates geliştirmek için biyoteknolojik yöntemlerden CRISPR-CAS9 tabanlı gen düzenleme yöntemini kullanarak domateste hassaslıktan sorumlu *SlMLO1* geni üzerinde mutasyon meydana getirerek transgenik olmayan dayanıklı domates çeşidi geliştirilmesini sağlamaktadır. Bunun için önce *MLO1* geni ticari salkım domates içerisinde spesifik primerlerle PCR da çoğaltılmış, elde edilen 1262 bp büyüklüğündeki *MLO1* geni incelenerek bu genin birinci ekzon bölgesine yönelik bir rehber RNA, hedef RNA ve palindromik sekansları içeren CRISPR-CAS9 sisteminin ögeleri oluşturulmuştur. Tasarlanan mutasyon için önce gRNA, tRNAve palindromik sekanslar klonlanarak önce *Escherichia coli* DH5α plazmidine aktarıldı. Sonra CRISPR-CAS9 gene düzenlemesi pHEE401E ticari binari vektörü *E. coli* DH5α çoğaltılarak klonlandı. Klonlanan binari vektördeki nükleik asit dizilimleri sanger sekanlama yapılarak doğrulanmıştır. pHEE401E plazmidi uygun restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 bakteri içerisine elektroporasyon ile yerleştirilerek istediğimiz *SlMLO1* geni üzerinde Sl*mlo1* gen mutasyonuna sebep olan CRISPR-CAS9 gen düzenleme sistemi oluşturulmuştur. Gelecekte oluşturulan bu CISPR-CAS9 gen düzenleme sistemiyle ticari salkım domates çeşitlerinde küllemeye dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi mümkün olacaktır.

ANAHTAR KELİMELER: Domates, CRISPR-CAS9, Gen Düzenleme, *SlMLO*

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 AGAİNST POWDERY MILDEW DİSEASE AGENT *Leveillula taurica* IN TOMATO

Gülsüm KOCAKAYA

MSc Thesis in Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

June 2026; 46 pages

One of the most widely cultivated vegetables in the world is the tomato (*Solanum lycopersicum*) which belongs to the *Solanaceae* family. The cultivation area of this widely consumed vegetable continues to expand every year. However, there are fungal diseases that limit the production of this economically important crop where one of the most significant powdery mildew diseases caused by *Leveillula taurica*. The best method for controlling this obligate pathogenic fungus is to develop resistant tomato varieties. The aim of this study is to develop a non-transgenic powdery mildew-resistant cluster tomato variety by using the CRISPR-CAS9-based gene editing technique, one of the biotechnological methods, to induce mutations in the *SlMLO1* gene, which is responsible for susceptibility to *L. taurica*. For achieving this, the *MLO1* gene was first amplified from a commercial cluster tomato using specific primers by PCR. After analyzing, PCR is resulting 1262 bp *MLO1* gene which was the components of the CRISPR-CAS9 system, including a guide RNA, target RNA, and palindromic sequences targeting the first exon region of this gene, were designed. For the specific mutation with CRISPR-CAS9 gene editing, the gRNA, tRNA, and palindromic sequences were first cloned and then transferred into the *Escherichia coli* DH5α plasmid. Subsequently, the CRISPR-CAS9 gene editing construct was cloned into the commercial binary vector pHEE401E after amplification in *E. coli* DH5α. The nucleic acid sequences in the cloned binary vector were verified by Sanger sequencing. After the pHEE401E plasmid was digested with appropriate restriction enzymes, it was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 by electroporation, thereby constructing a CRISPR-CAS9 gene editing system capable of inducing the *Slmlo1* mutation in the target *SlMLO1* gene. In the future, this CRISPR-CAS9 gene editing system will make it possible to develop powdery mildew-resistant commercial cluster tomato varieties.

KEYWORDS: Tomato, CRISPR-CAS9, Gene editing, *MLO*

COMMITTEE

Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Prof. Dr. Ş. Evrim ARICI ŞENKAYNAĞI

Assoc.Prof. Dr. Hakan FİDAN

ÖNSÖZ

Tez çalışmamda, domates yetiştiriciliğinde önemli verim kayıplarına neden olan külleme hastalık etmeni *Leveillula taurica*'ya karşı dayanıklılık mekanizmalarının geliştirilmesine yönelik olarak CRISPR/CAS9 genom düzenleme tekniğinin potansiyelini ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu çalışmada küllemeye hassas, tolerant ve dayanıklı domates çeşitleri kullanılarak, dayanıklılığın altında yatan moleküler mekanizma anlaşılması hedeflenmiştir. Ayrıca küllemeye karşı hassaslık genleri olarak belirtilen 3 farklı *SlMLO1* geni üzerinde CRISPR/CAS9 yöntemi ile mutasyon meydana getirerek *MLO*-mutant bitkiler elde edilmesi amaçlanmaktadır. Genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde RT-PCR yöntemi kullanılmıştır.

Tez sürecindeki her aşamada bana yol gösteren, bilgi ve deneyimleriyle tezimi zenginleştiren danışman hocam Prof. Dr. Özer ÇALIŞ'a ve değerli görüş ve katkılarıyla çalışmamın gelişmesine katkı sağlayan Doç. Dr. Hakan FİDAN'a minnettarlığımı ifade etmek isterim.

Tez çalışması sırasında bilgilerini bizlerden esirgemeyen, her çalışmamda yardımcı olan canım arkadaşım Abdul Razak AHMED'e teşekkür ederim.

Bu süreçte fiziksel ve psikolojik olarak yardımlarıyla tezimin başarılı bir şekilde tamamlanmasına olanak sağladığı için, çalışmalarım sırasında bana yol arkadaşlığı yaptığı için her daim yanımda olarak bana her zaman güç verdiği için kıymetli kardeşim diğer bir tabirle diğer yarım, ikizim Emine KOCAKAYA 'ya çok minnettarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca maddi/manevi desteğini eksik etmeyen bu süreçte beni yalnız bırakmayan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme özellikle her daim arkamda dağ gibi durduğunu hissettiren, her sıkıştığımda bana bir yol gösterici olan, sevgisiyle içimi ısıtan bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan bu dünyamdaki en büyük kahramanımdır canım dedem. Ve canım ananeme bu zorlu süreçte dualarıyla ve desteğiyle her zaman yanımızda olduğu için şefkatini bizlerden hiçbir zaman eksiltmediği için sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim. Her daim her zaman arkamda dağ gibi durduğunuz için çok teşekkür ederim canım ailem.

Son olarak Yüksek lisans eğitimim boyunca her anlamda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Mahinur BİLGİ ve İsmail Hilmi BİLGİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
ÖNSÖZ iii
AKADEMİK BEYAN vi
SİMGELER VE KISALTMALAR vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ xi
1. GİRİŞ 1
2 KAYNAK TARAMASI 5
2.1 Domates 5
2.2 Hastalık etmeni *Leveillula taurica* 7
2.3 Hastalık Çemberi ve Epidemiyolojisi 9
2.4 Küllemeye Karşı Dayanıklılıkta Rol Oynayan Genler 11
2.5 *MLO* Genleri Özellikleri 12
3 MATERYAL VE METOT 14
3.1 Materyal 14
3.1.1 Bitki Materyali 14
3.1.2 Kullanılan Besi ortamları 14
3.2 Metot 18
3.2.1 Domates Bitkisinden DNA izolasyonu 18
3.2.2 *SlMLO* Genlerinin Domates Bitkisinde Doğrulanması 19
3.2.3 gRNA Tasarımı ve Konstrakt Yapısının Oluşturulması 20
3.3 GoldenGate Reaksiyonu 23
3.4 Heat-shock ile Plasmidin *E.coli* DH5a'ya aktarılması 24
3.5 Koloni PCR 24
3.6 Plazmid izolasyonu 26
3.7 *A. tumefaciens* EHA105 Bakterisi Aracılığı İle Gen Aktarımı 26
3.7.1 *A. tumefaciens* competent cell hazırlama ve elektroporasyonu işlemi 26
3.7.2 Elektroporasyon ile Plasmidin Elektrokompatent *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 Suşuna Aktarılması 27
4 BULGULAR VE TARTIŞMA 29

4.1 *SlMLO* Genlerinin Domates Bitkisinde Doğrulanması 29
4.2 Golden-Gate© Reaksiyonu 30
4.3 Heat-shock ile Plasmidin *E.coli* DH5α'ya Aktarılması 31
4.4 Koloni PCR 33
4.5 Plazmit izolasyonu 34
4.6 Elektroporasyon ile Plasmidin Elektrokompatent *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 Irkına Aktarılması 35
5 SONUÇLAR 40
6 KAYNAKLAR 42

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "Domateste Külleme Hastalık Etmeni *Leveillula taurica'*ya Karşı CRISPR-CAS9 Tabanlı Gen Düzenleme Protokolünün 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

Gülsüm 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
.	: Ondalık ayıraç
ng	: Nonogram
F	: Forward
R	: Reverse
µM	: Mikrometre
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. Türkiye'de en fazla domates üretiminin yapıldığı iller (Demircan 2023).....2
Şekil 2.1. Dünya geneline en çok domates üretimi yapan ülkelerin üretim.....
miktarları (FAO, 2026). 7
Şekil 2.2. Domates külleme etmeni, *Leveillula. taurica (*Lév) G. a) Misel .....
yapısı; b) Simptomları.....10
Şekil 2.3.*SLMLO* gen ailesi özellikleri 13
Şekil 3.1.*SlMLO1* geninin şematize edilmiş hali ve bu geni hedeflemek için.....
oluşturulacak T-DNA yapısı**. a)** Ekzonlar mavi kutucuk olarak gösterilmiş olup, ...
farklı uzunluklardaki 5 ekzondan oluşmaktadır. gRNA dizilimleri ve isabet ettiği .....
yerler belirtilmiştir. **b)** SpCas9 endonükleazını, gRNA ifade kasetini ve seçilim .....
için hptII (higromisin dayanıklılık) ifade kasetleri, T-DNA üzerinde gösterilmiştir.....22
Şekil 3.2.*SlMLO* genlerini hedef alan gRNA'leri taşıyan pHEE401E vektörünün .....
fiziksel haritası 23
Şekil 4.1. F1 Domates çeşidinin Anne(A) ve Baba(B) ebeveyn hatlarında *SLMLO1* .....
gen bölgelerine spesifik primerler kullanılarak PCR işlemi ile birlikte genlerin.....
varlığının doğrulanmasına ait jel görüntüsü.....29
Şekil 4.2. GoldenGate klonlama yöntemi aşamaları.....31
Şekil 4.3. Heat-shock transformasyonundan sonra kanamisinli LB agar .ortamında……
pHEE401E içeren transformant plasmidin aktarılmasından sonra oluşan……..
*E.coli*DH5α.kolonileri.....32
Şekil 4.4. Koloni PCR ürünlerinin agarose jel üzerindeki görüntüsü ve koloni alınımı .33
Şekil 4.5.PCR ile doğrulanan koloniler 5 µl kanamisin içeren 5 ml LB broth .....
ortamına alınması.....34
Şekil 4.6. Plazmit izolasyonu aşamaları ve Qubit cihazında plazmid yoğunluk ölçümü 35
Şekil 4.7. Plasmid içerisine aktarılan gRNA konumlarının sanger sekans yöntemi .....
ile doğrulanması sonucu elde edilen kromotogramlar 35
Şekil 4.8. Plasmidin Agrobacterium EHA105 suşuna aktarılması; (a)elektroporasyon….
küvetinin BİORAD Gene Pulser Xcell cihazının elektroporasyon haznesine……
.yerleştirilmesi, (b) Elektroporasyon sonucu LB agar (+Kan ve +Rif içeren) ortamında..
gelişen taransfomant Agrobacterium EHA105 kolonileri, (c) LB sıvı (+Kan ve +Rif…..
içeren) ortamında gelişen Agrobacterium EHA 105 suşu.....36

Şekil 4.9. Elektroporasyon sonrası transformant *Agrobacterium tumefaciens* EHA ..... 105 suşlarına ait koloni PCR jel görüntüsü.....37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Domates bitkisinin modern taksonomide sınıflandırılması 6
Çizelge 2.2. Domates külleme hastalık etmeni *Leveillula taurica* taksonomisi 8
Çizelge 3.1. Luria Bertani Agar besiyeri hazırlamak için gerekli malzemeler 14
Çizelge 3.2. Sıvı LB ortamlarında kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları 15
Çizelge 3.3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları 15
Çizelge 3.4. Tezde kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları 17
Çizelge 3.5. Tez çalışmasında kullanılan kitler 17
Çizelge 3.6. Çalışmalarda kullanılan PCR bileşenleri ve hacimleri 19
Çizelge 3.7. Çalışmalarda kullanılan PCR amlifikasyon şartları 20
Çizelge 3.8. *SlMLO* genlerine ait genomik sekanslardan yararlanılarak gen ..... bölgelerinin domates çeşidinde varlığını ortaya koyabilmek için dizayn edilen ..... spesifik primer dizilimleri 20
Çizelge 3.9. Seçilen gRNA dizilimleri ON-TARGET, OFF-TARGET analiz sonuçları ve *SlMLO1* üzerindeki pozisyonları. Ok işareti yönleri gRNA yönünü işaret etmektedir. 21
Çizelge 3.10. gRNA konumlarını ve dizilimlerinin doğrulamak amacı ile genlere ..... özgü dizayn edilen primer dizilimleri ve beklenen Tm değerleri ve ürün boyutları 22
Çizelge 3.11. GoldenGate klonlama amplifikasyonunda kullanılacak kompotentler ve hacimleri 23
Çizelge 3.12. GoldenGate reaksiyonuna ait döngü koşulları 24
Çizelge 3.13. Koloni PCR bileşenleri ve hacimleri 25
Çizelge 3.14. Koloni Amlifikasyon için PCR Koşulları 25

1. GİRİŞ

İnsanlık tarihi boyunca tüm canlılarda olduğu gibi beslenme, en temel gereksinimlerin başında yer almıştır. Günümüzde hızlı kentleşmenin bir sonucu olarak nüfus yoğunluğunun artması; su kaynakları ile tarıma uygun alanların azalması, erozyon, gıda israfı ve denizlerin kirlenmesi gibi birçok olumsuzluğu beraberinde getirmiştir. Bu durum, artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılayacak düzeyde üretim yapılabilmesi için ekilebilir alanların genişletilmesini güçleştirmektedir. Bu nedenle, tarımsal üretimde hem ürün miktarının arttırılması hem de ekonomik değeri yüksek bitkilerin veriminin yükseltilmesi zorunlu hale gelmiştir (Arvas ve Kaya 2019).

Günümüzde insanlar sebze ve meyveleri yalnızca besin ihtiyacını karşılamak amacıyla değil; içerdikleri vitaminler, mineraller ve antioksidan bileşenler nedeniyle sağlık üzerindeki olumlu etkileri açısından da değerlendirmektedir. Bu besin öğeleri, insan sağlığının korunması ve iyileştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu kapsamda, sebzeler arasında hem besin değeri hem de sağlık açısından öne çıkan ürünlerin başında domates gelmektedir (Durmuş vd. 2018).

Domates (*Solanum lycopersicum*), *Solanaceae* familyasına ait olup dünya genelinde en yaygın olarak yetiştirilen sebze türlerinden birisidir (Güvenç 2019).

Domates, dünya genelinde yetiştirilen bahçe bitkileri arasında hem üretim hem de tüketim miktarı bakımından en önemli sebze türlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Son on yıllık süreçte domates üretiminde sürekli bir artış gözlenmiş, bu artış açık alanlar ve seralarda yapılan üretimin yaygınlaşmasıyla birlikte tarımsal ekonomi üzerinde önemli bir etki oluşturmuştur. Domatesin ilk olarak Avrupa'da kültüre alınarak yaygınlaşmasına rağmen, günümüzde Türkiye, Çin, Hindistan, Amerika Birleşik Devletleri ve Mısır gibi ülkeler küresel ölçekte başlıca domates üreticileri arasında yer almakta ve bu alanda birçok Avrupa ülkesini geride bırakmaktadır. Söz konusu ülkeler, yüksek üretim miktarları sayesinde dünya sıralamasında üst basamaklarda bulunmaktadır. Türkiye ise yıllık yaklaşık 14,6 milyon tonluk domates üretimiyle Çin, Hindistan'ın ardından dünyada üçüncü sırada yer almaktadır (Durmuş vd. 2018).

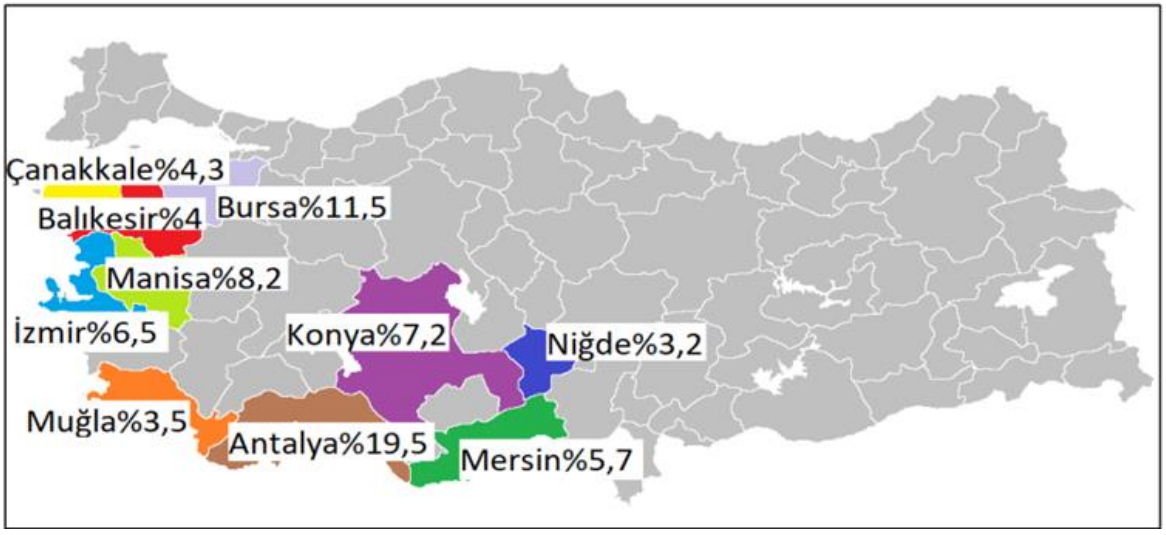
Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 2024 yılında sebze üretimi bir önceki yıla göre %5,6 artış göstermiş, domates üretiminde ise %9,9'luk artış gerçekleşmiştir. Türkiye'nin geniş iklim özellikleri ve geniş üretim alanları sayesinde domates üretimi ülke ekonomisinde önemli bir paya sahiptir (TUİK 2024)

Türkiye'de domates yetiştiriciliği ilk kez Adana ilinde gerçekleştirilmiştir. Domates hem taze olarak tüketilebilen hem de çeşitli işlemlerden geçirilerek değerlendirilebilen önemli bir sebzedir. Konserve, domates suyu, turşu, salça, kurutulmuş domates ve ketçap gibi birçok ürüne dönüştürülebilmektedir. Ülkemizde üretilen domatesin yaklaşık %25–30'luk kısmı sanayide işlenirken, geri kalan bölümü taze tüketim amacıyla kullanılmaktadır (Serin ve Horuz 2022).

Domates hem temel hem de uygulamalı araştırmalarda tercih edilmesini sağlayan çok sayıda avantaja sahip bir bitkidir. Farklı çevre ve yetiştirme koşullarına kolaylıkla uyum sağlayabilmesi, nispeten kısa bir yaşam döngüsüne sahip olması ve yüksek tohum üretme kapasitesi bu avantajlar arasında yer almaktadır. Ayrıca genom büyüklüğünün

göreceli küçük olması (yaklaşık 950 Mb), gen çoğaltma çalışmalarına elverişli yapısı, yüksek oranda kendine-döllenme ve homozigotluk oluşturabilmesi, tozlaştırma ve melezleme işlemlerinin kolay uygulanabilmesi, aşılamaya uygunluğu, aseksüel çoğalma yeteneği ve farklı bitki dokularından tam bitki elde edilebilmesi gibi özellikleri, domatesi araştırmalar için ideal bir model bitki hâline getirmektedir (Arvas ve Kaya 2019).

Sebze üretimi içerisinde en yüksek pay domatese ait olup, bu ürün toplam sebze üretiminin yaklaşık %41–42'sini oluşturmaktadır. Güncel verilere göre Türkiye'de üretilen domates miktarı yaklaşık 12,8 milyon ton düzeyindedir. Domatesten sonra sebze üretiminde sırasıyla 3,9 milyon ton ile karpuz, 2,6 milyon ton ile hıyar, 2,2 milyon ton ile biber, 1,9 milyon ton ile soğan ve 1,8 milyon ton ile kavun yer almaktadır (TUİK 2020). Türkiye'de sebze üretiminin bölgesel dağılımı incelendiğinde, en yüksek üretim payının Akdeniz Bölgesi'ne ait olduğu görülmektedir. Toplam sebze üretiminin yaklaşık %26'sı bu bölgede gerçekleştirilmektedir. Akdeniz Bölgesi'ni %22'lik pay ile Ege Bölgesi izlerken, Marmara Bölgesi %20, Orta Karadeniz Bölgesi %12 ve Orta Anadolu Bölgesi %10 oranında katkı sağlamaktadır. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin sebze üretimindeki payı ise %9 düzeyindedir(Duman vd. 2020).



Şekil 1.1.Türkiye'de en fazla domates üretiminin yapıldığı iller (Demircan 2023)

Türkiye'de domates gerek açıkta tarla sebzesi gerekse örtü altı sebze olarak yaygın şekilde üretilen önemli tarımsal bir üründür. Ülkemizin farklı iklim ve çevre koşullarına sahip olması, domates yetiştiriciliğinin geniş alanlara yayılmasını mümkün kılmaktadır. Özellikle Ege bölgesi ile birlikte Akdeniz, Batı ve Doğu Marmara bölgeleri domates üretimi açısından öne çıkmaktadır. Türkiye'de domates üretimi yıl içerisinde hem açık alan hem de örtü altı yetiştiriciliği sayesinde kesintisiz olarak devam etmektedir (Ertürk ve Çirka 2014). Ancak domates yetiştiriciliğinde verim kayıplarına yol açan çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörleri ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu stres etmenleri içerisinde fungal patojenler, bitkisel üretimde önemli verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır. Bu kayıpların azaltılması için kültürel önlemler, dayanıklı çeşit kullanımı ve kimyasal mücadele gibi farklı yöntemler uygulanmaktadır. Ancak özellikle fungusitlerin

yoğun kullanımı çevresel risklerin artmasına ve patojenlerde dayanıklılık gelişimine neden olabilmektedir. Bu nedenle sürdürülebilir mücadele yöntemlerine ilgi giderek artmaktadır (Çelik vd. 2017).

Domateste külleme hastalığının en önemli etmenlerinden biri *Leveillula taurica*'dır. Hastalık dünyanın birçok domates yetiştirme bölgesinde yaygın olarak görülmekte olup özellikle sıcak ve kurak iklim koşullarında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Etmen yaprak dokusuna girerek gelişen endoparazit bir külleme fungusudur ve diğer etmenlere göre yaprak dokusu içerisine stomalar yardımıyla girerek gelişim göstermektedir (Massire vd. 2025).

Bitkiler ise bu etmenlere karşı gelişmiş savunma mekanizmaları oluşturarak hayatta kalmaya çalışmaktadır. Bitki ile patojen arasındaki etkileşim, patojenin bitki tarafından algılanmasıyla başlamaktadır. Patojene ait bazı moleküller bitkide bulunan dayanıklılık mekanizmaları tarafından tanınmakta ve bu durum savunma özelliklerinin devreye girmesine neden olmaktadır. Böylece bitki patojenin yayılımına karşı tepkiler oluşturmaktadır. Bitkilerde görülen hipersensitif reaksiyon (HR) hastalık etmenine karşı geliştirilen etkili savunma mekanizmalarından biridir. Bu olay sırasında enfekte hücrelerde programlı hücre ölümleri meydana gelmekte ve patojenin sağlıklı dokulara ilerlemesi engellenmektedir. Savunma tepkimelerinin başlamasıyla birlikte hücre duvarında kalınlaşma, lignin ve kalloz birikimi ile antimikrobiyal bileşiklerin sentezi gibi çeşitli biyokimyasal değişimler ortaya çıkmaktadır. Bu değişimler hastalık etmeninin bitki içerisinde yayılmasını baskılamada önemli rol oynamaktadır. Bitki-patojen ilişkilerinde dayanıklılığın oluşabilmesi için bitkinin hastalık etmenini doğru şekilde tanımlayabilmesi gerekmektedir. Tanıma mekanizmasının gerçekleşmemesi durumunda ise patojen bitki dokularında gelişimini sürdürmekte ve hastalık belirtileri ortaya çıkmaktadır. *MLO* genleri, külleme hastalığına karşı duyarlılık oluşumunda görev alan genler arasında bulunmaktadır. Bu genlerde meydana getirilen mutasyonların, külleme etmenine karşı dayanıklılık kazandırabildiği bildirilmektedir. Bu nedenle *MLO* genleri, domateste dayanıklılık geliştirme çalışmalarında önemli hedef bölgelerden biri olarak kabul edilmektedir (Tör 1998).

CRISPR/CAS9 teknolojisi, bitki genomunda istenilen bölgeyi yüksek doğrulukla hedefleyerek geleneksel ıslah yöntemlerine göre daha kontrollü gen değişiklikleri yapılmasına olanak sağlar. Bu sistem sayesinde hastalığa duyarlılık genleri doğrudan düzenlenebilir ve kısa sürede dayanıklı bitki hatları geliştirilebilir. CRISPR/CAS9 uygulamaları, klasik melezleme çalışmalarında karşılaşılan uzun süre, yoğun iş gücü ve istenmeyen genlerin taşınması gibi sorunları büyük ölçüde azaltmaktadır. Aynı anda birden fazla genin hedeflenebilmesi, karmaşık hastalık direnç mekanizmalarının geliştirilmesinde önemli bir avantaj sağlamaktadır. Protein tasarımına ihtiyaç duymaması nedeniyle CRISPR/CAS9 sistemi, TALEN ve ZFN gibi önceki genom düzenleme tekniklerine göre daha kolay uygulanabilmektedir. Teknolojinin yüksek düzenleme başarısı, araştırmacıların hedef genlerde etkili mutasyonlar oluşturmasını kolaylaştırmaktadır. CRISPR/CAS9 ile elde edilen bazı bitkilerde yabancı DNA taşımayan (transgenik olmayan) bireyler oluşturulabilmekte, bu durum biyogüvenlik açısından önemli bir avantaj sunmaktadır. Bitki hastalıklarına karşı dayanıklılık geliştirilmesinde CRISPR/CAS9, fungisit kullanımını azaltabilecek çevre dostu bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Paul vd. 2021).

Bu proje kapsamında, domateste önemli verim ve kalite kayıplarına neden olan külleme hastalığı etmeni *Leveillula taurica*'ya karşı dayanıklılık geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, hastalığa duyarlı olduğu bilinen domates genotiplerinde külleme hassaslığı ile ilişkili olan *SLMLO* geninin işlevinin CRISPR/CAS9 gen düzenleme teknolojisi kullanılarak değiştirilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, *SLMLO* geninin birinci ekzon bölgesini hedefleyen rehber RNA (gRNA) dizileri tasarlanmış ve CRISPR/CAS9 sisteminin bileşenleri pHEE401E binary vektörüyle aktarılmıştır. Gen bölgesinde oluşturulacak mutasyonlar sonucunda *SLMLO* geninin işlevinin ortadan kaldırılması ve böylece bitkide külleme etmenine karşı doğal bir dayanıklılık mekanizmasının oluşturulması amaçlanmıştır. Böylece dominant olan *MLO* geni külleme hastalık etmenine karşı *mlo* geni haline getirilerek dayanıklılık oluşturulmuştur. Çalışma, klasik ıslah yöntemlerine kıyasla daha kısa sürede dayanıklı bitki materyali geliştirilmesine katkı sağlaması ve domateste sürdürülebilir hastalık yönetimine yönelik yeni bir yaklaşım sunması bakımından önem taşımaktadır.

2 KAYNAK TARAMASI

2.1 Domates

Solanaceae familyası içerisinde *Solanum* cinsi domates önemli ekonomik öneme sahip bir sebze türüdür (Gür et al. 2021). Domates çok yıllık otsu bir patlıcangiller bitki ailesi içerisinde yer almaktadır, ancak iki yıllık ve çok yıllık formları olsa da genellikle tek yıllık ürün olarak yetiştirilmektedir. Domates, tropikal ve ılıman iklimlerde açık alanda veya ılıman iklimde sera altında üretilebilmektedir. Seralar genellikle büyük üretim yapan yerlerde kullanılmaktadır. Büyüme için doğru ve yeterli güneşe sahip ılıman iklimlerde, çimlenmeden çiçeklenmeye kadar yaklaşık 45 gün ve meyve olgunlaşmasının başlangıcına ulaşmak için 90-100 güne ihtiyaç bulunmaktadır (Kal vd. 2018).

Anavatanı Orta ve Güney Amerika olan domatesin adı, Güney Amerika yerli dillerinde kullanılan "xitomate" veya "zitomate" sözcüklerinden türetilmiştir. İlk dönemlerde zehirli olduğu yönündeki inanışlar nedeniyle tüketimi sınırlı kalmış, ancak zamanla besin değeri ve kullanım alanlarının anlaşılmasıyla yaygın olarak yetiştirilmeye başlanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 19. yüzyıldan itibaren pişirilerek tüketimi yaygınlaşırken, Anadolu'ya Osmanlı İmparatorluğu döneminde Halep üzerinden giriş yaptığı ve buradan özellikle güney bölgeler başta olmak üzere ülkenin farklı kesimlerine yayıldığı bilinmektedir. Günümüzde ise domates, Türkiye'nin hemen hemen tüm bölgelerinde başarıyla yetiştirilen önemli bir tarım ürünü konumundadır (Güvenç 2019).

Kökeni And Dağları'na dayanan domates, 16. yüzyılda Avrupa'ya taşınmış ve zamanla dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilen önemli bir tarım ürünü hâline gelmiştir. Günümüzde domates hem üretim miktarı hem de tüketim oranı bakımından küresel ölçekte ekonomik değeri yüksek bir sebze olarak öne çıkmaktadır. Bunun yanı sıra, domates bitkisi dikotiledon kültür bitkilerine ait genlerin işlevsel analizlerinde sıklıkla tercih edilen bir model organizma olarak da kullanılmaktadır (Durmuş vd. 2018).

Domatesin hem yabani hem de kültüre alınmış çok sayıda uzak akrabası bulunmaktadır. Bu akrabalar Galapagos Adaları'ndan başlayarak Peru'ya, And Dağları boyunca uzanarak Ekvator ve Bolivya'ya kadar geniş bir coğrafyada yayılım göstermektedir. Kültür domatesinin yabani türleri, deniz seviyesinden yükseltiye ve enlemsel farklılıklara bağlı olarak önemli ölçüde çeşitlilik sergilemektedir. Bu geniş varyasyon, söz konusu türlerin evrimsel gelişimi açısından son derece değerli bir genetik kaynak oluşturmakta ve neredeyse tükenmez nitelikte bir gen havuzu sunmaktadır (Sönmez ve Ellialtıoğlu 2014).

Domates, sahip olduğu özgün besin bileşenleri sayesinde insan beslenmesinde ve sağlık alanında önemli bir yere sahiptir. Özellikle likopen, beta-karoten, flavonoidler, C vitamini ve hidroksisinnamik asit türevleri bakımından zengin olması, bu bitkinin besleyici ve biyolojik açıdan değerli bir gıda kaynağı olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır (Durmuş vd 2018).

Domates, 2n=24 kromozom sayısına sahip diploid bir bitki türüdür. Solanaceae familyası dünya genelinde 3000'den fazla türü bünyesinde barındırmaktadır. Domatesin ise 10.000'in üzerinde varyete ve çeşidinin bulunduğu bildirilmektedir. Tür, ilk kez 1754 yılında Philip Miller tarafından *Lycopersicon esculentum* adıyla bilimsel olarak

tanımlanmıştır. Domates üzerine yapılan ıslah çalışmalarının başlangıcı, diğer patlıcangillerle karşılaştırıldığında görece daha geç bir döneme rastlamaktadır. Bunun başlıca nedenlerinden biri, geçmişte domatesin zehirli olduğuna dair yaygın inanışın bulunması ve bu nedenle tüketimine temkinli yaklaşılmasıdır. İlk dönemlerde domates Avrupa'da "mala aurea" (Altın Elma) ve "poma amoris" (Aşk Elması) isimleriyle anılmıştır. Meksika kökenli olan domates, burada "tomatl" olarak adlandırılmış; bu ifade zamanla evrilerek günümüzde kullanılan "tomato" ismini almıştır (Durmuş vd. 2018).

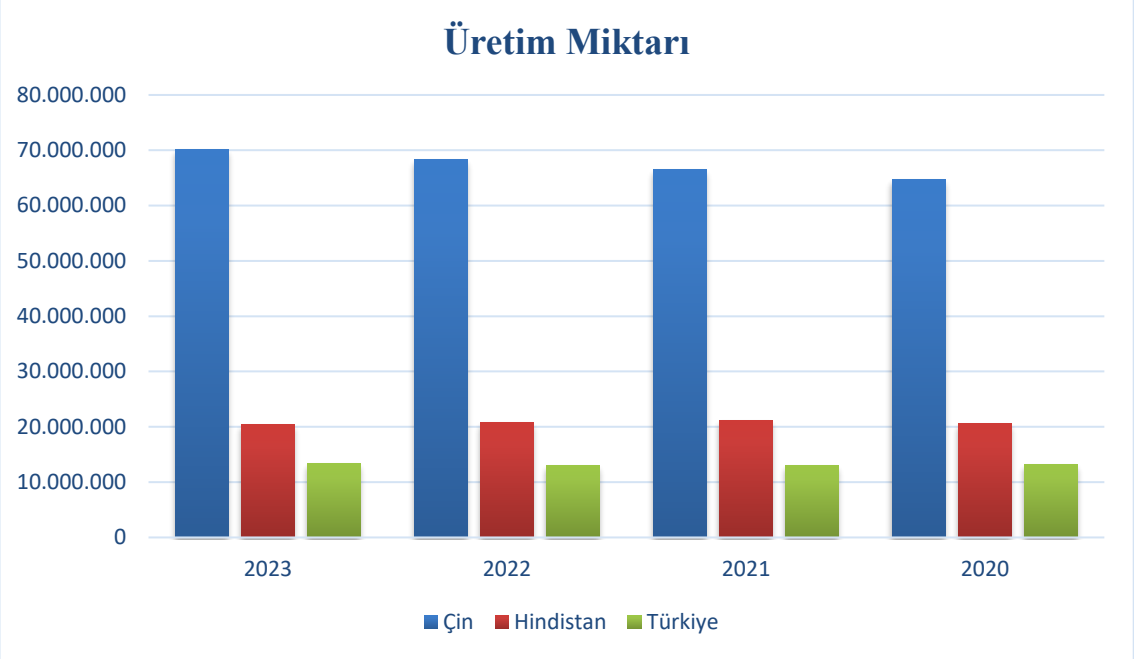
Solanaceae familyası içerisinde domates, patates, tütün, biber ve patlıcan gibi ekonomik değeri yüksek birçok kültür bitkisi yer almaktadır. Son yıllarda domates genomunun dizilenmesinin ardından, bu bitkinin bilimsel çalışmalarda model organizma olarak kullanımına yönelik ilgi belirgin şekilde artmıştır (Bozokalfa ve Duman 2009).

Domates dünya genelinde yetiştirilen bahçe bitkileri arasında en önemli üç türden biri olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra, tüketim miktarı bakımından da dünya çapında en fazla tercih edilen sebzelerden biridir. Son on yıl içerisinde domates üretiminde düzenli bir artış görülmüş; hem açık alanlarda hem de seralarda yapılan üretimin yükselmesi, ekonomik büyümeye kayda değer katkı sağlamıştır (Durmuş vd. 2018). Domates bitkisi modern taksonomide *Solanales* takımı içerisinde yer almaktadır (Çizelge 2.1.) (Gerszberg vd. 2015).

Çizelge 2.1. Domates bitkisinin modern taksonomide sınıflandırılması

Alem:	***Plantae***
Alt Alem:	*Tracheophyta*
Üst Bölüm	*Spermatophyta*
Bölüm:	*Angiospermae*
Sınıf:	*Magnoliopsida*
Alt Sınıf:	*Asteridae*
Takım:	*Solanales*
Familya	*Solanaceae*
Cins:	*Solanum*
Tür:	*Solanum lycopersicum*

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2026 yılı verilerine göre Türkiye, yaklaşık 13 milyon tonluk üretim miktarıyla dünya domates üretiminde önemli bir konuma sahiptir. Bu üretim düzeyiyle Türkiye, Çin ve Hindistan'ın ardından üçüncü sırada yer almaktadır. TÜİK tarafından yayımlanan 2023 yılı istatistiklerine göre ise Türkiye'nin toplam sebze üretimi yaklaşık 31,8 milyon ton olarak kaydedilmiştir. Sebze üretimi içerisinde en yüksek pay domatese ait olup, domates üretimi toplam sebze üretiminin yaklaşık %40,8'ini oluşturmaktadır. Türkiye'de domates yetiştiriciliği hem açık alanlarda hem de örtü altı sistemlerde gerçekleştirilmektedir. Örtü altı domates üretimi, toplam domates üretiminin yaklaşık %31,3'üne karşılık gelmekte olup bu miktar yaklaşık 4 milyon ton düzeyindedir. Türkiye 13 milyon tonluk üretim ile sektöre önemli bir katkısı olmuştur (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Dünya geneline en çok domates üretimi yapan ülkelerin üretim miktarları (FAO, 2026).

2.2 Hastalık etmeni *Leveillula taurica*

Domates üretiminde çeşitli hastalık etmenleri kayıplar satışa ve üretime engel olmaktadır. Bu kayıplar depolama, taşıma ve pazarlama aşamalarındaki kayıpların yanı sıra üretim esnasında etmen ve etkenler bu kayıplara neden olmaktadır. Domatesin iklim isteği, dar yaprakları, su içeriği özellikle yeşil aksamında zarar yapan hastalıklara ve zararlılara karşı hassaslığı bu üründe ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Biyotik etmenler içerisinde penetrasyon yeteneğine sahip funguslar önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Zheng vd. 2013). Özellikle külleme hastalıklarına sebep olan fungal patojenler, hem açıkta hem de örtüaltı domates üretiminde önemli verim kayıplarına neden olan yıkıcı hastalık grubunu oluşturmaktadır (Carrion 2022).

Çizelge 2.2. Domates külleme hastalık etmeni *Leveillula taurica* taksonomisi

Alem	*Fungi*
Bölüm	*Ascomycota*
Alt Bölüm	*Pezizomycotina*
Sınıf	*Leotimycetes*
Takım	*Erysiphales*
Familya	*Eriysiphaceae*
Cins	*Leveillula*
Tür	*Leveillula taurica (Lev) G.*

Verim ile kaliteyi ciddi oranda düşüren ve domates yapraklarında görülebilen külleme hastalık etmenleri olarak üç farklı patojen neden olmaktadır; *Leveillula taurica*, *Oidium neolycopersici ve Oidium lycopersici* olarak adlandırılabilir. Bu patojenler verim ve kalitede ciddi ürün kayıplarına yol açarak dünya çapında domates üretimini olumsuz etkilemektedir Bu külleme hastalık etmenlerinden özellikle *L. taurica* (Çizelge 2.2), ülkemizde serada yetiştiricilik yapılan bölgelerde en çok rastlanan ve zarar yapma potansiyeli en fazla olan türlerden bir tanesidir(Tümay ve Özkaya 2020).

Külleme hastalığı etmenleri, yaşamlarını sürdürebilmek için canlı bitki hücre ve dokularına ihtiyaç duyan zorunlu biyotrof patojenlerdir. Enfekte bitki kısımlarında oluşan beyaz, unumsu yapı nedeniyle bu hastalıklar "külleme" olarak adlandırılmaktadır. Küllemeler, bitkilerde genel olarak gelişme geriliğine yol açarak dokuların erken yaşlanmasına, bodurlaşmaya, yapraklarda kıvrılma ve renk değişimlerine neden olmakta; ayrıca tomurcukların dökülmesi gibi olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Yaprak yüzeyinde meydana getirdikleri belirtiler sonucunda fotosentez alanı azalmakta ve bu durum bitkide ciddi verim kayıplarına yol açmaktadır. Külleme etmenleri, otsu bitkilerden orman ağaçlarına kadar geniş bir konukçu yelpazesinde yaygın olarak görülmekte olup çoğunlukla aynı familyaya ait tek bir bitki türünü ya da yakın akraba türleri enfekte etmektedir. Günümüzde konukçuya özelleşmiş 850'den fazla külleme türünün varlığı rapor edilerek bildirilmiştir (Tümay ve Özkaya 2020).

Külleme hastalığı hem endofitik hem de epifitik miselyum oluşturan bir endoparazittir ve ilk olarak Asya, Akdeniz ve Afrika'daki sıcak kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde rapor edilmiştir. Domateste külleme hastalığı genellikle sadece olgun, tamamen gelişmiş yaprakları enfekte etmektedir (Mosquera vd. 2019).

Sebzeler arasında özellikle Patlıcangiller *(Solanaceae*) ve Kabakgiller *(Cucurbitaceae*) familyalarına ait türlerde külleme hastalığı yaygın olarak görülmektedir. Patlıcangiller familyasında küllemeye neden olan etmen *Leveillula taurica* olup, bu patojen patlıcan, patates ve domates gibi önemli kültür bitkilerini enfekte etmektedir.

Kabakgiller familyasında ise külleme hastalığına başlıca *Golovinomyces cichoracearum* (*= Erysiphe cichoracearum) ve Podosphaera xanthii (= Sphaerotheca fuliginea (Schltdl*.) Pollacci) türleri neden olmaktadır. Bu etmenlerin konukçuları arasında hıyar, kabak, kavun ve karpuz yer almaktadır. Külleme hastalığı, hem sera koşullarında hem de açık alanda yetiştirilen sebzelerde yaygın olarak görülmekte olup, serada yapılan sebze yetiştiriciliğinde düzenli ve dönemsel olarak mücadele edilmesi gereken önemli bir hastalık konumundadır (Tümay ve Özkaya 2020).

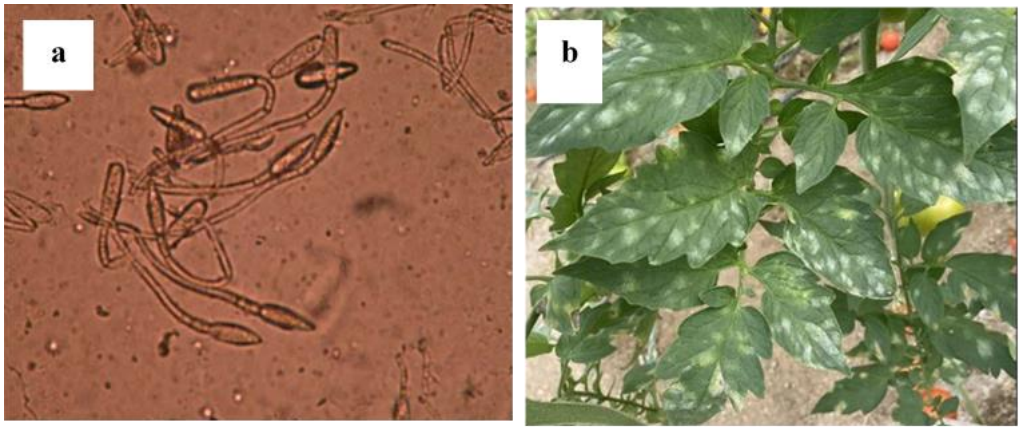
Leveillula taurica (Lév.) Arn. (*Oidiopsis taurica* (Lév.) Salmon) adlı külleme fungusu, çok sayıda ve çeşitli bitki türünü enfekte etme yeteneği bakımından benzersiz bir yaprak patojenidir. *L. taurica*'yı 59 bitki ailesinden yaklaşık 710 konukçu türünde hastalık yaptığı bildirmiştir. *L. taurica*'nın konukçu aralığının, ekonomik açıdan önemli 27 mahsul konukçusu da dahil olmak üzere en az 750 bitki türünü içerdiğini göstermektedir. Bu patojenle ilgili raporların çoğu, Asya, Akdeniz ve Afrika'daki sıcak kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinden gelmektedir (Mosquera vd. 2019).

Hastalığın tipik belirtileri, yaprakların üst yüzeyinde görülen ve rengi açık yeşilden parlak sarıya kadar değişebilen, yaklaşık 0,3–1,2 cm çapındaki lezyonlardır. Zamanla bu lekeler genişleyerek koyulaşır ve kahverengi bir görünüm kazanır. Yaprakların alt yüzeyinde ise bu alanların karşılığında açık renkli, kül benzeri bir tabaka oluşur. Uygun çevresel koşullar sağlandığında hem yaprağın alt hem de üst yüzeyinde yoğun şekilde konidiofor ve konidi oluşumu gözlenmektedir. Şiddetli enfeksiyonlarda yapraklar tamamen kuruyarak canlılığını yitirmektedir; ancak çoğunlukla gövdeden kopmadan bitki üzerinde kalmaktadırlar. Hastalık gövde ve meyvelerde doğrudan bir belirtiye yol açmaz. Buna karşın, yaprakların büyük oranda dökülmesi sonucunda meyveler doğrudan güneş ışığına maruz kalır ve güneş yanıklığı zararları ortaya çıkmaktadır (Ozan ve Maden 2006).

2.3 Hastalık Çemberi ve Epidemiyolojisi

L. taurica, düşük sıcaklıkların hâkim olduğu kuzey enlemlerinde kışı geçiremez. Bu nedenle söz konusu bölgelere genellikle kışı daha ılıman geçen güney alanlarından taşınmaktadır. Özellikle ılıman iklimlerde yetiştirilen fidelerin nakli, hastalığın yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Bunun yanında patojene ait sporlar, hava akımları aracılığıyla güneyden kuzeye doğru taşınabilmekte ya da ılıman bölgelerde meydana gelen ani sıcaklık değişimleriyle yayılım gösterebilmektedir. *Leveillula taurica*'nın konidileri 10–35 °C arasındaki sıcaklıklarda çimlenebilmekte olup, sera koşullarında 30 °C'nin altındaki değerler enfeksiyon için elverişlidir (Massire vd. 2025).

Bu külleme etmeni, hiflerinin doğrudan yaprak dokusu içerisinde gelişmesi ve tek bir stomadan birden fazla (1–4 adet) konidiofor oluşturabilmesi bakımından diğer külleme türlerinden ayrılmaktadır. Her konidiofor üzerinde tek bir konidi meydana gelmektedir. Enfeksiyon ilerledikçe beyaz renkli miselyum tabakası içinde küresel yapıda kleistotesyumlar oluşur. Bu yapılar, patojenin bir üretim döneminden diğerine canlılığını sürdürebilmesini sağlayan askus ve askosporları barındırmaktadır (Guzman-Plazola vd. 2003).



Şekil 2.2. Domates külleme etmeni, *Leveillula. taurica (*Lév) G. a) Misel yapısı; b) Simptomları

Külleme hastalık etmeni L. taurica konidiler genellikle uzun, çoğunlukla dallanmış konidioforlar üzerinde, tek tek ya da kısa zincirler halinde meydana gelmektedir. Jones ve Jones (1991)'e göre konidilerin boyutları konukçuya bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Piriform konidilerin boyutları yaklaşık 49,7–71,4 × 16,6–24,1 µm arasında iken, silindirik konidilerde bu değerler 44,6–65,2 × 16,2–22,7 µm olarak bildirilmektedir. Konidiler kısa hifler üzerinde tek tek oluşmakta, çoğunlukla silindirik veya kayık şeklinde görülmekte ve farklı konukçularda boyut bakımından değişkenlik göstermektedir. Genellikle konidilerin uzunluğu 25–95 µm (çoğunlukla 50–79 µm), genişliği ise 14–20 µm aralığında değişmektedir (Ozan ve Maden 2006).

Hastalığın sekonder yayılışı çoğunlukla rüzgârla taşınan konidiler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Konidilerin en iyi çimlenme gösterdiği koşullar yaklaşık 25–26 °C sıcaklık ve %52–75 nispi nem aralığıdır. Bununla birlikte 30 °C'nin üzerindeki sıcaklıklar yaprak dokusunda zararlanmayı arttırmakta ve hastalık belirtilerinin daha hızlı ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Enfeksiyonun gerçekleşebilmesi için gündüz sıcaklıklarının yüksek, gece saatlerinin ise nispeten serin olması yeterli olmaktadır (Massire vd. 2025).

Hastalık etmenin konukçu üzerindeki gelişimini 3 aşamada incelemek doğru olmaktadır. Özellikle penetrasyondan önce *L. taurica* sporları ile konukçu domates bitkileri arasında gen-için-gen ilişkisi olmaktadır. *L. taurica* sporlarının sahip olduğu avirulens genleri ve bu genlerin kodladıkları elisitör proteinler ile konukçunu sahip olduğu *MLO* geni ve bu genin resöptör proteinleri tam bir uyum göstermekte ve patojen domates üzerinde kolonize olabilmektedir (Tör 1998).

Halbuki domates bitkileri içerisinde bulunan *MLO* geni bir dominant gen olup bitkinin hücre duvarı üzerinde 7 adet transmembrane protein yapısından oluşmakta olup hücre içeriğini *L.taurica* sporlarına rapor ettiği için *hassaslık (susceptibility*) geni olarak görev yapmaktadır (Tör 1998).Bu domateste hassaslık sağlayan *MLO1* geni üzerinde yapılacak CRISPR-CAS9 gen düzenleme tekniği ile oluşturulan mutasyon sonucunda *Slmlo1* genine sahip bitkilerin dayanıklılığı sağladığı rapor edilmiştir (Zheng vd. 2016).

Külleme enfeksiyonu görülen bitkilerde fotosentetik alanın azalmasına bağlı olarak verim düşüşü meydana gelir. Ayrıca yaprak ve meyve dökülmeleri görülebilir.

Külleme hastalık etmeni fungus yalnızca yaprak yüzeyini etkileyerek bitkinin zayıflamasına yol açmakla kalmaz; çiçeklere zarar vererek meyve tutumunu engelleyebilir ya da doğrudan meyve dökülmesine neden olarak ekonomik kayıplara sebep olabilmektedir (Yıkılmazsoy ve Çetinkaya 2022).

2.4 Küllemeye Karşı Dayanıklılıkta Rol Oynayan Genler

Domates yetiştirilen alanların büyük kısmında külleme hastalığı etmeni, kimyasal fungisit uygulamalarıyla baskı altına alınmaktadır. Ancak yoğun ve bilinçsiz fungisit kullanımı hem çevre hem de insan sağlığı açısından risk oluşturmakta, ayrıca *L. taurica* popülasyonlarında ilaca karşı direnç gelişimini hızlandırmaktadır. Bu nedenle hastalıkla mücadelede dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi en sürdürülebilir ve etkili stratejilerden biri olarak kabul edilmektedir ve ıslah çalışmalarında öncelikli hedefler arasında yer almaktadır (Chen vd. 2021).

Bitkiler, insan ve hayvanlara kıyasla daha yalın bir bağışıklık düzenine sahiptir. Ancak bu durum, savunmasız oldukları anlamına gelmez. Aksine, doğuştan sahip oldukları bazı koruyucu mekanizmalar sayesinde pek çok patojene karşı dayanıklılık gösterebilirler. Bitkilerde bulunan bu ilk savunma hattı; yaprak yüzeyi, kalın hücre duvarı gibi fiziksel engeller ile önceden bitkilerin üretip dokularında depo ettikleri antimikrobiyal bileşikler gibi kimyasal savunma unsurları bulunmaktadır. Bunlar pasif olarak bitkinin sahip olduğu dayanıklılık mekanizmaları olup bitkilerde aktif dayanıklılık genlerinden oluşan savunma mekanizmalarının varlığı rapor edilmiştir (Çalış 2011).

Domateste *Leveillula taurica*'ya karşı dayanıklılık hem monogenik hem de poligenik mekanizmaların beraber değerlendirilmesini gerektiren karmaşık bir bitki–patojen birlikteliği olarak bilinmektedir. Literatür çalışmalarında *L. taurica*'ya karşı tanımlanan en önemli monogenik dayanıklılık kaynağı, yabani domates türü *Solanum chilense* kökenli '*Lv'* geni bilinmektedir. Bu genin 12'nci kromozom üzerinde yer aldığı, patojenin bitki dokusuna girişinden hemen sonra savunma tepkilerinin hızlı şekilde aktive edilmesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (Chunwongse vd. 1994; Zheng vd. 2013).

Poligenik dayanıklılıkta tek bir genin güçlü etkisinden ziyade, birden fazla lokusun küçük veya orta düzeyde katkısı sonucunda patojen gelişiminin yavaşlatılması, spor oluşumunun azaltılması, kolonizasyonun sınırlandırılması ve hastalık şiddetinin düşürülmesi hedeflenmektedir. Moleküler düzeyde bu dayanıklılık, salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA) ve etilen (ET) gibi çeşitli hormonlar ile birlikte sinyal yollarının dengeli şekilde aktive edilmesi, PR proteinlerinin sentezlenmesi, sistemik kazanılmış dayanıklılığın aktive olması ve savunma ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin aktifleşmesini desteklenmektedir. Özellikle biyotrofik karakterli külleme etmenlerine karşı SA yolu, PR proteinlerinin birikimi ve SAR oluşumu açısından merkezi bir role sahipken, JA ve ET hormonları stres faktörlerinin düzenlenmesine ve savunma ağının güçlendirilmesini sağlamaktadır. Son yıllarda CRISPR/CAS9 teknolojisinin kullanılması, domateste külleme hastalıklarına karşı dayanıklılığın geliştirilmesinde yeni bir yaklaşım olarak kendini göstermektedir. Doğrudan *L. taurica* üzerinde CRISPR/CAS9 uygulamaları sınırlı olmakla birlikte, domateste külleme duyarlılığı ile ilişkili 'SlMLO1' ve 'PMR4' gibi duyarlılık genlerinin hedef olarak belirlenmesi, patojenin bitki hücresini kullanarak enfeksiyon oluşturma kapasitesinin azaltılabileceğini savunmaktadır (Nekrasov vd. 2017; Martínez vd. 2020).

Bitkiler, patojenlere ait belirli moleküler yapı taşlarını (moleküler motifleri) tanıyabilme yeteneğine sahiptir. Bu tanıma gerçekleştiğinde, hücre içinde bulunan dayanıklılık genleri adeta bir orkestra şefi gibi çalışarak emrindeki savunmaya ilişkin pek çok mekanizmayı eş zamanlı biçimde devreye sokmaktadır. Bitki hastalık etmenine karşı sahip olduğu bu mekanizmaların devreye girmesiyle tam bir konukçu-patojen ilişkileri oluşmakta olup burada fungal patojenlerin sahip olduğu *avirulens* (*avirulence*) genleri bunların kodladıkları elisitör proteinler bitkideki dayanıklılık (*Resitance*) geni ve kodladığı reseptör gen bir birini tanımaktadır. Dayanıklılık geni kontrol ettiği savunma mekanizmalarını patojenin kontrolü için çalıştırmaktadır. Konukçu-patojen arasındaki bu ilişki "gen-için-gen" modeli olarak tanımlanmaktadır (Zheng vd. 2016).

Dayanıklılık genlerinin fungal külleme hastalık etmenlerine karşı aktive ettikleri çok sayıda mekanizma bulunmaktadır. Özellikle külleme etmeni funguslara karşı reaktif süper oksitlerin oluşumu (ROS), hipersentif hücre ölümü ve patojenisite ilişkili (Patohogenesis related proteins) proteinlerin sentezien etkili savunma mekanizmalarıdır (Çalış 2011).

2.5 *MLO* Genleri Özellikleri

MLO geni "*Mildew resistance locus O*" ifadesinin kısaltması olup, Freisleben ve Lein (Berg vd. 2015) tarafından 1942'lerde ilk olarak arpada keşfedilen *MLO* mutasyonu, arpada küllemeye karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Bai vd. 2008).*MLO* gen ürünleri, bitki hücre zarında yer alan heptahelical yani 7 transmembran segmentli membran proteinleridir. Bu proteinler, külleme etmeni tarafından kullanılan enfeksiyon sürecinde çeşitli hücresel süreçleri düzenlemektedir. Bu proteinler, kalsiyum sinyallemesi ve hücre duvarı modifikasyonu gibi süreçlerde rol oynamaktadır (Lyngkjaer vd. 2000).

Yapılan genom çapındaki çalışmalar *Arabidopsis*, üzüm, biber, pirinç, şeftali, çilek ve tütün gibi bitkilerde *MLO* gen ailesinin 12 ila 19 üyeden oluştuğu bulunmuştur. *MLO* gen ailesi üyelerinin savunma reaksiyonlarında hücre ölümü düzenlenmesinin kilit rol oynadığını ortaya koymuştur (Kusch. ve Panstruga 2017). Bitkilerde bulunan *MLO* genleri küllemeye karşı hassaslık sağlamakta ve bu genlerde fonksiyon kaybının olması durumunda ise bitkilerdeki *mlo* geni geniş spektrumda fungal patojenlere dayanıklılık sağlamaktadır (Lyngkjaer vd. 2000). İlk defa ticari olarak arpa bitkisinde *MLO* mutantlarının keşfedilmesi, küllemeye dayanıklı bitkilerin elde edilmesi için bitki ıslahında önemli adımlardan birini oluşturmuştur (Adam ve Somerville 1996).

Domateste tanımlanan 16 *MLO* geni ve bu genler arasından *SlMLO1* geninin küllemeye karşı hassaslıkta önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Pozharskiy ve ark. 2022). Domates *SlMLO1* olarak adlandırılan bu lokus, domateste *MLO* proteinlerini kodlayan genler arasında tanımlanan ilk lokustur. Daha sonra, 15 ek *SlMLO* proteini tanımlanmış ve *SlMLO1*'in domateste küf hassaslığının başlıca faktörü olduğu doğrulanmıştır (Yan vd. 2021). *SlMLO1*'in işlev kaybı mutasyonunun *L. taurica'nın* neden olduğu külleme hastalığına karşı dayanıklılık sağladığı da gösterilmiştir ; ancak, diğer *MLO* genlerinin eş zamanlı susturulması olmadan eksik olabilmektedir. *SlMLO1* Toz halinde küflenmeye dayanıklı domates çeşitlerinin geliştirilmesi için umut vadeden bir hedef olarak kabul edilmektedir. *SlMLO1*, külleme hassaslığına en büyük katkıda bulunan gendir (Bai vd. 2008). *SlMLO* gen ailesi özellikleri Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

SGN locus name	*MLO* gene	Chromosome	Position	ORF lenght (aa)	Introns
Solyc04g049090	*SlMLO1*	4	SL2.40ch04:38700445..38705951	507	14
Solyc08g015870	*SlMLO2*	8	SL2.40ch08:6074040..6078983	504	13
Solyc06g010030	*SlMLO3*	6	SL2.40ch06:4786764..4792828	591	14
Solyc00g007200	*SlMLO4*	2?	SL2.40ch00:6816892..6823417	554	14
Solyc03g095650	*SlMLO5*	3	SL2.40ch03:50279919..50288063	517	14
Solyc02g082430	*SlMLO6*	2	SL2.40ch02:40694608..40700995	553	14
Solyc09g018830 Solyc09g018840	*SlMLO7*	9	SL2.40ch09:17564555..17568214	270	10
Solyc11g069220	*SlMLO8*	11	SL2.40ch11:50939533..50946726	506	13
Solyc06g082820	*SlMLO9*	6	SL2.40ch06:44779673..44784035	511	13
Solyc02g083720	*SlMLO10*	2	SL2.40ch02:41596474..41602413	533	14
Solyc01g102520	*SlMLO11*	1	SL2.40ch01:83071860..83075439	475	13
Solyc08g067760	*SlMLO12*	8	SL2.40ch08:53957062..53962884	532	14
Solyc10g044510	*SlMLO13*	10	SL2.40ch10:22128868..22135940	558	14
Solyc07g063260	*SlMLO14*	7	SL2.40ch07:62995345..63002900	563	14
Solyc02g077570	*SlMLO15*	2	SL2.40ch02:37045094..37050486	375	10
Solyc06g010010	*SlMLO16*	6	SL2.40ch06:4699552..4706571	477	14

Şekil 2.3.*SlMLO* gen ailesi özellikleri

3 MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Bu çalışmada materyal olarak külleme hastalığına karşı dayanıklılık geliştirilmesi amacıyla yerli ticari salkım domates çeşidinin (Komutan) ana ve baba ebeveyn hatları kullanılmıştır. Moleküler çalışmalar kapsamında *SlMLO1* hassaslık genlerine ait genomik DNA analizleri için bitki materyali, bakteri çalışmaları için *Escherichia coli* DH5α (Catalog ID:CC-123) ve *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Catalog ID:CC-225) suşları tercih edilmiştir. CRISPR/CAS9 uygulamalarında hedef gen bölgelerine özgü olarak tasarlanan gRNA dizilerini taşıyan pHEE401E binary vektörü kullanılmıştır. Moleküler analizlerde PCR, jel elektroforezi işlemleri için gerekli kimyasallar ve laboratuvar cihazlarından yararlanılmıştır.

3.1.1 Bitki Materyali

Bitki materyali olarak seçilen küllemeye dayanıklılığı olmayan ticari F1 domates çeşidinin ebeveyn hatları kullanılmıştır. Ebeveyn hatları, saf hat olup transformasyonun yapılacağı Ana (A) ve Baba (B) hatları olarak isimlendirilmiştir. F1 domates çeşidine ait ana(A) baba(B) hatlarının tohumları temin edilmiştir.

3.1.2 Kullanılan Besi ortamları

3.1.2.1 Luria Bertani (LB)Agar Ortamı

LB ortamı moleküler çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Escherichia coli'nin in-vitro koşullarında rekombinant suşların elde edilmesinde kullanılan en yaygın besi yeri ortamlarından bir tanesi olduğu için bizim çalışmamızda da kullanılmıştır. LB agar besiyerinin hazırlanması amacıyla 12 g agar, 10 g Sodyum klorür (NaCl) ve 5 g yeast ekstrakt hassas terazide tartılmıştır. Tartılan maddeler 1 litrelik cam erlene aktarılmış ve karışımın hacmi saf su ilavesiyle 1 litreye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin pH'sı 7.0'ye ayarlanmıştır. Bu PH değeri 1N NaOH ve 1 N HCL çözeltileri ile ayarlanmıştır (Çizelge 3.1). Hazırlanan LB besi ortamı 121°C'de 20 dakika otoklav edilerek steril bir şekilde hazırlanmıştır. Transformant Escherichia coli hücrelerinin çoğaltımı için hazırlanan ortamlar her petri kaplarına 25 ml gelecek şekilde dökülmüştür.

Çizelge 3.1. Luria Bertani Agar besiyeri hazırlamak için gerekli malzemeler

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

3.1.2.2 **LB sıvı Hazırlanışı**

Sıvı Luria Bertani hazırlamak için yukarıda Çizelge3.1'de belirtilen kimyasallar kullanılmış. Ortam içerisine agar ilave edilmemiştir. LB ortamı transformasyon aşamasından sonra kanamisin ilave edilmektedir LB ortamında sadece kanamisin içeren koloniler gelişim gösterir. (Çizelge 3.2). LB Agar 'da çoğaltılan *E.coli* bakterilerinin önce doğrulaması yapılır sonra doğru kabul edilen bakterilerin LB sıvı içerisinde çoğaltımı yapılmaktadır.

Çizelge 3.2. Sıvı LB ortamlarında kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları

Antibiyotik Türü	**Çözücü**	**Stok konsantrasyonu(mg/ml)**	**Çalışma konsantrasyonları(mg/L)**
Kanamisin	Distile su	50	50
Rifampisin	Methanol	50	25

3.1.2.3 **Tez Çalışmasında Kullanılan Bakteri Irkları ve Plasmid**

Tasarlamış olduğumuz rehber RNA'nın (gRNA) aktarılması çalışmalarında *E.coli* DH5α, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 bakteri ırkı ve pHEE401E plazmidi kullanılmıştır.

3.1.2.4 **Kimyasallar ve Cihazlar**

Tez çalışmasında kullanılan kabin, otoklav, santrifüj cihazları Çizelge 3.3'de, DNA ladder, kanamisin, primer gibi kimyasallar Çizelge 3.4'de, plazmid izolasyonu sırasındaki kit Çizelge 3.5'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Cihaz Adı	**Kullanım Amacı**
Mini Satnrifüj	Klonlama, PCR ve DNA İzolasyonu işlemlerinin uygulanması sırasında kullanılacaktır.
Vorteks	Vorteks, karıştırma, çökeltme, işlemleri için kullanılacaktır.
Hassas Terazi	Tartım, uygulamalarında
Elektroforez Jel Görüntüleme Sistemi	Jellerin görüntülenmesi, DNA analizleri
Derin Dondurucu	PCR, Vector, *Agrobacterium*, Kesim enzimleri, DNA ve RNA sarflarının uzun süreli saklanması

Çizelge 3.3. Devam ediyor

Cihaz Adı	**Kullanım Amacı**
Mikro Dalga Fırın	Jel hazırlama,
Su Banyosu	DNA izolasyonu için kullanılacaktır.
Kabin	Steril olarak besi ortamlarını hazır elde etme, bakteri ve fungal organizmalar üzerinde izolasyonlar,
İnkubatör	Bakterilerin geliştirilmesiiçin uygun ortam,
Buz Makinesi	PCR çalışmalarında ve klonlama esnasında heatshock uygulamalarında
Tissue Lyser	DNA izolasyonu yapımında
Otoklav	Çalışmalarda kullanılacak ortamların hazırlanması ve malzemelerin sterilizasyonunda aktif bir şekilde kullanılır.
Spektrofotometre	DNA, miktarlarının belirlenmesi, *A. tumefaciens* OD_{600} değerinin ölçülmesi
saf su arıtma cihazı	Saf su üretimi
pH metre	pH ölçümü
Santrifuj	Santrifüj

Çizelge 3.4. Tezde kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları

Kimyasal Adı	Kullanım Amacı
DNA ladder (100bp)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Primerler (100 nmol)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
DNA ladder (1 kb)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
50 X TAE Buffer (1 lt'lik)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Etil Alkol (%99'lik-5 lt)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
CTAB	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
β-Merkaptoetanol	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Dream Taq Green Master Mix	*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
Agarose (1 kg)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
LB (Luria-Bertani) broth besi ortamı (1kg)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Agar (1 kg)	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
GeneJET Plasmid Miniprep Kit 50 preps	*In vitro* çalışmalar, Moleküler çalışmalar
Kanamisin	Klonlama çalışmalarında

Çizelge 3.5. Tez çalışmasında kullanılan kitler

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

3.2 Metot

3.2.1 Domates Bitkisinden DNA izolasyonu

Domates bitkisinden DNA izolasyonu için CTAB metodu kullanılmıştır. DNA izolasyonunda özellikle bitki dokularından yüksek kaliteli DNA elde etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bitki hücreleri: Kalın hücre duvarına sahiptir. Yüksek miktarda polisakkarit ve fenolik bileşik içermektedir. Bu maddeler DNA izolasyonunu zorlaştırmaktadır. CTAB yöntemi, bu istenmeyen bileşenleri önce yoğun bir tuz konsantrasyonu ile içerisine almakta daha sonra farklı kimyasallar kullanılarak istenmeyen kimyasallar uzaklaştırarak saf DNA elde edilmesini sağlanmaktadır (Doyle ve dolye 1990).

Toplam nükleik asit izolasyonu için (5 ml CTAB) hazırlamak için; 25 mikrolitre mercoptoethonol kullanılmaktadır. Kullanılan β: mercaptoethanol DNA'ların kırılmasını önlemekte onları korumaktadır. Örnek sayısına bağlı olarak CTAB çizelge 3'de verilmiştir. CTAB DNA izolasyonunda aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir.

1. Ezilecek örnekler Ependorf tüpler içerisine 100 gr olacak şekilde alınıp ve içerisine 150 µl CTAB solüsyonu eklenip örnekler ezilmiştir.

2. Örnekler iyice ezildikten sonra 1.5'lik ependorf tüplere 350 µl daha CTAB solüsyonu eklenmiştir. Toplam hacim 500 µl olmuştur.

3. 65 C° termomix cihazında 1-2 saat bekletilmiştir.

4. Toplam hacim 500 µl olduğu için 500 µl kloroform eklenmiştir.13.000 rpm 'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır.

5. Yeni tüplere, süpernant çekilip aktarım yapılmıştır.

6. Çekilen süpernant kadar isopropanol eklenmiştir.

7. Bir gece boyunca eksi 20 derecede (-20) bekletilmiştir.

8. Ertesi gün 20 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapılıp dökülmüştür.

9. 500 µl %70 lik soğuk Ethanol eklenmiştir.

10. Beş dakika 13.000 rpm 'de santrifüj yapılır ve tüp içerisindeki tüm sıvı dökülür.

11. Ethanol uzaklaştırılıp 40-60 dakika kurutma kâğıdı üzerinde kurutulmuştur.

12. Kuruyan tüpler içerisine 50-150 µl steril su koyulur.

Genomik DNA örneklerinin yoğunlukları Thermo Scientific® Multiskan Go spektrofotometre cihazı ile ölçülmektedir. Örneklerin yoğunlukları ve A260/280 değerleri 1.7 ile 2,0 arasında değişmektedir. WT çeşidine ait A ve B ebeveyn hatlarına ait

genomik DNA örneklerinin kalite ve miktarları yapılacak olan çalışmalar için kabul edilebilmektedir.

3.2.2 *SlMLO* Genlerinin Domates Bitkisinde Doğrulanması

Domates bitkisinde *L. taurica* etmenine karşı hassaslık faktörleri ile ilişkili olan *SlMLO* genleri geniş bir literatür taraması sonucunda bulunmuştur. Önce National Center for Biotechnology Information (NCBI) sisteminde NC-090803.1 accession no ile tanımlanan bu genlere ait tüm genomik sekanslar elde edilmiştir. Bu gen bölgelerinin çalışmaya konu olan domates çeşidinde varlığını ortaya koyabilmek için Primer3 Plus yazılım programı kullanılarak spesifik primerler dizayn edilmiştir (Çizelge 3.8). Optimum erime sıcaklığına ve %GC'ye sahip, sadece bu gen için spesifik primerler çalışmada kullanılmıştır. Bu primerler daha sonra 100 µM (0.1 nmol/ul) primer stokları elde etmek için nükleaz içermeyen saf suda çözdürülmüştür. Daha sonra, 100 µM primer stoklarının 1:10 oranında seyreltilmesiyle 10 µM çalışma konsantrasyonuna sahip primerleri ortaya konmuştur. Dizayn edilen bu primerlerle PCR işlemi gerçekleştirilmiş olup bu işlemler sırasında MLO/F (5’ AATGCAGATAATATTGCTAGTTGGC3’) ve MLO/R (5’AGGGTACCTGAAAGAGTACAAAGTT 3’) primer çiftleri kullanılmıştır. Tüm PCR analizlerinde elde edilen ürünler sekanslamaya gönderileceği için toplam PCR solüsyonunun hacmi 50 µl olarak ayarlanmıştır. DNA izolasyonu yapılan örneklerimiz istediğimiz gen bölgesini taşıyıp taşımadığının tespiti için dizayn edilen primerler ile birlikte PCR kurulmuştur. Bu PCR ürünleri sekanslama için kullanılacağından PCR solüsyonunun toplam hacmi 50 µl olarak ayarlanmıştır. Bu primer çiftleri PCR sonrası agaroz jelde yürütülerek istenilen gen bölgelerini taşıdığı anlaşılmıştır. Geriye kalan PCR solüsyonu sekanslama hizmeti alınmak üzere Macrogen firmasına gönderilmiştir. Çalışmalarda kullandığımız PCR karışımlarının bileşenleri ve hacimleri çizelge 3.6 ‘da gösterilirken Thermal Cycler cihazına yerleştirilen PCR solüsyonlarına uygulanan PCR döngü ve süreleri çizelge 3.7 ’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Çalışmalarda kullanılan PCR bileşenleri ve hacimleri

PCR Bileşenleri	Eklenen Hacimler
Xpert Fast Hotstart Mastermix(2x)	6.25µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
Su	2.25 µl
Kalıp DNA	2 µl
Toplam	10.5 µl

DNA izolasyonunun yapılmasından sonra bir gece -20 °C de beklenen DNA örnekleri için PCR koşulları çizelge 3.6’daki gibi sağlanmaktadır. Her bir örnek için eşit miktarda PCR bileşenleri eklenerek toplam bir mix hazırlanmaktadır. Daha sonra bu

mixden her bir örnek için PCR tüp içerisine dağıtılmaktadır bir sonraki aşamada üzerlerine izolasyonu yapılan DNA lardan 2 µl eklenmektedir. PCR şartları çizelge 3.7'deki gibi hazırlanarak cihazın çalışması gerçekleştirilmektedir.

Çizelge 3.7. Çalışmalarda kullanılan PCR amlifikasyon şartları

Aşama	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denaturasyon	95	3 dk	1
Denaturasyon	95	15 sn	X 30
Bağlanma	59	15sn	
Uzama	72	15 sn	
Son uzama	72	3 dk	1

Çizelge 3.8. *SlMLO* genlerine ait genomik sekanslardan yararlanılarak gen bölgelerinin domates çeşidinde varlığını ortaya koyabilmek için dizayn edilen spesifik primer dizilimleri

Primer	Beklenen TM Değeri	Ürün Boyutu(bp)
MLO/F	59	200
MLO/R		

3.2.3 gRNA Tasarımı ve Konstrakt Yapısının Oluşturulması

Domates *SlMLO* genlerinin CRISPR-CAS9 sistemi kullanılarak hedefli biçimde düzenlenmesi amacıyla öncelikle uygun kılavuz RNA (single guide: sgRNA) dizileri tasarlanmıştır. Tasarlanan sgRNA dizileri doğrultusunda gen aktarımı için vektör yapıları hazırlanmıştır. Rekombinant konstruktların elde edilmesinde GoldenGate© klonlama yöntemi uygulanmıştır. Oluşturulan plazmidler ilk olarak *E. coli* DH5 alpha hücrelerine aktarılmış, ardından doğrulanan konstrakt yapıları *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 bakteri suşu aracılığıyla bitki transformasyonu çalışmalarında kullanılmıştır. Bu aşamalar çalışmada izlenen temel yöntem basamaklarını oluşturmaktadır.

3.2.3.1 gRNA Tasarımı

Genin referans dizilimi Phytozome v14 üzerinden ***Solyc04G001288*** erişim numarasıyla indirilmiştir. Kromozom 4 üzerinde yer alan bu gendeki referans dizilimdeki ekzonlar işaretlenmiştir. Sekans daha sonra, Benchling (https://www.benchling.com/crispr) web aracına yüklenmiştir. Elde edilen potansiyel gRNA'lar; ilk ekzona isabet etmesi, yüksek on-target skoru, düşük off-target etki ve serbest enerji kriterlerine göre seçilmiştir (Doench vd., 2016). Birinci ekzon hedef

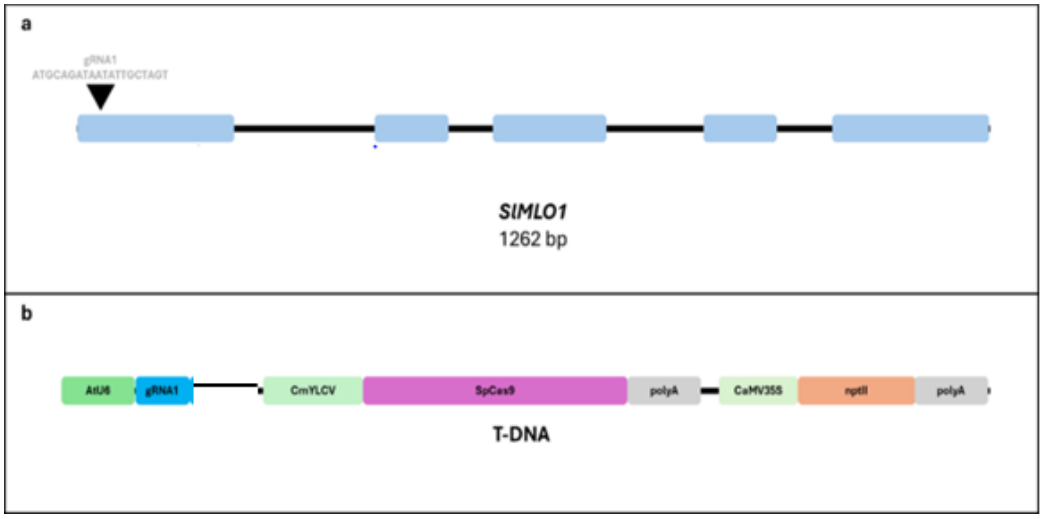
alınarak yediden yirmi altı baz dizilimleri doğrultusunda pozisyon belirlenmiştir. Seçilen gRNA dizilimleri Çizelge 3.9'da verilmiştir. ON-TARGET ve OFF-TARGET analiz sonuçları çizelge 3.9 'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Seçilen gRNA dizilimleri, On-Target, Off-Target analiz sonuçları ve *SlMLO1* üzerindeki pozisyonları. Ok işareti yönleri gRNA yönünü işaret etmektedir.

gRNA	Dizilim	Gen Üzerindeki Pozisyon
gRNA1	ATGCAGATAATATTGCTAGT	7 → 26
On-Target	54.4	
Off-Target	55.0	

3.2.3.2 CRISPR/CAS9 Vektörünün Elde Edilmesi

SlMLO1 geninde CRISPR/CAS9 yöntemiyle, mutasyon oluşumunu tetiklemek için gerekli bileşenleri içeren vektör Modüler Klonlama yöntemiyle elde edilmiştir (Weber ve ark. 2011). Seçilen gRNA'ler *BsaI* tanıma bölgesi eklenerek hem sense hem de antisense olacak şekilde sentezlenmiştir. Bu sentetik oligonükleotidler birbirinin komplementer dizilerine sahip olup diziler 1 µM olacak şekilde seyreltikten sonra aynı tüpte birleştirilmişlerdir. Bu sayede tek zincirli gRNA oligonükleotidleri, çift zincir hale getirilmiştir. Bu işlem her bir gRNA için de yapılmış daha sonra bu diziler, gRNA uyumlu giriş pHEE401E plazmidine aynı enzim ile aktarılmıştır. Reaksiyon için, 2 µL gRNA, 1 µL gRNA uyumlu plazmid (80 ng/uL), 0.5 µL T4 DNA ligase buffer, 0.5 µL T4 DNA ligase, 0.5 µL *Bsa1*, 5,5 µL nükleaz içermeyen su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sırasıyla, 37 °C'de 7 dakika, 16 °C'de 5 dakika olacak şekilde 35 döngü ve 80 °C'de 10 dakika enzim inaktivasyonu için thermocycler da inkübe edilmiştir. Elde edilen GoldenGate ürünü *E. coli* DH5α içerisinde heatshock yöntemiyle aktarılmıştır (Froger ve Hall 2007). Daha sonra hücreler 50 µg/ml Kanamisin içeren ortama yayılarak seçilmiştir. *E.coli* DH5a bakterileri LB besiyerinde çoğaltılarak gelişen bakterilerden toplam DNA izole edilmiştir. Bu sayede AtU6:gRNA1 yapısı ve gRNA ifade kaseti, CmYLCV:Cas9:polyA ve CaMV35S:nptII:polyA kasetleriyle, GoldenGate klonlama yöntemiyle birleştirilmiştir. Bu işlem için aynı reaksiyonda bu plazmitler ile PCR kurulup klonlama işleminde BsaI enzimi kullanılacaktır (Çizelge 3.10). Elde edilen ligasyon ürünü *E. coli* DH5a'da çoğaltılıp, plazmid izole edildikten sonra kesim enzimi ve NGS ile doğrulanarak bakteriler içerisinde oluşturulan T-DNA yapısı elde edilmiştir. (Şekil 3.1) (Froger ve Hall 2007).



Şekil 3.1. *SlMLO1* geninin şematize edilmiş hali ve bu geni hedeflemek için oluşturulacak T-DNA yapısı**. a)** Ekzonlar mavi kutucuk olarak gösterilmiş olup, farklı uzunluklardaki 5 ekzondan oluşmaktadır. gRNA dizilimleri ve isabet ettiği yerler belirtilmiştir. **b)** SpCas9 endonükleazını, gRNA ifade kasetini ve seçilim için hptII (higromisin dayanıklılık) ifade kasetleri, T-DNA üzerinde gösterilmiştir.

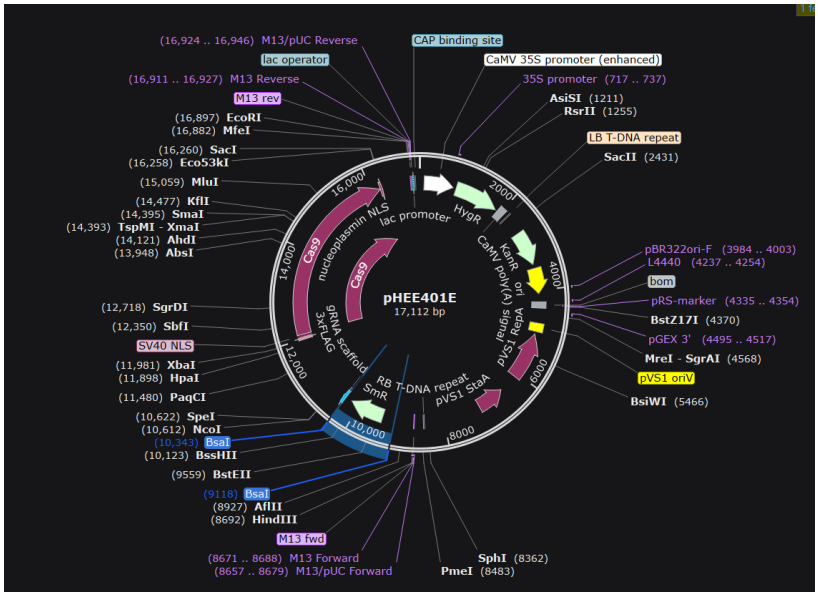
Çizelge 3.10. gRNA konumlarını ve dizilimlerinin doğrulamak amacı ile genlere özgü dizayn edilen primer dizilimleri ve beklenen Tm değerleri ve ürün boyutları

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

3.2.3.3 **Plazmid hakkında temel bilgiler**

Bu tez çalışmasında ticari pHEE401E (Addgene ID:71287) ticari binary vektörü kullanılmıştır. Bu ticari plazmid spesifik *E.coli*'nin DH5α suşlarında önceden transforme edilmiştir. Bakteriyel hücreler spesifik antibiyotiklerinin uygun miktarlarını içeren LB ortamında kültüre alınmıştır.

Çalışmada kullanılan Plasmid SNAP-Gene uygulaması kullanılarak dizayn edilmiş ve rehber RNA bölgeleri eklenmiştir. (Şekil 3.2)



Şekil 3.2. *SlMLO* genlerini hedef alan gRNA'leri aktarılacak olan pHEE401E vektörünün fiziksel haritası

3.3 GoldenGate Reaksiyonu

Çizelge 3.8 'de verilen PCR kompotentleri kullanılarak gRNA bölgesi çoğaltılmıştır. Bu aşamaların yapılmasının temel amacı gRNA'ların plazmite aktarılması sağlanmıştır. SlMLO 1-1F ve SlMLO 1-1C primerleri tek sarmallı bir yapıya sahip olduğu için bu işlem ile Sentetik oligonükleotidler birbirinin komplementer dizilerine sahiptir ve diziler 1 µM olacak şekilde seyreltikten sonra aynı tüpte karıştırılmıştır. Bu sayede tek zincirli gRNA oligonükleotidleri, çift zincir hale gelmiştir. SlMLO 1-1F ve SlMLO 1-1C primerleri 1µl olacak şekilde alınır 48 µl su ile birlikte tek bir tüp içerisinde karıştırılmıştır. 95 °C 'de 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 20 dakika bekletilerek kullanılmıştır (Ma vd 2015). Bu reaksiyon Çizelge 3.11'de verilen hacimlerde ve Çizelge 3.12'de verilen döngü koşullarında kurulmuştur.

Çizelge 3.11. GoldenGate klonlama amplifikasyonunda kullanılacak kompotentler ve hacimleri

Kompotentler	**Hacimler**
Su	5,5µl
Plazmit	1 µl
Oligo	2 µl
T4 Ligase buffer	0.5 µl
Kesim Enzimi bsa1	0.5 µl
T4 Ligase	0.5 µl

Çizelge 3.12. GoldenGate reaksiyonuna ait döngü koşulları

Sıcaklık	**Zaman**	
37 °C	7 dk	
16 °C	5 dk	X35
37 °C	7 dk	
80 °C	10 dk	

3.4 Heat-shock ile Plasmidin *E.coli* DH5a'ya aktarılması

Bu işlemin amacı GoldenGate ile elde ettiğimiz promotör, gRNA ve terminatör bölgelerimizi içeren transformant pHEE401E plasmidini çoğaltmaktır. İlk olarak Golden Gate reaksiyonundan elde edilmiş plazmit DNA ve 100 µl kompatent *E.coli* hücresi buz üzerinde çözdürülmüştür.PCR sürecinden geçen plazmit DNA'mızın tümünü kullanılmıştır. Kompatent hücreler buz üzerinde çözdürüldükten sonra her ikiside 1.5 ml steril ependorf tüpünde karıştırılmıştır ve buz üzerinde 25 dk boyunca birlikte inkübe edilmiştir. Bu işlem sonrasında 42 °C termomixte 30 saniye bekletilmiştir. Daha sonra tekrar buz içerisinde 5 dakika bekletilerek kabin içerisinde Ependorf tüp içerisine 900 µl LB sıvı broth eklenmiştir. Ependorf tüp 300 rpm de 1,5-2 saat 37 °C 'de. Çalkalayıcı içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Bekleme aşaması bittikten sonra 2 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Ependorfun üst fazından 900 µl çekilerek atılmıştır. Daha önceden hazırlanmış olan içerisinde kanamisin antibiyotiği olan LB agar ortamlarına öze yardımı ile pelet kısmı pipetleme yapılarak çözdürülüp LB agar üzerine çizim aşaması tamamlanmıştır. Hazırlanan Petriler ters çevrili olarak 16-24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Forger ve Hall 2007).

3.5 Koloni PCR

Heat-shock ile plasmidin bakteri içerisine aktarılmasından sonra inkübatöre bir gün boyunca gelişen bakterilerin doğru konstrakt yapısına sahip olup olmadığını anlamak için koloni PCR yapılmıştır (Woodman 2008). İdeal büyüklüğe ulaşan koloniler pipet ucu yardımıyla alınmış olup çizelge 3.13'de verilen reaksiyon bileşenleri PCR tüpünde karıştırılmış olup Çizelge 3.14'de verilen koşullar sağlanmıştır.

Çizelge 3.13. Koloni PCR 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
Koloni	2.00 µl
Toplam	10.50 µl

Yapılan koloni PCR ile doğrulaması gerçekleştirilen bakteri kolonileri pipetucu yardımıyla alınarak Falkon tüp içerisine aktarılır. Falkon tüpler 5 ml LB ve 5 µl kanamisin antibiyotik karışımı içermektedir. Bu falkon tüpler 1 gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılır. Koloni PCR yapılan ürünler %1.5'luk agarose jel elektroforezinde 70 V yürütülmüş ve doğru DNA'nın varlığı doğrulanmıştır. Jel elektroforezi ile DNA'nın varlığının doğrulanmasından sonra ideal büyüklükteki koloni 100 µl'lik pipet ucu ile alınarak 5 µl kanamisin (50 mg/mL) içeren 5 mL LB ortam içeren falkon tüp içerisine konmuştur. Sıvı besi ortamında 37 °C'de 12-16 saat boyunca 300 rpm'de çalkalamalı inkübe edilerek istenen konsrakt yapısına sahip bakterilerin gelişmesi sağlanmıştır.

Çizelge 3.14. Koloni Amlifikasyon için PCR Koşulları

Sıcaklık	Süre(Dk)	Döngü Sayısı
95 C°	3 dk	1
95 C°	15 sn	X30
59 C°	15 sn	
72 C°	15 sn	
72 C°	3 dk	1
4 C°	∞	

3.6 Plazmid izolasyonu

İstediğimiz konsrakt yapısına sahip *E.coli* DH5a içerisinde gelişen plazmitlerin buradan alınıp *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin plazmide yerleştirilmesi için plazmid izolasyonu aşağıdaki gibi yapılmıştır. Bu aşamalar GenJET^{TM} Plazmid Miniprep Kit (Thermo Fisher) üretici firmanın direktifleri izlenerek plazmid izolasyonu yapılmıştır.

1- Falkonlarda büyüyen plazmid içeren *E.coli*'lere 4000 rpm 10 dk santrifüj yapılır. Santrifüjle hücreler pelete toplanır.

2- Supernatant atılır.

3- 250 µl Resuspension Solution eklenir ve vortex yapılır.

4-250µl Lysis Solution eklenir. 4-6 kez tüp ters düz edilir.

5-Neutralization solüsyonundan 350 µl koyulur. Daha sonra ependprf tüplere alınıp iyice çözülmesi gerekir.

6-13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılır.

7- Özel filtreli ependorf tüplere santrifüj sonrası geçiş yapılır.

8- 13000 rpm de 1 dk santrifüj yapılır. Santrifüj sonrası filtre altındaki dökülür filtre kalır.

9- 500 µl Wash solition tüplere ilave edilerek 1 dk santrifüj yapılır. Filtre altındaki kalan sıvı dökülür.

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

11- 50 µl elution buffer eklenir.2 dakika boyunca bekleme yapılır. Daha sonra 13.000 rpm de 2 dk santrifüj yapılır.

12- Bu aşamadan sonra filtreli kısım atılarak altta kalan sıvı ile işlemler yapılacaktır.

13- Qubit cihazı ile yoğunlukları ölçülmüştür.

Plazmid izolasyonunun ardından tekrar doğrulamak için PCR yapılır. Elde edilen bulgular bir teknoloji firmasından hizmet alımı yapılarak sanger sekanslama yöntemi ile sekanslamaya gönderilir. Elde edilen sekanslar sonucunda insertlerimizin doğru bir şekilde plasmid içerisine aktarıldığı doğrulanmıştır.

3.7 *A. tumefaciens* EHA105 Bakterisi Aracılığı İle Gen Aktarımı

3.7.1 *A. tumefaciens* competent cell hazırlama ve elektroporasyonu işlemi

E.coli 'de çoğaltılan ve sekansa gönderilerek doğrulaması yapılan konstrakt *Agrobacterium tumefaciens* EHA105e bakterisine elektroporasyon yöntemi ile plazmite aktarılmıştır. Bu işlem için öncelikle *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 kompetent

hücre hazırlama protokolüne bağlı kalınarak hazırlık yapılmıştır. Kompetent *A. tumefaciens* hücrelerin elde edilmesi aşamasında bakteri hatlarına göre uygun antibiyotikleri (50 mg/l rifampisin) içeren LB agar besin ortamına öze ile yayılarak 28°C agar kültürde koloniler elde edilmiştir. Daha sonra LB agar üzerinde gelişen tek koloni alınarak uygun antibiyotikleri içeren 10 ml sıvı LB besin ortamı bulunan 50 ml'lik falcon tüpte 28°C'de bir gece büyütmeye bırakılmıştır.

Burada gelişen bakteri kültüründen 5 ml alınarak. 50 ml LB besin ortamı içeren 300 ml'lik erlene aktarılarak, uygun sıcaklıkta OD_{600}=0.4 absorbans değeri olacak şekilde 2-3 saat bekletilerek gelişmeleri sağlanmıştır.

Bakteri hücrelerini içeren solüsyon 50 ml'lik bir başka falcon tüpe aktarılarak buz içerisinde 20 dakika bekletildikten sonra 4°C 2500 rpm de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.

Çökeltilen bakteri hücreleri 10 ml 0.1 M CaCl2 içerisinde tekrar çözülerek buz üzerinde 30 dakika bekletilmiştir. Bu sefer kalsiyum klorür içerisindeki bakteri hücreleri tekrar santrifüj edilerek 2 ml soğuk 0.1M CaCl2 ve %15 gliserol içerisinde tekrar çözülmeye bırakılmıştır. Son olarak bakteri hücreleri 1.5 ml Ependorf tüplerine 50 µl olacak şekilde paylaştırılarak daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C muhafaza edilmiştir (Sambrook ve Russell 2001).

3.7.2 Elektroporasyon ile Plasmidin Elektrokompatent *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 Suşuna Aktarılması

Çalışmalarda *E.coli* bakterisi içerisinde olan konstrakt yapının *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşuna aktarımı için elektroporasyon yöntemi kullanılmış olup hazırlık ve uygulama aşamaları aşağıda verilmiştir (Prostak vd 2022).

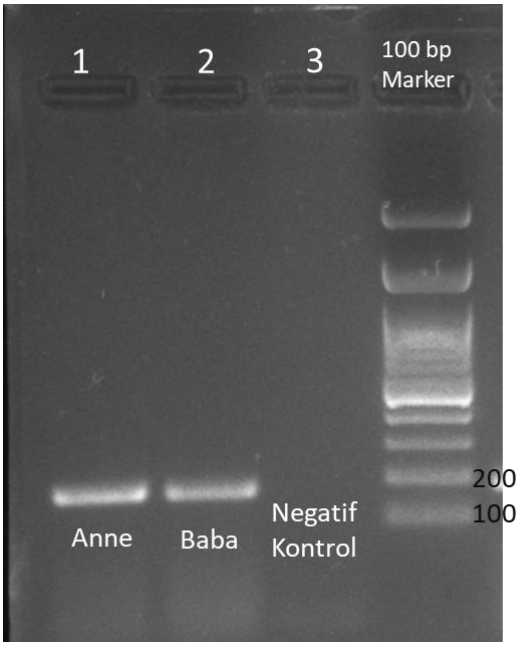
- Elektroporasyon metodu ile aktarılımı yapılacak olan pHEE401E plasmidi *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşuna aktarılmadan önce spektrofotometre cihazı kullanılarak konsantrasyonları 60 ng'a ayarlanmıştır. Bu işlem için öncelikle *Agrobacterium* EHA105 competent cell hazırlama protokolü uygulanmıştır.
- Elde edilen agrolar -80 de muhafaza edildikten sonra kullanım için Buz üzerinde eritilmeye bırakılmıştır.
- Goldengate klonlama yöntemi ile hazırlanan pHEE401E plasmidi steril 1.5 ml'lik ependorf tüplere 10 µl hacimde yerleştirilmiş olup elektroporasyona kadar buz üzerinde bekletilmiştir.
- Buz üzerindeki 40 µl elektrokompatent *Agrobacterium* EHA105 suşu 10 µl plasmidi içeren ependorf içerisine eklenmiştir (40 µl +10 µl =50 µl toplam hacim)
- Hazırlanan hücre süspansiyonu elektroporasyon küvetine transfer işlemi yapılmıştır.
- Süspansiyonun küvetin elektrotların bulunduğu elektroporasyon haznesine tam yerleştiğine hava kabarcığı olup olmadığına dikkat edilmiş ve tüpün kapağı kapatılmıştır. Küvetin dış çeperi kurulanarak BİORAD marka Gene Pulser Xcell cihazının elektroporasyon haznesine konulmuştur. 4 milisaniye, 2.5 KV gücünde ayarlanan elektroporasyon cihazi ile küvete akım gönderilmiştir. Bu işlemden sonra küvet içerisine 950 µl LB Broth eklenmiştir.Daha sonra kabin içerisinde küvetten ependorf tüp içerisine alınmıştır.

- Ependorf tüp 28 °C' de çalkalayıcıda 2-3 saat inkübe edilmiştir ve daha sonra 1,5 dk 12.000rpm'de santrifüj yapılmıştır.Kabinde 700 µl üst faz çekilerek atılmıştır. Kalan sıvı ile pelet çözdürülmüştür.
- Kanamisin (50 mg/l) ve rifampisin (25 mg/l) içeren LB agar ortamlarına 100 µl olacak şekilde ekilerek 48 saat 28 °C' de inkübe edilmeye bırakılmıştır.
- Yeterli koloni büyüklüğüne ulaşmış kolonilerden steril bir pipet ucu yardımıyla alınarak kanamisin (50 mg/l) ve rifampisin (25 mg/l) içeren 5 ml LB sıvı ortamına beklemeye bırakılmıştır. PCR ile doğrulaması yapılan koloniler 37°C'de 12 16 saat boyunca 225 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir.
- Uzun süreli saklamak için kültür OD 600 0.6 hücre yoğunluğuna gelene kadar spektrofotometrede ölçümleri yapıldıktan sonra 500 µl kültür + 500 µl %40'lık steril gliserol eklenerek 1.5 ml'lik epondorf tüplerde -80 °C muhafaza edilerek saklanmıştır.
- Elektroporasyon işleminden sonra transformant plasmid başarılı bir şekilde *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 ırkına aktarılıp aktarılmadığını kontrol etmek için pHEE401E/F ve pHEE401E/R primer çifti ile koloni PCR ile doğrulanmıştır (Çizelge 3.7).
- *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ırkına aktarılan CRISPR-CAS9 gen sistemine yerleştirilen SlMLO gen konstrakt yapısı PCR ile doğrulaması yapıldıktan sonra domates yapraklarına aktarılmak üzere doku kültüründe kullanılmaya başlamıştır.

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *SlMLO* Genlerinin Domates Bitkisinde Doğrulanması

Geniş bir litaratür taramasıyla belirlenen *SlMLO* genlerinin domates çeşidinde varlığını belirlemek için ticari F1 domates hattının hem anne hem de baba hattındaki varlığını ve dizayn edilen spesifik primer setleriyle PCR amplifikasyonlarında ortaya konmuştur (Kim vd. 2018). Yapılan PCR amplifikasyonları sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1.5'luk agarose jelde görüntülendikten sonra hem anne hem de baba ebeveynlerde 200 bp büyüklüğünde bantlar elde edilerek (Şekil 4.1) ebeveynlerdeki SlMLO1 geni varlığı ortaya konmuştur (Şekil 4.1). Elde edilen anne ve baba ebeveynlerdeki bantlarının sekansları Macrogen biyoteknoloji firmasından hizmet alınarak sanger sekansları çıkarılmıştır.



Şekil 4.1. F1 Domates çeşidinin Anne(A) ve Baba(B) ebeveyn hatlarında *SlMLO1* gen bölgelerine spesifik primerler kullanılarak PCR işlemi ile birlikte genlerin varlığının doğrulanmasına ait jel görüntüsü

Sanger sekanslamayla elde edilen gen dizilimi NCBI'da bulunan sekanslar karşılaştırılarak Single Nucleotide Polymorphism (SNP)'in varlığını kontrol edilmiştir. Dizileme sonuçlarına göre herhangi bir SNP ile ifade edilmemiştir. Bu nedenle *SlMLO* gen diziliminin NCBI veri tabanında bulunan gen dizilimleriyle aynı olduğu bulunmuştur. Bu adım CRISPR/CAS9 çalışmalarında gRNA dizilerinin bağlanacağı hedef bölgelerin sekans düzeyinde doğrulanması, Cas9 kesim etkinliğinin ve özgünlüğünün sağlanması açısından kritik bir kalite kontrol adımı olarak ön görülmektedir (Hsu vd. 2013).

Bu çalışmanın başlangıcında hedef gen bölgelerinde herhangi bir varyasyonun bulunmamasının ortaya konması, tasarlanan gRNA dizilerinin her iki ebeveyn hattına da özgül olarak bağlanabileceğini ve elde edilecek mutasyonların doğrudan CRISPR-CAS9

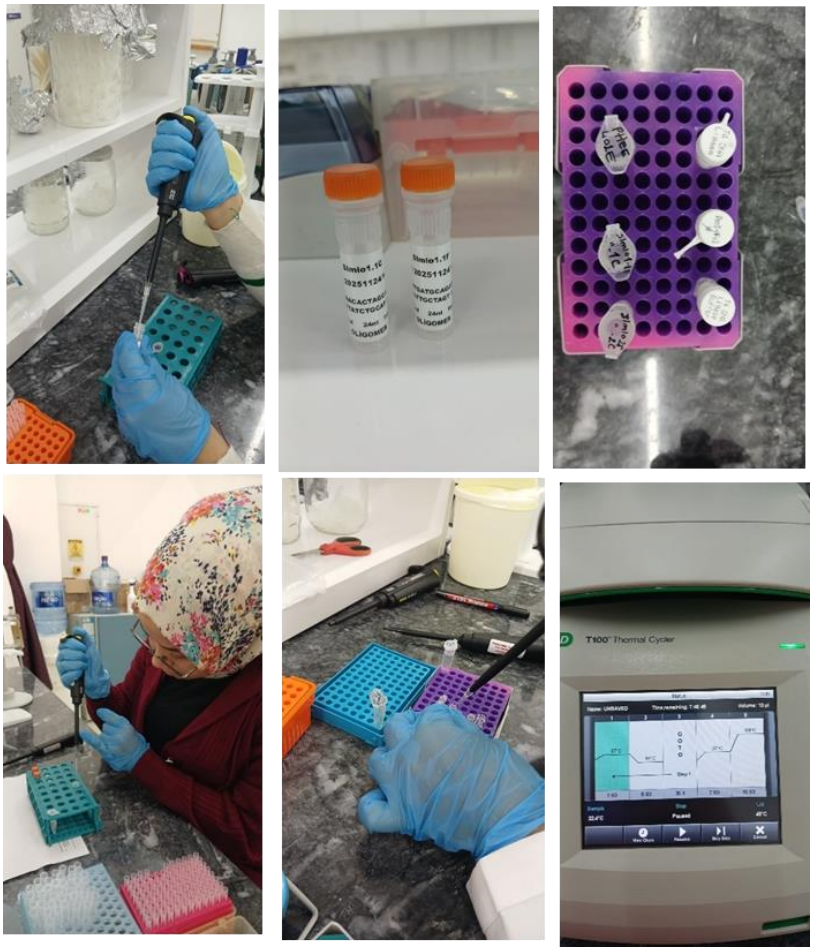
gen düzenleme sistemi ve sonrasındaki oto tamir mekanizması sonrasındaki ekleme (insertion) ve silme (deletion) sisteminin doğru çalışacağını göstermektedir. Bu bağlamda *SlMLO* gen dizilerinin referans genomla tam uyum göstermesi CRISPR/CAS9 aracılığı ile bu genlerin hedeflenmesinin güvenilirliğini arttırmakta ve ilerleyen nesillerde elde edilecek fenotipik sonuçların yorumlanmasını sağlamaktadır.

Bitkilerde CRISPR/CAS9 uygulamalarını değerlendiren Belhaj ve ark. (2015), gen düzenleme çalışmalarında hedef dizilerin önceden sekans analizleri ile doğrulanmasının, hedef dışı etkilerin azaltılması ve mutasyon verimliliğinin artırılması açısından önemli olduğunu belirtmiştir.

Domateste *MLO* genlerinin külleme hastalığına karşı dayanıklılıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. Zheng ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *SlMLO1* geninde oluşturulan mutasyonların külleme etmenine karşı dayanıklılık sağladığı bildirilmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda hedef bölgede doğal varyasyonların bulunmaması, oluşturulacak mutasyonların fenotipik etkilerinin daha doğru değerlendirilmesine katkı sağlayacak ve elde edilecek direnç mekanizmasının doğrudan *SlMLO* geninin düzenlenmesine bağlı olduğunun ortaya konmasına yardımcı olacaktır.

4.2 Golden-Gate© Reaksiyonu

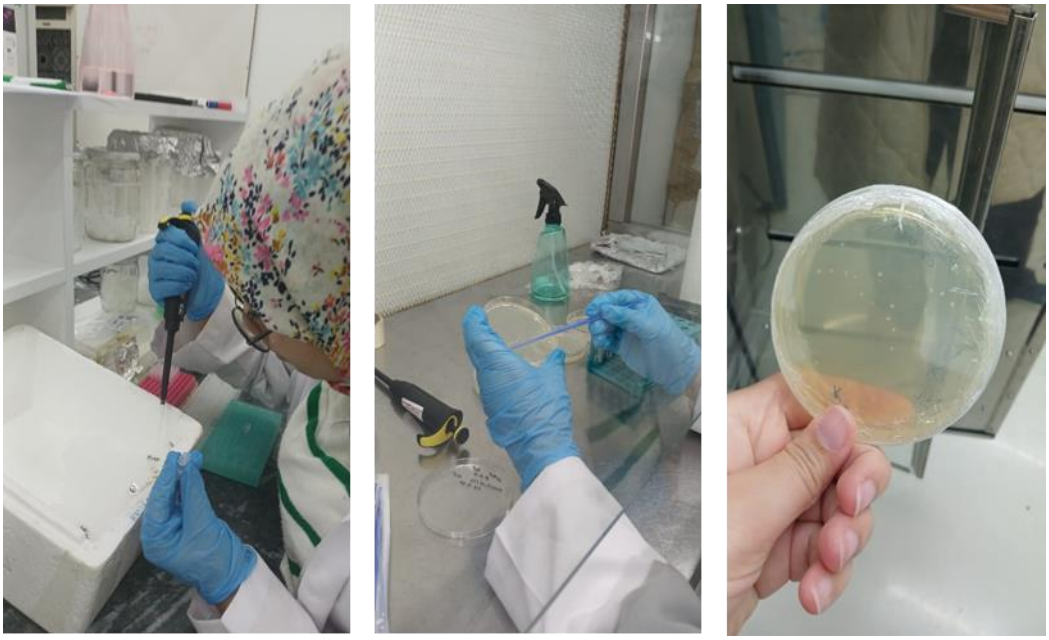
Çalışmamızın Materyal ve Metot kısmında belirtildiği gibi Golden-Gate klonlama reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu CRISPR-CAS9 sisteminin başarısı için kritik bir basamak olup Golden-Gate klonlama yöntemiyle çoklu gRNA'lerin uygun *E.coli* hücre yapısı içerisinde birleştirildiği ortaya konmuştur. İlk aşama olarak *SlMLO 1-1F* ve *SlMLO 1-1C* primerleri tek sarmallı bir yapıya sahip olan Sentetik oligonükleotidler birbirinin komplementer dizileri olarak oluşturulmuştur. PCR işlemleri için her bir kimyasal içerik karıştırılarak elde edilen solüsyon karışım içerisinde çoğaltılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. GoldenGate klonlama yöntemi aşamaları

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

Golden-Gate klonlama reaksiyon oluşturulan transformant plasmid Heat-shock bakteri transformasyonu yöntemi kullanılarak *E.coli* DH5α'ya aktarılmıştır. Transformasyon sonrası transformant pHEE401E plasmidi içeren sadece *E.coli* bakterileri kanamisin dayanıklılığı içerdiği için bu spesifik ortamda gelişebilmektedir. Besi ortamı LB kanamisin antibiyotiği içermekte olup sadece ve sadece bu antiyotiğe dayanıklılık geni içeren pHEE401E plasmidi içeren bakteriler gelişebilmektedir. Çalışmada bu plazmid ile birlikte *SlMLO* geni ilişkilendirildiği için bu *E.coli* bakterilerinin hem bu genetik yapıyı hemde *SlMLO* geni içerdiği anlaşılmaktadır(Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Heat-shock transformasyonundan sonra kanamisinli LB agar ortamında pHEE401E içeren transformant plasmidin aktarılmasından sonra oluşan *E.coli* DH5a kolonileri

Heat-shock transformasyonu sonrasında, pHEE401E plasmidinin kanamisin dayanıklılık geni taşıması sayesinde transformant kolonilerin yalnızca kanamisin içeren LB agar ortamında gelişim göstermesi, plasmidin *E.coli* DH5a hücrelerine doğru ve stabil biçimde aktarıldığını ortaya çıkarmıştır. *E.coli* DH5a şuşunun rekombinasyon aktivitesinin düşük olması ve yüksek plasmid stabilitesi sağlaması, klonlama sonrası plasmid çoğaltımı için bu suşun yaygın olarak tercih edilmesinin en önemli sonuçlarından bir tanesidir (Kostylev vd. 2015).

Golden-Gate klonlama sonrası elde edilen pHEE401E plasmidinin *E.coli* DH5a hücrelerine başarıyla aktarılması hem klonlama basamağının hem de transformasyon protokolünün etkinliğini sağlamıştır. Elde edilen transformant koloniler, ilerleyen aşamalarda yapılacak plasmid izolasyonu, restriksiyon analizi ve sekans doğrulama çalışmalarına uygun ve güvenilir bir başlangıç materyali hazırlamaktadır.

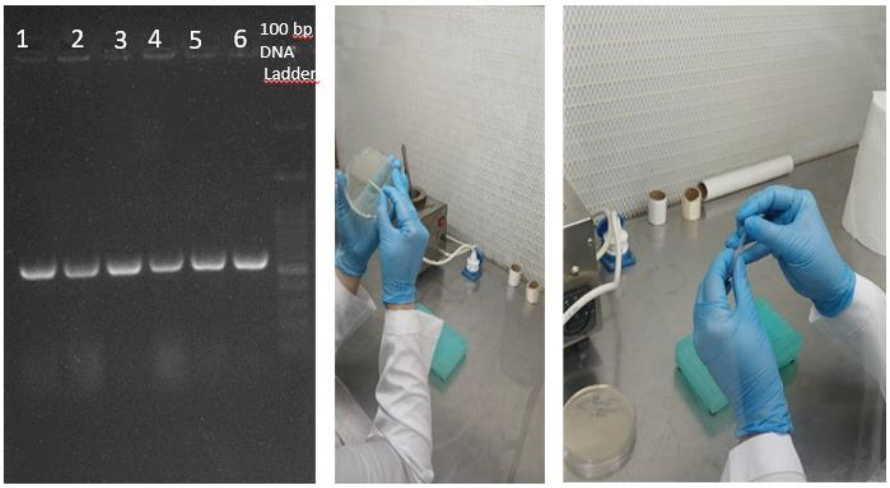
Bu bulgular, çoklu gRNA içeren kompleks CRISPR-CAS9 konstrüksiyonlarının bakteriyel sistemlerde çoğaltılmasında Heat-shock transformasyonunun etkili ve tekrarlanabilir bir yöntem göstermektedir.

Bu çalışmada pHEE401E plazmidinin *E. coli* DH5α hücrelerine heat-shock yöntemiyle aktarılmasının ardından kanamisin içeren LB agar ortamında transformant kolonilerin elde edilmesi, transformasyon işleminin başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir. Antibiyotik direnç geni taşıyan plazmidlerin seçici besiyerinde gelişim göstermesi, moleküler klonlama çalışmalarında transformasyon başarısının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. (Green ve Sambrook 2012). Son yıllarda bitkilerde CRISPR/CAS9 vektörlerinin oluşturulmasına yönelik çalışmalarda da benzer şekilde pHEE401E gibi çoklu gRNA taşıyan vektörlerin öncelikle

E. coli DH5α hücrelerinde çoğaltıldığı ve antibiyotik seçimi ile doğrulanan transformant kolonilerin sonraki basamaklar için kullanıldığı bildirilmektedir (Wang ve ark., 2015). Bu bakımdan elde edilen bulgular, heat-shock transformasyonunun CRISPR/CAS9 tabanlı vektörlerin bakteriyel sistemlerde çoğaltılması açısından etkin ve güvenilir bir yöntem olduğunu desteklemektedir.

4.4 Koloni PCR

Heat-shock ile *E.coli* transformasyonu sonucunda pHEE401E plasmidin yapısındaki aktarılmak istenen insertlerin varlığını doğrulamak için kanamisin içeren LB agar ortamında gelişen tek kolonilerden altı tane örneklerimizden seçim yapılarak PCR işleminde çoğaltılarak doğrulanmıştır. Elde edilen PCR bantları *E.coli* DH5a kolonileri 500 bp büyüklüğünde bant vererek doğrulanmıştır (Şekil 4.4).

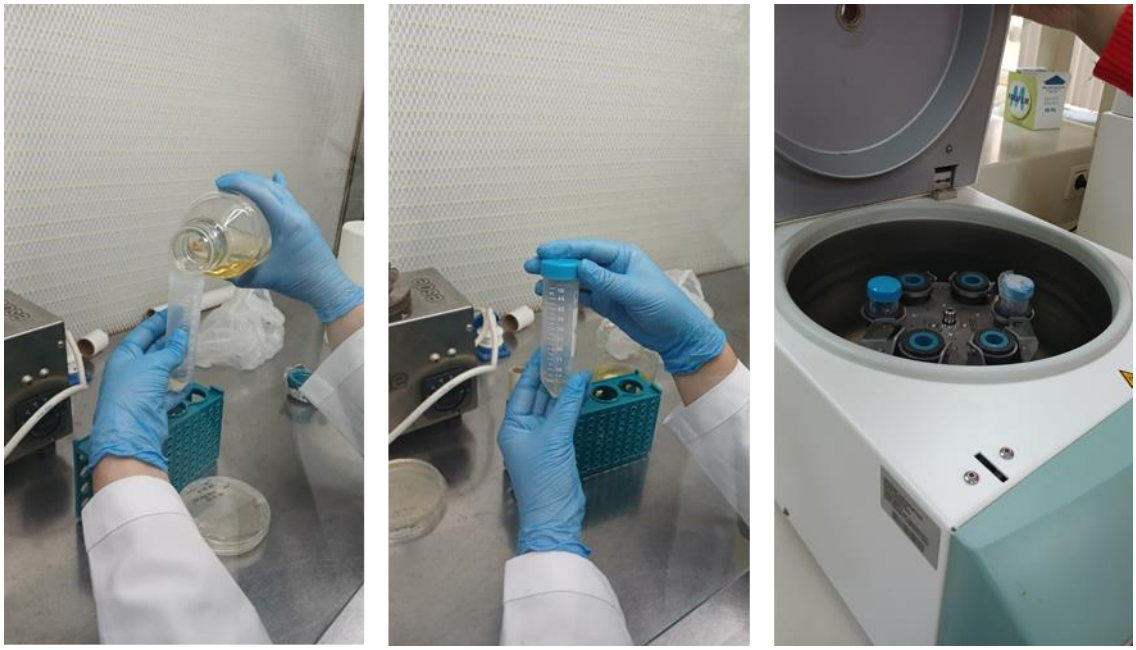


Şekil 4.4. Koloni PCR ürünlerinin agarose jel üzerindeki görüntüsü ve koloni alınımı

Koloni PCR tekniği rekombinant plasmidlerin yeni bakteri hücresinde doğru yerde, hızlı ve direkt doğrulanmasına olanak tanıması nedeniyle klonlama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Xing vd. 2014).

Elde edilen bant büyüklüğünün beklenen fragment uzunluğu ile uyumlu olması, insert DNA'nın vektör içerisine doğru yönde ve bütünlüğü bozulmadan aktarıldığını göstermektedir (Şekil 4.5). Pozitif kolonilerin sıvı LB broth ortamına alınarak çoğaltılması, ilerleyen aşamalarda gerçekleştirilecek plasmid izolasyonu çalışmalarına uygun bir basamak oluşturmaktadır. Koloni PCR analizi ile pHEE401E plasmid yapısındaki hedef insertlerin büyük oranda doğru şekilde klonlandığı ve seçilen kolonilerin moleküler doğrulama için uygun olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular, GoldenGate klonlama ve Heat-shock transformasyonunun birlikte etkin bir klonlama stratejisi sunduğunu ve çalışmanın sonraki aşamalarında yapılacak fonksiyonel analizler için sağlam bir temel oluşturduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, koloni PCR'nin rekombinant kolonilerin belirlenmesinde güvenilir bir ön doğrulama yöntemi olduğunu bildiren önceki çalışmalarla uyumluluk derecesi yüksektir. Zhao ve ark. (2014), koloni PCR'nin rekombinant plazmid taşıyan kolonilerin hızlı şekilde seçilmesini sağladığını ve sonraki moleküler analizler için zaman kazandırdığını göstermektedir. Benzer şekilde Pardesi ve Tompkins (2014), koloni PCR yönteminin plazmid izolasyonuna ihtiyaç duymadan doğru transformantların belirlenmesine olanak sağladığını bildirmiştir.



Şekil 4.5.PCR ile doğrulanan koloniler 5 µl kanamisin içeren 5 ml LB broth ortamına alınması

4.5 Plazmit izolasyonu

E.coli DH5α suşuna Heat-shock yöntemi ile aktarılan plasmidin bakteri hücrelerinde başarıyla çoğaltılmasından sonra yapılan plasmid izolasyonu ve spesifik primerlerle gerçekleştirilen PCR işlemleri *SlMLO* genin varlığını ortaya koymuştur. Plazmid izolasyonu sonrası plazmid yoğunlukları Qubit cihazı ile ölçülmüş olup 120 ng olan değer 60 ng olarak seyreltilmiştir. Elde edilen PCR ürünü Sanger sekans yöntemi ile nükleik asit dizilimleri çıkarılmış olup plazmid içerisine yerleştirilen sekansların doğruluğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Plazmit izolasyonu aşamaları ve Qubit cihazında plazmid yoğunluk ölçümü

4.6 Elektroporasyon ile Plasmidin Elektrokompatent *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 Irkına Aktarılması

E. coli Dh5α suşuna Heat-shock yöntemi ile aktarılan plasmidin çoğaltılmasından sonra spesifik primerlerle yapılan PCR ürünleri ve bu ürünlerin Sanger sekanslamasıyla guide DNA, target DNA ve palindromik sekanslarının varlığı doğrulanmıştır (Şekil 4.7).

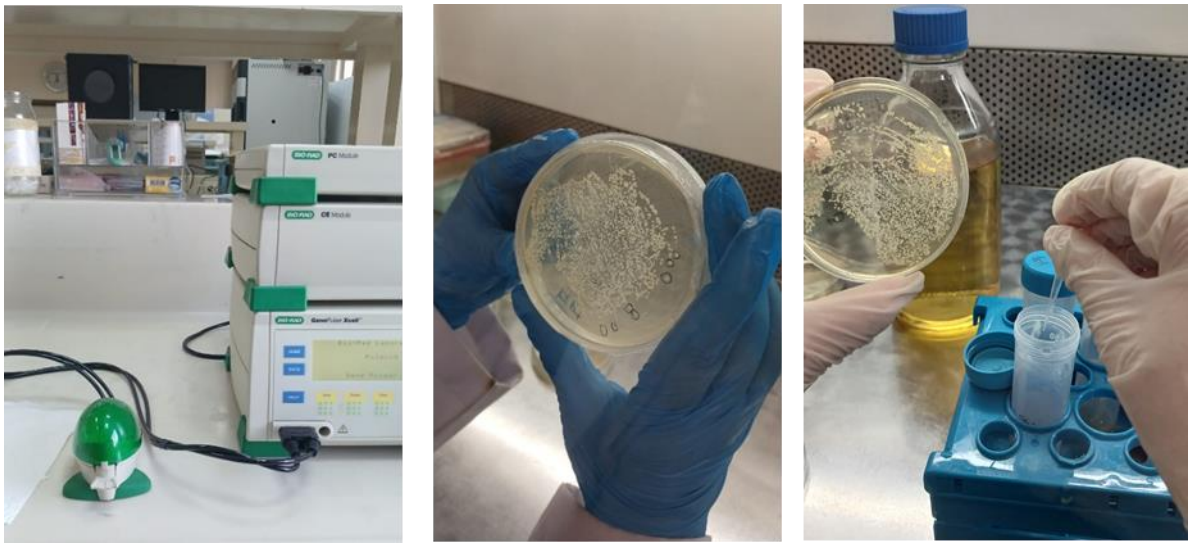


Şekil 4.7. Plasmid içerisine aktarılan gRNA konumlarının sanger sekans yöntemi ile doğrulanması sonucu elde edilen kromotogramlar

Çalışma kapsamında hedef gen bölgelerine yönelik tasarlanan sekanslar, Golden-Gate klonlama yöntemi kullanılarak pHEE401E plazmit vektörleri içerisine başarılı şekilde aktarılmıştır. Oluşturulan rekombinant plazmitler daha sonra elektroporasyon yöntemi ile 2.5 kV voltaj ve 4 milisaniye süre ayarlarında çalışan Gene Pulser Xcell cihazı

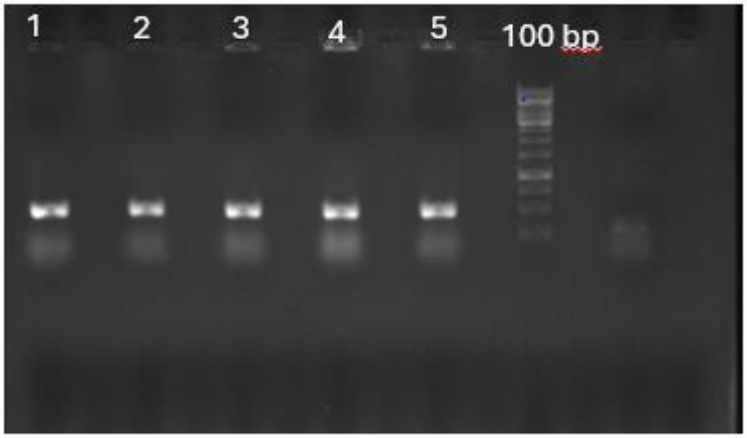
kullanılarak elektroporasyon uygulanmıştır. *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 hücrelerine aktarılmaktadır. Transformasyon sonrasında bakteriler antibiyotik içeren seçici besiyerlerine alınmış ve yalnızca doğru plazmit ve konstrakt yapısını taşıyan *A. tumefaciens* kolonilerinin gelişim gösterdiği belirlenmektedir. Bu durum, oluşturulan konstraktların başarılı şekilde bakteri hücrelerine aktarıldığını ve seçici ortam koşullarında doğrulandığını ortaya koymaktadır.

GoldenGate klonlama sistemi, Tip IIS restriksiyon enzimlerinin kullanılması sayesinde DNA parçalarının belirlenen yönlerde ve iz bırakmadan (scarless) birleştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu özellik özellikle CRISPR/Cas9 çalışmalarında sgRNA kasetlerinin oluşturulmasında önemli avantajlar sağlamaktadır. Nitekim Kim ve ark. (2021), pHEE401E vektörüne birden fazla sgRNA'nın GoldenGate yöntemiyle yüksek başarı oranıyla aktarılabildiğini ve oluşturulan konstrüksiyonların bitki transformasyonlarında etkin şekilde kullanılabildiğini bildirmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu çalışmada gerçekleştirilen klonlama ve doğrulama basamaklarıyla uyum göstermektedir.



Şekil 4.8. Plasmidin *Agrobacterium* EHA105 suşuna aktarılması; (a)elektroporasyon küvetinin BİORAD Gene Pulser Xcell cihazının elektroporasyon haznesine yerleştirilmesi, (b) Elektroporasyon sonucu LB agar (+Kan ve +Rif içeren) ortamında gelişen taransfomant Agrobacterium EHA 105 kolonileri, (c) LB sıvı (+Kan ve +Rif içeren) ortamında gelişen Agrobacterium EHA 105 suşu.

Elektroporasyon işleminden sonra transformant plasmid başarılı bir şekilde *Agrobacterium* EHA 105 suşuna aktarılıp aktarılmadığını kontrol etmek için pHEE401E /F ve pHEE401E /R primer çifti ile koloni PCR ile 5 örneğimiz doğru yerde 200 bp bant elde ederek *SlMLO* geni varlığı doğrulanmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Elektroporasyon sonrası transformant *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 suşlarına ait koloni PCR jel görüntüsü (1., 2., 3., 4., 5. Örneklerimizi ifade etmektedir, birer aralık boşluk ile jele yüklenmiştir).

Tez çalışmamızda külleme hastalık etmeni *L.taurica*'ya karşı hassaslık geni olarak çalışan domates bitkisindeki *SlMLO1* geninin CRISPR-CAS9 sistemine yerleştirilip bu gen düzenleme sisteminin domates genomunda yeri bulup kesmesini sağlayan bir genetik mühendisliği yapısı oluşturulmuştur. Sonrasında DNA'nın her iki allelinin kesilmesinden sonra oto tamir mekanizmasıyla ilk nükleik asitte ya da diğerinde polimeraz enzimlerinin oluşturduğu tamir mekanizmasıyla SlMLO1 mutasyonu oluşturulmaktadır. Projemizin buraya kadar gerçekleştirilen kısmında genetik mühendisliği uygulanarak dominant karakterde hassaslık geni olarak görev *SlMLO* geni CRISPR-CAS9 gen düzenleme sistemiyle *SlMLO* çekinik karakterde dayanıklılık olarak görev yapan gen yapısının temeli oluşturulmuştur.

Araştırmada transformasyon sonrası elde edilen bitkilerde moleküler doğrulama analizleri sonucunda hedef bölgede değişikliklerin meydana geldiği belirlenmiştir. CRISPR-CAS9 sisteminin hedefe yönelik düzenleme başarısı, daha önce domates ve diğer *Solanaceae* türlerinde bildirilen çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Özellikle rehber RNA tasarımının başarı üzerindeki etkisi dikkate alındığında, bu çalışmada kullanılan *sgRNA* bölgesinin etkin sonuç verdiği düşünülmektedir. Bununla birlikte bazı bitkilerde farklı mutasyon tiplerinin görülmesi, CRISPR-CAS9 sisteminin mozaik mutasyon oluşturabilme özelliği ile ilişkilendirilebilir.

CRISPR-CAS9 teknolojisinin klasik dayanıklılık genlerinden farklı olarak hassasiyet genlerini hedeflemesi, daha uzun süreli ve geniş spektrumlu dayanıklılık sağlayabilmesi açısından önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Ayrıca fungisit kullanımının azaltılması bakımından çevresel ve ekonomik açıdan sürdürülebilir bir yaklaşım sunmaktadır. Bununla birlikte gelecekte yapılacak çalışmalarda farklı *MLO* genlerinin birlikte düzenlenmesiyle dayanıklılık düzeyinin artırılıp artırılamayacağının araştırılması faydalı olacaktır. Özellikle *SlMLO1, SlMLO2* ve *SlMLO8 g*enlerinin kombine düzenlenmesi daha güçlü bir savunma yanıtı oluşturabilir.

Sonuç olarak bu çalışma, *SlMLO1* geninin domateste külleme hastalığına karşı

hassaslık mekanizmasında rol oynayabileceğini göstermiş ve CRISPR-CAS9 teknolojisinin hastalığa dayanıklı bitki geliştirilmesinde etkili bir araç olduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen bulguların gelecekte sürdürülebilir tarım uygulamalarına ve yeni dayanıklı çeşit geliştirme çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda külleme dayanıklılık mekanizmalarının araştırılması için hassas bir çeşit kullanılmıştır. Domatesde kullanılan *SlMLO1* genlerinin küllemeye karşı hassaslığı arttırdığı bilindiği için bu çalışma kapsamında *SlMLO1* geni üzerinde CRISPR-CAS9 yöntemi ile mutasyon meydana getirilerek *Slmlo1* mutantına ait domates bitkileri elde edilmeye çalışılmıştır. Dayanıklı çeşit geliştirilmesi amacıyla ticari salkım domatesin anne ve baba hatları kullanılmıştır.

Bu çalışmada domateste külleme hastalığına hassaslık geni olarak bilinen *SlMLO1* hedeflenmiş ve CRISPR-CAS9 sistemi kullanılarak Slmlo1 geni olarak düzenlenmesi sağlanmıştır. Elde edilen moleküler doğrulama sonuçları, tasarlanan sgRNA dizilerinin hedef bölgeye başarıyla yönlendirildiğini ve oluşturulan konstrüksiyonların genom düzenleme çalışmalarında kullanılabilecek nitelikte olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, *SlMlo1* geninin külleme etmeni ile bitki arasındaki etkileşimde kritik rol oynadığını ortaya koyan önceki çalışmalarla uyumludur. Bai ve ark. (2008), oluşan mutasyonun aslında bir *MLO* fonksiyon kaybı olduğunu ve bu mutasyonun domateste geniş spektrumlu külleme dayanıklılığı sağladığını bildirmiştir.

MLO genlerinin bitkilerde klasik dayanıklılık genlerinden farklı olarak birer hassaslık (susceptibility) geni şeklinde görev yaptığı bilinmektedir. Bu nedenle *MLO* genlerinin işlev kaybına uğratılması, patojene karşı doğrudan savunma mekanizmalarının aktive edilmesine olanak sağlamaktadır. Günümüzde birçok araştırma, külleme hastalığına karşı kalıcı ve geniş spektrumlu dayanıklılık elde etmek amacıyla *MLO* genlerinin hedeflenmesini önermektedir. Domates, arpa ve buğday gibi farklı bitki türlerinde elde edilen sonuçlar, *mlo* kaynaklı dayanıklılığın uzun süreli ve etkili olabildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda tercih edilen CRISPR-CAS9 yaklaşımı, geleneksel mutasyon ıslahı ve klasik melezleme yöntemlerine kıyasla hedef gen üzerinde daha hassas düzenlemeler yapılmasına olanak sağlamaktadır. Nekrasov ve ark. (2017), *SlMLO1* genini CRISPR-CAS9 sistemiyle düzenleyerek "Tomelo" olarak adlandırılan transgen içermeyen külleme hastalık etmeni funguslara dayanıklı domates hatları geliştirilmiştir. Araştırmacılar oluşturdukları mutantlarda külleme etmenine karşı yüksek düzeyde dayanıklılık elde etmiş ve belirgin bir olumsuz fenotip gözlemlememiştir. Bu sonuçlar, *SlMLO1* geninin genom düzenleme çalışmalarında güvenilir bir hedef gen olduğunu göstermektedir.

Domates genomunda yaklaşık 16 adet *MLO* homologunun bulunduğu bilinmektedir. Ancak bunlar arasında özellikle *SlMLO1* geninin külleme hassaslığında başlıca rol oynadığı bildirilmektedir. Zheng ve ark. tarafından gerçekleştirilen genom çapındaki analizlerde, *SlMLO1* fonksiyonunun kaybının fungal penetrasyonu büyük ölçüde engellediği ortaya konmuştur. Bu nedenle çalışmamızda yalnızca *SlMLO1* geninin hedeflenmesi, külleme dayanıklılığı açısından bilimsel olarak güçlü bir tercih oluşturmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bulgular, *SlMLO1* geninin domateste

külleme hastalığına hassaslıkta temel rol oynadığını ve CRISPR-CAS9 sisteminin bu genin düzenlenmesinde etkili bir araç olduğunu desteklemektedir. Elde edilen sonuçlar Bai ve ark. (2008), Nekrasov ve ark. (2017) ve daha sonraki genom düzenleme çalışmalarıyla paralellik göstermekte olup, gelecekte külleme hastalığına dayanıklı yeni domates çeşitlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecek niteliktedir.

5 SONUÇLAR

Fungal *L. taurica* domates'de neden olduğu külleme hastalığı, üretim sırasında verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır. Küllemeye karşı dayanıklılık mekanizmalarının bilinmesi dayanıklı domates çeşitlerinin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle çalışma kapsamında dayanıklılık sağlamak içim *SlMLO* geni üzerinde spesifik mutasyon yapmayı sağlayan CRISPR-CAS9 tabanlı gen düzenleme alt yapısı oluşturulmuştur.

Çalışmada kullanılan CRISPR-CAS9 yönteminin hedefe yönelik ve etkili mutasyon oluşturabilmesi, bu teknolojinin bitki hastalıklarına dayanıklı çeşit geliştirilmesinde önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle klasik mücadele yöntemlerinde yoğun fungisit kullanımının çevresel ve ekonomik sorunlara neden olduğu düşünüldüğünde, genom düzenleme temelli yaklaşımların sürdürülebilir tarım açısından önemli avantajlar sağlayabileceği değerlendirilmektedir.

Çalışmada CRISPR-CAS9 yöntemi ile domateste hassaslıkla ilgili olduğu belirlenen *SlMLO* genleri üzerinde mutasyon meydana getirilmiştir. Bunun için dizayn edilen gRNA ve diğer bileşenleri içeren plazmid *E.coli* DH5α hücrelerine Golden-gate klonlama yöntemi ile aktarılarak çoğaltılmış ve heat-shock aşamaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan her işlemin doğruluğu PCR ve Sanger sekanslama ile doğrulanmıştır. Daha sonra yeniden aktarılan plasmid izole edilmiştir. Ardından *A. tumefaciens* EHA105 içerisine aktarılan plazmid her aşamada doğrulaması gerçekleştirilmiştir.

Bu araştırmada elde edilen bulgular, domateste külleme hastalığına karşı dayanıklılık oluşturulmasında gen düzenleme teknolojilerinin önemli bir potansiyele sahip olduğunu kanıtlamıştır. Çalışma sürecinde oluşturulan CRISPR/CAS9 konstraktlarının başarılı şekilde *A. tumefaciens*'e aktarılması ve seçici antibiyotikli ortam koşullarında doğrulanması, kullanılan moleküler yaklaşımın güvenilir biçimde ilerlediğini ortaya koymaktadır. Özellikle antibiyotik seçilimi sonucunda yalnızca uygun plazmid yapısını taşıyan kolonilerin gelişim göstermesi, transformasyon basamaklarının etkin şekilde gerçekleştirildiğini desteklemektedir.

Fungal *L. taurica*'ya karşı hassaslıktan sorumlu *SlMLO* genlerinin CRISPR-CAS9 genom düzenleme sistemiyle hedeflenmesi oluşturulan mutasyon ile çekinik karakterde dayanıklık hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında CRISPR-CAS9 sistemi kullanılarak moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiş, elde edilen konstraktın doku kültürü çalışmaları için kullanımına başlanmıştır. Dayanıklılıktan sorumlu olan *Slmlo1* geni CRISPR-CAS9 gen düzenleme sistemine uygun çekinik karakterde kalıtım sağladığı için özellikle külleme hastalık etmenlerinin genetik kontrolü için uygun bir gen olarak rol oynamaktadır.

Çalışma kapsamında geliştirilen dayanıklı genlerin, hatların ilerleyen süreçlerde farklı çevre koşulları ve popülasyonu altında test edilmesiyle tarımsal üretimde kullanılabilecek yeni dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.

Bununla birlikte CRISPR-CAS9 tabanlı gen düzenleme teknolojisi klasik ıslah çalışmalarına göre daha hızlı ve hedefe yönelik sonuçlar vermesi bitki hastalıklarıyla mücadelede modern biyoteknolojik yaklaşımların önemini ortaya koymaktadır. Bu durum CRISPR-CAS9 gen düzenleme sisteminin her hangi bir dışarıdan gen ilave

etmemesi, sistem içinde dışarıdan aktarılan herhangi bir yapıyı içermemesi nedeniyle Türkiye ve Avrupa Birliğinde tıpkı klasik Mendel genetiğindeki ıslah yöntemleri olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışma kapsamında, domateste külleme hastalığına neden olan *L. taurica* etmenine karşı dayanıklılık geliştirilmesi amacıyla *SlMLO1* geni hedeflenmiştir. CRISPR-CAS9 sistemi için tasarlanan sgRNA'nın genin birinci ekzon bölgesine yönlendirilmesi tercih edilmiştir. Birinci ekzonlarda meydana gelen mutasyonların protein sentezinin erken aşamalarında çerçeve kaymasına veya erken dur kodonlarının oluşmasına neden olabilmesi, gen fonksiyonunun tamamen kaybedilme olasılığını artırmaktadır. Bu nedenle hedef bölge seçiminde gen susturma etkinliğinin yüksek olması amaçlanmıştır. Benzer stratejiler daha önce domateste gerçekleştirilen *SlMlo1* genom düzenleme çalışmalarında da kullanılmıştır (Nekrasov vd. 2017).

Çalışmada kullanılan sgRNA bölgesi seçilirken hedef özgüllüğü, uygun PAM dizisinin varlığı ve olası hedef dışı etkilerin düşük olması dikkate alınmıştır. CRISPR-CAS9 uygulamalarında genom düzenleme başarısının büyük ölçüde rehber RNA tasarımına bağlı olduğu bildirilmektedir (Bortesi ve Fischer 2015). Elde edilen doğrulama sonuçları, seçilen hedef bölgenin başarılı bir tasarım olduğunu göstermiştir.

Moleküler çalışmalar sırasında rekombinant plazmitlerin çoğaltılması için *E. coli* DH5α suşu kullanılmıştır. *E. coli* DH5α hücreleri yüksek plazmit stabilitesi ve rekombinasyon aktivitesinin düşük olması nedeniyle klonlama çalışmalarında yaygın olarak tercih edilmektedir. Buna karşılık bitki transformasyonu aşamasında plazmitlerin bitki hücrelerine aktarılabilmesi amacıyla *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşuna aktarılması gerekmiştir. EHA105 suşunun domateste yüksek transformasyon etkinliği göstermesi, bu suşun seçilmesinde etkili olmuştur (Hood vd. 1993). Nitekim çalışmalar elde ettiğimiz yapıların diğer CRISPR-CAS9 gen düzenleme tekniklerindeki yapılarla birebir benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çalışma sonucunda oluşturulan CRISPR-CAS9 konstrüksiyonlarının başarıyla elde edilmesi ve *A. tumefaciens* EHA105 hücrelerine aktarılması, ilerleyen aşamalarda gerçekleştirilecek bitki transformasyon çalışmaları için uygun bir genetik materyal oluşturmuştur. Elde edilen bulgular, *SlMLO1* geninin düzenlenmesine yönelik moleküler altyapının başarıyla kurulduğunu göstermektedir. Gelecekte transformasyondan elde edilecek bitkilerde mutasyon analizlerinin yapılması ve külleme etmenine karşı dayanıklılık düzeylerinin belirlenmesi, geliştirilen sistemin biyolojik etkinliğinin ortaya konulması açısından önem taşımaktadır.

6 KAYNAKLAR

Adam, L., &, Somerville, S. C. (1996). Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, *9*(3), 341–356. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.09030341.x (Erişim tarihi 15.02.2026)

Arvas, Y. &, Kaya, Y. (2019). Genetiği Değiştirilmiş Bitkilerin Biyolojik Çeşitliliğe Potansiyel Etkileri. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*, *29*(1), 168–177. https://doi.org/10.29133/yyutbd.468218(Erişim tarihi 25.01.2026)

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 (Erişim tarihi 17.03.2026)

Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N. J., & Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. Current Opinion in Biotechnology, 32, 76–84.

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), 1–17. https://doi.org/10.1186/s12870-015-0635-x (Erişim tarihi 05.02.2026)

Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnology Advances, 33(1), 41–52.

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

Carrion, N. C. (2022). *Plant-fungal symbıoses : clımate change , applıcatıons for plant productıon, and farmer educatıon*.

Çelik, Y., Yarşi, G., & Özarslandan, A. (2017). *Mikorizaların Bitkilerde Stres Mekanizması Üzerine Etkileri*. 1–11.

Chen, Q., Yu, G., Wang, X., Meng, X., & Lv, C. (2021). Genetics and Resistance Mechanism of the Cucumber (Cucumis sativus L.) Against Powdery Mildew. *Journal of Plant Growth Regulation*, *40*(1), 147–153. https://doi.org/10.1007/s00344-020-10075-7 (Erişim tarihi 11.03.2026)

Chunwongse, J., Chunwongse, C., Black, L. ve Hanson, P. (1994). Molecular mapping of the Lv powdery mildew resistance gene in tomato. Theoretical and Applied Genetics, 89, 76–7

Demircan, S. (2023). *Ürün Ra poru DOMATES*.

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 (Erişim tarihi 15.01.2026)

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12, 13–15.

Duman vd. 2020. Türkiye'de Sebze Üretiminde Tür ve Çeşit Tercihleri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 169–178. https://doi.org/10.20289/zfdergi.837441 (Erişim tarihi 13.01.2026)

Durmuş vd. 2018. *Domates Bitkisi , Besin İçeriği ve Sağlık Açısından Değerlendirmesi Tomato Plant , Evaluation in terms of Nutrient Content and Healthy İ nsano ğ lunun yery ü z ü nde var oldu ğ undan beri t üm canlılarda oldu ğ u gibi temel*. *1*(2), 59–74.

Ertürk ve Çirka 2014. *Türkiye ' de ve Kuzey Doğu Anadolu Bölgesi (KDAB)' nde Domates Üretimi ve Pazarlaması*. *25*(1), 84–97.

Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (6), 253. https://doi.org/10.3791/253(Erişim tarihi 02.02.2026)

Gerszberg vd. 2015. Tomato (Solanum lycopersicum L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *120*(3), 881–902. https://doi.org/10.1007/s11240-014-0664-4

Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Gür, A., Bastas, K. K., Kordali, Ş., & Yı, F. (2021). Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology Effectiveness of Boron Formulations against Pseudomonas syringae pv . tomato in Tomato Seeds # Domates Tohumlarında Pseudomonas syringae pv . tomato ' ya Karşı Farklı Bor Bileşiklerinin Etkilili. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, *9*, 2498–2505.

Güvenç İ. (2019). Türkiye'de Domates Üretimi, Dış Ticareti ve Rekabet Gücü. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, *22*(1), 57–61. https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.432316 (Erişim tarihi 11.01.2026)

Guzman-Plazola, R. A., Davis, R.M., &, & Marois, J. J. (2003). Effects of relative humidity and high temperature on spore germination and development of tomato powdery mildew (Leveillula taurica). *Crop Protection*, *22*(10), 1157–1168. https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00157-1 (Erişim tarihi 18.04.2026)

Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S., & Hoekema, A. (1993). New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Research, 2, 208–218.

Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G., & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature Biotechnology, 31(9), 827–832.

Jones, J. B., Zitter, T. A., Momol, T. M., & Miller, S. A. (Eds.). (2014). *Compendium of tomato diseases and pests* (pp. 58-60). St. Paul, MN: American Phytopathological Society.

Kal, Ü., Türkmen, Ö. &, & Hakkı, E. E. (2018). *Bazı Nitelikli Sanayi Tipi Domates Genotiplerinin Morfolojik Özellikleri *. 8*(2), 10–16.

Kámán-Tóth, E., Pogány, M., Dankó, T., Szatmári, Á., & Bozsó, Z. (2018). A simplified and efficient *Agrobacterium tumefaciens* electroporation method. *3 Biotech*, *8*(3), 148. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1171-9 (Erişim tarihi 07.04.2026)

Kim, D., Jin, B., Je, B. I., Choi, Y., Kim, B. S., Jung, H. J., Nou, I. S., & Park, Y. (2018). Development of DNA markers for Slmlo1.1, a new mutant allele of the powdery mildew resistance gene SlMlo1 in tomato (Solanum lycopersicum). Genome, 61(10), 703–712.

Kim, W.N., Kim, H.J., Chung, Y.S. & Kim, H.U. (2021). Construction of Multiple Guide RNAs in CRISPR/Cas9 Vector Using Stepwise or Simultaneous Golden Gate Cloning: Case Study for Targeting the FAD2 and FATB Multigene in Soybean. Plants, 10(11), 2542.

Kostylev, M., Otwell, A. E., Richardson, R. E., & Suzuki, Y. (2015). Cloning should be simple: Escherichia coli DH5α-mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. PLoS ONE, 10(9), e0137466.

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 (Erişim tarihi 13.01.2026)

Lyngkjaer, M. F., Newton, A. C., Atzema, J. L., & Baker, S. J. (2000). The Barley mlo-gene: An important powdery mildew resistance source. *Agronomie*, *20*(7), 745–756. https://doi.org/10.1051/agro:2000173 (Erişim tarihi 10.03.2026)

M Prostak, S., M Medina, E., Kalinka, E., &, & Fritz-Laylin, L. (2022). *Protocol 1: Electroporation of Agrobacterium tumefaciens with a plasmid of interest v1*. 1–6.

Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., ... & Liu, Y. G. 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Molecular plant, 8(8): 1274-1284.

Santillán Martínez, M. I., Bracuto, V., Koseoglou, E., Appiano, M., Jacobsen, E., Visser, R. G., ... & Bai, Y. (2020). CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene PMR4 for resistance against powdery mildew. *BMC plant biology*, *20*(1), 284.

Massire, A., Cussonneau, F., Elbelt, S., Constant, C., Bardin, M., Moury, B., &, & Lefebvre, V. (2025). Powdery Mildew Caused by Leveillula taurica (Synonym: Phyllactinia taurica): A Global Challenge for Pepper Production. *Molecular Plant Pathology*, *26*(7). https://doi.org/10.1111/mpp.70128 (Erişim tarihi 19.03.2026)

Mosquera, S., Chen, L. H., Aegerter, B., Miyao, E., Salvucci, A., Chang, T. C., Epstein, L., & Stergiopoulos, I. (2019). Cloning of the cytochrome b gene from the tomato powdery mildew fungus leveillula taurica reveals high levels of allelic variation and heteroplasmy for the G143A mutation. *Frontiers in Microbiology*,

10(APR), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00663 (Erişim tarihi 22.04.2026)

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

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

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

Pardesi, B., & Tompkins, G.R. (2014). Colony polymerase chain reaction of heme-accumulating bacteria. Anaerobe, 32, 99–102.

Paul, N. C., Park, S. W., Liu, H., Choi, S., Ma, J., MacCready, J. S., Chilvers, M. I., &, & Sang, H. (2021). Plant and Fungal Genome Editing to Enhance Plant Disease Resistance Using the CRISPR/Cas9 System. *Frontiers in Plant Science*, *12*(August), 1–10. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.700925 (Erişim tarihi 11.04.2026)

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 (Erişim tarihi 18.04.2026)

Sambrook, J., & Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Serin, M. &, & Horuz, S. (2022). Mersin ili Silifke ilçesinde yer alan domates seralarında görülen bakteriyel hastalıkların yaygınlıklarının belirlenmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, *27*(1), 79–87. https://doi.org/10.37908/mkutbd.1026011 (Erişim tarihi 25.04.2026)

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

Tör M. (1998). Bitkilerde Moleküler Konukçu-Patojen. *Tr. J. of Biology*, *22*, 271–285.

TÜİK. 2024. Türkiye İstatistik Kurumu Resmi sitesi sayfası, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) (tuik.gov.tr), Erişim tarihi: 15.04.2026.

Tümay, A. &, & Özkaya, H. (2020). Antalya İlinin Bazı İlçelerindeki Sebze Alanlarında Bulunan Külleme Türlerinin Belirlenmesi. *Çukurova Tarım Gıda Bil. Der.*, *35*(1), 1–14. https://doi.org/10.36846/cjafs.2020.13 (Erişim tarihi 16.04.2026)

Wang, Z. P., Xing, H. L., Dong, L., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Wang, X. C., & Chen, Q. J. (2015). Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis. Genome Biology, 16, 144.

Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., & Marillonnet, S. (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PloS one*, *6*(2), e16765. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765 (Erişim tarihi 19.04.2026)

Woodman, M. E. (2008). Direct PCR of intact bacteria (colony PCR). Current Protocols in Microbiology, 9, A.3D.1–A.3D.6.

Xing, H. L., Dong, L., Wang, Z. P., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Liu, B., Wang, X. C., & Chen, Q. J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biology, 14, 327.

Yan, Z., Appiano, M., van Tuinen, A., Meijer-Dekens, F., Schipper, D., Gao, D., Huibers, R., Visser, R. G. F., Bai, Y., &, & Wolters, A. (2021). Discovery and characterization of a novel tomato mlo mutant from an ems mutagenized micro-tom population. *Genes*, *12*(5). https://doi.org/10.3390/genes12050719 (Erişim tarihi 13.02.2026)

Yıkılmazsoy& Çetinkaya, 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.

Zhao, Y., Dong, Z., Li, T., & Huang, G. (2014). A simple negative selection method to identify adenovirus recombinants using colony PCR. Electronic Journal of

Zheng, Z., Nonomura, T., Appiano, M., Pavan, S., Matsuda, Y., Toyoda, H., Wolters, A., Visser, R., &, & Bai, Y. (2013). Loss of Function in Mlo Orthologs Reduces Susceptibility of Pepper and Tomato to Powdery Mildew Disease Caused by Leveillula taurica. *PLoS ONE*, *8*(7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070723 (Erişim tarihi 03.02.2026)

Zheng, Z., Appiano, M., Pavan, S., Bracuto, V., Ricciardi, L., Visser, R., Wolters, 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). https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00380 (Erişim tarihi 17.02.2026)

ÖZGEÇMİŞ



Gülsüm KOCAKAYA

gulsumkocakaya4346@gmail.com

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

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

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Stajyer 2023	Antalya Zirai Karantina Müdürlüğü