



Yeni Nesil Bitki İslahı Yöntemleri (Moleküler Bitki İslahı) Bazı Avantaj & Dezavantajları

Mehmet KARACA¹ Ayşe Gül İNCE²

¹Ziraat Fakültesi, Akdeniz Üniversitesi 07059, Antalya, Türkiye

²Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Akdeniz Üniversitesi 07059, Antalya, Türkiye

*Sorumlu Yazar

E-mail: mkaraca@akdeniz.edu.tr

Geliş Tarihi: 07 Haziran 2018

Kabul Tarihi: 02 Kasım 2018

Özet

Bu çalışmada yeni nesil bitki ıslahı yöntemleri, introdüksiyon, seleksiyon, mutasyon ve poliploidi ıslahı ile rekombinant DNA teknolojileri (transgenез) dışında kalan yöntemleri kapsamaktadır. Genlerin aktifleştirilmesi, susturulması veya yerlerinin değiştirilmesi, sadece genetiği değiştirilmiş organizmaları (GDO) üretmemize izin vermekle kalmamış aynı zamanda genlerin biyokimyasal, moleküler ve hücrel mekanizmalarını da daha hızlı bir şekilde anlamamızı sağlamıştır. Günümüzde genomun yeniden düzenlenmesi mühendislik açısından da mümkündür. Bitki araştırmacıları tarafından gen ifadesini susturma, artırma ve genlerin yer değiştirilmesi ile genomun yeniden düzenlenmesi ve oluşturulması ile ilgili çalışmalar önemli bir ivme kazanmıştır. Yeni nesil bitki ıslahı yöntemlerinin bir bölümünün temel hedefi, istenilen özellikleri transgenез ile kazandırılmış ancak kendisi transgenik olmayan bir hat veya çeşit geliştirmektir. Diğer bazı yeni nesil bitki ıslahı yöntemlerinin ana hedefi ise geleneksel rekombinant DNA teknolojileri ile oluşan sorunların düzeltilmesidir. Yeni nesil bitki ıslahı yöntemleriyle geliştirilen bitkilerin tanısı ise genomik, metabolomik ve proteomik yöntemlerin kullanılmasını gerekli kılmaktadır. Bu çalışmada genom düzenleme teknikleri ile birlikte yeni nesil bitki ıslahı yöntemleri, araştırmacı ve okurlara Türkçe olarak sunulmak üzere hazırlanmıştır. Bu çalışmada ele alınan konular arasında, Oligonükleotit Yönlendirilmiş Mutagenез (ODM), cisgenез ve transgenез, transgenik anaçlara aşılama, agro-infiltrasyon, agro-inokulasyon, floral dip, RNA-bağımlı DNA metilasyonu (RdDM), ters ıslah ve yeni genom düzenleme yöntemleri olarak Çinko Parmak Nükleaz Teknolojisi (ZFN), transkripsiyon aktifleyici benzeri protein destekli nükleaz (TALEN) teknolojisi ve düzenli kümelenmiş aralayıcı kısa palindromik diziler/Cas protein (CRISPR/Cas) sistemleri yer almaktadır.

Anahtar Kelimeler: CRISPR/Cas, Oligonükleotit Destekli Mutagenез, TALEN, Ters İslah, ZFN

New Generation Plant Breeding Methods (Molecular Plant Breeding) Some Advantages & Disadvantages

Abstract

In the present study new generation plant breeding methods are defined as those methods that other than the methods of introduction, selection, mutation and polyploidy breeding, and traditional recombinant DNA technologies. The main aim of the new generation plant breeding methods is to develop a non-transgenic line or breed that has the desired characteristics acquired by the recombinant DNA technologies. Some other new generation plant breeding methods are aimed at correcting the problems caused by the traditional recombination DNA technologies. Genomic, metabolomics and proteomic methods have to be used to identify plants developed with the new generation methods. The ability to activate, silence or replace genes not just did allow us to produce genetically modified organisms (GMO) but also let us a rapid understanding of biochemical, molecular and cellular mechanisms of genes. Today genome rearrangements are also possible to engineer. Creation and use of such genome rearrangements, gene knockouts and gene replacements by the plant science community is gaining significant momentum. In this study relatively new next generation genetic transformation methods along with some genome editing techniques were studied to provide knowledge in Turkish to researcher and readers. Topics covered oligonucleotide directed mutagenesis (ODM), cisgenesis and transgenesis, grafting to transgenic rootstocks, agro-infiltration, agro-inoculation, floral dip, RNA-dependent DNA methylation (RdDM), reverse breeding, and novel methods of genome editing methods such as zinc finger nuclease technology (ZFN), transcription activator-like effector nucleases (TALEN) and clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/Cas9 (CRISPR/Cas) systems.

Keywords: CRISPR, Oligonucleotide Directed Mutagenesis, Reverse Breeding, TALEN, ZFN

GİRİŞ

İlk kez ortaya atıldığı dönemlerde özellikle ıslah çalışmalarında çığır açan ve o dönemlerde yeni nesil bitki ıslahı yöntemleri olarak adlandırılan RNA interferans (RNAi) ve transfer DNA (T-DNA) teknolojileri geçmişten günümüze yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak gelişen teknoloji ile birlikte bu yöntemlerin belirgin dezavantajları ortaya konmuştur. RNAi teknolojisinin sadece gen ekspresyonunu azaltabildiği fakat tamamen inhibe edemediği için fenotipte genlerin fonksiyonunu tam olarak yansıtamadığı saptanmıştır. T-DNA teknolojisinde ise genoma T-DNA yerleştirilmesi rastgele olduğu için hedef lokusların seçiminin zor hatta imkansız olduğu durumlar ortaya çıkmıştır [1]. Cisgenез ve transgenез yöntemleri geleneksel transgenез yöntemlerine alternatif yöntemler olarak geliştirilmiştir [2]. Yeni nesil bitki ıslahı yöntemlerinden olan sentetik genomik yönteminin hali hazırda günümüzde bitkilerde kullanımı mümkün olmamakla birlikte, bu

yöntem zaman diliminde doğal olaylarla veya insan faaliyeti ile yok edilmiş bazı canlıların tekrar elde edilebilmesine olanak sağlama potansiyeli nedeniyle oldukça popülerdir. Çinko parmak nükleaz teknolojisi (ZFN), transkripsiyon aktifleyici benzeri protein destekli nükleaz teknolojisi (TALEN) ve düzenli aralıklı kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar/CRISPR ile birleşmiş proteinler/Cas9 teknolojisi (CRISPR/Cas9) yöntemleri ise yeni nesil genom düzenleme yöntemleri olduğu için oldukça önemli yeni nesil bitki ıslahı yöntemleridir. Bu yöntemlerde somaklonal mutasyonlar ve arzu edilmeyen hedef ve tip dışı bitkiciklerin elde edilme olasılığının geleneksel transgenез yönteminden daha düşük olmasına rağmen hedef dışı rekombinasyon olasılığı, yüksek maliyet ve teknik açıdan bazı sorunların varlığı en büyük dezavantajları olarak karşımıza çıkmaktadır [3-7].

Genomun düzenlenmesi (genome editing) dizi spesifik nükleazlar ve dizi spesifik proteinlerin keşfi ile mümkün olmuştur. Bakteride keşfedilen restriksiyon endonükleazlar

recombinant DNA teknolojisinin gelişimine büyük katkı sağlamıştır. Günümüzde genom düzenlenmesi ve yeni nesil bitki ıslahı yöntemleri olarak ZFN, TALEN ve CRISPR/Cas ümitvar yöntemlerdir. Her üç yöntemle de hedef lokusa ait DNA dizilerine ekleme, çıkarma, değiştirme ve modifikasyonlar mümkün olmuştur. Böylelikle yeni bir gen transferi veya epiallelik modifikasyonlar da sağlayabilmektedir. Genom düzenleme yöntemlerinde homolog ve homolog olmayan rekombinasyon temelli tamir mekanizmaları kullanılmakta olup aralarında mısır, çeltik, soya, buğday, domates, patates, biber ve patlıcanın bulunduğu bitki türlerinde kullanılmıştır [8,9]. Yapay olarak üretilen DNA bağlanma domainleri ve dizi değiştiriciler ile modifiye ediciler (nükleazlar, transkripsiyon aktivatörler, susturucular, rekombinazlar, transpozanlar, metil transferazlar ve histon modifiye edici enzimler) genom düzenleyici yöntemler dolayısı ile yeni bitki ıslahı yöntemleri olarak geliştirilmektedir [5,6,10-13]. Bu çalışmada yeni nesil bitki ıslahı yöntemlerinden günümüzde pratikte başarılı sonuç verenler ve gelecekte kullanılabilme potansiyelleri yüksek olanlar üzerinde durulmaktadır.

YENİ NESİL BİTKİ ISLAHI YÖNTEMLERİ

1. Çinko Parmak Nükleaz Teknolojisi (ZFN Teknolojisi)

DNA bağlanma motiflerinde sistein-histidin-çinko parmak yaygın olarak bulunmaktadır. Tek bir çinko-parmak yaklaşık olarak 30 aminoasitten oluşur. Alfa-heliks üzerinde yer alan birkaç aminoasit DNA büyük oluğunda bulunan 3 nükleotit ile seçici olarak etkileşime girer. Üç ila altı çinko parmak proteini, 9-18 bp'lık özel bir DNA dizisini tanıyan ve bağlanan bir protein domaini oluşturmak üzere birbirine bağlanabilmektedir. ZFN sistemi ise çinko parmak proteini ve *FokI* nükleaz enziminden oluşur. Çinko parmak proteini *FokI* nükleazına özel olmayan bir nükleaz domainine bağlanır. Bir çift ZFN, kendi DNA hedef dizilerine bağlanır ve birbirleriyle ters şekilde hizalanır. *FokI* nükleaz domaininin dimerizasyonu onu aktif hale getirir ve tanınan diziler arasında çift sarmalda kesim oluşturmasını sağlar [14]. Çinko parmak nükleazlar özel olarak düzenlenebilen ve çift sarmallı hedef nükleik asit zincirini özel olarak tanıma ve kesebilme yeteneğine sahip olan endonükleaz enzimlerdir. Çinko parmak nükleazlar doğal olarak var olan enzimler değildir [6]. Teorik olarak 18 baz uzunluğunda bir DNA dizisi 68 milyar bp uzunluğundaki bir DNA için seçici olduğu düşünülürse bu yöntemle yüksek düzeyde seçici hedefleme yapılabileceği öngörülebilir [4,6,12,15,16]. Çinko parmak nükleaz teknolojisinde ZFN proteinleri özel DNA dizilerini tanıyacak şekilde düzenlenmektedir. Bütün ZFN proteinlerinde çinko parmak DNA bağlama domainini tanıyan protein ve etki edici protein nükleaz *FokI* enzimi ile birlikte kullanılmaktadır. *FokI* bakteri kökenli enzim olup 13 nükleotitlik tanıma bölgesinden 9 ile 13 arasında kesim yapar [1,17,18]. ZFN çift protein şeklinde (heterodimer) düzenlenmiş olup her bir dimer bir sarmalı tanıyabilir [19]. ZFN teknolojisi kullanımında hedef genomun hedef dizisinde mutagenез oluşturulabilmekte veya arzu edilen bölgeye arzu edilen genin sabit olarak entegrasyonu sağlanabilmektedir [4,20,21].

Çinko parmak nükleazlar heterodimer yapıda enzimler olup iki farklı polipeptit zincirinden oluşmaktadır [18,22]. Her bir polipeptit için farklı gene ihtiyaç vardır. Bu nedenle bu yöntemde gen transferi için transformasyon gen kasetinde

iki farklı genin transferi gereklidir. ZFN teknolojisinde transformasyon gen kasetinde iki farklı gen ile birlikte bazı durumlarda rehber DNA veya RNA'ya ihtiyaç duyulur. ZFN teknolojisinde ilgili gen kaseti geleneksel transformasyon yöntemlerinden *Agrobacterium*, elektroporasyon, viral vektörler veya biyolistik gen transfer yöntemlerinden biri kullanılarak transformasyon işlemleri gerçekleştirilir [9,20,21,23].

ZFN teknolojisinde ilgili genler hedef organizmaya transit (geçici) olarak veya stabil (sabit) olarak transformasyon sonrası entegre edilebilir. Transit transformasyonda gen kaseti hedef organizmanın genomuna entegre olmaz ancak gen kaseti üzerindeki genlerin transkripsiyonu sonucu heterodimer yapıda çinko parmak nükleaz enziminin mRNA'sı sentezlenir (transkripsiyonu gerçekleştirir) ve bu mRNA'nın translasyonu sonucu enzim ortaya çıkar. Enzim ise hedef genomunda hedef lokusta mutasyonu (rekombinasyonu) gerçekleştirir. Transit olarak ifade ettirilen transformasyon ile gen kasetinin genoma entegrasyonu sağlanmadan genomda kalıtsal değişiklik yaratılmış olur. Eğer transformasyon stabil transformasyon ise genoma entegre olan gen kaseti yavru döllere geçecektir. Ancak yavru döllerin genetik analizleri sonucu transgeni içerenler (GDO'lar) uzaklaştırılır ve geri kalan yavru döllerde ise genetik yapısı arzu edildiği şekilde değiştirilmiş bireyler elde edilmektedir [23-25].

ZFN teknolojisinde üç farklı yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar çinko parmak nükleaz 1 (ZFN I), çinko parmak nükleaz 2 (ZFN II) ve çinko parmak nükleaz 3 (ZFN III) olarak adlandırılmıştır [4,21]. ZFN I ve ZFN II teknolojilerinde tek nükleotit mutasyonları veya az sayıda nükleotit çıkarması (delesyon) veya eklemesi (insersiyon) gerçekleştirilmektedir. Diğer taraftan ZFN III'de ise yeni bir genin eklenmesi ve entegrasyonu söz konusu olup bu yaklaşım geleneksel transgenез yöntemine çok benzerlik göstermektedir. Bu nedenle de ZFN III teknolojisinin yeni nesil çeşit geliştirme yöntemi olarak adlandırılması güçtür. Ancak ZFN I ve ZFN II teknolojileri yeni nesil çeşit geliştirme yöntemleridir [14,17,26].

ZFN I teknolojisinde sadece ZFN genleri rehber DNA olmadan bitki hücrelerine transfer edilmektedir. Bu durumda ZFN enzimi bitki DNA'sına bağlanır ve özel bir noktada çift kesim (her iki sarmalı da) gerçekleştirir. Entegrasyonda bitkide var olan DNA onarım mekanizması devreye girer ve genoma bir veya birkaç baz ekleme ve çıkarma ile sonuçlanır. ZFN II teknolojisinde hedef genomun arzu edilen bölgesine homolog olan ve transformasyon gen kasetine eklenen rehber DNA'sı ile birlikte ZFN genleri hücreye transfer edilir. Bu durumda ZFN bitki DNA'sına bağlanır ve hedefte spesifik olarak çift sarmallı keser. Burada doğal onarım mekanizması onarımı DNA kalıbı ile birlikte çalışır ve hedef genomdaki değişim homolog rekombinasyon olarak sonuçlanmaktadır. ZFN III teknolojisinde ZFN genleri ile hedef bölgenin birkaç kilo baz alt ve üst kısmına homolog olan rehber DNA ile birlikte transfer edilir ve entegrasyonu gerçekleştirir. Bu durumda yabancı DNA (transgen) da genoma entegre edilmiş olur. Bu hali ile ZFN III teknolojisi geleneksel rekombinant DNA teknolojisi ile transgenik organizma elde etmeye benzer. ZFN I tekniğinde ZFN genleri ile birlikte rehber DNA hedef genoma transfer edilmez [19,27,28].

ZFN teknolojisinde geleneksel transgenез sürecinden (GDO) farklı olarak sadece hedef genomun hedef bölgesinde arzu edilen değişikliğin yapılabilmesine izin verilmektedir. Özellikle ZFN I ve ZFN II teknolojileri kullanılarak elde edilen hat veya çeşitler transgenik hat veya çeşit olmaması

nedeni ile maliyet yönünden daha ekonomiktir. Ayrıca bu teknoloji ile üretilen çeşit veya hatların çevre ve insan sağlığına olumsuz bir etkisi bulunmamaktadır [27,28].

Çinko parmak nükleazı hedef spesifik genom düzenlenmesinde ilk sistem olup aralarında *Arabidopsis*, tütün, soya ve çeltik gibi çok çeşitli bitkilerin ıslahında kullanılmıştır. ZFN I teknolojisi tütün bitkisinde herbisite dayanıklılık geni olan ALS (asetolaktat sentaz), raportör genlerden GUS (beta-glikuronidaz) ve GFP (yeşil florsan protein) genlerinde kullanılmıştır. ZFN II teknolojisi *Arabidopsis* GUS geni üzerinde ZFN III teknolojisi ise tütün ve mısır bitkilerinde herbisite dayanıklılık geni olan PAT (fosfotrisin fosfotransferaz) geni kullanılarak başarılı sonuçlar alınabilmiştir [20,21,27].

ZFN teknolojisi önemli sorunları arasında hedef dışı dizilerde (off-site cleavage) mutasyon oluşturmaları, sitotoksisiteye yol açması ve bazı durumlarda fazla sayıda nükleaz enzimine ihtiyaç duyulması yanında başarı oranının düşüklüğü ve ekonomik olmama gibi durumları bulunmaktadır. Hedef dizilerin sol ve sağ dizileri çinko parmak proteinlerinin hedefe bağlanması için tanımda önemlidir. Her bir çinko parmak elemanı tarafından ZFN'de tanınan üçlü dizi genellikle GNN bazları olmaları nedeniyle hedef dizilerin düzenlenmesi sınırlı kalmaktadır. Ayrıca çinko parmak proteininin hedef dizilere bağlanması içeriğe bağımlıdır. Diğer sınırlamalar ise özel tanıma aktivitesi, uzun deney süresi ve yüksek maliyet gerektirmesidir. Avantajları arasında önemli bir genom düzenleme aracı olması ve hedef spesifik rekombinasyon (mutasyon) yaratabilmesi yer almaktadır [9,26,28,29]. Ancak bu yöntemin günümüzde daha çok kliniksel kullanım amacı bulunmaktadır.

2. Oligonükleotit Destekli Mutageniz (ODM)

Bu teknoloji aynı zamanda hedeflendirilmiş gen onarımı, genoplasti, kemoroplasti, oligonükleotit destekli gen düzenlenmesi olarak da adlandırılabilir [30,31]. Yönlendirilmiş oligonükleotit mutageniz veya daha yaygın adıyla oligonükleotit destekli mutageniz yöntemi kullanılarak hedef genomun hedef DNA dizisinde değişiklikler, eklemeler veya çıkarmalar yapılabilmekte aynı zamanda mutasyonun tekrar düzeltilmesi de gerçekleştirilebilmektedir [31,32].

ODM yöntemi kullanılarak arzu edilen genlerde ve DNA dizilerinde özel mutasyonlar oluşturularak (i) proteinlerin amino asit dizileri değiştirilebilmekte ve amaca yönelik protein üretilmektedir, (ii) hedef DNA dizisinde durdurma kodonu (TAA, TGA ve TAG) oluşturulabilmekte veya belirli DNA dizilerinin eklemesi/çıkarmaları yapılarak gen susturması, çerçeve kayması mutasyonlar ortaya çıkartılabilmektedir, (iii) gen ekspresyon seviyesi ilgili genin regülatör dizilerinde örneğin promotör, enhanser, susturucu veya izolatör elementleri değiştirilerek ifade düzeyleri kontrol edilebilmektedir. RNA oligonükleotit kullanımı ile RNA destekli hedeflendirilmiş DNA'da nokta mutasyonlarının oluşumu RNA destekli DNA tamiri mekanizmasıyla ortaya çıkar. Dolayısıyla bu yöntemle oluşturulmuş mutasyonlar doğal mutasyonlardan ayırt edilemez [33-36]. Böylelikle elde edilen bir hat veya çeşidin doğal mı yoksa transgeniz süreci ile mi elde edildiği kolaylıkla tespit edilemez.

Oligonükleotit destekli mutageniz yönteminde hedef DNA molekülüne homolog oligonükleotitler düzenlendikten ve transfer edildikten sonra hedef dizilerde değişimler, eklemeler ve çıkarmalar DNA onarım mekanizmalarından biri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Yöntemde kullanılan oligonükleotitler yaklaşık olarak 20-100 nükleotit

uzunluğundadır. Bu nükleik asit dizileri yapay olarak sentezlenir ve hedef bölgeye homolog olarak düzenlenirler. Oligonükleotitler RNA ve DNA karışımı (kimerik) veya tek sarmallı yapıda olabildiği gibi üç sarmal (triple heliks) oluşturabilme özelliğine de sahiptir. Oligonükleotitler elektroporasyon, polietilen glikol veya bakterilerle doğal transformasyon ile hedef hücreye transfer edilir. Bu yöntemle gönderilen oligonükleotit ile hedef genom DNA'sı arasında dizi spesifik interaksyonlar oluşur [32,36].

Bu teknolojiye 4 farklı oligonükleotit kullanılabilmektedir. Bunlar (i) tek sarmallı homolog DNA oligonükleotitler, (ii) kimerik oligonükleotitler, (iii) 3 sarmal oluşturabilen oligonükleotitler ve (iv) RNA oligonükleotitlerdir. Tek sarmallı homolog DNA oligonükleotiti kullanımında oligonükleotit DNA ile hedef DNA arasında tek eşleşmeyen baz (mismatch) yer almaktadır. Böylelikle hedef DNA üzerinde arzu edilen tek baz değiştirilebilmektedir. Kimerik oligonükleotitler tek sarmallı DNA molekülü ve RNA dizilerinden oluşur. Üçlü sarmal oluşturan oligonükleotitlerin kullanımı ile hedef DNA molekülü arasında 3 sarmallı yapı oluşturulmaktadır. Baz eşleşmesi Hoogsteen baz eşleşme tipini kullanır. RNA oligonükleotitleri kullanılarak RNA-DNA onarım mekanizmasından yararlanılmaktadır [32,34-38].

ODM yöntemi bütün bitki türlerine uygulanabilme potansiyeline sahip olup hedef genomda birden fazla genin ifadesi değiştirilebilmektedir. Bu yöntemle elde edilen hat veya çeşitler GDO olarak nitelendirilmez. Bu durum bir taraftan hat veya çeşit geliştirme maliyetinin daha düşük olmasını sağlarken diğer taraftan tüketiciye daha güvenli ürün verebilme yönünden de yöntemi tercih edilebilir kalmaktadır. Yöntemle arzu edilen gen ifadesi değiştirilebilmekte, pozisyonel inaktivasyonu düşük olmakta ve genomda belirli bir DNA dizisi üzerinde var olabilecek bütün kombinasyonlar oluşturulabilmektedir [32,36].

ODM yönteminin somatik mutasyon oluşturabilmesi en büyük dezavantajdır. Ancak geleneksel transgeniz yöntemlerinden elde edilen mutasyon oranları ile karşılaştırıldığında etki düzeyi daha sınırlıdır. Arzu edilmeyen mutasyonları tespit etmek ve uzaklaştırmak için yoğun DNA analizlerine ihtiyaç duyulabilmektedir [13,32,36,39]. Bu yöntem herbisite dayanıklılık kazandırmak amacıyla çeltik ve tütün bitkilerinde ALS geni, mısırdaki AHAS (asetohidroksiasit sentez), mısır, muz, buğday, *Arabidopsis* ve kanola bitkilerinde ise GFP geni üzerinde uygulanabilmiştir [32,34-38].

3. Cisgeniz ve İntrageniz

Cisgeniz ve intrageniz geleneksel transgeniz yöntemine alternatif olarak geliştirilen yöntemlerdir. En basit tanımla cisgeniz bitkiye aktarılan transgenlerin bu bitki ile tozlanan ve döllenebilen tüm bitkileri kapsar iken intragenizde transgen aynı tür ve tür içinde tozlanabilen ve döllenebilen bireylerden transgen alınımı tanımlar. Cisgeniz/intrageniz geleneksel transgeniz yönteminden farklı olarak birbirleri ile akraba olan, doğal olarak aralarında tozlanabilme ve döllenebilme yeteneğine sahip organizmalar arasında gen transferinin yapılabildiği yöntemlerdir [40]. Cisgeniz yönteminde transfer edilen gen kendi intronu, promotörü ve diğer regülatör dizileri ile birlikte transfer edilmektedir. Bu durum cisgeniz ile elde edilen sonucun klasik ıslah yöntemleri ile de elde edilebildiğini gösterir [2,13,41-43]. Ancak cisgeniz yönteminde geleneksel ıslah yönteminden daha kısa bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır.

İntrageniz yönteminde transfer edilen gen veya genler

hedef organizma ile tozlanabildiği diğer bitkinin yeni gen kombinasyonlarını içerir. Bu yöntemde ilgili genin promotörü ve diğer regülatör dizilerinin değiştirilebilmesi nedeni ile oluşturulan çeşitlilik ve yeni kombinasyon bakımından cisgenез yönteminde göre daha fazla opsiyona sahiptir. Bu yöntemde P-DNA gen transferi, RNA interferans (RNAi) teknolojisi ve diğer yeni generasyon ıslah yöntemlerinden de yararlanılabilmektedir [44,45]. Cisgenез/intragenез yönteminin geleneksel transgenез işleminden temel farkı canlı alemleri arasında gen transferi gerçekleştirilmemekte bunun yerine birbirlerine yakın olan türler arasında değişimlere izin verilebilmektedir. Bu hali ile geleneksel ıslah yöntemlerinde elde edilen hat ve çeşitlere benzer hat ve çeşitler elde edilmektedir [46].

Cisgenез ve intragenез teknolojisinde gen aktarım tekniği olarak genellikle *Agrobacterium* yöntemi kullanılmaktadır. Ayrıca biyolistik tekniği de uygulama alanı bulmaktadır. Yöntemde *Agrobacterium* kullanıldığında *Agrobacterium* T-DNA bölgesi hedef bölgeye entegrasyonda kullanılır. Ayrıca özel vektörler de geliştirilmiştir. P-DNA yaklaşımı olarak bilinen yöntemde geleneksel *Agrobacterium* T-DNA sekans dizileri hedef organizmanın veya yakın türlerin DNA dizilerini içermektedir. Gen kasetindeki P-DNA hedef nükleusa transfer edilmektedir. P-DNA hedef genomda spesifik olarak çift sarmala yerleşir. Cisgenез ve intragenез yaklaşımlarla ORF (Open Reading Frame) de çerçeve kayması veya yeni çerçevelerin eklenebilmesi sağlanmaktadır [42,44-46].

Cisgenез ve intragenез yöntemlerinde birden fazla gen hedef organizmaya transfer edilebilmektedir. Bu durum aralarında verimin de yer aldığı çok genle kontrol edilen özelliklerde kullanılabilecek yöntemler olduğunu göstermektedir. P-DNA kullanımı ile geleneksel T-DNA kullanımının dezavantajları ortadan kaldırılmaktadır. P-DNA kullanımında bir kısım bakteri DNA'sının genoma entegrasyonu da engellenmiştir [39,41,44].

Cisgenез ve intragenез aynı tür içerisinde veya birbirleri ile akraba türler arasında etkilidir. Bu durum bu yöntemlerin uzak cins ve türler arasında kullanımını sınırlamaktadır. Bu yöntemlerde transformasyon frekansı az da olsa T-DNA/P-DNA rastlantısal entegrasyonu ile genlerin istemsiz susturulabilmesi söz konusudur. Doku kültürü teknikleri gerektirmesi nedeni ile somatik mutasyon oluşturabilme potansiyeline sahiptir. Ancak cisgenез yöntemi geleneksel bitki ıslahındaki işlemlerin daha kısa bir sürede tamamlanmasına izin verebilmektedir [45-47].

Cisgenез ve intragenез teknolojisinin bitki ıslahında kullanımı transgenik yaklaşıma benzemektedir. Elde edilen değişimler ile biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanım, kalite ve besin değerleri yönünden artış sağlanabilir. Klasik ıslah yöntemlerinde elde edilen iyileştirmelere benzemekle birlikte sonuca daha kısa bir sürede ulaşılabilir [41]. Klasik ıslah yöntemlerinin sorunlarından biri olan linkej bloğu (bağıllık bloğu) veya arzu edilmeyen diğer genlerin entegrasyonu genellikle bu yöntemlerde oluşmaz. Yöntem yakın tür veya çeşitlerden hastalık ve zararlılara dayanıklılık genlerinin transferi ile gen pramitleme çalışmalarına daha uygundur. Cisgenез ve intragenез teknolojileri kullanılarak patatestе düşük düzeyde akrilamid seviyesine ulaşılabilmiştir. Cisgenез yöntemi ile elma, patates ve kavun bitkilerinde mantar hastalığına dayanıklılık sağlanabilmiş, intragenез yöntemi ile de tütün bitkisinde restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi değiştirilebilmiştir [2,41,43,46].

4. RNA Bağımlı DNA Metilasyonu (RDM)

Bu yöntemde bitki genomik DNA dizilerine homolog olan ve RNA kodlayan genler bitki hücrelerine transfer edilir. Bu genler transkripsiyon işlemine alındığında çift sarmallı RNA moleküllerine dönüşürler. Bu çift sarmallı RNA'lar homolog bölgelerinde bitkiye ait DNA dizilerini metilasyona tabi tutarlar böylece onların transkripsiyonları engellenir. Yöntem bitki DNA'sı üzerinde mutasyon oluşturmaz. Ancak transfer edilmiş genler spesifik bitki genlerinin susturulmasına neden olur. Bu yöntemle elde edilen hat veya çeşitler yabancı gen (transgen) içermezler ve dolayısıyla GDO olarak nitelenmezler. Bu yöntemle aynı zamanda hedef organizmanın DNA dizisi değiştirilmediği için gen dizileri mutasyon ile de değiştirilmez. Hedef organizmanın gen ifadesi epigenetiksel olarak değiştirilir ve arzu edilen özellikler kazandırılmış olur [47-50].

RDM ile hedef genin promotörünün ifadesi değiştirilebilmekte ve spesifik bir gen susturulabilmektedir [48]. Yöntemin çalışması şu şekilde gerçekleşir; i) ilk olarak hedef genomik DNA bölgesine, örneğin promotör bölgesine, homolog RNA dizisi transformasyon gen kasetine eklenir, ii) transformasyon gen kaseti bitkiye uygun bir gen transfer yöntemi kullanılarak transfer edilir, iii) transgenik bitkide transfer edilmiş DNA transkripsiyonu ile çift sarmallı RNA molekülü oluşturulur ve iv) özel enzimler yardımı ile transgen RNA hedef bölgedeki promotörü metilleştirerek genin ifadesini durdurur. Transgenik bitki dölllerinden transgen olmayanlar uygun moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak seçilir ve sonuçta transgenik olmayan döllerde gen ifadesi değiştirilmiş olur. Transgenik bitkiler kendilenerik genetik açılım sağlanır ve entegre edilmiş geni taşımayan ancak metilleşmiş promotörleri veya hedef DNA dizilerinde metilleştirilmiş dizileri taşıyanlar alınır [51-55].

RDM yöntemi bir veya birkaç RNA interferans (RNAi) patikalarını kullanılmaktadır. Bu yöntemde genellikle 21-24 nükleotit uzunluğunda küçük RNA molekülleri (siRNA ve miRNA) kullanılmaktadır [53]. Bu küçük RNA molekülleri hedef genomda spesifik DNA metilasyonu yapmakta ve dolayısıyla arzu edilen genlerin ifadeleri susturulabilmektedir. Bu teknolojiye genomda çift sarmallı RNA molekülleri ribonükleazlar olarak görev yapmaktadır. Ribonükleazlar hedef genomun özellikle CG, CHG ve CHH dizilerindeki (H; G dışındaki 3 nükleotitten herhangi birisi olmak üzere) sitozin üzerine metil (CH₃) ekleyerek bu dizilerin ifadeleri baskılanabilmekte ve dolayısıyla gen anlatımı değiştirilebilmektedir [52,53].

RDM yöntemi kullanılarak elde edilmiş hat veya çeşitler transgenik değildir. Diğer bir tanımla GDO değildir. Bu nedenle tüketiciler tarafından arzu edilmektedir. DNA dizisinde değişiklik yapılmaksızın gen anlatımı kalıtsal olarak değiştirildiğinden epigenetiksel değişimler elde edilir. Bu yöntemle genomda spesifik bir gen veya bir grup genin ifadesi susturulabilmektedir. Ancak metilleştirilmiş hedef bölgedeki metilasyon ilerleyen generasyonlarda etkisini kaybetmektedir. Hedef organizmada yapılan değişikliğin kaç generasyon ileriye taşınabileceği tür veya genotiplere bağlıdır. Yapılan çalışmalarda bu teknoloji ile susturulmuş genlerin F₃ kademesine kadar devam ettiği belirlenmiştir. Bu yöntem mısır bitkisinde erkek kısırılık, patates bitkisinde nişasta sentaz geni, havuç bitkisinde embriyo spesifik transkripsiyon faktörü geni ve petunyada renk oluşumu genleri üzerinde başarıyla uygulanabilmiştir [50,55].

5. Transgenik Anaçlara Aşılama

Aşılama yöntemi kalem olarak adlandırılan vejetatif kısmın kök sistemine sahip diğer bir bitkiye eklenerek kimerik bitki elde edilmesidir. Bu yöntem ile GDO anaçlara GDO içermeyen fide aşılması yapılabilmektedir. Bazı durumlarda transgenik kalem transgenik olmayan anaça da aşılatabilmektedir. Transgenik anaçlara aşılama yöntemiyle hastalıklara dayanıklılık, kök gelişimi, besin maddesi ve su tutumu gibi özellikler sağlanabilir. Başarılı bir aşılama için kökün iletim demetleri ile sapın iletim demetlerinin birleştirilmesi gerekmektedir. GDO anaçlar yaygın olarak geleneksel transgeniz yöntemleri olan *Agrobacterium* veya biyolistik yöntemleri kullanılarak elde edilebilmektedir. Transgenik anaça arzu edilen kalem aşılatabilmekte ve böylelikle arzu edilen bitkisel üretimin kalitesi ve miktarı artırılabilir [1,56,57].

Bu yöntemle elde edilmiş bitkiler moleküler biyoloji çalışmalarında da etkin olarak kullanılabilir. Özellikle protein ve RNA moleküllerinin kimerik bitki dokularında ifade düzeylerinin ortaya konulmasında yaygın olarak kullanılabilir. Yakın akraba türlerde ve bazı durumlarda aynı familyada yer alan türler anaç olarak kullanılabilir ve böylece üretim maliyeti azalmaktadır. Bu yöntem anaç bitkilerin toprak kökenli hastalıklara dayanıklılığının yanında topraktan su ve besin maddelerinin daha etkin kullanımını sağlayabilmektedir. Yöntem toprak üstü kısımlarından yararlanan bitkiler için yaygın olarak kullanılmaktadır [58]. Örneğin patates, asma, karpuz, fasulye ve hiyar bitkilerinde kök gelişimini arttırmada, fungus ve bakteri hastalıklarına dayanıklılık kazandırma çalışmalarında kullanılmaktadır. Bazı türlerde anaç bitkide ifade edilen RNA molekülleri kalem bitkide transit olarak ifade edilebilmesi nedeniyle arzu edilmeyen durumlar ortaya çıkmaktadır. Uygulanabilirliği ancak anaç olarak kullanılacak bitkide transgeniz ile oluşturulan özelliğin bulunmasına bağlıdır. Yöntemin diğer bir dezavantajı ise aşılama çalışmalarına ihtiyaç duyulması nedeni ile ilave zaman ve maliyet gerektirmesidir [57-59].

6. Ters İslah Yöntemi

Bu yöntemde geleneksel bitki ıslahı yöntemlerinden melezleme çalışmaları ile yeni hat veya çeşitlerin elde edilmesi işleminin tersi gerçekleştirilmektedir. Ters ıslah yöntemi kullanılarak homozigot ebeveyn hatlar heterozigot hattan geriye melezleme çalışmalarına gerek duyulmadan tekrar elde edilebilmektedir. Yöntemde heterozigot hattan homozigot hatların elde edilebilmesi nedeniyle geleneksel ıslahın tersi gerçekleştirilmektedir. Ters ıslah yönteminin işleyişi kısaca şu şekildedir. İlk işlem üstün özelliklere sahip heterozigot hattın seçilmesidir. İkinci işlemde ise seçilen hattın mayoz bölünme aşamasında mayozdaki rekombinasyonunun gen susturma yöntemi ile baskılanması ve bitkiden olgunlaşmamış polenlerin (mikrospor) elde edilmesidir. Yöntemin ileri aşaması transgenik özellikte olmayan haploit bitkilerin elde edilmesi ve sonuçta haploit bitkilerden genom katlayıcı ajanlar kullanılarak diploit bitkilerin üretilmesidir [60-61].

Homozigot ebeveyn hatlar heterozigot bitkilerden mayoz bölünmenin rekombinasyonu durdurularak elde edilebilmektedir. Mayozdaki rekombinasyon RNAi (RNA interferaz) destekli gen düzenleme yöntemi ile sağlanabilmektedir. Bu yöntemle çift haploit hatlar elde edilebilmekte ve bu hatların melezlenmesi ile de heterozigot hat tekrar elde edilebilmektedir. Mayozdaki rekombinasyon aralarında RNAi teknolojisinin de bulunduğu farklı

yöntemler kullanılarak önenebilmektedir. Örneğin *dmc1* ve *spo11* genleri mayoz bölünmenin rekombinasyon işlemlerinde görev almaktadır. Bu genlerin RNAi teknolojisi ile susturulmasıyla heterozigot bir hattan homozigot ebeveyn hatları elde edilmektedir [13,62].

Ters ıslah yöntemi ile elde edilen hat veya çeşitler GDO değildir. Bu durum ters ıslah yöntemi ile elde edilen ürünlerin tüketici tarafından arzu edilmesine neden olmaktadır. Ters ıslah yöntemi ile elit genotiplerin korunması ve sürdürülmesi mümkündür. Eldeki herhangi bir hibrit bitkinin genetik kombinasyonu bozulmadan tekrar kendisi elde edilebilmektedir. Bu yöntem F_1 'deki heterozisin sürdürülmesini sağladığı için ileride daha fazla kullanım alanına sahip olacaktır. Ancak heterozisin apomiktik özellik ve vejetatif üretime alınması ile de sağlanabileceği unutulmamalıdır [62].

Bu yöntemin ebeveyn ikame hatları oluşturulmasında ve değerlendirilmesinde etkin bir şekilde kullanımı bulunmaktadır. Ancak bu yöntem günümüz teknolojisinde haploit kromozom sayısı 12 veya daha az olan türler için kullanım olanağına sahiptir. Kromozom sayısı yüksek olan türlerde uygulama zorluğu bulunmaktadır. Bu yöntemin patent altında bulunması nedeni ile konuyla ilgili yayın sayısı yetersizdir [62-64].

7. Agro-İnfiltrasyon Yöntemi

Yöntemin kullandığı gen kaseti ve doku tipine göre 3 tipi bulunmaktadır [1]. Bunlar Agro-İnfiltrasyon, Agro-inokulasyon (Agro-Enfeksiyon) ve Floral Dip yöntemleridir. Bu yöntemde genellikle bitki yaprakları uygun gen kaseti içeren *Agrobacterium* sıvı süspansiyonu ile ıslatılır. Kullanılan dokular genellikle vejetatif bitkilerin genç yapraklarıdır. Gen kasetinde yer alan genler ilk birkaç gün en yüksek düzeyde genoma entegre olmadan ifade edilir. Bu yöntemlerden sadece floral dip tipinde genoma entegrasyon sağlanmaktadır [39,50,65,66].

Agro-infiltrasyon yöntemi genellikle yaprak dokusu gibi generatif olmayan dokularda kullanılır. Vejetatif dokular ekspresyon vektörlerini taşıyan süspansiyon ile muamele edilir. Bu yöntem bitki parçası (explant, *in vitro*) veya bütün bitkiye (*in planta*) bağlı parçaya uygulanabilmektedir. Bitkiden alınan parçalar doku kültürü ortamında işlemlere alınabildiği gibi bitkiler saksılarda da muamele edilebilmektedir. Bu yöntemle örneğin bir viral vektörün bitki dokularına olan etkileri kolaylıkla saptanabilmektedir [51].

Diğer bir tip Agro-inokulasyon veya agro-enfeksiyon yöntemidir. Buradada vejetatif bitki dokuları kullanılmaktadır. Yabancı gen, bir gen kasetine eklenmekte ve bu gen kaseti bir virüs vektörü ile bütün bir bitkiye uygulanmaktadır. Yöntemde viral vektörün kullanımı durumunda agro-enfeksiyon, viral vektörünün kullanılmaması durumunda ise Agro-inokulasyon adını almaktadır [51,65].

Floral dip yönteminde vejetatif olmayan dokular örneğin çiçek kısımları kullanılmaktadır. Transformasyonda genellikle *Agrobacterium* T-DNA bölgesindeki gen kaseti dişi gametlere transfer edilir. Geametlerin eşleşmesinin (döllenmenin) ardından tohum oluşur. Bu yöntem geleneksel transgeniz yöntemine benzemektedir [66].

Bu yeni nesil yöntemler özellikle bitki-patojen ilişkilerini ortaya koymada etkin bir yöntemdir. Özel bir gen kasetinin ekspresyon seviyesi bu yöntemle ortaya konabilmektedir. Bu yöntemle transit olarak bazı biyomoleküller üretilebilmektedir. Bitki ıslahında kullanılacak ebeveyn hatlarının tarımsal özelliklerinin ortaya konulabilmesinde

etkin olarak kullanılabilir. Bu yöntem yeni generasyon bitki ıslah yöntemleri içerisinde en ekonomik yöntemlerden biridir. Ancak transit ekspresyon durumu nedeni ile yavru döllere gen akışı bulunmamaktadır. Bu nedenle sadece *in vitro* seleksiyon ön denemelerine uygundur [1,51,65]. Bu yöntemler tütün, patates, domates, fasulye ve diğer birçok bitkide uygulanmıştır. Bu yöntemler ayrıca tıbbi aşı, antikor, bazı kan proteinleri ve diğer tıbbi metabolitlerin aralarında tütün ve patatesin de yer aldığı bitki türlerinde üretilmesine yönelik çalışmalarda kullanılmaktadır [13,65].

8. TALEN

Doğada ilk olarak *Xanthomonas* cinsine ait bakterilerde görülmüştür. Bakteriyel bir patojen olan *Xanthomonas*, genellikle bitki hücrelerine bakteriyel Tip III salgılama sistemi ile salınan transkripsiyon aktivatör benzeri etkileyiciler (TALE) olarak bilinen bir dizi salgılanmış protein içerir. Çalışmalar, TALE'lerin spesifik konak bitki DNA dizilerine bağlanma özelliği sonucu bir patojenin istilasını önlemeye yardımcı olabilecek konakçı bitkinin spesifik gen ekspresyonunu teşvik etme yeteneğine sahip olduklarını göstermektedir. Bakteri tarafından bitki sitoplazmasına salınan bu proteinler DNA'ya bağlanma özelliğine sahip olup adeta transkripsiyon faktörleri (TF) gibi davranarak hedef genlerin ekspresyonunu tetiklemektedir. TALE proteinleri farklı domainler (alanlar) içermektedir. Bunlar merkezde bir DNA bağlanma domaini, bir nükleer lokalizasyon sinyal domaini ve hedef gen transkripsiyon aktivasyon domainidir [6,28].

Her TALE'in (i) tip III sekresyon sinyalini içeren N terminal alanı, (ii) nükleer lokalizasyonda ve transkripsiyonel aktivasyonda rol oynayan C-terminal alanı ve (iii) tanıma ve bağlamadan sorumlu merkezi tekrar alanı olmak üzere üç alanı vardır. TALEN DNA tanıma alanı, merkezi tekrarlardan oluşan yüksek oranda korunmuş tekrarlanan birimlerden oluşan bir diziyi içerir. TALE proteinlerinin her bir DNA bağlanma domaini monomerlerden oluşmakta ve her bir monomer hedefte özel bir nükleotide bağlanmaktadır. Monomerler 34 aminoasitlik ardışık tekrarlardan oluşmaktadır. Ardışık tekrarlardan ikisi 12 ve 13 numaralı aminoasitlerden oluşmakta olup yüksek düzeyde varyasyona sahip olan değişken tekrarlı ikili aminoasit dizisi anlamına gelen RVD (repeat variable diresidue) dizileridir. RVD dizileri hedef nükleotitleri tanıma yeteneğine sahip olmakla birlikte tanıma dejenerat özelliğindedir. Diğer bir ifadeyle farklı bağlanma etkinliği göstermektedir. Hedef DNA dizisinin 5'-terminal kısmında Timin nükleotidinin bulunması bağlanmanın spesifitesini artırmaktadır [6,29].

TALE proteinlerinin yapıları anlaşıldıktan sonra TALE Nükleazların (transkripsiyon aktifleyici benzeri protein destekli nükleaz, TALEN) oluşturulma süreci başlatılmıştır. TALE enziminin DNA bağlanma domaini ile *FokI* enziminin endonükleaz domaininin plazmitte birleştirilmesi ve ekspresyonu ile katalitik aktivitesi ve DNA bağlanma kısmı olan nükleaz (TALEN) üretilebilmiştir. TALEN endonükleaz enzimi yapay DNA bağlanma domaini, nükleer lokalizasyon sinyal domaini, yarım-tekrar (20 amino asit), N-terminal domaini ve *FokI* katalitik domainin eklenmesiyle oluşturulur. Farklı tiplerde yapay nükleazlar oluşturmak için TALE endonükleaz monomerlerinin DNA bağlanma domainleri değiştirilebilir. RVD dizilerindeki iki aminoasitin genellikle Asn ve Ile (NI) Adenin, Asn ve Gly (NG) Timin, iki Asn (NN) Guanin ve Adenin, His ve Asp (HD)'nin ise Sitozin bazını tanıyıp bağlandıkları görülmüştür [6,28].

TALEN çiftler halinde çalışır ve onların bağlanma

dizileri arasında aracı diziler (spacer sequence, 12–25 bp) yer alır. Bu nükleazlar nükleusta olduğu zaman hedef dizilerin varlığında bu dizilere bağlanırlar. Kimerik proteinin C terminalinde yer alan *FokI* dimerleşerek aracı diziler arasında bir çifte sarmal kesimi yapar. Teorik olarak TALEN nükleazların DNA bağlanma domaini tarafından tanınan herhangi bir dizide çift sarmalda kesim yapılabilir. TALEN nükleazın hedef bölgesinin seçiminde hedefin 5'-terminal kısmında T bazının bulunması zorunludur. DNA bağlanma domainin N-terminal ucunun W232 dizisinin hedefin 5'-ucundaki Timin ile interaksyonu söz konusudur. Ancak TALEN mutantları seçilerek T spesifikliğı azaltılabilmekte A, G ve C bazlarına da bağlanabilmektedir [6].

TALEN yönteminin en belirgin dezavantajı hedef dışı (off-target) mutasyonların ortaya çıkabilmesidir. Hedef dışı mutasyonların ana kaynaklarından en önemlisi RVD dizilerinden kaynaklanmaktadır. Örneğin HD ve NN monomerleri nükleotitlerle güçlü hidrojen bağları oluştururken, NG ve NI monomerleri nükleotitlerle zayıf hidrojen bağları oluşturur. Bu durum DNA tanıma domainlerinin (alanının) hedef dizilerde birkaç nükleotitlik bir sapma ile bağlanmasına neden olabilmektedir. RVD ve nükleotitler arasındaki tanıma kodun dejenerasyonu farklı hedeflere bağlanmaya neden olabilmektedir, örneğin NG ve A arasındaki etkileşime yol açabilir. İki nükleazın *FokI* domainlerinin aynı DNA bağlanma domainleri ile dimerleşmesi mümkün olmaktadır. Bu durumu ortadan kaldırmak amacıyla heterodimer oluşturan *FokI* domainlerini içeren TALEN'ler geliştirilmiştir. Olası hedef dışılığın (off-target) nedenlerinden birisi de nükleaz tanıma sitelerindeki (nuclease recognition sites) aralayıcı DNA (spacer DNA) boyutunun farklı türlerde sabit olmasıdır. Bu durum *FokI* domainlerinin dimerizasyonu için yeterli bir mesafede bulunan hedef dışı dizilere nükleazların bağlanması sırasında çift iplikte kopmaların olmasına neden olmaktadır. DNA-bağlama alanı (domaini) hemen hemen aynı tekrarlardan oluşur [6].

TALEN'leri ifade eden genetik yapıların düzenlenmesinde bazı teknik zorluklar bulunmaktadır. Bu nedenle 20-30 veya daha fazla monomerden oluşan TALE DNA-bağlama alanlarının oluşturulmasını sağlayan bir dizi yöntem önerilmiştir. Stratejilerden biri, tip II DNA restriksiyon endonükleazlar ve ligasyon ile hidroliz kullanılan standart DNA klonlama çalışmalarına dayanır ve REAL (Regrasyon ve Ligasyon) olarak adlandırılır. REAL'de ilk aşamada, 5'- ve 3'- uçlarda endonükleaz aktiviteleri ile kesilen siteleriyle tanımlanan bir monomer kütüphanesi üretilir. DNA hidrolizinden sonra, daha sonra tetramerler ve benzerleri içinde birleştirilen dimerlerin (N1N2, N3N4, N2k-1N2k) oluşumuyla sonuçlanan çiftler halinde ligasyonu gerçekleştirilir. Bu durumda, çeşitli restriksiyon endonükleazların kullanılmasıyla doğru dizi elde edilir [6,28].

ZFN'den daha iyi bir genom düzenleme yöntemi olan TALEN çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. TALEN'in hedef dizilere yönlendirilmesinde daha az sınırlayıcı faktöre bağlı olup hedef dizinin sadece ilk bazının T olması yeterlidir. TALEN'in hedefe bağlanmasında hedef alanın sol ve sağ dizileri TALEN'in etkinliğini azaltmaz. TALE domainleri ve bazlar arasındaki birebir eşleşme nedeniyle, TALEN enzimlerinin mühendisliğı ve dizaynı Zn-parmak nükleazlardan daha açık ve kolaydır. TALEN'lerin montajı kolay olup kütüphane taramaya gerek olmadığı için zamandan tasarruf sağlanır. Son olarak, TALEN'lerin yapım maliyetinin ZFN'lerden daha düşük olması çoğu laboratuvar için kullanım avantajı sağlar. Ancak, TALEN sistemi de mükemmel değildir. CRISPR/Cas sistemi ile karşılaştırıldığı

zaman TALE proteininin çok büyük olması nedeniyle immünogenisite sorununun ortaya çıkabildiği bilinmektedir. Ayrıca sol TALEN ve sağ TALEN'i tek bir vektöre entegre etmek zor olduğundan TALEN kurulumu nispeten daha zor ve uzun zaman almaktadır. TALEN'in tek nokta mutasyon verimliliği yüksek olmasına rağmen, aynı anda iki veya daha fazla hedefin düzenlenmesinde teknik zorluklar mevcuttur. ZFN'ler ve TALEN'ler DNA'yı protein ve DNA etkileşimi ile bağlarken CRISPR/Cas, RNA ve DNA etkileşimi aracılığıyla hedef bölgeyi tanımlar [6,28,64].

9. CRISPR/Cas

Düzenli aralıklı kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar/CRISPR ile birleşmiş proteinler/Cas9 [clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 associated, CRISPR/Cas9] sistemi, yaygın olarak kullanılan *FokI* tabanlı ZFN ve TALEN yöntemlerine bir alternatiftir. CRISPR-Cas9, bakterileri ve arkeaları virüs veya plazmit istilalarından koruyan, RNA aracılı bir adaptif bağışıklık sistemidir [6,7,67,68]. Özellikle son yıllarda CRISPR-Cas9'un sistemi geniş bir organizma ve hücre tipi yelpazesinde hedefleme ve genom düzenleme için anahtar bir teknolojiye aktarılmaktadır. CRISPR lokusu, Cas9 proteinini kodlayan bir operon ve tekrarlanan diziler dizisinden oluşur. Tekrarlayıcı aralayıcılar, eksojen DNA'ya tamamlayıcı olan olgun crRNA'lar üretmek üzere transkripsiyona alınır ve işlenir, daha sonra crRNA ve tracrRNA molekülleri birleşerek hibrit crRNA-tracrRNA oluştuktan sonra DNA'yı parçalamak için Cas9 nükleaza yol gösterir. Sistem, hedef bölgeye özel olarak tasarlanmış tek sarmallı-rehber RNA (sgRNA, single-guide RNA), bir Cas9 endonükleaz ve proto-aracı motif (Protospacer Adjacent Motif, PAM) dizileri gerektirir. sgRNA-Cas9 kompleksi, hedefine bağlanır ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi (Nonhomolog End Join, NHEJ) veya homoloji destekli onarım (Homology Directed Repair, HDR) yolu ile tamir edilebilen, genomik olarak modifiye veya kalıcı olarak değiştirilebilen bir çift-sarmal kırılması (Double Strand Break, DSB) oluşturur [6,67].

CRISPR/Cas sisteminin Cas nükleaz komponenti ve birbirinden ayrı iki RNA komponenti bulunmaktadır. Bu RNA komponentinden biri değiştirilebilir crRNA diğeri ise sabit tracrRNA komponentidir [67]. Bakteriye alınmış istilacı faj DNA molekülü Cas nükleaz tarafından küçük kısımlara bölünür ve konakta bulunan CRISPR lokusuna aracı olarak entegre edilir. CRISPR kasetinin transkripsiyonu sonucu crRNA ve buna tamamlayıcı diziye sahip tracrRNA sentezlenir ve olgunlaştırılır. Bu iki RNA komponentinin eşleşmesi Cas proteinlerinin kesme kabiliyeti kazanmasına neden olur. İstilacı DNA'nın üzerinde crRNA hedef dizisinin bitişiğinde bulunan proto-aracı motif (PAM) CRISPR/Cas sisteminin hedefe bağlanmasında önemli bir işleve sahiptir [67].

Biyoinformatik çalışmalar CRISPR/Cas sistemlerini üç ana tipe (Tip I-III) ve en az 10 alt tipe ayırmaktadır. Bunlar arasında *S. pyogenes* patojeninden izole edilen Tip II-A CRISPR/Cas sistemi şu anda genomik mühendisliğinde en yaygın kullanılan CRISPR/Cas sistemidir. Bu bakteride minimum sayıda dizi gen bulunmaktadır. Bu sistemde çok işlevli bir Cas9 proteini, hem ön crRNA'nın işlenmesini hem de yabancı DNA'ya müdahaleyi (interference) gerçekleştirmektedir. Tip II sisteminde tek bir Cas proteini (Cas9) kullanılır. Cas9 sisteminde RNA rehberli DNA tanıma, crRNA ve tracrRNA birleşimi ile oluşan tek rehber RNA (sgRNA) tarafından gerçekleştirilir. CRISPR/Cas9

proteini bir tanıma lobu (REC) ve bir nükleaz (NUC) lobu içerir. REC lobunda birer adet uzun alfa heliks, REC1 ve REC2 domeinleri bulunur. NUC lobunda RuvC, HNH ve PAM-iteraksiyon (PI) domeinleri bulunur. PI domein Cas9 proteininin PAM dizisini tanımasında önemlidir. crRNA ve tracrRNA birleşmesi ile oluşturulan sgRNA çift sarmallı hedef DNA'nın Cas9 tarafından kesilmesini mümkün kılar. Cas9-sgRNA kompleksi sgRNA dizilerine homolog olan hedefi tanıyarak ve PI PAM dizilerini tanıyarak, proteinde üçüncü boyut kompleks oluşur, tamamlayıcı dizi HNH ve tamamlayıcı olmayan dizi RuvC domeinlerince kesilir. HNH T4 endonükleaza benzer DNA'ya bağlanma ve kesme işlemini yaparken RuvC Holliday kavşağını açarak kesim yapar [7,67,68].

Günümüzde sgRNA, PAM ve Cas9 değiştirilmesi ile istenilen hedef DNA dizilerine ekleme, çıkarma ve değişim yapılabildiği gibi yeni gen transferi de gerçekleştirilmektedir. CRISPR/Cas9 sistemi ile genom düzenlenmesinde nükleazlar tarafından kesilen hedef lokuslarda rekombinasyon veya mutasyonlarda iki ana mekanizma kullanılır. Bu mekanizmalar homolog olan (HR) ve homolog olmayan (NHR) rekombinasyonlardır. Homolog olmayan uçların birleştirilmesi veya eklenmesi hedef lokus ile kalıp arasındaki farklılıklar ekleme ve çıkarma mutasyonlarına neden olmaktadır. Homolog rekombinasyonlarda kalıp olarak hedef diziler homolog bir dizi kullanılır. Örneğin homoloji destekli onarım (HDR) temelli yaklaşımda ikili vektör sistemi kullanılabilmektedir. İlk vektör üzerinde donör DNA ve homolog dizileri, ikinci vektör üzerine ise Cas9 ve rehber RNA dizileri yerleştirilir. Donör vektörde bulunan homolog dizilerden dolayı ilgili hedef bölgeler arasında DNA dizisi alışverişi hedeflenir. Bu amaçla ikili vektörler *Agrobacterium tumefaciens* suşuna ısı şoku (heat shock) yöntemi ile aktarılır. Hedef bitkilere *A. tumefaciens* aracılığıyla transformasyon gerçekleştirilmektedir [7,68].

Kesme bölgesindeki DNA dizilerine homolog olan yapay bir DNA molekülü CRISPR/Cas9 bileşenleri ile birlikte eklendiğinde HDR mekanizmasıyla hedef lokusta mutasyonlar oluşturulur. HDR mekanizması için iki farklı yapı kullanılabilmektedir. Bunlar tek sarmallı oligonükleotitler ve plazmit vektörlerdir. Oligonükleotitler dizi olarak hedef molekülden biraz farklıdır ve genellikle 90 bp uzunluğunda yapıldır. İçerik olarak ise çift-sarmalın kesildiği dizilere homolog olarak tasarlanırlar. Rekombinasyon için plazmit vektörler donör moleküller olarak kullanıldığında 500 veya birkaç bin bazlık nükleik diziler kullanılabilmektedir. Bu dizilerde yeterli uzunlukta homolog diziler bulunabilir, bu homolog kollara raportör genler, markır genler veya diğer regülatör diziler eklenebilir [7,67,68].

HDR transgenезin yanı sıra genomdaki lokusu değiştirmede, hedefe restriksiyon enzim dizileri eklemeye, hastalıkların düzeltilmesinde kullanılabilmek potansiyeline sahiptir. Ancak HDR etkin olarak bölünen hücrelerde hücre tipine, gelişme dönemine, genom ve lokusa bağlı olarak değişebilmektedir. Donör plazmitin olmadığı durumlarda homolog olmayan uçların eklenmesi ile bir kaç nükleotit uzunlukta insersiyon veya delesyonlarla birlikte hedef bölgelerde susturma, çerçeve kayması mutasyonları gerçekleştirilebilmektedir. Çift sarmallı oligonükleotitlerin veya donör plazmitlerin varlığında 14 kilo bazdan daha büyük DNA fragmanları homolog olmayan uçların birleştirilmesiyle eklenebilmektedir [7,67,68].

ZFN ve TALEN teknolojilerine kıyasla, CRISPR/Cas teknolojisi daha basit bir yapıya, daha düşük maliyete ve

daha yüksek düzenleme verimliliğine sahip olup birden çok sitenin düzenlenmesi için kullanımı da kolaydır. CRISPR/Cas sistemi, genom düzenleme teknolojisinin çalışma prosedürlerini büyük ölçüde basitleştirmiş ve bitkilerde kullanımını daha kolay hale getirmiştir. Ancak PAM dizileri içermesi gereken hedef alan ana sınırlamalarından biri olup NGG dizisi çeşitli biyolojik genomlarda yaygın olmasına rağmen, bazı genler hala PAM içermez, bu yüzden CRISPR/Cas sistemi bu genleri düzenleyemez [7,67,68].

Hızlı ve etkili olarak mutasyonlar oluşturulması ve gen aktivitesinin çalıştırılmasına olanak sunan CRISPR/Cas9 teknolojisi hücre duvarına sahip olan bitkilerde protoplast transformasyonu veya *Agrobacterium tumefaciens* aracılı transformasyon yöntemi (agro-infiltrasyon) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. CRISPR/Cas9 ve TALEN hedef bölgelerinin tespiti için biyoinformatiksel yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler kullanılarak hedef dışı mutasyonlar azaltılabilmektedir. Ancak hedef bölgelerin seçimi için hedef genom dizilerinin bilinmesi gerekmektedir [7,67,68].

CRISPR/Cas9 sisteminin temel dezavantajlarından biri de hedef dışı mutasyon oluşturma olasılığının yüksek olmasıdır. Değişik organizmalarda yapılan *in vitro* çalışmalarda tek sarmallı-rehber RNA'nın (sgRNA) 20 nükleotitik aracı bölgesinin 3'-terminal kısmının sondan 2-10'nuncu dizisinde yapılan nükleotid değişimlerinin (substitutions) CRISPR/Cas9 aktivitesinde önemli düzeyde azalmalara neden olduğu görülmüştür. Tüm bunlar sistemin bazı kusurları olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak Cas9'da ortologların kullanımına dayanan ve daha karmaşık bir konsensus dizisine sahip bir PAM'a ihtiyaç duyan yöntemlerin araştırılması ve geliştirilmesi bu dezavantajların üstesinden gelecektir. Örneğin *N. meningitidis*'in Tip II CRISPR/Cas sisteminde 5'-NNN-NGATT-3' dizili PAM kullanımı hedef-dışı mutasyon oranını azaltmaktadır [26].

Hem TALEN-aracılı hem de CRISPR/Cas9-aracılı genomik modifikasyonlarda NHEJ yoluyla genomda hedeflenen bir lokusta indel oluşturulabilir veya HDR yoluyla bir homolog donör DNA dizisi genomu eklenebilir. Bu HDR-bazlı gen yer değiştirmesi, TALEN-bazlı analiz ile en azından model organizmaların bazılarında iyi bir şekilde kurulabilmiş iken henüz Cas9 aracılı mühendislik uygulamaları deney aşamasındadır. TALEN-aracılı genom düzenlenmesi, genomda spesifik DNA tanıma için etki alanlarını kodlayan bir çift büyük tekrarlı sekans gerektirir. CRISPR/Cas9-aracılı genom düzenlenmesinde ise bölgeye özgü DNA tanıma ve kesim için TALEN tekrarlarını birleştirmekten çok daha kolay manipüle edilen kısa bir RNA molekülüne ihtiyaç vardır. TALEN'lerin tanıma siteleri hemen hemen her zaman T ile başlarken, CRISPR/Cas9 sistemi genellikle NGG'nin di-guanin sitelerini tanımaktadır [7,26,67,68].

YENİ NESİL ISLAH YÖNTEMLERİ İLE ELDE EDİLEN BİTKİLERİN TANISI

Genomik yöntemler "genomiks" olarak da adlandırılan yöntemleri kapsamaktadır. Genomik yöntemler DNA dizisindeki farklılığı ortaya koymada kullanılan bütün yöntemleri ve yaklaşımları kapsamaktadır. Örnek olarak i) agaroz, poliakrilamid ve kapılar elektroforez yöntemleri, ii) blotlama/hibritleme ve interaksiyon yöntemleri, iii) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve gerçek zamanlı PZR teknikleri, iv) mikrodizin yöntemleri, v) DNA dizi yöntemleri ve gelecek nesil DNA dizileme tekniklerinden

oluşmaktadır [9,63]. Genomik yöntemler ODM, RDM, ters-ışlah ve cisgenез ile geliştirilmiş çeşitleri geleneksel ıslah yöntemi ile geliştirilenlerden ayırt edememektedir.

Transkriptomik yöntemler transkriptomiks olarak da bilinmektedir. Transkriptomikte herhangi bir hücre, doku, organ veya organizmada belirli bir zaman ve gelişme döneminde ifade edilen genlerin durumları ifade düzeyleri tespit edilmektedir. Genomiks'de kullanılan ve yukarıda adları verilen çoğu yöntem transkriptomikte de kullanılmaktadır. Transkriptomik yöntemler ters ıslah, agro-infiltrasyon, agro-inokulasyon, floral dip, TALEN ve CRISPR/Cas yöntemleri ile geliştirilen çeşitlerin tanısında genomik yöntemlere göre daha avantajlıdır [9,68].

Proteomik yöntemler proteomiks olarak da bilinmektedir. Proteomikte herhangi bir hücre, doku, organ veya organizmada belirli bir zaman ve gelişme döneminde sentezlenen proteinlerin durumları ve miktarları tespit edilmektedir. Bu yöntem etkili kullanıldığı durumda transgenik anaçlara aşılama, ters ıslah, agro-infiltrasyon, agro-inokulasyon, floral dip, TALEN ve CRISPR/Cas yöntemleri ile geliştirilen çeşitlerin tanısında kullanım olanağına sahiptir [68,69].

Metabolomik yöntemler metabolomiks olarak da bilinmektedir. Metabolomikte herhangi bir hücre, doku, organ veya organizmada belirli bir zaman ve gelişme döneminde üretilen tüm metabolitlerin durumları ve miktarları tespit edilmektedir. Metabolomikte kromatografik yöntemler (örneğin kütle kromatografisi, gaz ve likit kromatografisi) kullanılabilir. Geliştirilmiş çeşidin metabolik farklılığı bu yöntemle belirlenebilmektedir. Ancak doğal süreçte var olan metabolik farklılıklarla yeni nesil çeşitteki farklılıktan ayırt edilebilme kriterinin belirlenmiş olması gerekmektedir [63].

In silico yöntemler genomiks, transkriptomiks, proteomiks ve metabolomiks yöntemleri ile elde edilen bilgilerin birlikte kullanıldığı yöntemlerdir. En basit tanımlama ile genomik, proteomik, transkriptomik ve metabolomik yöntemlerle elde edilen yoğun ve çok hacimli verilerin veri tabanlarında depolanması, sınıflandırılması, yeni yöntemler kullanarak veya geliştirilerek analiz edilmesi, *in vitro* çalışma sonuçlarının teyit edilmesi ve yeni moleküllerin dizayn edilmesi çalışmalarını kapsamaktadır. [63,69]

Yeni nesil ıslah yöntemleri ile geliştirilmiş olan hat veya çeşitlerin tanısında DNA, protein ve metabolit tabanlı yöntemlerden bazıları kullanılabilir. DNA tabanlı yöntemlerle ZFN III, cisgenез, intragenез ve floral dip yöntemleri ile elde edilen hat veya çeşitlerin tespitini gerçekleştirilebilmektedir. Protein ve metabolit analizleri ile ZFN I, ZFN II, oligonükleotid destekli mutagenез, RNA bağımlı DNA metilasyon, TALEN ve CRISPR/Cas yöntemleri ile geliştirilmiş hat veya çeşitlerin tanısı yapılabilmektedir [69].

CRISPR/Cas9 sistemine oluşturucu-aracı (protospacer) bölgesi dizisinde, TALEN sisteminde aracı (spacer) dizisinde çift-sarmalda kesim yapılır. Homolog donör dizilerinin bulunmaması durumunda çift-sarmaldaki kesim homolog olmayan uçların birleştirilmesi mekanizması ile onarılır. Bu işlem sırasında çift sarmallı kesim kırıklığı tamirinde hatalar oluşur ve özellikle birleştirilen uç bölgelerinde bu hatalar küçük ekleme veya çıkarmalar olarak görülür. Oluşan mutasyonun tespiti için farklı metotlar geliştirilmiştir. TOPO klonlama mekanizması tabanlı yöntemle homolog olmayan rekombinasyon ile oluşmuş mutasyonlar tespit edilebilmektedir. Nükleazın tanıma bölgesini içeren hedef

DNA PZR yöntemi ile çoğaltılır, klonlanır ve dizilerek DNA dizi değişimleri belirlenir. Endonükleaz analizleri, heterodupleks ve yüksek çözünürlükle erime analizleri (high resolution melting analysis (HRMA)) ile de mutasyonlar belirlenebilmektedir [63].

Yeni nesil ıslah yöntemlerinde elde edilen hat veya çeşitlerin tanısında, transformasyonun teyidinde ve somaklonal mutasyonların tespitinde yaygın olarak karyotipleme, kromozom sayımı ve akış sitometresi, densitometre, Southern (DNA), Northern (RNA), Western (protein) hibridizasyon yöntemleri, PZR, gerçek zamanlı PZR, mikroarray, ELISA, *in silico* analizler, afiniti kromatografisi, kütle spektrofotometre, RNAi teknikleri ve çeşitli NGS yöntemleri kullanılmaktadır [1,60-63,69].

Yeni nesil yöntemlerle geliştirilen çeşitlerin bir kısmının doğal yollarla oluşan veya geliştirilen çeşitlerden ayırt edilmesi zordur. Sonraki nesil DNA dizileme yöntemlerinin daha da gelişerek maliyetlerinin düşmesi ile birçok kültür bitkisinin genom dizisinin ortaya konması ve genom düzenlenmesi ile oluşturulan çeşitlerin tanısı daha da kolay olabilecektir [63,69].

SONUÇ

Sonuç olarak yeni nesil ıslah yöntemleri klasik ıslah yöntemlerinin çözemediği birçok sorunu ortadan kaldırma potansiyeline sahiptir. Ancak mevcut teknolojilerin bazı dezavantajları bulunmakta olup bunların büyük bir kısmını ilerleyen yıllarda ortadan kaldıracak nitelikte etkin bilimsel çalışmalar yapılmaktadır. Yeni nesil bitki ıslah yöntemleri organizmanın genom yapısını dışarıdan gen transferi ile değiştirilmesinin dışında var olan genomik bilginin arzu edilen ifadelerinin elde tutulması ve ifadelerinin artırılmasına yönelik yöntemlerdir. Yeni nesil ıslah yöntemleri ile elde edilen hat veya çeşitlerin büyük bir kısmı doğal olarak var olabilecek genetik çeşitliliği göstermesi nedeni ile günümüzde kullanılan çoğu DNA tabanlı tanı yöntemleri ile belirlenememektedir. Yeni nesil ıslah yöntemleri ile klasik ıslah yöntemlerinin birlikte kullanılması ile tarımsal üretimde verim ve verimi etkileyen özelliklerin iyileştirilmesi mümkündür. Yeni nesil ıslah yöntemlerinin hemen hemen hepsinin gelişmiş ülkelerin özel veya kamu kuruluşları tarafından patent altına alınmış olması nedeni ile kullanım maliyetleri fazladır. Bu nedenle ülkemizin kamu ve özel sektöründe çalışan araştırmacı ve bilim insanlarının biran önce bu konulara ağırlık vermesi önemlilik göstermektedir.

Teşekkür

Bu derlemenin daha iyi olması için zaman harcayan ve önemli önerilerde bulunan Sayın Dr. Ayşe Gümüş Karaca (Antalya Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü) ve Sayın Dr. Şaire Türkoğlu'na (Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi) teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

- [1] Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodriguez-Cerezo E. 2012. Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature Biotechnology*. 30:231-239.
- [2] Rousseliere D, Rousseliere S. 2017. Is biotechnology (more) acceptable when it enables a reduction in phytosanitary treatments? A European comparison of the acceptability of transgenesis and cisgenesis. *PLOS ONE*. 12:9.
- [3] Carroll D, Morton JJ, Beumer KJ, Segal DJ. 2006.

Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases. *Nature Protocols*. 1:1329-1341.

[4] de Pater S, Neuteboom LW, Pinas JE, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ. 2009. ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium* mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnology Journal*. 7:821-835.

[5] Espinoza C, Schlechter R, Herrera D, Torres E, Serrano A, Medina C, ArceJohnson P. 2013. Cisgenesis and intragenesis: new tools for improving crops. *Biological Research*. 46:4.

[6] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*. 31:7.

[7] Singh V, Braddick D, Dhar PK. 2017. Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. *Gene*. 599:1-18.

[8] Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*. 32:279-84.

[9] Eck JV. 2017. Genome editing and plant transformation of *Solanaceous* food crops. *Current Opinion in Biotechnology*. 49:35-41.

[10] Huettel B, Kanno T, Daxinger L, Aufsatz W, Matzke AJM, Matzke M. 2006. Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and *Pol IV* in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*. 25:2828-2836.

[11] Calarco JP, Borges F, Donoghue MTA, van Ex F, Jullien PE, Lopes T, Gardner R, Berger F, Feijo FA, Becker JD, Martienssen RA. 2012. Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell*. 28:194-205.

[12] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. 2014. Fusion of catalytically inactive Cas9 to *FokI* nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*. 32:577-82.

[13] Savadi S, Prasad P, Kashyap PL, Bhardwaj SC. 2018. Molecular breeding technologies and strategies for rust resistance in wheat (*Triticum aestivum*) for sustained food security. *Plant Pathology*. 67:771-791.

[14] Petolino HF. 2015. Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 51:1-8.

[15] Porteus MH. 2009. Plant biotechnology: Zinc fingers on target. *Nature*. 459:337-338.

[16] Wright DA, Townsend JA, Winfrey RJ, Irwin PA, Rajagopal J, Lonosky PM, Hall BD, Jondle MD, Voytas DF. 2005. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant Journal*. 44:693-705.

[17] Mani M, Smith J, Kandavelou K, Berg JM, Chandrasegaran S. 2005. Binding of two zinc finger nuclease monomers to two specific sites is required for effective double strand DNA cleavage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 334:1191-1197.

[18] Beumer K, Bhattacharyya G, Bibikova M, Trautman JK, Carroll D. 2006. Efficient gene targeting in drosophila with zinc finger nucleases. *Genetics*. 172:2391-2403.

[19] Camenisch TD, Brilliant MH, Segal DJ. 2008. Critical parameters for genome editing using zinc finger nucleases. *Journal of Medicinal Chemistry*. 8: 669-676.

[20] Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, et al. 2009. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*. 459: 437-441.

[21] Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F,

Maeder ML, Joung JK, Voytas DF. 2009. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*. 459:442-445.

[22] Osakabe K, Osakabe Y, Toki S. 2010. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom designed zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 107:12034-12039.

[23] Cai CQ, Doyon Y, Ainley WM, et al. 2008. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Molecular Biology*. 69:699-709.

[24] Tovkach A, Zeevi V, Tzfira T. 2009. A toolbox and procedural notes for characterizing novel zinc finger nucleases for genome editing in plant cells. *Plant Journal*. 57:747-757.

[25] Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, Li X, Pierick CJ, Dobbs D, Peterson T. 2010. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107:12028-12033.

[26] Weeks DP, Spalding MH, Yang B. 2016. Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnology Journal*. 14:483-495.

[27] Curtin SJ, Zhang F, Sander JD, Haun WJ, Starker C, Baltes NJ. 2011. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiol*. 156:466-73.

[28] Leitao AL, Costa MC, Enguita FJ. 2017. Applications of genome editing by programmable nucleases to the metabolic engineering of secondary metabolites. *Journal of Biotechnology*. 241:50-60.

[29] Osakabe Y, Osakabe K. 2015. Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant Cell Physiol*. 56:389-400.

[30] Igoucheva O, Alexeev V, Scharer O, Yoon K. 2006. Involvement of ERCC1/XPF and XPG in oligodeoxynucleotide-directed gene modification. *Oligonucleotides*. 16:94-104.

[31] de Semir D, Aran JM. 2006. Targeted gene repair: the ups and downs of a promising gene therapy approach. *Current Gene Therapy*. 6:481-504.

[32] Jiang WZ, Dumm S, Knuth ME, Sanders SL, Weeks DP. 2017. Precise oligonucleotide-directed mutagenesis of the *Chlamydomonas reinhardtii* genome. *Plant Cell Reports*. 36:1001-1004.

[33] Breyer D, Herman P, Brandenburger A, Gheysen G, Remaut E, Soumillon P, Van Doorselaere J, Custers R, Pauwels K, Sneyers M, Reheul D. 2009. Genetic modification through oligonucleotide-mediated mutagenesis. a GMO regulatory challenge? *Environmental Biosafety Research*. 8:57-64.

[34] Dong C, Beetham P, Vincent K, Sharp P. 2006. Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system. *Plant Cell Reports*. 25:457-465.

[35] Zhu T, Mettenburg K, Peterson DJ, Tagliani L, Baszczyński C. 2000. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Biotechnology*. 18:555-558.

[36] Sauer NJ, Mozoruk J, Miller RB, Warburg ZJ, Walker KA, Beetham PR, Schopke CR, Gocal GF. 2016. Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnol J*. 14:496-502.

[37] Okuzaki A, Toriyama K. 2004. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Reports*. 22:509-512.

[38] Suzuki T. 2008. Targeted gene modification by oligonucleotides and small DNA fragments in eukaryotes. *Frontiers in Bioscience*. 13:737-744.

[39] Akhond MAY, Machray GC. 2009. Biotech crops: technologies, achievements and prospects. *Euphytica*. 166:47-59.

[40] Jacobsen E, Schouten HJ. 2007. Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends in Biotechnology*. 25:219-223.

[41] Schouten HJ, Krens FA, Jacobsen E. 2006. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Reports*. 7:1-3.

[42] Jacobsen E, Schouten HJ. 2008. Cisgenesis, a new tool for traditional plant breeding, should be exempted from the regulation on genetically modified organisms in a step by step approach. *Potato Research*. 51: 75-88.

[43] Holme IB, Wendt T, Holm PB. 2013. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal*. 11:395-407.

[44] Rommens CM, Haring MA, Swords K, Davies HV, Belknap WR. 2007. The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *TRENDS in Plant Science*. 12:389-403.

[45] Schouten HJ, Jacobsen E. 2008. Cisgenesis and intragenesis, sisters in innovative plant breeding. *Trends Plant Science*. 13:261-263.

[46] Ricroch AE, Henard-Damave MC. 2015. Next biotech plants: new traits, crops, developers and technologies for addressing global challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*. 36:675-690.

[47] de Jong H. 2013. Plant genetics in the era of modern genomics. *Thai Journal Genetics*. 1:80-82.

[48] Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette AF, Matzke AJM. 2004. Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*. 1677:129-141.

[49] Matzke M, Kanno T, Huettel B, Daxinger L, Matzke AJM. 2007. Targets of RNA-directed DNA Methylation. *Current Opinion in Plant Biology*. 10:512-519.

[50] Niaz S. 2018. The AGO proteins: an overview. *Biological Chemistry*. 399:525-547.

[51] Zottini M, Barizza E, Costa A, Formentin E, Ruberti C, Carimi F, Schiavo FL. (2008). Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. *Plant Cell Reports*. 27: 845-853.

[52] Schoft VK, Chumak N, Mosiolek M, Slusarz L, Komnenovic V, Brownfield L, Twell D, Kakutani T, Tamaru H. 2009. Induction of RNA-directed DNA methylation upon decondensation of constitutive heterochromatin. *EMBO reports*. 10:1015-1021.

[53] Calarco JP, Martienssen RA. 2011. Genome reprogramming and small interfering RNA in the *Arabidopsis* germline. *Current Opinion in Genetics and Development*. 21:134-139.

[54] Hartung F, Schiemann J. 2014. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant J*. 78:742-752.

[55] Matzke MA, Kanno T, Matzke JM. 2015. RNA-Directed DNA methylation: The evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants. *Ann Rev Plant Biol*. 66:243-267.

[56] Gal-On A, Wolf D, Antignus Y, et al. 2005. Transgenic *Cucumbers harboring* the 54-kda putative gene

of cucumber fruit mottle mosaic tobamo virus are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection. *Transgenic Research*. 14:81-93.

[57] Song GQ, Walworth AE, Loescher WH. 2015. Grafting of genetically engineered plants. *J Am Soc Horticult Sci*. 140:203-213.

[58] Belide S, Hac L, Singh SP, Green AG, Wood CC. 2011. *Agrobacterium*-mediated transformation of safflower and the efficient recovery of transgenic plants via grafting. *Plant Methods*. 7: 12.

[59] Jin S, Liang S, Zhang X, Nie Y, Guo X. 2006. An efficient grafting system for transgenic plant recovery in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 85: 181-185.

[60] Dirks R, van Dun K, de Snoo CB, et al. 2009. Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnology Journal*. 7:837-845.

[61] Wijnker E, van Dun K, Bastiaan de Snoo C, et al. 2012. Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. *Nature Genetics*, 44:467-470.

[62] Schaart JG, Van de Wiel CCM, Lotz LAP, Smulders MJM. 2016. Opportunities for products of new plant breeding techniques. *Trends Plant Sci*. 21:438-449.

[63] Karaca M, Ince, AG. 2017. Molecular Markers in *Salvia* L.: Past, Present and Future. In: *Salvia Biotechnology* (ed. Georgiev V, Pavlov A.), pp 291-398. Springer, Cham. Switzerland.

[64] Ni Z, Han Q, He Y, Huang S. 2018. Application of genome-editing technology in crop improvement. *Cereal Chemistry*. 95: 35-48.

[65] Ryu CM, Anand A, Kang L, Mysore KS. 2004. Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse *Solanaceous* species. *The Plant Journal*. 40:322-331.

[66] Yasmin A, Jalbani AA, Baloch S. 2013. *Agrobacterium*-mediated stable transformation of *Arabidopsis thaliana* plants using β -glucuronidase (*gus*) gene. *Science International (Lahore)*. 25:287-290.

[67] Mei Y, Wang Y, Chen H, Sun ZS, Ju XD. 2016. Recent progress in CRISPR/Cas9 technology. *Journal of Genetics and Genomics*. 43:63-75.

[68] Aman R, Ali Z, Butt H, Mahas A, Aljedaani F, Khan MZ, Ding S, Mahfouz M. 2018. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biology*. 19: 1.

[69] van Nocker S, Gardiner SE. 2014. Breeding better cultivars, faster: applications of new technologies for the rapid deployment of superior horticultural tree crops. *Hortic Res*. 1:14022.