

## CRISPR/Cas9 Teknolojisinin Sebze Islahında Kullanımı

Şeyma SÜTÇÜ<sup>1\*</sup>, Gölge SARIKAMIŞ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ziraat Yük. Müh., Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara; ORCID: 0000-0002-0205-6062

<sup>2</sup>Prof. Dr., Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara; ORCID: 0000-0003-0645-9464

### ÖZ

Bitkilerde verim, kalite, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, olumsuz çevre ve toprak koşullarına tolerant yeni çeşitlerin geliştirilmesi öncelikli ıslah hedefleri arasındadır. Özellikle son yıllarda verim ve kalite kaybına neden olan biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı adaptasyon yeteneği yüksek çeşitlerin geliştirilmesi bitki ıslahı açısından önem taşımaktadır. Yeni çeşitlerin geliştirilmesinde klasik ıslah yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, sürecin uzun olması ve yoğun iş gücü gerektirmesi nedeniyle güncel teknolojik yöntemler ıslah programlarına dahil edilerek ıslah sürecinin daha hızlı ve etkin olarak yürütülmesi sağlanmaktadır. Moleküler biyoloji alanında yeni nesil teknolojilerin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte ıslah çalışmaları hız kazanmıştır. Son yıllarda CRISPR/Cas9 yeni nesil genom düzenleme uygulamaları ile genomda hedef bölgeler düzenlenerek bitkilere ıslah amacına yönelik özellikler kazandırılmaktadır. Bu kapsamda hastalık ve zararlılara karşı direncin artırılması, ürün kalitesinin iyileştirilmesi, kuraklık ve tuz stresine karşı tolerant bitkilerin geliştirilmesi başta olmak üzere çeşitli konularda araştırmalar yürütülmektedir. Sunulan çalışmada, CRISPR/Cas9 teknolojisinin bazı sebze türlerinin ıslahında kullanımı güncel araştırma bulguları ışığında değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Islah, CRISPR/Cas9, genom düzenleme

### The Use of CRISPR/Cas9 Technology in Vegetable Breeding

#### ABSTRACT

Development of new varieties with high yield, quality, disease and pest resistance and tolerance to adverse environmental and soil conditions are among the major breeding objectives. In recent years, the development of improved varieties tolerant to biotic and abiotic stress factors that cause yield and quality loss is important for plant breeding. Classical breeding methods are widely used in the development of new varieties. However, since the process is long and labor intensive, current biotechnological methods are included in breeding programs to ensure that the breeding process is carried out faster and more effectively. Breeding studies accelerated with the introduction of new technologies in the field of molecular biology. In recent years, CRISPR/Cas9 next-generation genome editing technologies have been used to edit target genome regions to develop plants with desired traits. In this context, researches are carried out on various breeding objectives such as increasing resistance to diseases and pests, improving product quality, and developing plants tolerant to drought and salt stress. In the present study, the use of CRISPR/Cas9 technology for breeding purposes in some vegetable species was evaluated in the light of current research findings.

**Keywords:** Breeding, CRISPR/Cas9, genome editing

### GİRİŞ

Küresel değişimlerle birlikte, üreticilerin ve tüketicilerin isteklerine uygun yeni çeşitlerin ülkemize kazandırılması ıslah çalışmalarının temel amacını oluşturmaktadır. Artan dünya nüfusu ve beslenme ihtiyacı yüksek verimli çeşitlere, tüketici tercihleri ise kalite özellikleri ve besin değeri yüksek çeşitlere olan gereksinimi artırmaktadır. İklim değişikliğine bağlı olarak etkili olan kuraklık, su baskınları, tuzluluk, sıcaklık gibi uygun olmayan iklim ve toprak koşullarına tolerant, bitkisel üretimi sınırlayan ve önemli verim kayıplarına neden olan hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşitlerin kullanımı

günümüzde ve ilerleyen dönemlerde tarımsal üretimde devamlılığın sağlanması bakımından büyük önem taşımaktadır.

Sebzelerde çeşit geliştirme amacıyla klasik ıslah yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak, klasik yöntemlerle ıslah sürecinin zaman alması, emek gerektirmesi ve yüksek maliyetli olması gibi nedenlerle biyoteknolojik yöntemlere yönelim olmuştur. Moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerin 1990'lı yıllardan sonra hız kazanmasıyla birlikte klasik ıslah programlarının daha etkin olarak yürütülmesi yönünde önemli kazanımlar olmuştur [1]. Moleküler yöntemler bitki ıslah çalışmalarına yönelik olarak, bitkisel gen kaynaklarının genomik

\*Sorumlu yazar / Corresponding author: sseymaalga@gmail.com

düzeyde taranması, genetik mesafelerin belirlenmesi, ıslah amacına yönelik gen/genom bölgelerinin tespiti, bu bölgelerden geliştirilen belirteçler ile seleksiyon (MAS), hibrit bitki ve çeşit tanısı gibi amaçlarla sıklıkla kullanılmaktadır [2].

Son yıllarda genom düzenleme esasına dayanan CRISPR/Cas9 teknolojisinin kullanılmaya başlaması ıslah çalışmalarına ileri bir boyut kazandırmıştır. Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR)/Cas9 teknolojisi, bitkilere verim, kalite, dayanıklılık gibi birçok özelliğin daha hızlı bir şekilde kazandırılması potansiyeline sahiptir [3]. Bu derlemede, yeni nesil CRISPR/Cas9 teknolojisinin sebze türlerinin ıslahında kullanımı güncel literatür bilgileri ışığında değerlendirilmiştir.

### CRISPR/Cas9 TEKNOLOJİSİ VE SEBZE ISLAHINDA KULLANIMI

CRISPR tekrarlayan palindromik dizileri ilk olarak *Escherichia coli* bakterisinde belirlenmiş [4], CRISPR/Cas sistemi ile ilgili kapsamlı araştırma ise Jansen [5] tarafından yürütülmüştür. Tekniğin esası bakterilerin virüslere karşı geliştirdikleri savunma sistemine dayanmaktadır. CRISPR/Cas sisteminin bileşeni Cas proteini DNA'nın her iki iplikçliğini kesebilen bir endonükleazdır. Bitki ıslahında en yaygın kullanılan sistem, *Streptococcus pyogenes*'de belirlenen CRISPR/Cas9 sistemidir. Cas9 proteini, sgRNA (single guide RNA) yardımıyla genomdaki hedef DNA sekansına yönlendirilmektedir. Cas9/sgRNA kompleksinin hedef DNA'ya bağlanması sonucunda Cas9, genomda düzenleme yapılmak istenen bölgede DNA'yı çift iplikli olarak kesmektedir. Böylece hedeflenen genom bölgesinde düzenleme yapılabilmektedir [6]. CRISPR/Cas9 gen düzenleme sisteminin keşfi bitki biyolojisindeki çalışmalara ışık tutmuştur [7]. Birçok kültür bitkisinde CRISPR teknolojisi kullanılarak genom düzenlemeleri yapılmıştır. Pirinçte CRISPR/Cas9 teknolojisi başarıyla uygulanmış ve hedef bölgelerde değişiklik yapmak için sistemin uygulama potansiyelini gösterilmiştir [8]. Soya fasulyesinde Jacobs vd. [9] tarafından teknoloji başarıyla uygulanmıştır. Kolzada (*Brassica napus*) yürütülen araştırma ile CRISPR/Cas9 teknolojisinin kullanımı dört farklı gen ailesinden 12 gende test edilmiştir [10].

Çeşitli bitki türlerinde yürütülen araştırmalarla; herbisitlere dayanıklılık [11], tane verimi [12], biyotik ve abiyotik streslere tolerans [13-16], besinsel özelliklerin iyileştirilmesi [17, 18] gibi verimi ve kaliteyi artırmaya yönelik ıslah çalışmalarında da CRISPR/Cas9 uygulamalarından yararlanılabileceği gösterilmiştir.

Yüksek ekonomik değeri, *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyona uygun olması, sekans bilgisinin bulunması nedeniyle domates, CRISPR/Cas9 uygulamalarının test edilmesi için bir model bitki haline gelmiştir. Domateste CRISPR/Cas9 teknolojisinin uygulama başarısını belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada, gen ifadesi değiştiğinde fenotipe yansıyan ve kolaylıkla belirlenebilen yaprak özelliği hedef gen olarak seçilmiş ve domatesin düz yapraklarının iğne formunda ve kıvrılmış olduğu mutantların olduğu gözlenmiştir [19]. Bu sonuçlar yöntemin domateste başarıyla yürütülebileceğini ortaya koymuştur. Domateste farklı araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalarla bitki büyümesi, yaprak, çiçek ve meyve özellikleri ve olgunlaşma, erkek kısırılığı, likopen içeriği, biyotik ve abiyotik stres gibi çeşitli özellikler bakımından CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılmıştır [20].

### Biyotik Strese Karşı Dayanıklılığının Geliştirilmesi

Biyotik stres faktörleri içerisinde yer alan bakteriler, funguslar ve virüsler birçok hastalığa neden olarak bitkisel üretimde önemli verim ve kalite kayıplarına yol açabilmektedir. Bu hastalıklara karşı dayanıklı çeşit ıslahı, kimyasal mücadeleye olan gereksinimi azaltarak daha etkin ve çevre dostu üretim olanağı sağlamaktadır. Yapılan bir araştırmada, Arabidopsiste belirlenen ve çeşitli hastalıklara karşı dayanım sağlayan DMR6 (downy mildew resistance 6) geninin ortoloğunun (SIDMR6-1) domateste CRISPR/Cas9 teknolojisi ile ufak delesyonlar yaratılarak önemli zararlar yapan *Pseudomonas syringae*, *Phytophthora* ve *Xanthomonas* etmenlerine karşı dayanıklılık sağladığı belirlenmiştir [21].

Domateste önemli bir fungal hastalık olan külemeye dayanım sağlamak amacıyla küleme/mildiyö dayanıklılık lokusu mildew resistance locus O (MLO) hedeflenerek CRISPR/Cas9 teknolojisi ile yaratılan mutasyonla kısa sürede dayanıklılık sağlanmıştır [22].

*Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*), domateste büyük zararlara neden olarak, dünya genelinde domates üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Yapılan bir araştırma ile CRISPR/Cas9 uygulamasıyla domateste *Fusarium* dayanıklılık ile ilgili olduğu düşünülen bir gen tespit edilmiştir [23].

Sebze türlerini enfekte eden bir bitki patojeni olan *Botrytis cinerea*, büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Domateslerde, CRISPR/Cas9 kullanılarak mitojen aktif protein kinazların

(SIMAPK<sub>3</sub>) susturulmasıyla *Botrytis cinerea*'ya karşı dayanıklılık sağlandığı belirlenmiştir [24].

Hıyarda yürütülen bir araştırmada, CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak hıyar sarı damar virüsü, kabak sarı mozaik virüsü ve papaya halkalı leke virüsüne (PRSV-W) karşı dayanıklılık sağlanmıştır [25].

### **Abiyotik Strese Karşı Toleransın Geliştirilmesi**

Bitkilerde büyüme ve gelişimi sınırlandırarak, verim ve kalite kaybına neden olan çevresel kökenli abiyotik stres faktörlerine karşı adaptasyon yeteneği yüksek çeşitlerin ıslahında da yeni nesil teknolojiler önemli avantajlar sunmaktadır. Son yıllarda iklim değişikliğine bağlı küresel ısınmanın etkisi ile kuraklık dünya genelinde tarımsal üretimi etkileyen en önemli faktörlerden birisi olmuştur. Pek çok bitki türünde kurağa toleranslı çeşitlerin geliştirilmesi yönünde araştırmalar sürdürülmektedir. CRISPR/Cas9 teknolojisi kuraklığa tolerans sağlamaya yönelik bir araç olarak araştırmalara konu olmaktadır. Domateste kuraklık ile biyotik ve abiyotik stresle ilişkilendirilen mitojen aktif protein kinazların (SIMAPK<sub>3</sub>) kuraklık stresi altında indüklendiği, CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak geliştirilen mutantlarda kuraklık etkisinin daha şiddetli görüldüğü bu sonuçların mitojen aktif protein kinazların domateste hücre membranlarını oksidatif zarardan koruyarak ve stresle bağlantılı genlerin transkripsiyonunu etkileyerek kuraklık ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir [26].

Diğer önemli bir stres faktörü olan tuzluluğa karşı tolerans sağlanmasına yönelik bir çalışmada, tuz stres tepkisinin negatif regülatörü olan tomato hybrid proline-rich protein 1 (HyPRP1) CRISPR/Cas9 sistemi ile manipüle edilerek elimine edilmesinin çimlenme ve vejetatif dönemde tuza toleransı artırdığı belirlenmiştir [27].

### **Sebzelerde Kalite Özelliklerinin İyileştirilmesi**

Tüketici tercihlerine göre belirlenen kalite özellikleri kapsamında, sebzelerin şekil, irilik, renk, tat ve aroma bileşikleri, hasat sonrası raf ömrü gibi başlıca önemli özellikleri çeşitli araştırmalara konu olmaktadır. Ayrıca, günümüzde gıdaların temel besleyici değerinin yanında içerdikleri çeşitli fitokimyasalların antioksidan aktivite göstererek veya bağışıklık sistemini destekleyerek hastalıklara karşı koruduğu bilinmektedir. Bu kapsamda CRISPR teknolojisinden yararlanarak sebzelerin kalite özelliklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar literatürde yer almaktadır.

CRISPR/Cas9, domateste pembe meyve rengi elde etmek amacıyla kullanılmıştır [20]. Domateste meyve rengi ile ilişkili üç genin (PSY1, MYB12, SGR1) CRISPR/Cas9 aracılığıyla düzenlenmesi

sonucunda kırmızı meyve rengine sahip domatesten sarı, kahverengi, pembe, açık sarı, pembe-kahverengi, sarı-yeşil ve açık yeşil meyve renklerine sahip genotipler elde edilmiştir [28].

Çin lahanasında karotenoid izomeraz geninin (BoaCRTISO) hedeflenerek CRISPR/Cas9 sistemi ile düzenlendiği çalışmada, biallelik ve homozigot mutantlarda karotenoid ve klorofil konsantrasyonunun azaldığı, bu mutantlarda rengin yeşilden sarıya döndüğü belirlenmiştir. Mutantlarda karotenoid ve klorofil biyosentezi ile ilişkili genlerin ifade seviyelerinin belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda CRISPR/Cas9 sisteminin Brassica grubu sebzelerde kalite özelliklerine yönelik kullanım potansiyeli bulunan bir uygulama olduğu belirtilmiştir [29].

CRISPR/Cas9, bitkiler tarafından sentezlenen çeşitli metabolitlerin düzenlenmesi için de kullanılmaktadır. Örneğin patates yumrularında,  $\alpha$ -solanine ve  $\alpha$ -chaconine gibi steroidal glikoalkaloidlerin (SGA'lar) yüksek oranda bulunması patateslerin lezzetlerini etkilemektedir. CRISPR/Cas9 ile patates SGA biyosentetik yolundaki St16DOX (steroid 16 $\alpha$ -hidroksilaz) hedeflenerek SGA içermeyen patates hatları elde edilmiştir [30].

Uzun raf ömrü, ürünlerin kalite özelliklerini kaybetmeden daha uzun süre korunabilmesi bakımından önemlidir. Raf ömrünün uzatılmasına yönelik çalışmalar kapsamında CRISPR/Cas9 teknolojisinin kullanım potansiyelinin değerlendirildiği araştırmalar bulunmaktadır. Domateste meyve olgunlaşmasını regüle eden bir MADS-box transkripsiyon faktörünü kodlayan RIN geninin hedeflendiği uygulamayla RIN-protein eksikliği gösteren mutantlarda meyvelerde olgunlaşmanın tamamlanmadığı, kırmızı renk oluşumunun zayıf olduğu belirlenmiştir [31].

## **SONUÇ**

Bitkisel üretimde klasik ıslah yöntemleri hem zaman alıcı hem de yoğun iş gücü gerektirir. Biyoteknolojik uygulamaların klasik ıslah programlarına entegrasyonu süreci kısaltarak daha etkin olarak yürütülmesini sağlamaktadır. Günümüzde moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerle CRISPR/Cas9 teknolojisi gibi yeni nesil uygulamalar ıslah hedeflerine daha kısa sürede ulaşılabilir olanağını sunmaktadır. Son yıllarda, birçok bitki türünde önemli tarımsal özelliklerle ilişkili genlerin fonksiyonlarının belirlenmesi ve tarımsal özelliklerin iyileştirilmesi amacıyla uygulanmaya başlanmıştır. Küresel ısınmaya bağlı iklim değişikliği, artan dünya nüfusu ve besin

ihtiyacına bağlı olarak hızlı bir biçimde tuzluluk, kuraklık ve sıcaklık stresine tolerant bitkilerin geliştirilmesi amacıyla buğday, pirinç, domates, soya fasulyesi, patates, mısır gibi türlerde CRISPR/Cas9 teknolojilerinden yararlanılmaktadır [32, 30, 33]. Sebze türlerinde ise domateste araştırmaların yoğunlaştığı, bu türün yanı sıra hıyar, bazı lahana grubu sebzeler, marul ve karpuzda yapılan araştırmaların olduğu belirlenmiştir [34]. Sebze türlerinde yürütülen araştırmaların önemli verim artışı, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, çeşitli abiyotik stres faktörlerine tolerans, raf ömrünün uzatılması, meyve şekli, iriliği, besin içeriğinin artırılması, karotenoidler gibi bazı sekonder metabolit üretiminin modifiye edilmesi gibi kalite özelliklerine yönelik yoğunlaştığı belirlenmiştir.

### KAYNAKLAR

1. Tester, M., Langridge, P. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 327:818-822.
2. Collard, B.C.Y., Mackill, D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 363:557-572.
3. Van der Oost, J., Jore, M.M., Westra, E.R., Lundgren, M., Brouns, S.J. 2009. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* 34:401-407.
4. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakamura, A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* 169:5429-5433.
5. Jansen, R., Embden, J.D.V., Gaastra, W., Schouls, L.M. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43:1565-1575.
6. Ding, Y.D., Li, H., Chen, L.L., Xie, K.B. 2016. Recent advances in genome editing using CRISPR/ Cas9. *Frontiers in Plant Science* 7:703.
7. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. 2012. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816-821.
8. Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., Wan, J., Gu, H., Qu, L.J. 2013. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Nature* 23:1233-1236.
9. Jacobs, T.B., LaFayette, P.R., Schmitz, R.J., Parrott, W.A. 2015. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnology* 15:2-10.
10. Yang, H., Wu, J.J., Tang, T., Liu, K.D., Dai, C. 2017. CRISPR/Cas9-mediated genome editing efficiently creates specific mutations at multiple loci using one sgRNA in *Brassica napus*. *Nature* 7:1-13.
11. Sun, Y., Zhang, X., Wu, C., He, Y., Ma, Y., Hou, H., Xia, L. 2016. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Molecular Plant* 9:628-631.
12. Zhou, J., Xin, X., He, Y. 2019. Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties. *Plant Cell Reports* 38:475-485.
13. Pyott, D.E., Sheehan, E., Molnar, A. 2016. Engineering of CRISPR/Cas9 mediated potyvirus resistance in transgene free *Arabidopsis* plants. *Molecular Plant Pathology* 178:1276-1288.
14. Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H.R., Archibald, R.L., Yang, M., Habben, J.E. 2017. Argos 8 variants generated by CRISPR Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal* 15:207-216.
15. Xu, Z.S., Yang, Q.Q., Feng, K., Xiong, A.S. 2019. Changing carrot color: insertions in DcMYB7 alter the regulation of anthocyanin biosynthesis and modification. *Plant Physiology* 18:195-207.
16. Ren, C., Liu, X., Zhang, Z., Wang, Y., Duan, W., Li, S., Liang, Z. 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Scientific Reports* 6:1-9.
17. Sun, Y., Jiao, G., Liu, Z., Zhang, X., Li, J., Guo, X., Xia, L. 2017. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Frontiers in Plant Science* 8:298.
18. Dong, O.X., Yu, S., Jain, R., Zhang, N., Duong, P.Q., Butler, C., Ronald, P.C. 2020. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9. *Nature Communications* 11:1-10.
19. Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z.B., Van Eck, J. 2014. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated system. *Plant Physiology* 166:1292-1297.
20. Deng, L., Wang, H., Sun, C., Li, Q., Jiang, H., Du, M., Li, C.B., Li, C. 2018. Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 system. *Journal of Genetics and Genomics* 45:51-54.

21. Paula de Toledo Thomazella, D., Brail, Q., Dahlbeck, D., Staskawicz, B. 2016. CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance Proceedings of the National Academy of Sciences 118(27):e2026152118.
22. Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D., Kamoun, S. 2017. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. Scientific Reports 7:1-6.
23. Prihatna, C., Barbetti, M.J., Barker, S.J. 2018. A Novel Tomato Fusarium Wilt Tolerance Gene. Frontiers in Microbiology 9:1226.
24. Zhang, S., Wang, L., Zhao, R., Yu, W., Li, R., Li, Y., Sheng, J., Shen, L. 2018. Knockout of SIMAPK3 reduced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 34:8949-8956.
25. Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T., Gal-On, A. 2016. A. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. Molecular Plant Pathology 17:1140-1153.
26. Wang, L., Chen, L., Li, R., Zhao, R., Yang, M., Sheng, J., Shen, L. 2017. Reduced drought tolerance by CRISPR/Cas9-mediated SIMAPK3 mutagenesis in tomato plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 65:8674-8682.
27. Tran, M.T., Doan, D.T.H., Kim, J., Song, Y.J., Sung, Y.W., Das, S., Kim, E.J., Son, G.H., Kim, S.H., Van Vu, T., Kim, J.Y. 2020. CRISPR/Cas9-based precise excision of SlHyPRP1 domain(s) to obtain salt stress-tolerant tomato. Frontiers in Plant Science 999:10-11.
28. Yang, T., Ali, M., Lin, L., Li, P., He, H., Zhu, Q., Sun, C., Wu, N., Zhang, X., Huang, T., Li, C-B., Li, C., Deng, L. 2023. Recoloring tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex gene editing. Horticulture Research 10:1-6.
29. Sun, B., Jiang, M., Zheng, H., Jian, Y., Huang, W.L., Yuan, Q., Zheng, A.H., Chen, Q., Zhang, Y.T., Lin, Y.X. 2020. Color-related chlorophyll and carotenoid concentrations of Chinese kale can be altered through CRISPR/Cas9 targeted editing of the carotenoid isomerase gene *BoaCARTISO*. Horticulture Research 7:161.
30. Nakayasu, M., Akiyama, R., Lee, H.J., Osakabe, K., Osakabe, Y., Watanabe, B., Sugimoto, Y., Umemoto, N., Saito, K., Muranaka, T. 2018. Generation of  $\alpha$ -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the *St16DOX* gene. Plant Physiology and Biochemistry 131:70-77.
31. Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Mikami, M., Toki, S. 2015. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. Biochemical and Biophysical Research Communications 467:76-82.
32. Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J.J., Qiu, J.L. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nature Biotechnology 31:686-688.
33. Chilcoat, D., Liu, Z.B., Sander, J. 2017. Use of CRISPR/Cas9 for crop improvement in maize and soybean. progress in molecular biology and translational science. Progress in Molecular Biology and Translational Science 149:27-46.
34. Karkute, S.G., Singh, A.K., Gupta, O.P., Singh, P.M., Singh, B. 2017. CRISPR/Cas9 mediated genome engineering for improvement of horticultural crops. Frontiers in Plant Science 8:1635.