

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

PROJE KATEGORİSİ

PROJE ADI: CRISPR-Cas9 Genom Düzenleme Aracılığı ile Erkek Kısır Domates Bitkilerinin Geliştirilmesi

TAKIM ADI: GENOM AVCILARI

TAKIM ID: T3-24149-155

DANIŞMAN ADI: Doç. Dr. Musa KAVAS

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Domates (*Solanum lycopersicum L.*), patlıcangiller (Solanaceae) familyasından ana vatanı Güney ve Orta Amerika olan tek yıllık bir bitki olup Amerika'dan Avrupa'ya, buradan da tüm dünyaya yayıldığı bilinmektedir (Demirci, Erdoğan et al. 2005, Mamay and Yanık 2012). Özellikle son dönemlerde tüketicilerde sağlıklı ve dengeli beslenme bilincinin oluşması, temel ürün olarak domatesin önemini arttırmıştır (Özer 2016). Dünyada ve ülkemizde en çok üretilen sebze türü olan domates, taze tüketiminin yanı sıra endüstriyel kullanım (konserve, salça, ketçap, turşu vb.) açısından da önemli bir yere sahiptir. Üretim miktarı açısından incelendiğinde Türkiye; Çin, Hindistan ve ABD'den sonra dünyada dördüncü sırada yer almaktadır. Dünyada üretilen yaklaşık 161 milyon ton domatesin %7'si Türkiye'de üretilmektedir FAO (2014).

Türkiye'de her yıl yeni hibrit çeşitler piyasaya sürülmektedir. Hibrit domates tohumluğunun önemli bir bölümünü de ithal edilen domates çeşitleri oluşturmaktadır. İthalatın azalması açısından da, ancak sebze ıslahı çalışmalarının hız kazanması ve bu çalışmaların sonucunda da yerli hibrit çeşitlerin geliştirilmesi ile mümkün olacaktır. Geniş alanlarda hibrit tohum üretiminde kendine döllenmeyi engellemek için dişi hatlarda erkek organların emaskulasyonu ile bu çiçeklerin melezlenmesi gerekmektedir. Bu işlem maliyeti arttırdığı gibi yoğun bir iş gücüne de ihtiyaç göstermektedir. Bu nedenle, domates, biber, patlıcan, karpuz gibi bazı sebze türlerinde de, melezleme işlemlerinde zorlukların önüne geçilmesi için erkek kısır bitkiler kullanılmaktadır. Polen duvarının önemli bir bileşeni olan sporopolen, tapetumda sentezlenir ve daha sonra anter lokülüne taşınır (Zhang and Li 2014). AtMS1-like (Solyc04g008420) anormal polen oluşumu ve tapetum gelişiminden sorumlu önemli genlerden biridir. Anormal polen ve tapetum oluşumundan sorumlu olan AtMS1-like (Solyc04g008420) geninin susturulması sonucunda erkek kısır bitkiler oluşmaktadır. CRISPR/Cas teknolojisi bitkilerde dahil olmak üzere farklı organizmalarda genom düzenlenmesinde devrim yaratmıştır. CRISPR/Cas teknolojisi genom düzenlenmesinin ötesinde sekansa spesifik gen manüplasyonu için uygun ve çok yönlü araçlar içerisinde değerlendirilmektedir. CRISPR/Cas sistemi tarafından genom düzenlenmesi, spesifik mutasyonlar yoluyla hızlı ve hassas bitki ıslahını sağlayabilir.

Yapılacak olan bu projenin amacı CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak AtMS1-like (Solyc04g008420) genin susturulması sonucunda polen oluşumunun engellenmesi ile erkek kısır domates bitkisi elde etmektir. Bu genin susturulmasında iki teknik kullanılacaktır. İlk teknikte *Agrobacterium tumefaciens* ile genomda ilgili genin susturulması yapılacaktır. Bu teknikte oluşturulan bitkiler erkek kısır olacağı için tohum üretimi olamayacak tekrardan bitki üretimi için her defasında doku kültürü tekniği uygulanması gerekmektedir. İkinci teknikte ise Virus-induced Gene Silencing (VIGS) metodu ile gen susturma yapılacaktır. Bu teknolojinin avantajı ise elimizde CRISPR konstraktı içeren virüsü bitki yapraklarına enjekte edilerek kolayca bu gen susturulup erkek kısır domates bitkileri elde edilecektir. İlk elde edilen erkek kısır domates bitkileri ıslah çalışmalarında ve özellikle de hibrit tohum üretiminde kullanılacaktır. Bu sayede klasik ıslah çalışmaları ile hibrit tohum üretiminde oluşan zorlukların önüne geçilecektir. Ayrıca Agroinfiltrasyon aracılığı ile genotipe bağımlı olan bitki rejenerasyon sistemine ihtiyaç duyulmayacaktır. Sistem başarılı bir şekilde uygulanırsa tüm domates anne hatlarda uygulamaya imkan sunacaktır. Ayrıca

agroinfiltrasyon klasik transformasyona göre oldukça maliyeti düşük ve uygulaması kolaydır.

2. Problem/Sorun:

Günümüzde sebze türlerinde hibrit çeşitlerin kullanım oranı oldukça yaygınlaşmıştır. Hibrit çeşitlerde; verim, kalite, dayanıklılık ve adaptasyon yeteneği gibi faktörler iyileştirilmiş olmakla birlikte, F1 hibrit tohumluğu tek kullanımlık olması nedeniyle de ticari bir önem taşımaktadır. Domates bitkisinde hibrit tohumların üretilmesinde birçok zorluk yaşanmaktadır. Bu türlerin çiçek yapılarının küçük ve melez başına elde edilen tohum sayılarının az olması büyük alanlarda hibrit tohum üretim maliyetini artırmaktadır. Hibrit tohum üretiminde bu tür zorlukların aşılabilmesi için alternatif arayışlara girilmiştir. Erkek kısırılığı, bitki ıslahçıları ve hibrit tohum üreticilerinin en çok arzuladığı özelliklerin başında gelmektedir. Erkek kısırılığı sistemini oluşturmanın uzun yıllar alması ve mevcut kısır hatlarda stabilite sorunlarının ortaya çıkmasından dolayı genetik mühendisliğinden yararlanılarak erkek kısır hatlar oluşturulabilmektedir. Bu amaçla önerilen projenin amacı son yıllarda keşfedilen hücre içerisinde yabancı DNA girişi olmaksızın bitki genom düzenlenmesine imkan sağlayan CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak AtMS1-like genin susturulması sonucunda polen oluşumunun engellenmesi ile erkek kısır domates bitkisi elde etmektir.

3. Çözüm

Modern biyoteknoloji en geniş kullanım alanını tarım sektöründe bulmuştur. Tarımsal biyoteknolojide en çok üzerinde çalışılan özellikler yüksek miktarda ve kalitede ürün almak, hastalıklara ve zararlılara karşı dayanıklılık, yabancı ot ilaçlarına dayanıklılık, meyve olgunlaşma sürecinin değiştirilmesi, besin öğelerince zenginleştirilmesi ve iyileştirilmesi, raf ve depolama ömrünün uzatılması ve aromanın artırılmasıdır. Hastalık ve zararlıların etkisi azaltılarak yüksek verim ve daha ekonomik üretim amaçlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda tohum üretiminde en çok yararlanılan ıslah yöntemlerinden olan F1 hibrit üretimini artırmak ve üretim sırasındaki zorlukları aşmak için biyoteknolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Klasik yöntemlerle erkek kısır bitkiler elde edilebilmekte fakat sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle biyoteknolojik yöntemlerle erkek kısır bitkiler elde etmek hem daha kolay hem de maliyet olarak daha uygundur. CRISPR/Cas teknolojisinin ortaya çıkarılması ile birlikte, bitki gen aktivitelerinde hassas manipülasyonların yapılabilmesi çok daha kolay olmaktadır. Bu teknoloji kullanılarak polen oluşumundan sorumlu genlerin susturulması ile polen oluşumu engellenebilmektedir. Bu teknoloji sayesinde foto periyoda ve ısıya duyarlı genler belirlenerek çevreye duyarlı erkek kısır hatlar elde edilmesine imkan sağlanmaktadır. Diğer erkek kısır hatların elde edildiği yöntemlerin zorlukları ve tohum devamlılığının sağlanması zor olmaktadır. CRISPR genom düzenleme tekniği sayesinde çevreye duyarlı erkek kısır hatların elde edilmesi sonucunda mutant bitkilerde tohum devamlılığı da sağlanabilmektedir. Yapılan bu çalışmada domates bitkisinde CRISPR/Cas9 sistemi ile AtMS1-like geni hedeflenerek mutasyon oluşturulması sonucunda polen oluşumu engellenip erkek kısır bitkiler elde edilecektir. İlk olarak AtMS1-like genini hedefleyen sgRNA'lar dizayn edilecek ve CRISPR/Cas9 ifade vektörü oluşturulacaktır. Oluşturulan bu vektör *Agrobacterium tumefaciens* bakteri hücre içerisine transfer edilecektir. Doku kültürü ile yetiştirilen domates bitkilerine *Agrobacterium* aracılı

transformasyon yapılacak ve bitki rejenerasyonu sağlanacaktır. Oluşan bitkilerde fizyolojik ve moleküler analizler sonucunda erkek kısır bitkiler belirlenecektir. Ayrıca bu gene özgü oluşturulan mutasyon gelecek nesillere aktarımı gözlemlenecektir.

4. Yöntem

Yapılacak olan bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünde yürütülecektir. Çalışma iki aşamada gerçekleştirilecektir.

(i): Erkek kısırlıkla ilişkili gen olan AtSM1 geni *Agrobacterium* aracılı bitki gen transformasyonu yapılarak hedef gen CRISPR/Cas9 sistemi ile susturulacak karakterize edilecektir. Gen susturulduktan sonra erkek kısır hatlar morfolojik olarak test edilecektir.

(ii): Elde edilen erkek kısır hatlarda doku kültürüne bağımlılığı azaltmak için agroinfiltrasyon aracılığı ile CRISPR/Cas9 sistemi bitkilere aktarılacak ve erkek kısır hatlar elde edilecektir.

4.1. Bitki Materyali ve Doku Kültür Ortamı

Transformasyon deneylerinde croker domates çeşidi materyal olarak kullanılacaktır. Mikrosantrifüj tüp içerisindeki domates tohumlarının üzerine %70'lik etil alkol eklenerek 30 saniye bekletilecek ve ardından steril saf su ile durularak %20'lik sodyum hipoklorit eklenecek ve 20 dakika bekletilecektir. Daha sonra tohumlar 5 kere steril distile su ile yıkanarak hormonsuz MS büyüme ortamına (MS (2.2 g/L) + Sükroz (30 g/L) + Fitajel (2.8 g) pH:5.8) ekimi gerçekleştirilecektir. 25 °C'de fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan bitki büyüme kabininde çimlendirilecektir. 8-10 günlük domates fidelerinin kotiledon kısımları gen aktarım çalışmalarında eksplant olarak kullanılacaktır. Gen aktarım sonrasında ko-kültürasyon için besi ortamı olarak (MS (4.4 g/L) + 0.1 mg/ml IAA + 3 mg/ml BA + Sükroz (30 g/L) + Fitajel (2.8 g) pH:5.8) kullanılacaktır. Bitki rejenerasyon besi ortamı olarak (MS (4.4 g/L) + 0.1 mg/ml IAA + 3 mg/ml BA + Higromisin 10 mg/ml + Sükroz (30 g/L) + Fitajel (2.8 g) pH:5.8) kullanılacaktır.

4.2. Kullanılan Bakteri Suşları ve Besi Ortamları

Gen aktarım çalışmalarında *E.coli* (*Escherichia coli*) (Dh5 α) ve *A. tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens*) (GV3101) bakteri suşu ve bu bakterilerinin büyüme ortamlarında LB ve YEB besi ortamları kullanılacaktır.

4.3. gRNA Dizayn Edilmesi

AtMS1-like (Soly04g008420) genine ait nükleotid sekansları NCBI veritabanı kullanılarak elde edilecektir. Daha sonra Bencling programı kullanılarak öncelikle AtMS1 genini exon 1 ve diğer exzonlarını hedefleyen 4 gRNA dizaynı gerçekleştirilecektir. Dizayn edilen gRNA'ların hedef dışı mutasyonların belirlenebilmesi için CRISPR P.2.0 programı kullanılacaktır. Etkili bir gRNA elde etmek için GC içerikleri, gen üzerindeki lokasyonları, off-target kapasitesi ve 17. Nükleotid A ve T bazının bulunması gibi kriterler baz alınarak tasarlanacaktır. Dizayn edilen 19 nükleotid uzunluğunda gRNA'lar primer olarak sentezletilecektir.

4.4. Bitki İfade Vektörünün (pHSE401) Oluşturulması

gRNA tasarımı yapıldıktan sonra pHSE401 plazmidi kullanılarak golden gate klonlama yöntemi aracılığı ile bir vektöre 2 gRNA klonlaması yapılacaktır (Xing et al. 2014). İlk olarak sentezletilen gRNA'lar ile PCR yapılarak golden gate PCR reaksiyonu gerçekleştirilecektir. Klonlama Tablo 4.1. belirtildiği şekilde gerçekleştirilecektir. Daha

sonra elde edilen PCR reaksiyonu CRISPR/Cas9 pHSE401 vektörüne klonlamak için Tablo 4.2. reaksiyonu oluşturularak bitki ifade vektörü elde edilecektir.

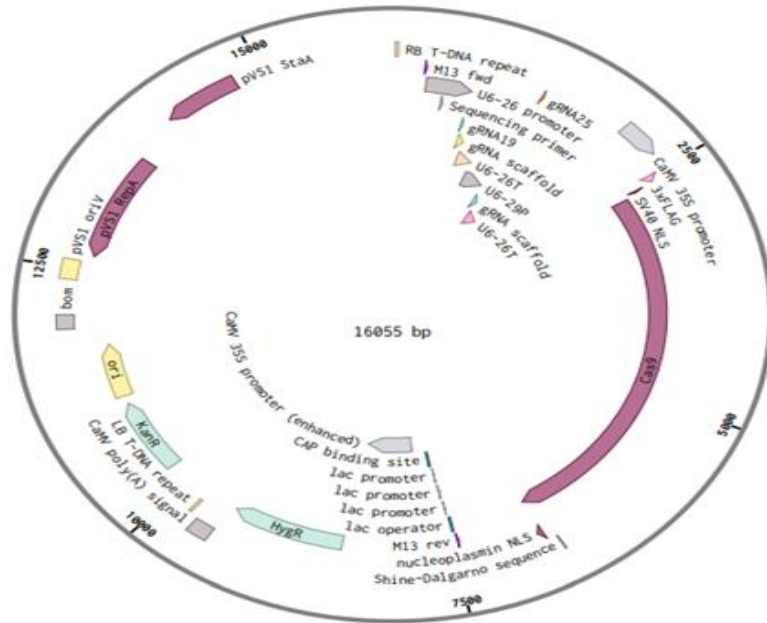
Tablo 4.1. Golden Gate Cloning PCR Reaksiyonu

Bileşenler	Miktar (ul)	Döngü koşulları
10× Q5 polimeraz enzim Buffer	5	
MgSO ₄ (25mM)	3	
dNTPs (2mM)	4	
Q5 polimeraz enzim	1	1. One cycle: 94 °C, 2 min.
pCBC-DT1T2 (diluted to 200 times) plazmid (adgene 50590)	1	2. 30 cycles: 94 °C, 15 sec; 60 °C, 30 sec; 68 °C, 1 min.
DT1-BsF (20 µM) gRNA1 ileri primer	1	3. One cycle: 68 °C, 5 min
DT1-F0 (1 µM) gRNA 2 ileri primer	1	
DT2-R0 (1 µM) gRNA 2 reverse primer	1	
DT2-BsR (20 µM) gRNA1 geri primer	1	
ddH ₂ O	32	
Total hacim	50 ul	

Tablo 4.2. Golden gate reaksiyonunun oluşturulması

Bileşenler	Miktar (ul)	Döngü koşulları
Purified PCR fragments (~100 ng/µl)	2	
pHSE401 (~100 ng/µl)	2	
10× T4 DNA Ligase Buffer (NEB)	1.5	
10× BSA	1.5	5 hours at 37°C
BsaI (NEB)	1	5 min at 50°C
T4 DNA Ligase (HC, NEB)	1	10 min at 80°C
ddH ₂ O	6	
Total volume	15	

Klonlama aşaması tamamlandıktan sonra elde edilen vektör E.Coli bakterisine ısı-şok yöntemi ile transformasyon yapılacaktır. Transformasyon sonrasında elde edilen bakterile 50 mg/L kanamisin içeren katı LB besiyerine yayılarak 17 saat 37°C’de inkübasyon sonrasında tek koloniler gözlemlenecektir. Doğru klonları belirlemek amacı hem kloni PCR hemde sanger dizileme yapılacaktır.



Şekil 4.1. pHSE401+gRNA19+gRNA25-8420ATMS1like (16055 bp) plazmid

4.5. Kompetan E.coli Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetant E.coli hazırlamak için öncelikle Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te gösterilen tampon 1 ve tampon 2 hazırlanacaktır.

Tablo 4.3. Tampon 1

Potasyum asetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$)	10 mM
RuCl_2	100 mM
CaCl_2	10 mM
Gliserol	8.6 ml
dH_2O	50 ml'ye tamamlanmıştır.

Tablo 4.4. Tampon 2

TAMPON 2	
MOPS	10 mM
RuCl_2	10 mM
CaCl_2	75 mM
Gliserol	8.6 ml
dH_2O	50 ml'ye tamamlanır

Tampon 2 malzemeleri 50 ml'lik bir santrifüj tüpüne katılıp iyice çözündürülecektir. pH'ı KOH ile 6.5'e ayarlanarak filtre sterilizasyonu yapılacaktır. *Escherichia coli* (E. coli) *DH5a* bakteri suşu gliserol stoğundan alınarak 50 μl çizgi ekim tekniği ile LA besi ortamına ekim yapılacaktır. Tek koloni alınıp 50 ml'lik falkon tüplere 10 ml ekim yapılarak 16 saat 37 °C 200 rpm'de gece boyu inkübatörde büyümeye bırakılacak ve O.D 600= 0.4-0.7 olunca 100 ml'lik bakteri kültüründen 50 ml'lik iki falkon tüpe bölünecek ve 15 dk buzda

bekletilecektir. Sonra 4 °C'de 5 dk 3500 rpm'de santrifüj yapıp bakteriler çöktürülecek, santrifüjden çıkarılan tüplerin üst sıvı fazı dökülüp buzda bekletilerek tampon 1'den 5 ml falkon tüplerin üzerine eklenerek pipet kullanılarak bakteri çözündürülecektir. Sonra 4 °C'de 5 dk 3500 rpm'de santrifüj yapıp çöktürülür ve sıvı kısmı atıldıktan sonra buzda bekletilerek tampon 2'den 2 ml her bir falkon tüpe eklenir ve mikropipet ile nazik bir şekilde pipetaj yapılarak çözündürülür. Sonra bu çözeltiyi 1.5 ml'lik soğuk santrifüj tüplerine 100 µl olacak şekilde dağıtılarak 30 dk buzda bekletilip sıvı nitrojen ile dondurulduktan sonra -80 °C'de depolanacaktır.

4.6. pHSE401 Vektörünün Kompetan E.coli'ye Klonlanması

Kompetant E.coli bakterilerinin bulunduğu tüpler buz üstüne konarak ligasyon örneğimizden 2 µl eklenip karışması sağlanacaktır. 10 dakika buz üzerinde bekletilir. Tüplere 42 °C'de 30 saniye ısı şoku uygulanır ve hemen vakit geçirilmeden buz üstüne alınacaktır. Tüpler içerisine 250 µl SOC besi ortamı eklenip 37 °C'de 60 dakika 200 rpm'de sallanarak inkübasyona bırakılacaktır. İçerisinde seçici antibiyotik 100 mg/L Spectinomycin içeren LB besin ortamına 100 µl bakteri yayılıp 37 °C'de 1 gece boyunca inkübe edilecektir. Plazmitin klonlanıp klonlanmadığını anlamak için koloni PCR yapılacak. 100 mg/L Spectinomycin içeren seçici ortamdan bakteri kolonileri numaralandırılarak seçilecek Seçilen her bir koloni için ayrı bir PCR tüpü hazırlanıp her bir koloniden pipet ucu ile bakteri alınacak ve koloni PCR yapılacaktır.

4.7. Plazmit izolasyonu

PCR sonucu belirlenmiş olan kolonilerden plazmit izolasyonu yapmak için bakteriler, içerisine 100 mg/L Spectinomycin eklenmiş 10 ml sıvı LB besin ortamında 37 °C 200 rpm'de 1 gece boyunca inkübatörde büyütülecektir. Plazmit izolasyonu için Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep kit kullanılacak ve ilgili firmanın protokolü takip edilecektir.

4.8. pHES401 Vektörünün Agrobacterium tumefaciens'e (GV3101) Transformasyonu

pHES401 vektörü A. tumefaciens (Gv3101) bakterilerine elektroporasyon (Biorad) cihazı ile transforme edilecektir. Elektroporasyonda kullanılacak küvetler buz üzerine önceden yerleştirilip soğutulacaktır. Kompetan *Agrobacterium tumefaciens* (Gv3101) buz üzerine yerleştirilerek 50 µl bakteri üzerine 3 µl LR reaksiyonu sonucu elde edilen pHES401 vektörü eklenecektir. Daha sonra bunlar elektroporasyon küvetine alınıp işlem gerçekleştirilecektir. İşlem gerçekleştirildikten sonra çok hızlı bir şekilde hücrelerin üzerine 1 ml YEB besin ortamı eklenip 28 °C 200 rpm'de 3 saat büyütülecektir. Daha sonra spektinomisin (100 mg/ml), carbenicilin (50 mg/ml) antibiyotikleri içeren katı YEB besin ortamına 100 µL bakteri yayılarak 28 °C'de inkübasyona bırakılıp iki gün boyunca büyütülecektir. Seçici ortamdan bakteri kolonileri numaralandırılarak seçilecek Seçilen her bir koloni için ayrı bir PCR tüpü hazırlanıp her bir koloniden pipet ucu ile bakteri alınacak ve koloni PCR yapılacaktır.

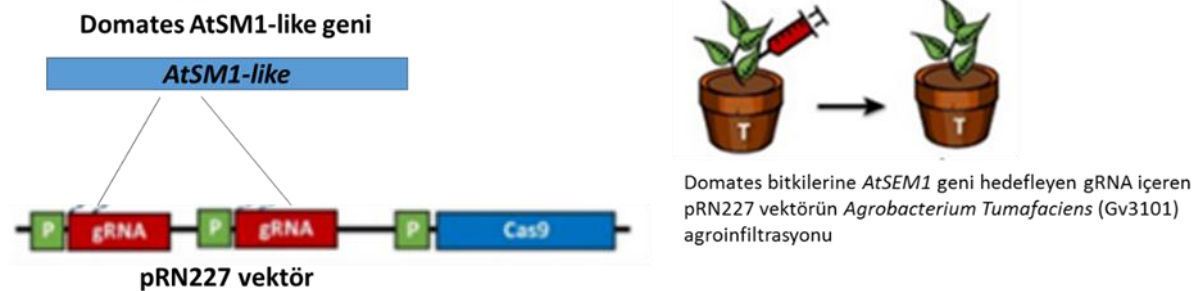
4.9. Agrobacterium tumefaciens Aracılı Bitki Transformasyonu

pHES401 vektörüne sahip *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) bakterileri domates transformasyonunda kullanılacaktır (Ito, Nishizawa-Yokoi et al. 2015). Agro hücreleri gentamisin (30 mg/L), spektinomisin (100 mg/L) ve rifampisin (10 mg/L) antibiyotiklerini içeren 50 ml sıvı LB ortamında 28°C'de 200 rpm'de 1 gün süreyle büyütülecektir. Daha

sonra 10 gün boyunca in-vitro koşullarda MS büyüme ortamına (MS (2.2 g/L) + Sükroz (30 g/L) + Fitajel (2.8 g) pH:5.8) çimlendirilmiş olan 8 günlük domates kotiledon yaprakları transformasyon için kullanılacaktır. Domates kotiledon yapraklarından 0,5 cm² büyüklüğünde kesilerek 1 gün önceden büyütülmüş olan bakteri kültürü (OD600:0.5-0.8) içerisinde 10 dakika süreyle bekletilerek inkübasyon sağlanacaktır. İnokübasyondan sonra eksplantlar ko-kültüvasyon ortamına (MS (4.4 g/L) + 0.1 mg/ml IAA + 3 mg/ml BA + Sükroz (30 g/L) + Fitajel (2.8 g) pH:5.8) alınarak 2 gün süreyle karanlık şartlarda ko-kültüvasyona bırakılacaktır. Ko-kültüvasyondan sonra domates eksplantları üzerinde üremiş olan fazla bakterileri uzaklaştırmak için timentin (160mg/L) bulunan sıvı MS ortamında yıkanarak steril kurutma kağıtlarında kurutulduktan sonra eksplantlar, rejenerasyon besi ortamı (MS (4.4 g/L) + 0.1 mg/ml IAA + 3 mg/ml BA+ Higromisin 10 mg/ml + Sükroz (30 g/L) + Fitajel (2.8 g) pH:5.8) transfer edilecektir. Rejenerasyon ortamına alınan eksplantlar 16sa/8sa periyodunda bitki büyüme kabininde kallus oluşturmak üzere inkübasyona bırakılacaktır. 4-5 hafta sonra kallusların üzerinde gelişen higromisine (20 mg/L) dayanıklı transgenik sürgün adayları timentin (160mg/L) ve higromisin (50 mg/L) içeren köklendirme (MS) ortamına alınacaktır. Kalluslardan elde edilen sürgünlerin kök oluşturması için alınmış olduğu seçici besi yerinde (MS, higromisin (20 mg/L), timentin (160mg/L)) yaklaşık 8 hafta sonra rejenerasyon olan aday transgenik domatesler steril edilmiş toprağa alınarak seraya aktarılacaktır.

4.10. Agroinfiltrasyon Aracılı Transformasyon

Agrobacterium aracılı klasik transformasyonda doku kültürüne bağımlı kalınmaktadır. Virüs aracılı gen aktarım vektörleri doku kültürü kullanılmaksızın transformasyona imkan sunmaktadır. Bu çalışmada klasik transformasyona ek olarak Agroinfiltrasyon için VİGS aracılı CRISPR vektörü pRN227 (Plasmid #127222) kullanılacaktır. Plazmit oluşturulması Maher et al (2019) protokolüne göre yapılacaktır. Elde edilen plazmit yukarıda bahsedilen golden gate klonlama yöntemine göre gerçekleştirilecektir. Plazmid oluşturulduktan sonra sanger dizileme ile doğrulama yapılacaktır. Doğrulanmış plazmitler *Agrobacterium tumefaciens* (Gv3101) içersine aktarılacaktır. Oluşturulan bakteri Agroinfiltrasyon için kullanılacaktır. Domates bitkileri torf içeren saksılarda çimlendirilerek 2-4 yapraklar oluştuğundan sonra Agroinfiltrasyon için kullanılacaktır. Bitkiler 26 °C'de 16 saat aydınlık 8 karanlık olacak şekilde iklim odasında yetiştirilecektir.



Şekil 4.2. AtSM1 Genini hedefleyen gRNA içeren pRN227 vektörünün agroinfiltrasyonu

4.11. T0 Domates Aday Bitkilerin Analizleri

Domates bitkilerinden DNA izolasyonu ZR plant/Seed DNA MiniPrep™ kit (Zymo

research) ile gerçekleştirilecektir. Elde edilen DNA'dan AtMS1 geni, higromisin geni ve Cas genine spesifik primerler aracılığı ile aday T0 bitkiler belirlenecektir. Pozitif olan T0 bitkilerinden PCR aracılığı ile AtMS1 genin tamamı klonlanarak dizileme yapılacaktır. Dizileme sonucunda AtMS1 geninde meydana gelen insersiyon delesyonlar belirlenecektir.

4.12. RNA İzolasyonu ve Kantitatif RT-PCR

RNA izolasyonuna başlamadan önce kullanılacak olan saf su, porselen havanlar, mikrosantrifüj tüpler, pipet uçları, pensler ve diğer tüm malzemeler 2 kere otoklavlanarak steril edilecektir. Porselen havan ve mikrosantrifüj tüpler kullanılmadan önce sıvı azot ile muamele edilecektir. RNA izolasyonu için QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit kullanılarak kullanılacaktır. İki mikrogram RNA, oligo (dT) primer ve AMV ters transkriptaz (Promega) enzimi kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilecektir. Daha sonra kantitatif RT-PCR yapılacak ve her bir PCR üç kez tekrarlanacaktır. Çalışmada gen ifadesinin belirlenebilmesi için domates actin 1 geni kontrol olarak kullanılacaktır.

4.13. T0 Domates Bitkilerinde Fizyolojik Analizler

Seraya aktarılan T0 domates bitkileri çiçeklenme aşamasında anter ve polen yapıları elektron mikroskop altında incelenecektir. Polen canlılığı tetrazolium testi ile gerçekleştirilecektir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Geniş alanlarda hibrit tohum üretiminde kendine döllemeyi engellemek için dişi hatlarda erkek organların emaskulasyonu ile bu çiçeklerin melezlenmesi gerekmektedir. Bu işlem maliyeti arttırdığı gibi yoğun bir iş gücüne de ihtiyaç göstermektedir. Yapılacak olan bu proje ile elde edilen erkek kısır domates bitkilerinin hibrit tohum üretiminde kullanılması hem maliyetin hem de yoğun işgücünün azalmasına yardımcı olacaktır.

Erkek kısırlığı üzerine yapılan bu çalışma ile hibrit tohum üretimi ivme kazanacaktır. Ülkemizde ve Dünyada sebze ıslahçıları ve tohum üreticilerinin bu metot ile geliştirilen erkek kısır hatların kullanılması sağlanarak F1 hibrit çeşitlerin geliştirilmesine katkıda bulunulacaktır. Elde edilen bu sonuç ile hem tohum üreticilerinin hem de sanayinin problemi çözülmüş olacaktır.

Bu projenin başarılı bir şekilde hayata geçirilmesi sonucunda CRISPR/CAS9 sistemi ile erkek kısırlıkla ilişkili genlerin belirlenmesinin yanısıra çevre duyarlı (termogenik ve fotoperiyot) erkek kısır bitkilerin geliştirilmesi ile literatüre, ıslahçılar ve sanayiye katkıda bulunması projemizin ayrı bir yenilikçi yönüdür.

6. Uygulanabilirlik

Hibrit tohum üretiminde ekonomik öneminden dolayı erkek kısırlığı üzerindeki çalışmalar son yıllarda artan bir ivme kazanmıştır. Sebze ıslahçıları ve tohum üreticileri stoplazmik erkek kısırlığı ve erkek kısır doğal mutant hatlardan sıklıkla yararlanmaktadırlar. Fakat bu yöntemler hibrit üretiminde her üstün özellikte anne hatlar için uygulanabilir değildir. Bu projede önerilen Crispr/Cas9 sistemi tüm genotipler için uygulanabilir olduğu gibi hibrit üretimi yapılan tüm bitkilerde de uygulanabilir. Crispr/Cas9 sistemi ile elde edilen erkek kısır hatların bitki ıslahçıları ve tohum üreticileri tarafından kullanılarak hibrit tohum üretimi sağlanacaktır.

Geniş alanlarda hibrit tohum üretiminde kendine döllenmeyi engellemek için dişi hatlarda erkek organların emaskulasyonu ile bu çiçeklerin melezlenmesi gerekmektedir. Bu işlem maliyeti arttırdığı gibi yoğun bir iş gücüne de ihtiyaç göstermektedir. Yapılacak olan bu proje ile elde edilen erkek kısır domates bitkilerinin hibrit tohum üretiminde kullanılması hem maliyetin hem de yoğun işgücünün azalmasına yardımcı olacaktır.

Ülkemizde ve Dünyada birçok ülkede sebze ıslahçıları ve tohumluk üreticilerinin geliştirilen erkek kısırlığı sisteminin kullanılması sağlanarak F1 hibrit çeşitler geliştirilmesine katkıda bulunulacaktır. Elde edilen bu sonuç ile hem tohum üreticilerinin hem de sanayinin problemi çözülmüş olacaktır.

Bu sistemin laboratuvarımızda optimizasyonu sonucunda ileride yapılması muhtemel diğer çalışmalar için zemin oluşturacak olması bakımından belirgin bir katma değer özelliği taşımaktadır. Ayrıca proje çıktıları prestijli ve etki değeri yüksek dergilerde araştırma makalesi olarak yayımlanabilecektir. Bu bağlamda, proje önerisi başarıyla tamamlandığında yeni projeler üretme potansiyeli bulunmaktadır. Ayrıca, Proje Yürütücüsü'nün son teknolojilerden olan CRISPR/Cas9 sistemi konusunda bilgi düzeyi artacağından ileriki yıllarda yeni nitelikli proje üretme şansını artıracaktır.

CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak elde edilen bitkiler farklı ülkelerde transgenik olarak kabul edilmemektedir. Özellikle Amerika'da kabul edilmezken Avrupa birliği ülkeleri genom düzenleme teknolojileri ile elde edilen bitkileri transgenik kapsamında değerlendirmektedir. Ülkemiz açısından biyogüvenlik yönetmeliğinde transgenik bitkilerin ekimi yasaklanmıştır. Fakat Genom düzenlenmiş bitkiler ile ilgili bir düzenleme bulunmamaktadır. Bu sistemde bitkiye dışarıdan herhangi bir gen aktarımı söz konusu değildir. Bitkilerimiz GMO değil genom düzenlenmiş bitkilerdir. Bu sistem aracılığı ile oluşturulan mutasyonlar doğal olarak da meydana gelebilmektedir. Söz konusu ülkemizde GMO ekimi yasal olmasa bile hitap etmiş olduğumuz tohum firmaları ve bitki ıslahçıları bu sistem aracılığı ile elde ettikleri ürünleri genom düzenlenmiş bitkilerin yasal olduğu ülkelere pazarlama imkanı bulabilirler. Kendi ülkemizde ekim imkanı bulunmasa da yurt dışına ihracat yapılacağından dolayı ülkemize maddi kazanç sağlaması bakımında projemiz uygulanabiliridir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Projenin tahmini miktarı ve projede kullanılacak olan sarf malzemeler aşağıdaki tabloda verilmiştir. Aynı zamanda proje takvimi de tabloda özetlenmiştir.

Tablo 7.1. Proje takvimi

İP No	İş Paketlerinin Adı ve Hedefleri	Kim(ler) Tarafından Gerçekleştirileceği	Zaman Aralığı (... Ay)	Başarı Ölçütü ve Projenin Başarısına Katkısı
1	gRNA vektörünün oluşturulması ve klonlanmanın sekans ile doğrulanması	Gökhan Zafer	3 ay	%30
2	Genom düzenleme çalışmalarında doku kültürü işlemleri	Gökhan Zafer	3 ay	%30
3	Virüsün domates bitkilerine agroinfiltrasyonu ve erkek kısırılığın bitkilerde gözlenmesi	Gökhan Zafer	2 ay	%20
4	Bitki genomunda oluşturulan mutasyonun moleküler olarak belirlenmesi	Gökhan Zafer	2 ay	%10
5	Sonuçların değerlendirilmesi	Gökhan Zafer	2 ay	%10

Tablo 7.2. Projede kullanılacak malzeme listesi

Alınması Önerilen Tüketime Yönelik Mal ve Malzeme Alımı Listesi (Sarf Malzemesi)				
Adı, Modeli	Birim Fiyatı	Adet	Toplam Bedeli (KDV Dahil, TL)	Gereçesi
Pipet ucu, 1-10 ul hacimli, 1000 adet/poşet	175	3	525	DNA izolasyonu ve PCR aşamasında kullanılacaktır.
Pipet ucu, 20-200 ul hacimli, 1000 adet/poşet	170	3	510	DNA izolasyonu ve PCR aşamasında kullanılacaktır.
Pipet ucu, 100-1000 ul hacimli, 1000 adet/poşet	175	3	525	DNA izolasyonu ve PCR aşamasında kullanılacaktır.
Eppendorf tüpleri 2 ml lik 1000 adet/poşet	85	5	425	DNA izolasyonu aşamasında kullanılacaktır.
Eppendorf tüpleri 1,5 ml lik 1000 adet/poşet	85	5	425	DNA izolasyonu aşamasında kullanılacaktır
PCR tüpleri 0,2 ml lik 1000 adet/poşet	120	2	240	PCR çalışmalarında kullanılacaktır.
Pudrasız Eldiven (orta boy), 100 çift	40	5	200	Laboratuvar çalışmalarının her aşamasında kullanılacaktır
Agarose 100 gr	230	1	230	Agaroz jelin koşturulacağı TAE tamponu hazırlamak için kullanılacaktır
MS besi ortamı 50 l	430	1	430	Doku kültürü
Phtagel 250 gr	820	1	820	Doku kültürü
DNA ladder , DNA markörü 50	350	1	350	Agaroz jelde DNA

bp, 100 reaksiyonluk				bantlarının boyutlarını belirlemede kullanılacaktır.
ZR/Plant/Seed DNA Miniprep(50) DNA izolasyon kiti – 100 örneklilik	1380	1	1380	Genomik DNA izolasyonu için kullanılacaktır.
PCR Mastermiks 500 Reaksiyonluk	1660	1	1660	PCR çalışmalarında kullanılacaktır.
BSAI restriksiyon ezim (125 ünit)	1280	1	1280	Gen klonlanmasında
Plasmid isolation kiti- 50 örneklilik	1350	1	1150	Plasmid izolasyonunda kullanılacaktır.
RNA izolasyon kit	1600	1	1400	Gen ifadesinin belirlenmesinde
Gel and PCR Clean-up- 100 örneklilik	1180	1	980	DNA dizileme amaçlı kullanılacaktır.
Site-Directed Mutagenesis Kit	1479	1	1479	Mutasyonların belirlenmesinde
Syber green mix 250 reaksiyon	750	4	3000	Gen ifadesinin belirlenmesinde
cDNA sentez kit 50 reaksiyon	1200	1	1200	Gen ifadesinin belirlenmesinde
PRN227 sgRNA expression vector	450	1	450	Gen klonlanmasında
PHSe401 vektör	450	1	450	Gen klonlanmasında
LB medium- 500 gr	740	1	740	Gen klonlanmasında
Giserol 250 ml	110	1	110	Gen klonlanmasında
T4 ligase	890	1	890	Gen klonlanmasında
Higromisin 5 gr	3580	1	3580	Gen aktarımında
Gentamisin 5 gr	2680	1	2680	Gen aktarımında
Spektinomisin 5 gr	3160	1	3160	Gen aktarımında
Timentin 5 gr	3850	1	3850	Gen aktarımında
Q5 polimeraz enzyme 100 reaksiyon	860	1	860	Gen klonlanmasında
Sanger dizleme hizmet alımı	65	70	4550	Gen klonlanmasında
Primer sentez hizmet alımı	3,50	400	1400	Gen klonlanmasında
qPCR plate 96 well	45	10	450	Gen ifadesinin belirlenmesinde
Agar 250 gr	325	1	325	Jel elektroforez çalışmalarında
3-indol asetic asit 5 gr	395	1	395	Gen aktarımında
Asetosringone 5 gr	3430	1	3430	Gen aktarımında
6-benzylaminopurine 5 gr	1278	1	1278	Gen aktarımında
Petri plate 90 mm 1000 lik koli	920	1	920	Doku kültürü
Elektroporasyon küveyti 5 adet paket	490	2	980	Gen aktarımında
Talep Edilen Destek Toplamı			49.307 TL	

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):

Projenin hedef kitle ticari tohum şirketleri ve ıslah şirketleridir. Bu proje ile arazi ve seralarda büyük işgücü gerektiren emeskülasyon işlemlerini ortadan kaldırarak zaman ve maliyetten büyük kazanç sağlayacaktır.

9. Riskler

Tablo 9.1. Projedeki riskler ve alternatif planlar

İP No	En Önemli Riskler	Risk Yönetimi (B Planı)
1	Tasarlanan gRNaların hedef bitkide istenen mutasyonu oluşturması bu projenin en önemli sorunudur.	Bu durumda farklı gRNalar tasarlanacak ve denenecektir.
2	Hedeflenen gende oluşan mutasyon sonucu erkek ısır hatların elde edilememesi	Hedef gende oluşturulan mutasyon sonucunda erkek kısır hat elde edilemez ise aynı patayda yer ala profilin ve aspartic genleri hedeflenerek erkek kısır hat elde edilecektir.

10. Proje Ekibi

Takım Lideri: Zafer SEÇGİN

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Zafer SEÇGİN	Araştırmacı	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	Laboratuvar ve TÜBİTAK Projeleri
Gökhan GÖKDEMİR	Araştırmacı	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	Laboratuvar ve TÜBİTAK Projeleri

*Tüm üyeleri tabloya eklemeniz gerekmektedir. Tablo Örnektir. Farklı tasarımlar ile tablo oluşturabilirsiniz.

Hazırladığınız şemada takım üyelerini, çalışma gruplarını ve üyelerin görevlerini açık bir şekilde ağaç yapıları kullanarak yazabilirsiniz. Üyeleri, bölümlerini ve sınıflarını istenildiği gibi uygun şekilde belirtmelidir.

11. Kaynaklar

Demirci, F., et al. (2005). "Ankara ili Ayaş ve Nallıhan ilçelerinde domates üretim alanlarında zirai mücadele uygulamaları." Tarım Bilimleri Dergisi 11(4): 422-427.

Maher MF, Nasti RA, Vollbrecht M, Starker CG, Clark MD, Voytas DF. Nat Biotechnol. 2019 Dec 16. pii: 10.1038/s41587-019-0337-2. doi: 10.1038/s41587-019-0337-2. 10.1038/s41587-019-0337-2 PubMed 31844292.

Mamay, M. and E. Yanık (2012). "Şanlıurfa'da domates alanlarında Domates güvesi [Tuta absoluta (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae)]'nin ergin popülasyon gelişimi." Türkiye Entomoloji Bülteni 2(3): 189-198.

Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ BMC Plant Biol. 2014 Nov 29;14(1):327.

Zhang, D. and H. Li (2014). Exine export in pollen. Plant ABC transporters, Springer: 49-62.

RAPOR TASLAKLARI İLE İLGİLİ NOT:

- Yukarıda yer alan 11 madde en fazla 15 (on beş) sayfada anlatılacaktır.
- En fazla 2 (iki) sayfa görsel EK olarak gönderilebilir.
- Kapak, açıklama ve görsel olmak üzere en fazla 17 sayfa olacaktır.
- Tüm raporlar akademik rapor standartlarına uygun olarak yazılmalıdır.
- Her rapor bir kapak sayfası içermelidir.
- Yazı tipi: Times New Roman, Punto: 12, Satır Aralıkları: 1,15 , İki tarafa yaslı, Sayfa kenar boşlukları üst-alt-sağ-sol 2,5 cm olmalıdır.
- Rapor içindeki cümleler birbirinin aynı ve tekrarı niteliğinde olmamalıdır.