

Araştırma Makalesi (Research Article)

Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 2025, 62 (1):117-131

<https://doi.org/10.20289/zfdergi.1432614>

Hilal Betül Kaya^{1*} 

¹ Manisa Celal Bayar Üniversitesi,
Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik
Bölümü, 45140, Yunusemre, Manisa,
Türkiye

* Sorumlu yazar (Corresponding author):

hilalbetul.kaya@cbu.edu.tr

Anahtar sözcükler: CRISPR/Cas9, genom düzenleme, *PDS* geni, protoplast, *Vitis vinifera*

Keywords: CRISPR/Cas9, genome editing, *PDS* gene, protoplast, *Vitis vinifera*

Asma protoplastlarında CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme

CRISPR/Cas9-Mediated genome editing in grapevine protoplasts

* Bu makale MCBÜ-BAP tarafından 2020-123 Numaralı proje ile desteklenmiştir.

Received (Alınış): 08.02.2024

Accepted (Kabul Tarihi): 02.11.2024

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 (CRISPR-associated protein 9) aracılı genom düzenleme yöntemi kullanılarak asma protoplastlarında hedefe yönelik mutasyonun gerçekleştirilmesidir.

Materyal ve Yöntem: Chardonnay asma çeşidinde CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme için hedef gene uygun gRNA tasarımı yapılarak, hem gRNA'yı hem de Cas9 ve *GFP* genlerini içeren final CRISPR/Cas9 vektörü elde edilmiştir. Asma yapraklarından protoplast izolasyonu ve transformasyonu gerçekleştirilerek, transformasyon ve mutasyon verimliliği analiz edilmiştir.

Araştırma Bulguları: Çalışmada Chardonnay yapraklarından yapılan protoplast izolasyonunda 1 g taze yaprakтан 1×10^7 protoplast elde edilmiştir. *VvPDS* genini hedef alan vektörün (~10 kb) protoplastlarda transformasyon verimliliği %40-60 iken, sadece *GFP* genini içeren vektörde (~3 kb), transformasyon verimliliği %80-90 olarak bulunmuştur. Vektör büyüklüğü transformasyon verimliliğini büyük oranda etkilemiş, vektör büyüklüğü arttıkça verimlilik azalmıştır. Transformasyon gerçekleşmesine rağmen, hedeflenen mutasyon doğrulanamamıştır.

Sonuç: Çalışmada asma protoplastlarında CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme için ilk aşama olan gRNA tasarımından son aşama olan protoplast transformasyonuna kadar uygulanan basamaklar başarılı bir şekilde gerçekleştirilerek, sistemin sorunsuz uygulanabilirliği gösterilmiştir. Uygulanan protokoller ve elde edilen sonuçlar asmada hedef mutasyonların gerçekleştirilmesi amacıyla yapılacak olan diğer çalışmalarda kullanılabilecektir.

ABSTRACT

Objective: This study aims to perform targeted mutation in grapevine protoplasts using the CRISPR/Cas9-mediated genome editing method.

Material and Methods: For CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 (CRISPR-associated protein 9)-mediated genome editing in the Chardonnay cultivar, a gRNA design targeting the desired gene was performed, resulting in obtaining a final CRISPR/Cas9 vector containing both the gRNA and Cas9 and *GFP* genes. Protoplast isolation and transformation were performed using leaves, followed by analysis of transformation and mutation efficiency.

Results: In the study, Chardonnay leaf protoplast isolation produced 1×10^7 protoplasts per 1 g of fresh leaves. The vector targeting the *VvPDS* gene (~10 kb) achieved a transformation efficiency of 40-60%, while the vector containing only the *GFP* gene (~3 kb) reached 80-90% efficiency. Vector size notably impacted transformation, with larger vectors reducing efficiency. Despite successful transformation, the presence of the targeted mutation could not be confirmed.

Conclusion: The study successfully completed all stages from gRNA design, the initial step of CRISPR/Cas9-mediated genome editing in protoplasts, to the final protoplast transformation stage, showcasing the system's seamless usability. The protocols applied and the results obtained can be utilized in future studies aimed at implementing targeted mutations in grapevines.

GİRİŞ

Artan dünya nüfusu ve küresel ısınmanın getirdiği kısıtlamalar ile birlikte tarımsal üretimin artan talebi karşılayabilmesi için bitki ıslahında klasik yöntemlere alternatif güncel teknolojilerin kullanımı tarımsal araştırmalar için büyük önem taşımaktadır (Bailey-Serres et al., 2019; Chen et al., 2019). CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme, bitki genomlarında istenilen değişikliği yapmaya olanak sağlayarak, ıslah süresinin hızlandırılmasına, istenilen özelliğin bitkilere kazandırılmasına ve farklı genlerin fonksiyonlarının ve biyosentez yollarının anlaşılmasına olanak sağlamaktadır (Wada et al., 2020). CRISPR/Cas9 teknolojisi, ilk defa *Arabidopsis*, tütün, çeltik ve buğday bitkilerinde hedeflenmiş gen modifikasyonu amacıyla kullanıldıktan sonra birçok bitkide de gen fonksiyonlarının belirlenmesi ile biyotik ve abiyotik stres etmenlerine karşı dayanıklı bitkilerin elde edilmesi amacıyla kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Yin et al., 2017).

CRISPR ilk olarak 1987 yılında *E. coli*'de virüs ve plazmit DNA'sına karşı savaşmak için oluşturulan bir bağışıklık mekanizması olarak keşfedilmiştir (Ishino et al., 1987; Jinek et al., 2012). Sonrasında ise CRISPR/Cas sistemleri bakteri, hayvan ve bitkilerde hedeflenen mutasyonun gerçekleştirilmesinde genom düzenleme yöntemi olarak kullanılmaya başlanmıştır. CRISPR/Cas9 sistemi, esneklik, basitlik ve göreceli düşük maliyet açısından önceki düzenleme yöntemleri olan TALEN, ZNF ve meganükleaz'ları geride bırakarak tarımda genetik düzenlemeyi yaygın bir şekilde kullanılabilir hale getirmiştir (Feng et al., 2013).

CRISPR/Cas9, nükleaz Cas9 enzimi ve kılavuz RNA olarak adlandırılan gRNA'dan oluşur ve bir ribonükleotit kompleksi olarak görev yapar. Cas9 enzimi, gRNA ve devamındaki 3 nükleotitten oluşan (NGG) PAM (protospacer yan motif) bölgesini tanır ve gRNA'nın tamamlayıcısı olduğu hedef sekansı 17. nükleotitten keser. Nükleaz enzimleri, DNA'da çift ya da tek iplikli kesikler oluşturarak, hücre onarım sistemini başlatır ve hücrenin farklı tamir mekanizmaları devreye girerek kesim meydana gelen bölgede silme, ekleme ve ikamelerin ortaya çıkmasına yol açar (Jiang et al., 2016; Kolasinli et al., 2023).

CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme çalışmalarında, öncelikli olarak yapılacak çalışmanın amacına yönelik hedef gen/bölge seçimi gerçekleştirilmektedir. Hedef gen/bölge seçimi yapıldıktan sonra, amaca uygun olarak hedeflenen mutasyon tipine (ekleme, silme, ikame) karar verilmesi gerekmektedir. Bu aşamadan sonra gRNA'nın belirlenmesi ve CRISPR/Cas9 vektörlerinin tasarım ve oluşturulması işlemleri gerçekleştirilmektedir (Jaganathan et al., 2018). Bu amaç için tasarlanmış farklı plazmit sistemleri bulunmaktadır (Tang et al., 2018). Bu sistemler, gRNA tasarımı yapıldıktan sonra, gRNA'nın kolayca transformasyon vektörüne klonlanmasına olanak sağlamaktadır (Cermak et al., 2017; Tang et al., 2018). Transformasyon vektörü elde edildikten sonra ise bitki transformasyonu, bitki rejenerasyonu ve bitkilerde tarama işlemleri gerçekleştirilmektedir (Belhaj et al., 2015). CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme çalışmalarında en maliyetli ve uzun süren basamak, steril bitki doku kültürü aşamalarıdır (Maher et al., 2020). Bu sebepten dolayı genom düzenlemede kullanılacak olan CRISPR/Cas9 vektörünün direk olarak bitkilerde denenmesi yerine, öncelikle protoplastlarda denenerek test edilmesi, diğer bir ifadeyle çalıştırmanın doğrulanması, bu teknolojinin uygulanmasında tercih edilen bir yaklaşım olmuştur (Lin et al., 2018).

Bitkilerde *PDS* geni, karotenoid biyosentez yolu içinde görev alan fitoen dehidrogenaz enzimini kodlamaktadır. Karotenoidler bitkilerde bulunan önemli pigmentlerdir ve fotosentezde, ışık Emiliminden sorumlu olmalarının yanında bitkilerin büyümesi, gelişmesi ve çevresel streslere uyum sağlamalarında da önemli görevler üstlenmektedirler (Hou et al., 2016). Genom düzenleme çalışmalarında *PDS* genine yönelik mutasyonlar, bitkilerin karakteristik bir fenotip göstermesine neden olmaktadır. Bu mutant fenotip, bitkide oluşturulan mutasyon çeşidine bağlı olarak albino veya koyu yeşilden soluk yeşile doğru alacalı bir renk göstermektedir (Qin et al., 2007). *PDS* geninin mutasyonunu sonucunda oluşan fenotip, genom düzenleme

çalışmalarında sıklıkla kullanılarak, mutasyonun varlığını hızlı ve kolay şekilde tespit edilmesini sağlamaktadır. Günümüze kadar mısır (Svitashev et al., 2015), buğday (Howells et al., 2018), domates (Secgin et al., 2021), patates (Wang et al., 2015) ve asma (Nakajima et al., 2017) gibi çeşitli bitkilerde yapılan genom düzenleme çalışmalarında *PDS* geni genom düzenlemenin başarıyla gerçekleştirildiğini görsel olarak doğrulayan bir işaretleyici olarak kullanılmıştır.

Asma, hem ülkemiz hem de dünyada ekonomik ve kültürel açıdan oldukça önemli bir bitkidir (Kusaksız vd, 2019; Kaya et al., 2023). Asma ıslahında, genellikle klasik ıslah yöntemleri kullanılmakta ve bu teknikler ise uzun zaman almaktadır. Ayrıca, hali hazırda yetiştiriciliği yapılan çeşitlerde klasik ıslah yöntemleri uygulandığında, varolan özelliklerin kaybedilme riski bulunmakta ve bu durum bağcılık sektörü tarafından tercih edilmemektedir (Giacomelli et al., 2018). Bu sebeplerden dolayı asmada klasik ıslah yöntemlerine alternatif CRISPR/Cas9 gibi güncel teknolojilerinin kullanılması varolan çeşitlerin özelliklerini kaybetmeden, sadece istenilen değişikliklerin yapılabilmesine olanak sağlamaktadır (Dalla Costa et al., 2017). CRISPR/Cas9 gibi nükleazları kullanarak genomda istenilen bölgede hedeflenen değişikliği oluşturabilen genom düzenleme araçlarının asma bitkisinde başarılı bir şekilde uygulanabilmesi bu önemli bitkide büyük önem taşımaktadır (Campos et al., 2021).

Asma bitkisinin çok yıllık ve heterozigot genoma sahip olması, bitki transformasyon aşamalarının uzun ve zorlu olmasına yol açmaktadır. Bu sebeple asmada yapılan CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme çalışmaları, ekonomik öneme sahip diğer bitkilerle kıyaslandığında oldukça sınırlı sayıda kalmıştır. Bu çalışmalarda en çok hedef alınan gen küllleme hastalığına karşı duyarlılık geni olarak bilinen *MLO* genidir (Malnoy et al., 2016; Giacomelli et al., 2018; Wan et al., 2020). *MLO* geni hem metot geliştirme çalışmalarında (Malnoy et al., 2016) hem de külllemeye karşı dayanıklı çeşit geliştirme çalışmalarında (Giacomelli et al., 2018; Wan et al., 2020) hedef gen olarak seçilmiştir. Ayrıca tartarik asit içeriğinin azaltılması için *IdnDH* geni (Ren et al., 2016), gri küf hastalığına karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi için *WRKY52* geni (Wang et al., 2018), bağ mildiyösüne dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi için *DMR6* geni (Giacomelli et al., 2018) ve sürgün dallanmasının arttırılması için *CCD7* ve *CCD8* genleri (Ren et al., 2020) hedef alınarak genom düzenleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bir başka çalışmada ise *PDS* geni hedef gen olarak seçilerek yöntemin uygulanabilirliği gösterilmiştir (Nakajima et al., 2017).

Bu çalışmanın amacı, asmada CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme yöntemi kullanılarak asma yaprağından elde edilen protoplastlarda hedefe yönelik mutasyonun gerçekleştirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda Chardonnay asma çeşidinde hedef gene uygun gRNA tasarlanarak, transformasyon vektörünün elde edilmesi ve vektörün protoplastlarda test edilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bitki materyali

Çalışmada kullanılan Chardonnay (klon 76) asma çeşidi Kavaklıdere Şarapları A.Ş.'den tüplü fidan olarak temin edilmiştir. Bitkiler Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü iklimlendirme odasında %80 bağıl nemde, 16 saatlik fotoperiyot ile gündüz 25°C, gece 17°C'de muhafaza edilmiştir.

VvPDS geninde gRNA tasarımı ve CRISPR/Cas9 vektörünün hazırlanması

VvPDS geninin (VIT_09s0002g00100) sekans bilgileri EnsemblPlants veritabanından indirilmiştir. gRNA tasarımı için VvPDS geninin ikinci ekzonu hedef alınarak, web tabanlı Benchling programı (<https://benchling.com>) kullanılarak gRNA tasarımı off-target puanı ve GC içeriği dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. CRISPR/Cas9 vektörünün oluşturulmasında Cermak et. al. (Cermak et al., 2017) modüler sistem plazmitleri (pMOD_A1111, pMOD_B2515, pMOD_C3001 ve pTRANS_100) kullanılmıştır. VvPDS geni ekzon 2 üzerinde yer alan 20 bazlık gRNA dizisi ve PAM sekansı Şekil 1'de gösterilmektedir. Modüler sistem plazmitlerine ait bilgiler Çizelge 1'de yer almaktadır.



Şekil 1. *VvPDS* geninde hedef bölgenin seçilmesi ve gRNA'nın dizaynı, A) *VvPDS* genini oluşturan ekzon ve intronlar dikdörtgen kutucuklar ile gösterilmiştir. gRNA dizisi, ekzon 2'de yer almaktadır. B) Ekzon 2'de yer alan 20 bazlık gRNA dizisi sarı, 3 bazlık PAM dizisi ise yeşil ile işaretlenerek gösterilmiştir.

Figure 1. Selection of target region in the *VvPDS* gene and design of the gRNA, A) Exons and introns that make up the *VvPDS* gene are shown with rectangular boxes. The gRNA sequence is located in exon 2. B) The 20-base gRNA sequence in exon 2 is highlighted in yellow, while the 3-base PAM sequence is highlighted in green.

Çizelge 1. CRISPR/Cas9 vektörünün elde edilmesinde kullanılan modüler sistem plazmitleri

Table 1. Modular system plasmids used to obtain the CRISPR/Cas9 vector

Plazmit adı	Gen	Promotör	Terminatör
pMOD_A1111 (Addgene #91032)	TaCas9	OsAct1	HSP
pMOD_B2515 (Addgene #91072)	Tek gRNA klonlama için <i>Esp3I</i> ccdb kaseti	AtU6	Pol III
pMOD_C3001 (Addgene #91094)	<i>GFP</i>	35S	pea rbcS9
pTRANS_100* (Addgene #91198)	-	-	-

*T-DNA içermeyen transformasyon vektörü

gRNA'nın modüler sistem plazmitlerinden modül B plazmit içerisine klonlanması için gRNA dizisine plazmit ile uyumlu 4 bazlık uzantı sekansları eklenerek iki adet primer sentezletirilmiştir (Şekil 2). Kullanılan Modül B plazmit pMOD_B2515'te U6 Pol III promotörü olduğu için gRNA dizisinin önüne "G" bazı eklenmiştir (Şekil 2). Primerler T4 polynucleotide kinaz enzimi ile fosforilasyon yapılmış, aşamalı sıcaklık değişimi uygulanarak birbirlerine bağlanması sağlanmıştır (Cermak et al., 2017). Sonrasında tek bir Golden Gate birleştirme reaksiyonu ile *Esp3I* restriksiyon enzimi ve T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak gRNA sekansı pMOD_B2515 içerisine klonlanmıştır. Golden Gate birleştirme reaksiyonu, kompetan *E. coli* (NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency, DH5α)) hücrelerine transforme edilerek, LB+ampisilin antibiyotigi içeren agarlı besiyerine ekim yapılmıştır. Elde edilen kolonilerden sıvı kültür başlatılarak, Monarch® Plazmit Miniprep Kit (NEB) ile plazmit izolasyonu yapılmış ve Sanger sekanslama ile gRNA'nın plazmit içerisine doğru bir şekilde aktarıldığı doğrulanmıştır.

Genom düzenlemede kullanılan final CRISPR/Cas9 vektörünün elde edilmesinde Cermak et al. (2017) protokolü (Protocol 5) temel alınmıştır. Bu sistemde *Cas9* geni içeren pMOD_A1111 plazmit, gRNA klonlanan modül B plazmit (pMOD_B2515) ve *GFP* geni içeren modül C plazmit (pMOD_C3001), T-DNA içermeyen transformasyon vektörü (pTRANS_100) içerisinde tek bir Golden Gate birleştirme reaksiyonu ile birleştirilmiştir. Final birleştirme reaksiyonu, kompetan *E. coli* (NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency, DH5α)) hücrelerine transforme edilerek, LB+spektinomisin antibiyotigi içeren agarlı besiyerine ekim yapılmıştır. Elde edilen kolonilerden sıvı kültür başlatılarak, Monarch® Plazmit Miniprep Kit (NEB) ile plazmit izolasyonu yapılmış, final vektör restriksiyon enzimi (*SacI*) ile kesim yapılarak doğrulanmıştır.

genomik DNA izolasyonu CTAB temelli DNA izolasyonu protokolü (Öncü-Öner et al., 2023) ile gerçekleştirilmiş ve DNA konsantrasyonu Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen) ile belirlenmiştir. PCR, ileri primeri 5'- GACTCAATTCAGATATGTTTCTGCGG -3' ve geri primeri 5'- GGGGCAGAAATCCTTCCTCC -3' kullanılarak Q5 DNA polimeraz enzimi (NEB) ile gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri Monarch PCR & DNA Clean Up Kit (NEB) kullanılarak saflaştırılmış ve saflaştırılan PCR ürünlerinin konsantrasyonu Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen) kullanılarak belirlenmiştir. T7E1 analizi için 200 ng PCR ürününe, 2 µl 10X NEBuffer 2 eklenerek son hacim 19 µl olarak şekilde nükleaz enzimi içermeyen ultra saf su eklenmiştir. Hibridizasyon işlemi PCR cihazında (Invitrogen, SimpliAmp) uygun sıcaklık derecesi ve süreleri (95°C'den 85°C'ye 2°C/saniye azalarak ve 85°C'den 25°C'ye 0.1°C/saniye azalarak) uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon sonrasında 19 µl reaksiyon hacmine 1 µl T7 endonükleaz 1 enzimi eklenerek 15 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Reaksiyona 1.5 µl 0.25 M EDTA ilave edilerek durdurulmuştur. Reaksiyon sonucunda elde edilen DNA fragmentleri SafeView (ABM) DNA boyası içeren %2'lik agaroz jel elektroforezinde ayrımlanarak, UV ışık (Vilber Lourmat) altında görüntülenmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

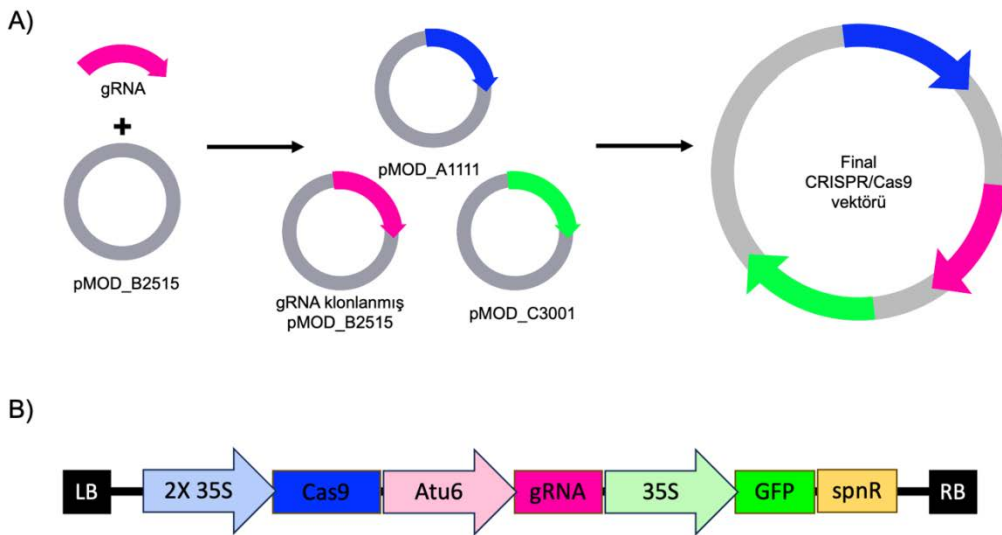
Hedef gen ve CRISPR/Cas9 vektör tasarımı

VvPDS (VIT_09s0002g00100) geni 15 ekzon ve 6 introndan oluşmaktadır. CRISPR/Cas9, çoğunlukla çerçeve kaymaları ve STOP kodonları oluşumuna yol açtığı için işlevsiz proteinler üretmek amacıyla hedef gen bölgesi seçiminde genin yukarı yöndeki ekzonlarının hedef olarak seçilmesi daha yaygındır (Ren et al., 2016). Bu çalışmada *VvPDS* geninin susturulması amacıyla ikinci ekzon hedef olarak seçilmiştir. Benzer yaklaşım asmada CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme *VvCCD7* geni için ekzon 1 ve *VvCCD8* geni için ekzon 2 hedef alınarak, bu genlerinin nakavt edilmesinde uygulanmıştır (Ren et al., 2020).

VvPDS geninin DNA sekansı EnsemblPlants veritabanından indirilerek Benchling programında CRISPR tasarımı özelliği ile off-target puanı ve GC içeriği göz önünde bulundurularak gRNA dizisi belirlenmiştir. PAM sekansı NGG olacak şekilde belirlenen 20 bazlık gRNA dizisinin, off-target puanı 49.1, GC oranı ise %45'tir. GC içeriği gibi gRNA özelliklerinin, Cas9 enziminin nükleaz aktivitesini etkilediği önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Liu et al., 2016). Yapılan çalışmalarda %35-65 arasında GC oranına sahip gRNA'ların kullanımının daha yaygın olduğu (Malik et al., 2021), GC içeriği %40-60 aralığında olan gRNA'ların ise daha yüksek bir mutasyon oranına sahip olduğu belirtilmiştir (Konstantakos et al., 2022; Liu et al., 2016). Buna karşılık, çok yüksek veya çok düşük GC içeriğine sahip gRNA'ların mutasyon oranlarının daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Doench et al., 2014). Genom düzenlemede verimliliği etkileyen birçok farklı parametre olmasına rağmen, gRNA'nın GC içeriği CRISPR/Cas9 sisteminin mutasyon verimliliğini önemli ölçüde etkileyen parametrelerden bir tanesidir (Ren et al., 2018).

CRISPR/Cas9 vektör tasarımı, genom düzenleme çalışmalarında önemli bir basamaktır ve bu basamak, uygun Cas proteinlerinin belirlenmesini, gRNA'ların tasarlanması, aynı zamanda gRNA'ları ve Cas proteinlerini ifade etmek için düzenleyici elemanların (promotör, terminatör vb.) seçimini içerir (Hassan et al., 2021). Seçim işleminden sonra bu DNA parçalarının minimum hata ile kolay ve eş zamanlı birleşimini sağlayan farklı yöntemler uygulanmaktadır (Cermak et al., 2017). Bunlardan en yaygın kullanılanları Golden Gate birleştirme olarak bilinen Tip IIS restriksiyon endonükleaz enzimleri aracılı yöntem (Engler et al., 2014) ile Gibson klonlama olarak bilinen doğrusal üst üste eşleşen DNA parçalarının birleşmesini temel alan ligasyondan bağımsız bir yöntemdir (Gibson et al., 2008). Bu çalışmada Golden Gate birleştirme prensibi temel alınarak geliştirilen modüler sistem plazmitleri kullanılmıştır (Cermak et al., 2017). Final CRISPR/Cas9 vektörünün elde edildiği basamakları özetleyen şematik görünüm Şekil 3A, final CRISPR/Cas9 vektörünün şematik gösterimi ise Şekil 3B'de verilmiştir. Çalışmada kullanılan modüler sistem plazmitlerinde, gRNA için *Arabidopsis* U6 promotörü (AtU6), GFP için Cauliflower Mosaic Virus 35S promotörü (35S) ve Cas9 için çeltik aktin 1 (OsAct1) promotörü tercih edilmiştir. GFP (yeşil floresan protein) geni, transforme edilen protoplast hücrelerini hızlı bir şekilde

seçmek için raportör gen olarak kullanılmıştır. Raportör genler, protein lokalizasyonu ve promotör karakterizasyonu çalışmalarında ve bitki transformasyonunun optimizasyonunda kullanılmaktadırlar (Huttly 2009). Bitkilerde yaygın kullanılan raportör genler *E. coli*'den izole edilen β -glukuronidaz geni (*GUS*) (Gilissen et al., 1998) ve Amerikan ateş böceği *Photinus pyralis*'den izole edilen lusiferaz (*luc*) raportör genleridir. Bir diğer yaygın kullanılan gen ise Pasifik denizanası *Aequoria victoria*'dan izole edilen *GFP* raportör genidir (Chiu et al., 1996). *GUS* raportör sistemi, in vivo analiz için zararlı olan bir substratın (X-gluc) kullanımına gereksinim duyarken, *luc* geni ise lusiferin substratı ile reaksiyona girerek biyoluminesans oluşturmakta ve bu şekilde sonuç vermektedir (Ow et al., 1986). Bu çalışmada da tercih edilen *GFP* geni dışardan bir substratın kullanımına gereksinim duymaması sebebiyle farklı bitkilerde genom düzenleme çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir raportör genidir (Chen et al., 2006; Zhao et al., 2016; Wang et al., 2021). Bu çalışmada da *GFP* geninin kullanımı ile transforme olan protoplastlar kolaylıkla diğer protoplastlardan ayrılmıştır.



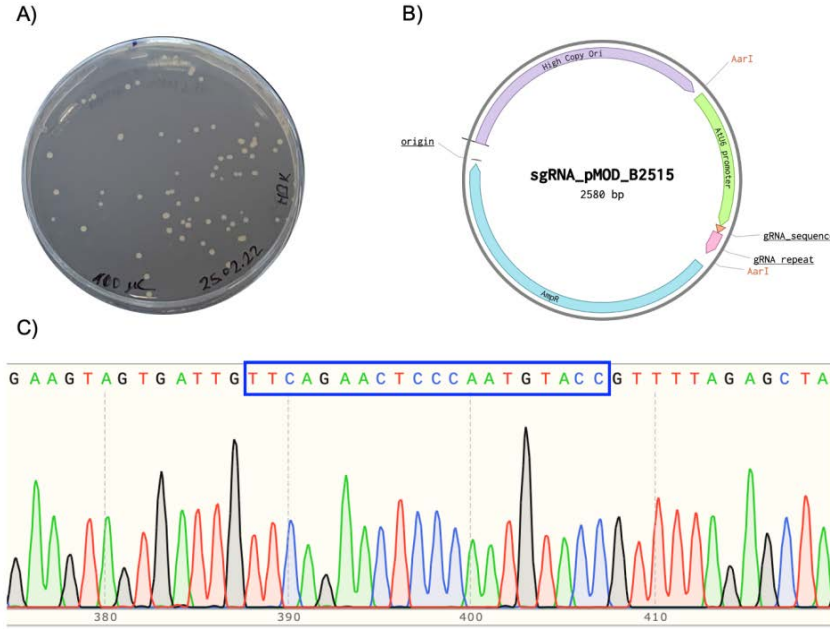
Şekil 3. Final CRISPR/Cas9 vektörü tasarımı, A) Final CRISPR/Cas9 vektörünün elde edilmesi aşamaları, B) Final CRISPR/Cas9 vektörünün şematik gösterimi.

Figure 3. Design of final CRISPR/Cas9 vector, A) Steps for obtaining the final CRISPR/Cas9 vector, B) Schematic representation of the final CRISPR/Cas9 vector.

CRISPR/Cas9 vektörünün doğrulanması

Vektörün oluşturulma basamaklarında ilk olarak gRNA'nın modül B plazmit içerisine doğru bir şekilde klonlandığının doğrulanmasında restriksiyon enzimleri, PCR veya Sanger sekanslama kullanılabilir (Zhang et al., 2020; Hardiyani et al., 2023). Restriksiyon enzimleri eğer gRNA dizisi herhangi bir restriksiyon enzimi bölgesi içeriyorsa ya da gRNA'nın klonlanması varolan restriksiyon enzim bölgesinin yok olmasına sebep oluyorsa pratik uygulama imkanı sunduklarından dolayı tercih edilmektedir. PCR ile doğrulama işleminde ise gRNA'nın plazmit içerisindeki varlığının belirlenmesi için kullanılacak olan primerlerden bir tanesinin gRNA'nın komplementeri olacak şekilde tasarlanması gerekmektedir. Sanger sekanslama ise gRNA'nın doğru bir şekilde plazmit içerisinde klonlandığının doğrulanmasında en güvenilir ve en çok tercih edilen yöntemdir (Yang et al., 2017; Tang et al., 2018). Bu çalışmada da gRNA'nın plazmit içerisindeki varlığı Sanger sekanslama ile doğrulanmıştır. Klonlama sonrasında gRNA dizisini içeren modül B plazmit pMOD_B2515'in *E. coli*'ye transformasyonu yapılarak LB+ampisilin antibiyotigi içeren agarlı besiyerinde farklı koloniler elde edilmiştir (Şekil 4A). gRNA dizisini içeren modül B plazmit pMOD_B2515'in Benchling programında oluşturulan gen haritası Şekil 4B'de yer

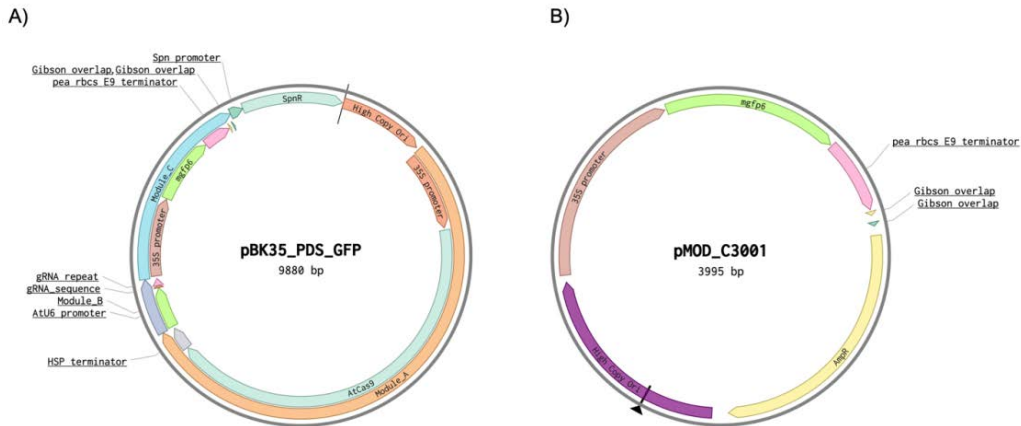
almaktadır. Elde edilen kolonilerden (Şekil 4A) seçim yapılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildikten sonra Sanger sekanslamaya gönderilmiş ve gRNA'nın plazmite doğru bir şekilde klonlandığı belirlenmiştir (Şekil 4C).



Şekil 4. gRNA'nın modül B içerisine klonlanması ve klonun Sanger sekanslama ile doğrulanması A) LB+ampisilin antibiyotigi içeren agarlı besiyerinde elde edilen koloniler B) gRNA içeren modül B plazmitin gen haritası C) Sanger sekanslama sonucu elde edilen kromatogram, mavi işaretlenen sekans gRNA dizisini göstermektedir.

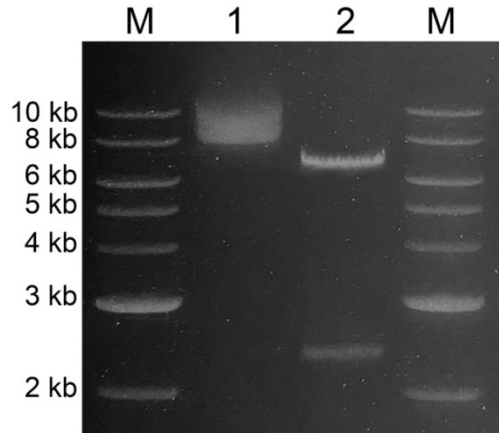
Figure 4. Cloning of gRNA into Module B and verification of the clone by Sanger sequencing: A) Colonies obtained on agar medium containing LB + ampicillin antibiotic. B) Genetic map of the Module B plasmid containing gRNA. C) Chromatogram obtained from Sanger sequencing, highlighting the blue-marked sequence representing the gRNA sequence.

Golden Gate birleştirme reaksiyonu ile elde edilen final vektörün (pBK35_PDS_GFP) Benchling programında oluşturulan gen haritası Şekil 5A'da, GFP genini içeren vektör pMOD_C3001'in gen haritası ise Şekil 5B'de verilmiştir. pBK35_PDS_GFP final vektörünün SacI restriksiyon enzimi ile kesimi sonrasında 7.4 kb ile 2.5 kb bant büyüklüklerinde iki fragment elde edilerek final vektör doğrulanmıştır (Şekil 6).



Şekil 5. Protoplast transformasyonunda kullanılan vektörlerin gen haritası.

Figure 5. Genetic map of vectors used in protoplast transformation.



Şekil 6. Final vektörün restriksiyon enzimi ile kesimi sonrasında elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü, M: Markır (Fast DNA Ladder, NEB), 1: pBK35_PDS_GFP plazmit DNA , 2: pBK35_PDS_GFP'in *SacI* ile kesimi sonrasında elde edilen DNA fragmentleri (7.4 kb ile 2.5 kb).

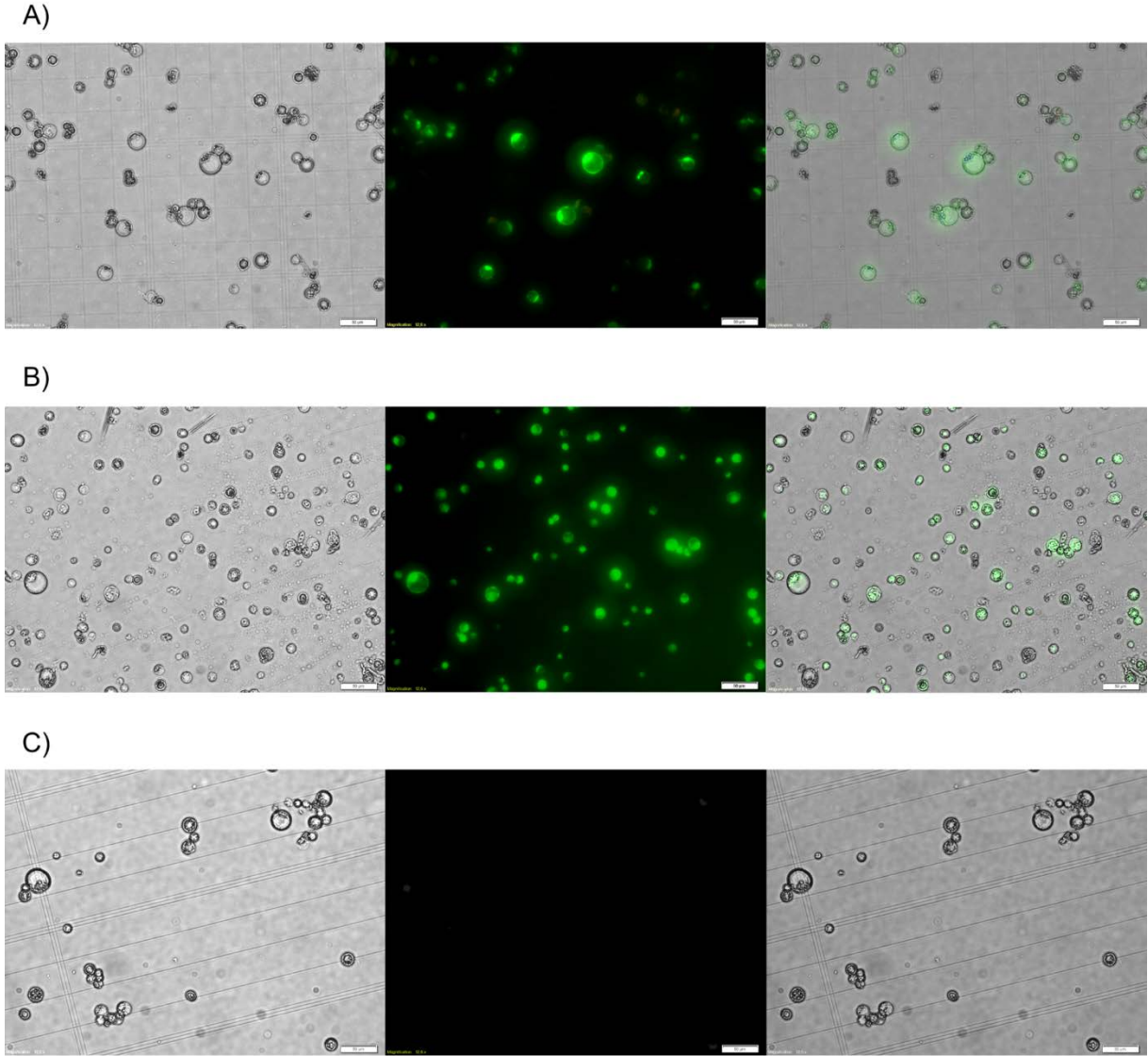
Figure 6. Agarose gel electrophoresis image obtained after digestion of the final vector with restriction enzyme, M: Marker (Fast DNA Ladder, NEB), 1: pBK35_PDS_GFP plasmid DNA, 2: DNA fragments (7.4 kb and 2.5 kb) obtained after digestion of pBK35_PDS_GFP with *SacI*.

Protoplast transformasyon verimliliği

PEG aracılı gerçekleştirilen protoplast transformasyonu sonrasında *PDS* genini hedef alan final CRISPR/Cas9 vektörünün (~10 kb) transformasyon verimliliği %40-60 olarak bulunmuştur (Şekil 7A). Sadece *GFP* genini içeren vektör pMOD_C3001 (~3 kb) ile yapılan transformasyonda ise, transformasyon verimliliği %80-90 olarak bulunmuştur (Şekil 7B). Vektör büyüklüğü transformasyon verimliliğini büyük oranda etkilemiş, vektör büyüklüğü arttıkça verimlilik düşmüştür. Transformasyonda kullanılan plazmit büyüklüğünün transformasyon verimliliğini etkilediği daha önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir (Zhang et al., 2011; Hong et al., 2012; Zhao et al., 2016). Zhao et al. (2016) asma protoplastlarında 4.6 kb ve 11 kb büyüklüğünde iki plazmit ile yaptıkları transformasyonda, sırasıyla %61 ve %86 oranında transformasyon verimliliği elde etmiştir. Transformasyonda kullanılan plazmit DNA miktarı da transformasyon verimliliğini etkilemektedir. Scintilla et al. (2022) asma protoplastlarında 10 µg, 20 µg ve 40 µg plazmit DNA'sı kullanarak yaptıkları çalışmada, plazmit DNA'sı arttıkça transformasyon verimliliğinin de arttığını belirtmişlerdir. Bir diğer çalışmada 5 µg'dan 160 µg'a kadar farklı miktarlarda plazmit DNA'sı kullanılarak asma protoplastlarında transformasyon gerçekleştirilmiştir. En yüksek transformasyon verimliliği 40 µg plazmit DNA'sı kullanıldığında elde edilmiştir ve plazmit DNA miktarı arttıkça transformasyon verimliliği düşmüştür (Zhao et al., 2016). PEG konsantrasyonu, transformasyon süresi, protoplast sayısı ve DNA konsantrasyonu dahil olmak üzere transformasyon verimliliğini etkileyen çeşitli faktörler hem asmada hem de farklı bitkilerde daha önce test edilmiş ve optimum koşullar rapor edilmiştir (Reed & Bargmann 2021; Zhao et al., 2016). Çalışmada negatif kontrol olarak sadece PEG ile muamele edilen protoplastlar beklenildiği gibi herhangi bir işıma vermemişlerdir (Şekil 7C).

Genom düzenleme verimliliği

Transformasyonun doğrulanmasından sonra hedef mutasyon varlığının belirlenmesi için T7E1 analizi gerçekleştirilmiştir. Uyumsuzluk tespit analizi olarak da adlandırılan T7E1 analizi, CRISPR/Cas9 sistemi gibi bölgeye özgü nükleazların aktivitesini değerlendirmek için bitkilerde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Pan et al., 2016; Sattar et al., 2021). T7E1 analizi mutasyonu tespit etmek için düzenleme gerçekleşen ve gerçekleşmeyen DNA iplikçiklerinin hibridizasyonuna dayanmaktadır. T7E1 homodubleks ve heterodubleks DNA arasında ayırım yaparak, özellikle heterodubleks dsDNA'yı hedeflemektedir (Gohlke et al., 1994). Uyumsuzluklar, nükleaz enzimi tarafından kesilerek, ortaya çıkan DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi ile ayırılmaktadır (Sattar et al., 2021).

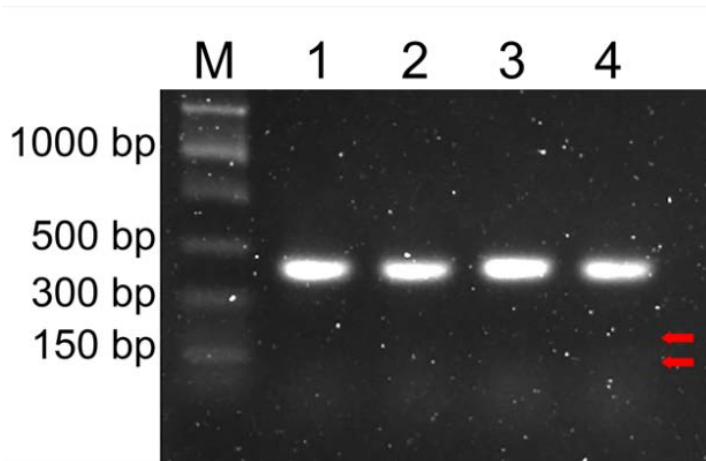


Şekil 7. Final CRISPR/Cas9 vektörün (A) ve pMOD_3001 plazmitinin (B) transformasyonu sonrasında protoplastların ve negatif kontrol olarak sadece PEG ile muamele edilen protoplastların (C) aydınlık alan (sol), floresan mikroskop (orta) ve birleştirilmiş (sağ) görüntüleri. Yeşil parlayan protoplastlar transformasyonun başarılı olduğu GFP içeren protoplastları göstermektedir.

Figure 7. Images of protoplasts after the transformation of the Final CRISPR/Cas9 vector and pMOD_3001 plasmid and as well as protoplasts treated with PEG only as a negative control (C): Bright-field microscopy (left), fluorescent microscopy (middle) and merged image (right). The green-fluorescent protoplasts indicate the success of the transformation, showing protoplasts containing GFP.

Bu çalışmada T7E1 analizi sonucunda aynı plazmit ile 3 tekrerr olacak şekilde yapılan transformasyon sonucunda elde edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezi ile ayrılmanması sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 8'de verilmiştir. Bölgeye özgü tasarlanan primer ile yapılan PCR sonucunda beklenen DNA bant profilleri (411 kb) hem 3 farklı tekekür örneğinde hem de herhangi bir uygulama yapılmayan Chardonnay DNA'sında elde edilmiştir. Ancak restriksiyon işlemi sonucunda mutasyon olan bölgelerde uyumsuz heterodubleks DNA'yı tanıyıp keserek oluşması beklenen bant profilleri elde edilememiştir (Şekil 8). T7E1 analizinin hassasiyetinin düşük olduğu başka çalışmalarda da belirtilmiştir (Sentmanat et al., 2018;

Nadakuduti et al., 2019). T7E1 analizinin özellikle SNP'lerin ve kısa ekleme/ silme'lerin tespitinde çok güvenilir sonuç vermediği rapor edilmiştir (Vouillot et al., 2015). Ayrıca, T7E1'in düşük mutasyon değişkenliği gösteren DNA örneklerinde, mutajenez oranlarını olduğundan az tahmin edebildiği de bilinmektedir (Bernabé-Orts et al., 2019). T7E1 analizi aynı zamanda DNA/enzim oranlarına ve inkübasyon süresine de bağlı olarak değişkenlik gösterdiğinden, optimizasyona ihtiyaç duyulabilmektedir (Nadakuduti et al., 2019). T7E1 yöntemi gibi mutasyon tespitinde kullanılan PCR/RE yöntemin de bazı dezavantajları vardır. Örneğin, hedef bölgenin restriksiyon enzimi kesim bölgesi içerme gerekliliği, CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme çalışmalarında bir PAM bölgesinin mutlak gerekliliğine ek olarak, gen düzenleme olaylarını tespit etmek için başka bir sınırlama daha eklemektedir. Bu çalışmada da olduğu gibi çoğu zaman, seçilen hedef bölgede uygun bir kesim bölgesi bulmak imkansızdır. T7E1 ve PCR/RE yöntemlerine alternatif olarak uygulanan yeni nesil sekanslama yöntemi olan ampikon sekanslama çok daha hassas ve doğru bir sonuç vermektedir. Ancak maliyetin yüksek olması, diğer tekniklere göre sonuç vermesinin daha uzun zaman alması ve sekans sonucunun analizi için biyoinformatik araçlara gereksinim duyulması bu yöntemin en önemli dezavantajlarıdır. Ayrıca primer bağlama bölgelerini kapsayan büyük eklemeler veya silmelerin bu yöntemle tespiti de sorunlara yol açabilmektedir (Nadakuduti et al., 2019). Bu çalışmada T7E1 analizi ile mutasyon varlığı tespit edilememiştir. Bu durumun sebepleri mutasyonun gerçekleşmemesi olabileceği gibi başka çalışmalarda da belirtildiği gibi yöntemin çok hassas olmamasına bağlı olarak ekstra optimizasyona ihtiyaç duyulması olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca hedef bölgede eğer SNP ya da kısa ekleme ve silme meydana geldiyse T7E1 analizinin bunların tespitinde çok hassas olmaması da mutasyon görülmemesinin bir sebebi olabileceği düşünülmektedir. Daha detaylı sonuçlar için başka çalışmalarda da önerildiği gibi örneklere ampikon sekanslama yaptırılabilir (Sentmanat et al., 2018).



Şekil 8. Transforme protoplastların T7E1 analizi sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: Markır (Fast DNA Ladder, NEB), 1-3: Transformasyon gerçekleştirilen protoplastlardan 3 farklı tekerrüre ait örnekler, 4: Chardonnay yabani tip DNA örneği. Kırmızı oklar T7E1 analizi sonucunda elde edilmesi beklenen bant uzunluklarını göstermektedir.

Figure 8. Agarose gel electrophoresis image obtained from the T7E1 analysis of transformed protoplasts. M: Marker (Fast DNA Ladder, NEB), 1-3: Samples from three different replicates of transformed protoplasts, 4: Chardonnay wild-type DNA sample. Red arrows indicate the expected band lengths from the T7E1 analysis.

SONUÇ

Hedefe yönelik mutasyonların oluşturulmasında bitkilerde yaygın bir yöntem olarak uygulanan CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme teknolojisinin, özellikle asma gibi heterozigot genome sahip, çok yıllık bitkilerde uygulanabilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada asmada CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme için ilk aşama olan gRNA tasarımı son aşama olan protoplast transformasyonuna kadar uygulanan basamaklar başarılı bir şekilde gerçekleştirilerek, sistemin sorunsuz uygulanabilirliği

gösterilmiştir. Uygulanan protokoller ve elde edilen sonuçlar asmada hedef mutasyonların gerçekleştirilmesi amacıyla yapılacak çalışmalarda kullanılabilir.

TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan plazmitleri sağlayan Prof. Dr. Adam Bogdanove ve Prof. Dr. Daniel Voytas'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Veri Kullanılabilirliği

Veriler makul talep üzerine sağlanabilmektedir.

Yazar Katkıları

Çalışmanın konsepti ve tasarımı: HBK; örnek toplama: HBK; verilerin analizi ve yorumlanması: HBK; istatistiksel analiz: HBK; görselleştirme: HBK; makalenin yazımı: HBK.

Etik Beyan

Bu araştırma için etik kurula ihtiyaç olmadığını beyan ederim.

Finansal Destek

Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından finansal olarak desteklenmiştir (BAP, Proje No; 2020-123). Yazar finansal destek için teşekkür eder.

Makale Açıklaması

Bu makale Konu Editörü Dr. Emrah ZEYBEKOĞLU tarafından düzenlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Bailey-Serres, J., J. E. Parker, E. A. Ainsworth, G. E. Oldroyd & J. I. Schroeder, 2019. Genetic strategies for improving crop yields. *Nature*, 575 (7781): 109-118. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1679-0>
- Belhaj, K., A. Chaparro-Garcia, S. Kamoun, N. J. Patron & V. Nekrasov, 2015. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, 32: 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.007>
- Bernabé-Orts, J. M., I. Casas-Rodrigo, E. G. Minguet, V. Landolfi, V. Garcia-Carpintero, S. Gianoglio, M. Vázquez-Vilar, A. Granell & D. Orzaez, 2019. Assessment of Cas12a-mediated gene editing efficiency in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 17 (10): 1971-1984. <https://doi.org/10.1111/pbi.13113>
- Campos, G., C. Chialva, S. Miras & D. Lijavetzky, 2021. New technologies and strategies for grapevine breeding through genetic transformation. *Frontiers in Plant Science*, 12: 767522. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.767522>
- Cermak, T., S. J. Curtin, J. Gil-Humanes, R. Cegan, T. J. Y. Kono, E. Konecna, J. J. Belanto, C. G. Starker, J. W. Mathre, R. L. Greenstein & D. F. Voytas, 2017. A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. *Plant Cell*, 29 (6): 1196-1217. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00922>
- Chen, K., Y. Wang, R. Zhang, H. Zhang & C. Gao, 2019. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual Review of Plant Biology*, 70: 667-697. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049>
- Chen, S., L. Tao, L. Zeng, M. E. Vega-Sanchez, K. Umemura & G. L. Wang, 2006. A highly efficient transient protoplast system for analyzing defence gene expression and protein-protein interactions in rice. *Molecular Plant Pathology*, 7 (5): 417-427. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00346.x>
- Chiu, W., Y. Niwa, W. Zeng, T. Hirano, H. Kobayashi & J. Sheen, 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*, 6 (3): 325-330. Doi: 10.1016/s0960-9822(02)00483-9
- Dalla Costa, L., M. Malnoy & I. Gribaudo, 2017. Breeding next generation tree fruits: technical and legal challenges. *Horticulture Research*, 4. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.67>
- Doench, J. G., E. Hartenian, D. B. Graham, Z. Tothova, M. Hegde, I. Smith, M. Sullender, B. L. Ebert, R. J. Xavier & D. E. Root, 2014. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature Biotechnology*, 32 (12): 1262-1267. <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>

- Engler, C., M. Youles, R. Gruetzner, T.-M. Ehnert, S. Werner, J. D. Jones, N. J. Patron & S. Marillonnet, 2014. A golden gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synthetic Biology*, 3 (11): 839-843. <https://doi.org/10.1021/sb4001504>
- Feng, Z., B. Zhang, W. Ding, X. Liu, D.-L. Yang, P. Wei, F. Cao, S. Zhu, F. Zhang & Y. Mao, 2013. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 23 (10): 1229-1232. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.114>
- Giacomelli, L., T. Zeilmaker, M. Malnoy, J. Rouppe van der Voort & C. Moser, 2018. Generation of mildew-resistant grapevine clones via genome editing. XII International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, 1248. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1248.28>
- Gibson, D. G., G. A. Benders, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, H. Baden-Tillson, J. Zaveri, T. B. Stockwell, A. Brownley, D. W. Thomas & M. A. Algire, 2008. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 319 (5867): 1215-1220. <https://doi.org/10.1126/science.1151721>
- Gilissen, L. J., P. L. Metz, W. J. Stiekema & J.-P. Nap, 1998. Biosafety of *E. coli* β -glucuronidase, GUS) in plants. *Transgenic Research*, 7: 157-163. <https://doi.org/10.1023/A:1008832711805>
- Gohlke, C., A. Murchie, D. Lilley & R. M. Clegg, 1994. Kinking of DNA and RNA helices by bulged nucleotides observed by fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (24): 11660-11664. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11660>
- Hardiyani, W. A., A. Wafa, W. I. D. Fanata & H. S. Addy, 2023. Design and construction of single guide RNA for CRISPR/Cas9 system based on the xa13 resistance gene in some varieties of rice, *Oryza sativa*). *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 23 (1): 47-55. <https://doi.org/10.23960/jhptt.12347-55>
- Hassan, M. M., Y. Zhang, G. Yuan, K. De, J.-G. Chen, W. Muchero, G. A. Tuskan, Y. Qi & X. Yang, 2021. Construct design for CRISPR/Cas-based genome editing in plants. *Trends in Plant Science*, 26 (11): 1133-1152. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.06.015>
- Hong, S., P. J. Seo, S.-H. Cho & C.-M. Park, 2012. Preparation of leaf mesophyll protoplasts for transient gene expression in *Brachypodium distachyon*. *Journal of Plant Biology*, 55: 390-397. <https://doi.org/10.1007/s12374-012-0159-y>
- Hou, X., J. Rivers, P. León, R. P. McQuinn & B. J. Pogson, 2016. Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants. *Trends in Plant Science*, 21 (9): 792-803. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.001>
- Howells, R. M., M. Craze, S. Bowden & E. J. Wallington, 2018. Efficient generation of stable, heritable gene edits in wheat using CRISPR/Cas9. *BMC Plant Biology* 18 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1433-z>
- Huttly, A., 2009. "Reporter Genes, 39-69". In: *Transgenic Wheat, Barley and Oats: Production and Characterization Protocols* (Eds. H. D. Jones & P. R. Shewry), Humana Press, New York, USA, 349 pp.
- Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura & A. Nakata, 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169: 5429-5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jaganathan, D., K. Ramasamy, G. Sellamuthu, S. Jayabalan & G. Venkataraman, 2018. CRISPR for crop improvement: an update review. *Frontiers in Plant Science*, 9: 985. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00985>
- Jiang, F., D. W. Taylor, J. S. Chen, J. E. Kornfeld, K. Zhou, A. J. Thompson, E. Nogales & J. A. Doudna, 2016. Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*, 351 (6275): 867-871. <https://doi.org/10.1126/science.aad8282>
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna & E. Charpentier, 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337 (6096): 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kaya, H. B., Y. Dilli, T. Oncu-Oner & A. Ünal, 2023. Exploring genetic diversity and population structure of a large grapevine, *Vitis vinifera* L.) germplasm collection in Türkiye. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1121811. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1121811>
- Kolasinliler, G., M. M. Aagre, C. Akkale & H. B. Kaya, 2023. The use of CRISPR-Cas-based systems in bacterial cell factories. *Biochemical Engineering Journal*, 194: 108880. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.108880>
- Konstantakos, V., A. Nentidis, A. Krithara & G. Paliouras, 2022. CRISPR-Cas9 gRNA efficiency prediction: an overview of predictive tools and the role of deep learning. *Nucleic Acids Research*, 50 (7): 3616-3637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac192>

- Kuşaksız, E. K. & H. Çimer, 2019. Asma, *Vitis vinifera* var. Sultani çekirdeksiz) yapraklarında farklı salamura ortamlarının pestisit kalıntı düzeylerine etkisi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 56 (3): 267-272. <https://doi.org/10.20289/zfdergi.446022>
- Lin, C. S., C. T. Hsu, L. H. Yang, L. Y. Lee, J. Y. Fu, Q. W. Cheng, F. H. Wu, H. C. W. Hsiao, Y. Zhang & R. Zhang, 2018. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. Plant Biotechnology Journal, 16 (7): 1295-1310. <https://doi.org/10.1111/pbi.12870>
- Liu, X., A. Homma, J. Sayadi, S. Yang, J. Ohashi & T. Takumi, 2016. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. Scientific Reports, 6 (1): 19675. <https://doi.org/10.1038/srep19675>
- Maher, M. F., R. A. Nasti, M. Vollbrecht, C. G. Starker, M. D. Clark & D. F. Voytas, 2020. Plant gene editing through de novo induction of meristems. Nature Biotechnology, 38 (1): 84-89. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0337-2>
- Malik, A., A. Gul, F. Munir, R. Amir, H. Alipour, M. M. Babar, S. M. Bakhtiar, R. Z. Paracha, Z. Khalid & M. Q. Hayat, 2021. Evaluating the cleavage efficacy of CRISPR-Cas9 sgRNAs targeting ineffective regions of Arabidopsis thaliana genome. PeerJ, 9: e11409. <https://doi.org/10.7717/peerj.11409>
- Malnoy, M., R. Viola, M.-H. Jung, O.-J. Koo, S. Kim, J.-S. Kim, R. Velasco & C. Nagamangala Kanchiswamy, 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. Frontiers in Plant Science, 7: 1904. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01904>
- Nadakuduti, S. S., C. G. Starker, D. K. Ko, T. B. Jayakody, C. R. Buell, D. F. Voytas & D. S. Douches, 2019. Evaluation of methods to assess in vivo activity of engineered genome-editing nucleases in protoplasts. Frontiers in Plant Science, 10: 110. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00110>
- Nakajima, I., Y. Ban, A. Azuma, N. Onoue, T. Moriguchi, T. Yamamoto, S. Toki & M. Endo, 2017. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. PLoS One, 12 (5): e0177966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177966>
- Ow, D. W., K. V. Wood, M. DeLuca, J. R. De Wet, D. R. Helinski & S. H. Howell, 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Science, 234 (4778): 856-859. <https://doi.org/10.1126/science.234.4778.856>
- Pan, C., L. Ye, L. Qin, X. Liu, Y. He, J. Wang, L. Chen & G. Lu, 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. Scientific Reports, 6 (1): 24765. <https://doi.org/10.1038/srep24765>
- Qin, G., H. Gu, L. Ma, Y. Peng, X. W. Deng, Z. Chen & L.-J. Qu, 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. Cell Research, 17 (5): 471-482. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.40>
- Reed, K. M. & B. O. Bargmann, 2021. Protoplast regeneration and its use in new plant breeding technologies. Frontiers in Genome Editing, 20. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.734951>
- Ren, C., E. Gathunga, S. Li & Z. Liang, 2018. Application and optimization of the CRISPR/Cas9 system in grape. XII International Conference on Grapevine Breeding & Genetics 1248. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1248.22>
- Ren, C., Y. Guo, J. Kong, F. Lecourieux, Z. Dai, S. Li & Z. Liang, 2020. Knockout of VvCCD8 gene in grapevine affects shoot branching. BMC Plant Biology, 20 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2263-3>
- Ren, C., X. Liu, Z. Zhang, Y. Wang, W. Duan, S. Li & Z. Liang, 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay, *Vitis vinifera* L. Scientific Reports, 6 (1): 32289. <https://doi.org/10.1038/srep32289>
- Sattar, M. N., Z. Iqbal, J. M. Al-Khayri & S. M. Jain, 2021. Induced genetic variations in fruit trees using new breeding tools: Food security and climate resilience. Plants, 10 (7): 1347. <https://doi.org/10.3390/plants10071347>
- Secgin, Z., M. Kavas & K. Yildirim, 2021. Optimization of Agrobacterium-mediated transformation and regeneration for CRISPR/Cas9 genome editing of commercial tomato cultivars. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 45 (6): 704-716. <https://doi.org/10.3906/tar-2009-49>
- Sentmanat, M. F., S. T. Peters, C. P. Florian, J. P. Connelly & S. M. Pruett-Miller, 2018. A survey of validation strategies for CRISPR-Cas9 editing. Scientific Reports, 8 (1): 888. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19441-8>
- Shan, Q., Y. Wang, J. Li & C. Gao, 2014. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. Nature Protocols, 9 (10): 2395-2410. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.157>
- Svitashev, S., J. K. Young, C. Schwartz, H. Gao, S. C. Falco & A. M. Cigan, 2015. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. Plant Physiology, 169 (2): 931-945. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00793>

- Tang, T., X. Yu, H. Yang, Q. Gao, H. Ji, Y. Wang, G. Yan, Y. Peng, H. Luo & K. Liu, 2018. Development and validation of an effective CRISPR/Cas9 vector for efficiently isolating positive transformants and transgene-free mutants in a wide range of plant species. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1533. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01533>
- Öncü-Öner, T., M. Temel, S. Pamay, A. K. Abaci & H. B. Kaya, 2023. an improved method for efficient DNA extraction from grapevine. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 6 (1): 21-36. <https://doi.org/10.38001/ijlsb.1150387>
- Vouillot, L., A. Thélie & N. Pollet, 2015. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 5 (3): 407-415. <https://doi.org/10.1534/g3.114.015834>
- Wada, N., R. Ueta, Y. Osakabe & K. Osakabe, 2020. Precision genome editing in plants: state-of-the-art in CRISPR/Cas9-based genome engineering. *BMC Plant Biology*, 20: 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02385-5>
- Wan, D., Y. Guo, Y. Cheng, Y. Hu, S. Xiao, Y. Wang & Y.-Q. Wen, 2020. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of VvMLO3 results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine, *Vitis vinifera*. *Horticulture Research*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0339-8>
- Wang, L., H. B. Kaya, N. Zhang, R. Rai, M. R. Willmann, S. C. Carpenter, A. C. Read, F. Martin, Z. Fei & J. E. Leach, 2021. Spelling changes and fluorescent tagging with prime editing vectors for plants. *Frontiers in Genome Editing*, 3: 617553. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.617553>
- Wang, S., S. Zhang, W. Wang, X. Xiong, F. Meng & X. Cui, 2015. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Reports*, 34: 1473-1476. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1816-7>
- Wang, X., M. Tu, D. Wang, J. Liu, Y. Li, Z. Li, Y. Wang & X. Wang, 2018. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. *Plant Biotechnology Journal*, 16 (4): 844-855. <https://doi.org/10.1111/pbi.12832>
- Yang, H., J.-J. Wu, T. Tang, K.-D. Liu & C. Dai, 2017. CRISPR/Cas9-mediated genome editing efficiently creates specific mutations at multiple loci using one sgRNA in *Brassica napus*. *Scientific Reports*, 7 (1): 7489. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07871-9>
- Yin, K., C. Gao & J.-L. Qiu, 2017. Progress and prospects in plant genome editing. *Nature Plants*, 3 (8): 1-6. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.107>
- Zhang, N., H. M. Roberts, J. Van Eck & G. B. Martin, 2020. Generation and molecular characterization of CRISPR/Cas9-induced mutations in 63 immunity-associated genes in tomato reveals specificity and a range of gene modifications. *Frontiers in Plant Science*, 11: 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00010>
- Zhang, Y., J. Su, S. Duan, Y. Ao, J. Dai, J. Liu, P. Wang, Y. Li, B. Liu & D. Feng, 2011. A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant Methods*, 7 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-30>
- Zhao, F., Y.-J. Li, Y. Hu, Y.-R. Gao, X.-W. Zang, Q. Ding, Y.-J. Wang & Y.-Q. Wen, 2016. A highly efficient grapevine mesophyll protoplast system for transient gene expression and the study of disease resistance proteins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 125: 43-57. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0928-7>