



BİTKİ ISLAHINDA CRISPR/CAS9 UYGULAMALARI

Anıl Mehmet BALTACI^{1*} Mehmet ARSLAN²

¹ Kayseri Şeker Fabrikası A.Ş. AR-GE Birimi, Kayseri, Türkiye

² Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kayseri, Türkiye

*sorumlu yazar: anbltc@gmail.com

Derleme

Yayın Bilgisi

Geliş Tarihi: 15.12.2020

Revizyon Tarihi: 21.12.2020

Kabul Tarihi: 21.12.2020

Anahtar Kelimeler

TALEN, ZFN, biyotik stres, abiyotik stres, genom düzenleme

Keywords

TALEN, ZFN, biotic stress, abiotic stress, genome editing

Özet

Bitkiler için genom sekanslarının mevcudiyeti ve genom düzenleme teknolojisindeki ilerlemeler, hemen hemen her türlü tarımsal karakter açısından ıslah olanaklarını artırmıştır. ZFN (Zinc Finger Nucleas) ve TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) gibi genom düzenleme teknolojilerindeki gelişmeler moleküler düzeyde ilgilenilen herhangi bir genin düzenlenmesini mümkün kılmıştır. Bunların aksine CRISPR / Cas9 genom düzenleme yöntemi basit tasarım ve kolay klonlama yöntemlerini içermektedir. Cas9 genomdaki birden fazla bölgeyi hedefleyen farklı kılavuz (guide) RNA'lar ile farklı birden fazla gen bölgesine müdahale edilebilmektedir. CRISPR-Cas9 modülünde hedef özgüllüğünü geliştirmek ve hedef dışı bölünmeyi azaltmak için birkaç farklı modifiye Cas9 kaseti kullanılmaktadır. Ayrıca farklı bakteri türlerinden elde edilen Cas9 enzimlerinin mevcudiyeti gen düzenleme yöntemlerinin özgüllüğünü ve verimliliğini artırmak için yeni seçenekler sunmaktadır. Bu çalışmada, CRISPR/Cas9 temelli genom düzenleme tekniğinin bitki ıslahında mevcut durumu özetlenmekte ve CRISPR/Cas9'un biyotik ve abiyotik stres toleransını artırmak için kullanıldığı çalışmalar sunulmaktadır.

CRISPR / Cas9 Applications In Plant Breeding

Abstract

The availability of genome sequences for plants and advances in genome editing technology have increased breeding possibilities for virtually every agricultural character. Advances in genome editing technologies such as ZFN (Zinc Finger Nucleas) and TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) have made it possible to edit any gene of interest at the molecular level. On the contrary, the CRISPR / Cas9 genome editing method includes simple design and easy cloning methods. With different guide RNAs targeting more than one region in the Cas9 genome, multiple different gene regions can be intervened. Several different modified Cas9 cassettes are used in the CRISPR-Cas9 module to improve target specificity and reduce non-target cleavage. In addition, the availability of Cas9 enzymes from different bacterial species offers new options to increase the specificity and efficiency of gene editing methods. In this study, the current state of the CRISPR / Cas9 based genome editing technique in plant breeding is summarized and studies using CRISPR / Cas9 to increase biotic and abiotic stress tolerance are presented.

1. GİRİŞ

İnsanlığın karşılaştığı en kritik zorlukların başında büyüyen nüfus için gıda güvenliğini sağlamak bulunmaktadır. 2050 yılına kadar insan nüfusu 10 milyara ulaşacak ve dünyayı beslemek için küresel gıda üretiminin %60-100 oranında artması gerekecektir (Jaganathan ve ark., 2018). Artan nüfus oranının yanı sıra, ekstrem hava koşulları, azalan tarım arazisi mevcudiyeti, artan biyotik ve abiyotik stresler tarımsal üretim için önemli kısıtlamalardır. Bitki ıslahına katkıda bulunabilecek teknolojilerin geliştirilmesi, üretimi önemli ölçüde artırabilir. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik (T-DNA ekleme / transpozonlar) mutagenesis kullanan genetik manipülasyon teknikleri, genlerin çalışılmasına ve bitki türlerinin iyileştirilmesi için biyolojik mekanizmaların belirlenmesinde büyük ölçüde katkıda bulunmuştur (Ma ve ark., 2016). Geçtiğimiz 30 yıldır, transgenik teknikler temel bitki biyolojisini anlamak ve bitkilerin iyileştirilmesi için kullanılmıştır.

Son yıllarda SSN (site-specific nuclease) genom düzenleme teknolojilerinin kullanımı hem hayvan hem de bitki sistemlerinde kesin olarak gen düzenlenmesinin yapılabileceğini göstermiştir. Bu SSN'ler hedef DNA'da çift sarmallı kırılmalar (DSB: double-stranded breaks) oluşturur. DSB'ler, homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ: non-homologous end joining) veya homoloji odaklı rekombinasyon (HDR: homology-directed recombination) yoluyla onarılır ve hedef bölgede/bölgelerde sırasıyla insersiyon (ekleme) / delesyon (silme) (INDELS) ve ikame mutasyonları ile sonuçlanır (Jinek ve ark., 2012). Rastgele eklemelere ve çoğunlukla rastgele fenotiplere yol açan transgenik yaklaşımın aksine genom düzenleme yöntemleri, tanımlanmış mutantlar üretmektedir ve böylece bitki ıslahında güçlü bir araç haline gelmiştir. Genomu düzenlenmiş bitkiler, istenen özellik için düzenlenmiş DNA'ları taşıdıkları için transgenik bitkilere göre avantaja sahiptir (Malzahn ve ark., 2017). Bu tür iyileştirilmiş bitkiler ıslah programlarında kullanılabilir ve ortaya çıkan çeşitler, geleneksel genetiği değiştirilmiş bitkilere kıyasla daha az tüketim sorunları oluştur ve nispeten daha az düzenleyici prosedürlerle doğrudan kullanılabilir (Waltz, 2018).

Bu derleme, CRISPR / Cas9 gibi ikinci nesil genom düzenleme tekniklerinin, ZFN ve TALEN gibi birinci nesil genom düzenleme araçlarına göre avantajlarını ve CRISPR / Cas9 uygulamalarını tartışmaktadır.

2. TASARLANMIŞ NÜKLEAZLAR – YENİ GENOM DÜZENLEME DÖNEMİ

Tasarlanmış nükleazlar, bir diziyeye özgü DNA bağlanma alanına yapışma özelliğinde olan ve spesifik olmayan nükleaz alanı içermektedir. Bu tür nükleazlar, hedeflenen geni kesin olarak bölebilir ve kırılmalar NHEJ veya HDR ile onarılabilir. Bu işleme "genom düzenleme" denilmektedir (Gaj ve ark.,

2013). Meganükleazları, ZFN'leri ve TALEN'leri kullanan birinci nesil genom düzenleme teknolojileri, hedef spesifikliğe ulaşmak için zahmetli prosedürler içerir ve zaman alıcıdır. Buna karşılık, CRISPR / Cas9 dahil olmak üzere ikinci nesil genom düzenleme teknikleri daha az zaman ve maliyet, daha kolay tasarım ve uygulama yöntemlerini içermektedir. ZFN hem hayvan hem de bitki sistemlerinde uzun zamandır genom düzenleme için yaygın olarak kullanılmaktadır (Govindan ve Ramalingam, 2016). ZFN genom düzenleme teknolojisi, düşük hedef özgüllükleri, hedef dışı bölünmeleri ve sınırlı sayıda hedef bölgeleri bulunması nedeniyle daha az tercih edilmektedir (Chen ve Gao, 2013). TALEN genom düzenleme teknoloji, istenen hedef tanıma için transkripsiyon etkinleştirici benzeri efektör (TALE) alan tekrarlarını değiştirerek tasarlanır ve daha sonra FokI nükleaz ile birleştirilerek hedef genom düzenlemesi için uygun bir TALEN elde edilir. Tasarlanmış TALEN'ler 18–20 bp'lik uzunluktaki bölgeyi tanımaktadır (Stephens ve Barakate, 2017). TALEN'ler, uzunluklarından dolayı ZFN'lere kıyasla daha yüksek hedef bağlanma özgünlüğünü gösterir. Bununla birlikte, başlangıç pozisyonunda bir timin bazının gerekliliği ve büyük boyutu nedeniyle, TALEN'lerin tasarlanması ve sentezlenmesi zordur. TALEN'ler, Arabidopsis (Cermak ve ark. 2011), çeltik (*Oryza sativa*) (Li ve ark., 2012), tütün (*Nicotiana tabacum*) (Zhang ve diğerleri, 2013) ve *Brachypodium* (Shan ve ark., 2013) gibi bitkilerde genom düzenleme için kullanılmıştır.

2.1. CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats)

CRISPR / Cas9 gen düzenleme sisteminin keşfi, hayvan ve bitki biyolojisindeki araştırmalarda devrim yaratmıştır ve genom düzenlemedeki faydası ilk olarak 2012'de memeli hücrelerinde gösterilmiştir (Jinek ve ark., 2012). ZFN ve TALEN genom düzenleme sistemlerinden farklı olarak, CRISPR genom düzenlemesi daha basittir ve hedef gen içindeki DNA uzantısını tamamlayan yaklaşık 20 nükleotidden oluşan bir kılavuz RNA (gRNA) içermektedir. CRISPR isimlendirmesi ilk olarak Jansen ve arkadaşları tarafından 2002'de tanımlanmıştır ve *Escherichia coli* iap (inhibitor of apoptosis) genlerinde gözlemlenen tekrarlayıcı olmayan DNA uzantıları ile çevrili ardışık tekrarları ifade etmektedir (Ishino ve ark., 1987). 2005 yılında, bu tekrar etmeyen dizilerin, plazmitlerden ve fajlardan türetilen yabancı DNA dizileriyle homolog olduğu bulunmuştur. Homolojiye bağlı bölünme mekanizması genom düzenleme için araştırılmıştır ve CRISPR / Cas9 bölünme teknolojisi ümit verici bir genom düzenleme aracı haline gelmiştir (Mojica ve ark., 2005; Liu ve ark., 2017). CRISPR yöntemi, hedef DNA'ya bağlanan 20 nükleotidden oluşan kısa bir sentetik gRNA dizisi ve genellikle 50 NGG olan PAM (protospacer-associated motif) bölgesinden sonra 3–4 baz kesim bölgesi olan Cas9 nükleaz enzimi gerektirmektedir (Jinek ve ark., 2012). Cas9 nükleazı RuvC benzeri bir bölge ve bir HNH

bölgesi olmak üzere iki bölgeden oluşmaktadır ve her bölge bir DNA ipliğini kesmektedir. Bir CRISPR projesinin uygulanması hedef gendeki PAM sekansının belirlenmesi, tek klavuz RNA'nın (sgRNA) sentezlenmesi, sgRNA'nın uygun bir binary vektöre klonlanması, konakçı türe aktarılması ve düzenlenen parçanın taranması ve doğrulanması gibi basit adımlar içermektedir. CRISPR / Cas9 aracılı genom düzenlemede yer alan basit adımlar, genom düzenleme projelerini gerçekleştirmek için bitki genom düzenlenmesi yapılan küçük laboratuvarlarda bile uygulanmasına izin vermektedir (Jaganathan ve ark., 2018). CRISPR / Cas9 teknikleri, son beş yılda bitki genomlarını düzenlemek için ZFN ve TALEN'e kıyasla daha kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır ve bu da kullanım kolaylığını yansıtmaktadır. Bununla birlikte bitkilerde genom düzenlemesi Arabidopsis, çeltik ve tütün gibi model organizmalarda gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2013).

3. BİTKİLERDE GEN DÜZENLEME İÇİN CRISPR / CAS9 VEKTÖRLERİ

Hedeflenen hücre içindeki Cas9 ve sgRNA ekspresyonu, bitki genomlarını modifiye etmek için yeterlidir. Bitkiye özgü RNA polimeraz III promotörleri [(tU6 (Arabidopsis); TaU6 (buğday); OsU6 veya OsU3 (çeltik)], bitkilerde Cas9 ve gRNA'yı eksprese etmek için kullanılmaktadır. Bitkilerde Cas9 veya Cas9 varyantlarını ve gRNA'ları eksprese etmek için ticari olarak temin edilebilen birkaç vektör vardır. Addgene, şu anda binary vektörlerde 30'dan fazla boş gRNA omurgasını (backbones) kullanıma sunabilen, plazmidler için küresel, kâr amacı gütmeyen bir havuzdur. Boş gRNA omurgaları (backbones), bitki RNA polimeraz III destekleyicisine ve gRNA'yı ekleyebileceği gRNA scaffoldlarını içermektedir (Jaganathan ve ark., 2018).

3.1. sgRNA Ekspresyon Kasetleri

Tipik bir sgRNA 98 nükleotid içermektedir (20 nt hedef sekans dahil) ve Cas9 / sgRNA nükleaz kompleksinde bir klavuz olarak işlev görmektedir (Nishimasu ve ark., 2014). Bitkilerdeki sgRNA'ların ekspresyonu genellikle U3 veya U6 küçük nükleer RNA gen promotörleri tarafından yönlendirilmekte ve sgRNA'lar, RNA polimeraz III tarafından kopyalanmaktadır (Jiang ve ark., 2013; Li ve ark., 2013; Nekrasov ve ark. 2013; Shan ve ark., 2013). sgRNA ekspresyon kasetleri küçük olduğundan (300-600 bp), hedef sekanslarla sgRNA ekspresyon kasetlerini oluşturmak için hedef adaptör ligasyonu veya over-laping PCR kullanılabilir (Li ve ark., 2013; Mao ve ark., 2013; Shan ve ark., 2013; Xie and Yang, 2013; Ma ve ark., 2015b). Ma ve ark. (2015b) sgRNA ekspresyon kasetlerini hızlı bir şekilde hazırlamak için PCR temelli, orta düzeyde klonlamasız bir strateji tasarlamışlardır ve bu kasetler, Golden Gate klonlaması veya Gibson montajı ile CRISPR / Cas9 binary vektörlerine doğrudan klonlanmaktadır. Başka bir strateji ise RNA polimeraz

II tarafından kopyalanan bir pre-RNA'yı işleyerek işlevsel sgRNA üretmek için ribozim sistemini kullanmaktadır. Bu sayede düzenli dokuya özgü sgRNA'ları ifade etmek için bu sistem kullanılabilir (Gao ve Zhao, 2014).

3.2. Cas9 Ekspresyon Kasetleri

Cas9'un orijinal kodlama dizisi 4107 bp uzunluğundadır. Ökaryotlarda, Cas9'un nükleer lokalizasyonu, Cas9 kodlama dizisine tekli veya ikili bir NLS (nuclear localization signal) füzyonunu gerektirmektedir. Çeltik ve diğer buğdaygillerde buğdaygiller genlerini taklit eden yüksek bir düzenleme etkinliğine sahip kodon ile optimize edilmiş Cas9 geni (Cas9p) kullanılmaktadır (Wong ve ark., 2002). Bununla birlikte, bitkilerdeki bazı uygulamalarda bitki olmayan türler için optimize edilmiş Cas9 kodonu kullanılmıştır. Ancak düzenleme verimliliğinin bitki için optimize edilmiş yöntemlerden nispeten daha düşük olabildiği bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2013; Mao ve ark., 2013; Nekrasov ve ark., 2013; Xie ve Yang, 2013; Lawrenson ve ark., 2015). Genel olarak mısır, çeltik ve Arabidopsis Ubiquitin geni ve Karnabahar mozaik virüsü (CaMV) 35S gibi promotörler, kallus bazlı transformasyon yöntemlerinde etkili genom düzenlemesine aracılık etmek için monokot ve dikot bitkilerde Cas9 genini çalıştırma gereksinimini karşılayabilmektedirler. Çoğu durumda, daha güçlü Ubiquitin promotörleri, CaMV 35S promotöründen daha yüksek düzenleme verimliliğine sahiptir (Ma ve ark., 2016).

3.3. Cas9 ve sgRNA İfade Kasetlerinin Bitki Hücrelerine Gönderilmesi

İn vivo genom düzenlemesine aracılık etmek için, Cas9 ve sgRNA ekspresyon kasetlerini taşıyan vektör yapılarının bitki hücrelerine iletilmesi gerekmektedir. CRISPR / Cas9 sisteminin uygulanabilirliğini ve verimliliğini doğrulamak için, araştırmacılar genellikle Cas9 ve sgRNA ekspresyon kasetlerini taşıyan plazmidleri protoplastlara veya tütün, Arabidopsis yapraklarına vakum infiltrasyonu yöntemini kullanmışlardır (Jiang ve ark., 2013). Cas9 kasetleri ve sgRNA kasetleri, ayrı veya tekli yapılarda düzenlenebilir (Jiang ve ark., 2013; Li ve ark., 2013; Nekrasov ve ark., 2013; Shan ve ark., 2013; Xie ve Yang, 2013).

Cas9 ve sgRNA ekspresyon yapılarını bitki genomlarına entegre etmek ve kalıtsal mutasyonlar üretmek için kallus ve olgunlaşmamış embriyoların biyolistik dönüşümü kullanılabilir (Shan ve ark., 2013). Biyolistik dönüşüm ayrıca in vitro sentezlenmiş sgRNA'yı doğrudan Cas9 ile dönüştürülmüş bitki hücrelerine iletebilir ve hedeflenen mutasyonları indükleyebilmektedir (Svitashev ve ark., 2015).

Agrobacterium aracılı transformasyon yöntemi birçok bitki için en etkili yöntem olduğundan, bitkilerdeki CRISPR / Cas9 uygulamalarının çoğu

hem Cas9 hem de sgRNA ekspresyon kasetlerini taşıyan T-DNA'ları bitki genomlarına entegre etmek için bu yöntem kullanılmaktadır. Arabidopsis'in genom düzenlemesi için genellikle Agrobacterium aracılı 'Floral dip transformasyon' yöntemi kullanılmaktadır. Çeltik, mısır, tütün, domates, patates ve kavak gibi diğer monokot ve dikot bitkiler için CRISPR / Cas9 ile genom düzenleme için genellikle kallus, olgunlaşmamış embriyolar veya diğer dokuların Agrobacterium ile transformasyonu kullanılmaktadır. Ayrıca agroinfiltrasyon yaklaşımı sgRNA ekspresyon kaseti taşıyan tütün çingirak virüsü DNA'sını Cas9 ile genomu düzenlenmiş tütün elde etmek için kullanılmıştır (Yin ve ark., 2015; Ali ve ark., 2015).

4. BİTKİLERDE MULTİPLEKS GENOM HEDEFLERİ STRATEJİLERİ

Bitkilerdeki birden çok genomik bölgenin eşzamanlı olarak düzenlenmesinin, birden çok ilgili genin incelenmesi, işlevsel olarak fazlalık genlerin susturulması ya da bitki ıslahında birden çok özelliğin genetik iyileştirilmesi gibi pek çok uygulaması bulunmaktadır. Daha önce belirtildiği gibi, CRISPR / Cas9 temelli genom düzenleme yöntemi, kararlı genomu düzenlenmiş bitkiler elde etmek için çoğunlukla Agrobacterium aracılı dönüşüme bağlıdır. Ayrıca, Agrobacterium ile bitkiye birden fazla T-DNA'nın ayrı binary vektörlerden birlikte aktarılması zor ve kontrol edilmez bir durumdur (Hiei ve Komari, 2008). Bu nedenle, birden çok sgRNA ekspresyon kasetini tek CRISPR / Cas9 binary yapıları halinde birleştirmek için birkaç strateji geliştirilmiştir.

Geleneksel olarak sgRNA kasetlerini bir vektöre eklemek için sıralı uyumlu palindromik yapışkan uçlar veren birden fazla restriksiyon enzimi kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2015; Wang ve ark. 2015). Bu geleneksel klonlama yöntemi ile CRISPR / Cas9 binary vektörlerine yalnızca birkaç sgRNA ekspresyon kaseti klonlanabilir. Bu işlem yavaş ve zaman alıcıdır. Golden Gate klonlama yöntemi, birden çok DNA parçası arasında sıralı uyumlu, palindromik olmayan yapışkan uçlar oluşturmak için BsaI gibi ayırt edici tip II restriksiyon enzimleri kullanılmaktadır. Bu nedenle Golden Gate klonlama, belirli bir genom düzenlemede birden çok DNA parçasını aynı anda ve verimli bir şekilde bağlayabilmektedir (Engler ve ark., 2008). Bu klonlama yöntemine dayanarak, CRISPR / Cas9 binary yapılarını çoklu PCR ile hazırlanmış sgRNA ekspresyon kasetleriyle oluşturmak için iki set CRISPR / Cas9 vektör sistemi geliştirilmiştir (Xing ve ark., 2014; Ma ve ark., 2015b). 'Gibson Assembly' yöntemi, T5 eksonükleaz, Phusion DNA polimeraz ve Taq DNA ligazın uyumlu etkilerini kullanarak birden çok DNA parçasını homolog uçlarla verimli bir şekilde birleştirebilmektedir (Gibson ve ark., 2009). Bu yöntem CRISPR / Cas9 binary vektörlerine tek reaksiyonda birden fazla sgRNA ekspresyon kasetini birleştirmek için kullanılmıştır (Ma ve ark. 2015b).

5. HEDEFLenen MUTASYONLARIN ANALİZİ

Yeni kurulan bir CRISPR / Cas9 vektör sistemini doğrulamanın veya kurulan CRISPR / Cas9 sistemini yeni bir bitki türüne uygulamanın ilk adımı, düzenleme verimliliğini belirlemek olmalıdır. Buna ek olarak sonuçta ortaya çıkan mutantların genotipi daha fazla çalışma yapılmadan önce belirlenmelidir. Bu durum hedeflenen mutasyonların tespitini ve mutasyona uğramış gen bölgelerinin dizilenmesini gerektirmektedir.

5.1. Hedeflenen Mutasyonları Doğrulamak İçin Haberci (Rapoter) Genlerini Kullanma

Yeni kurulmuş bir CRISPR / Cas9 vektör sisteminin işlevini hızlı bir şekilde doğrulamak için, b glukuronidaz veya bir floresan proteini (GFP, YFP veya RFP) kodlayan genler gibi haberci genler, genom düzenlemesinin bir göstergesi olarak kullanılabilir. Örneğin, haberci genler bir çerçeve kaymasına neden olan hedef bölge içerecek şekilde tasarlanabilmektedir ve hedefin Cas9 / sgRNA kompleksi tarafından mutasyonunun işlevini eski haline getirmek için genin okuma çerçevesini düzeltebilmektedir (Jiang ve ark., 2013; Feng ve ark., 2014).

5.2. Hedeflenen Mutasyonları Doğrulamak İçin Endonükleazları Kullanma

Hedefin Cas9 / sgRNA kompleksi bir restriksiyon enzim bölgesini içerecek şekilde tasarlanırsa hedeflenen mutasyonlar restriksiyon enzim bölgesini yok edebilmektedir. Bu nedenle, PCR amplifikasyonundan önce veya sonra restriksiyon kesimi, mutasyona uğramış sekansları zenginleştirebilmektedir (Lloyd ve ark., 2005; Voytas, 2013). Hedeflenen mutasyonların varlığını belirlemek ve düzenleme etkinliğini ölçmek için bu yöntemden pek çok çalışmada faydalanılmıştır. Bununla birlikte, bu strateji, hedef dizileri, bir restriksiyon enzim bölgesi içeren dizilerle sınırlamaktadır (Jiang ve ark., 2013; Nekrasov ve ark., 2013; Shan ve ark., 2013; Xie ve Yang, 2013).

5.3. Hedeflenen Mutasyonları Belirlemek İçin Yüksek Verimli Sekanslama Kullanma

Tüm genomun veya tekli / çoklu PCR amplikonlarının yüksek verimli dizilenmesi (deep sequencing) özellikle tüm genom üzerindeki olası hedef dışı mutasyonları tanımlamak için ve nadir (düşük frekanslı) mutasyonları ve karmaşık kimerik (çoklu) mutasyonları tespit etmek için uygundur (Fauser ve ark., 2014; Feng ve ark., 2014). Ancak bu strateji maliyetli ve zaman alıcıdır.

5.4. Hedeflenen Mutasyonları Belirlemek İçin Sanger Sekanslama Kullanma

Hedeflenen bölgeleri içeren bir PCR amplikonu, birden fazla klonun Sanger sekanslamasıyla (tek tip mutasyonlar için yaklaşık beş klon [bir bitkinin tüm hücreleri aynı mutasyona sahiptir] veya bir bitkinin

somatik hücrelerinde kimerik [çoklu] mutasyonlar için 10'dan fazla klon) klonlanabilmektedir ve incelenebilmektedir. Bölünme bölgesinde bir restriksiyon bölgesi mevcutsa, mutant DNA, restriksiyon enzimi kesim yöntemi kullanılarak zenginleştirilebilir (Shan ve ark., 2013). Bu strateji, basit mutasyonları veya karmaşık kimerik mutasyonları belirlemek için kullanışlıdır ancak pahalıdır (Ma ve ark., 2016).

Çeltik gibi bazı bitki türlerinde CRISPR / Cas9 temelli genom düzenleme yöntemi oldukça etkilidir ve ilk nesilde yüksek oranlarda tek tip mutasyonlar üretebilmektedir (Zhang ve ark., 2014; Zhou ve ark., 2014; Ma ve ark., 2015b). Mutasyonların varlığını saptamak için PCR amplikonları bitkilerdeki gerçek nükleotid varyasyonlarını belirlemek için doğrudan dizilenebilmektedir. Ancak bir plazmit içerisine klonlanmadan bialellik ve heterozigot mutasyonları içeren PCR amplikonlarının doğrudan dizilenmesi üst üste yerleştirilmiş sekanslama kromatogramları ile sonuçlanır. Bu sorunu çözmek için, dejenere dizi kod çözme (DSD [degenerate sequence decoding]) (Ma ve ark., 2015a) adı verilen bir yöntemle ve onun web temelli aracı DSDecode (<http://dsdecode.scgene.com/>) (Liu ve ark., 2015) ile mutasyona uğramış allelik dizileri üst üste yerleştirilmiş kromatogramları dizileme dosyalarından (ab1 formatı) hızlı bir şekilde belirleyebilmektedir. Böylece multiklon (çoklu klon) dizilemeleri çözümlenebilen bu araç hedeflenen bölgelerin analizini büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır (Ma ve ark., 2016).

6. BİTKİ ISLAHINDA CRISPR

CRISPR / Cas9 gen düzenleme yöntemi verim iyileştirme ve biyotik ve abiyotik stres yönetimi başta olmak üzere çeşitli özellikler için yaklaşık 20 bitki türünde kullanılmıştır (Ricoch ve ark., 2017). Yayınlanan makalelerin çoğu, CRISPR / Cas9 sisteminin abiyotik veya biyotik strese tolerans mekanizmalarında önemli rol oynayan belirli genleri devre dışı bırakarak uygulandığını tanımladıkları için kavram kanıtı çalışmalar olarak kabul edilmektedir. Patojenik mikroorganizmalar tarafından uygulanan biyotik stres, hastalığa dayanıklı bitkilerin gelişiminde ciddi zorluklar ortaya çıkarır ve potansiyel verim kaybının %42'sinden fazlasını oluşturur ve gıda üretimindeki küresel düşüşlerin %15'ine neden olmaktadır. (Oerke, 2005). CRISPR / Cas9 temelli genom düzenleme, bitki hastalıklarına karşı direnci artırmak ve ayrıca kuraklık ve tuzluluk gibi büyük abiyotik streslere karşı toleransı iyileştirmek için kullanılmıştır.

6.1. Monokotlar

Çeltik dünya nüfusunun yarısından fazlası için önemli bir temel gıda bitkisidir. Küçük genom boyutu nedeniyle iyi incelenmiştir ve monokotlar için önemli bir model organizmadır. Çeltik genomu, bol miktarda potansiyel PAM bölgesi içermektedir (Xie ve Yang, 2013). Bu nedenle CRISPR teknolojisi çeltik

genomundaki herhangi bir ilgi alanını hedeflemek için potansiyel olarak kullanılabilir durumdadır.

Çeltikte ilk kez çeşitli abiyotik streslere karşı rol alan Fitoen desaturaz (OsPDS), betain aldehit dehidrogenaz (OsBADH2) ve mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (OsMPK2) isimli üç genin hem protoplastta hem de kalluslara parikül bombardımanı yapılarak gen dizisine özgü CRISPR/Cas9 temelli genomik modifikasyonu yapılmıştır ve herhangi bir bitki türünde de yapılabileceği gösterilmiştir. OsPDS ve OsBADH2 için gen düzenleme oranlarının yaklaşık %7-9 olduğu gözlemlenmiştir (Shan ve ark., 2013). Xie ve Yang (2013) çeltikte, pRGE3 ve pRGE6'da genom düzenlemesi için uygun iki vektör geliştirerek rehber RNA (gRNA) ile genom düzenleme yapılabileceğini göstermişlerdir. Üç adet gRNA kullanılarak mutagenез oluşturmak için biyotik ve abiyotik streslerin negatif regülatörü olan OsMPK5 seçilmiştir ve çeltik protoplastlarında test edilmiştir. Bu test sonucunda daha hassas bir gRNA tasarımı yapıldığında düşük seviyede hedef dışı mutagenез oluşumunun gerçekleştiği bildirilmiştir. Hedef dışı mutasyon olmayan veya 1 bp hedef dışı mutasyon içeren çeşitli genler için T0 neslinde mutasyon oranlarında geniş bir varyasyon (%21-66) gözlemlenmiştir ve T2 neslinde homozigot mutantların %11' olduğu belirlenmiştir. Herbisite dayanıklılık genin baz düzenleme işlemi DSB'ler eklenmeden önce sitidin deaminaz ile kaynaşmış dCas9 (dead Cas9) 'un kullanıldığı aktivasyonla uyarılan sitidin deaminaz yöntemi kullanılarak mümkün olmuştur (Shimatani ve ark., 2017). Benzer şekilde çeltik, buğday ve mısırdaki hassas bir genom düzenlemesinin yapılabileceği gösterilmiştir (Zong ve ark., 2017). Li ve ark. (2017) BE3 baz düzenleme yöntemini kullanarak çeltikteki OsPDS ve OsSBEIIb genlerinin baz düzenlemelerini gerçekleştirmişlerdir. BE3 baz düzenleyici, çentikli cas9 (cas9'da bir D10 mutasyonu), sitozin deaminaz ve urasil glikozilaz inhibitörünü (UGI) birleştiren gelişmiş bir genom düzenleme aracıdır (Jaganathan ve ark., 2018). Bu çalışma, çeltikte temel düzenlemenin başarılı bir şekilde uygulandığını göstermiştir. Potansiyel olarak sınırsız sayıda genin multipleks genom düzenlemesi artık CRISPR / Cas9 ile kolaylaştırılmıştır ve çeltik ve Arabidopsis'te gösterilmiştir (Lowder ve ark. 2015; Zhang ve ark., 2016; Shen L. ve ark., 2017). Shen L. ve ark. (2017) çeltikteki her genetik dönüşüm için birer binary vektör kullanarak sekiz agronomik geni başarıyla düzenlemişlerdir. Çeltikte etilen duyarlı faktör OsERF922'de yapılan CRISPR / Cas9 mutasyonu ile Magnaporthe oryzae'nin neden olduğu çeltik yanıklığı hastalığına karşı direnç başarıyla kazandırılmıştır (Liu ve ark., 2012).

Buğday dünya çapında temel gıda ürünü olarak yetiştirilen önemli bir tahıldır. Shan ve ark. (2014), CRISPR / Cas9 yaklaşımının buğday protoplastlarında TaMLO geni (Küf direnci lokusu O) için uygulamasının başarıyla yapıldığını göstermişlerdir. CRISPR TaMLO gen susturulmasının, Blumeria

graminis f sp Tritici'nin (Btg) neden olduğu külleme hastalığına karşı direnç sağladığı da belirlenmiştir (Wang ve ark., 2014). Etkili bir vektör yöntemi, elde edilen transgenik soyların sayısını iyileştirebilir veya artırabilir. T-DNA temelli iletim sistemleri, SSN'leri ve gRNA'yı tanıtmak için yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, DNA virüsü bazlı amplikonlar, gen hedefleme verimliliklerinde artışa yol açtığı görülmektedir (Jaganathan ve ark., 2018). Gil-Humanes ve ark. (2017), CRISPR / Cas9 kasetlerinin geçici ve doğrudan ekspresyonu için buğday geminiviral (Geminiviridae bir bitki virüsleri ailesidir) bazlı DNA replikonlarını [buğday çüce virüsü (WDV)] kullanmışlardır. Kim ve ark. (2018), buğday dehidrasyonuna duyarlı element bağlayıcı protein 2 (TaDREB2) ve buğday etilene duyarlı faktör 3 (TaERF3) olmak üzere iki abiyotik stresle ilişkili gen için buğday protoplastlarında CRISPR / Cas9 genom düzenleme sistemini rapor etmişlerdir. Protoplastların yaklaşık %70'i başarılı bir şekilde transfekte edilmiştir ve bu düzenlenmiş genlerin ekspresyonu T7 endonükleaz testi ile doğrulanmıştır. Bitkilerde CRISPR / Cas9 temelli genom düzenlemenin uygulanmasıyla ilgili olarak transgen entegrasyonu ve hedef dışı mutasyonlar önemli endişelerdir görülmektedir (Jaganathan ve ark., 2018) Bu sorunların üstesinden gelmek için Liang ve ark. (2017) CRISPR / Cas9 ribonükleoproteinlerin (RNP'ler) biyolistik aktarım yönteminin etkili bir genom düzenleme yöntemi olduğunu göstermişlerdir. Genel olarak, CRISPR / Cas9 DNA, konakçı genomuna entegre edilecek ve kararlı bir şekilde ifade edilecektir. RNP'leri biyolistik aktarma yöntemi ile geçici ekspresyon sağlanarak hızlı bir şekilde bozup hedef dışı bölgeleri büyük ölçüde azaltacaktır. Ekmeklik buğdayda CRISPR / Cas9 RNP kompleksi kullanılarak iki farklı gen (TaGW2 ve TaGASR7) düzenlenmiştir. Bu kompleks in vivo ortamda bozduğundan hedef dışı etkileri önemli ölçüde azaltır ve mutant ekmeklik buğday popülasyonunda hedef dışı hiçbir değişiklik bulunmamıştır (Jaganathan ve ark., 2018). Liang ve ark. (2018) tarafından genişletilmiş bir RNP aktarma protokolü kullanıma sunulmuştur. Bu DNA'sız düzenleme yöntemi, transgenin çıkarılması için geri melezleme gibi zaman alıcı prosedürleri önlemektedir ve T0'da transgen içermeyen bitkilerin elde edilmesini sağlamaktadır. Ancak ekspresyon geçici olduğundan ve geliştirme sırasında hiçbir markör seçimi uygulanmadan mutant taraması gerektirdiğinden, bu yöntemin CRISPR / Cas9 DNA binary vektör sistemlerine kıyasla düşük verimlilik oranları gibi sınırlamaları mevcuttur. Bu sınırlamaların üstesinden gelinebilirse, RNP yöntemi, özellikle çok yıllık bitkilerde olmak üzere bitki türlerinde CRISPR / Cas9 temelli genom düzenlemesini gerçekleştirmek için etkili bir yaklaşım olacaktır. CRISPR / Cas9 temelli genom düzenleme sisteminin, model bitkilerin birçok önemli agronomik özelliğini aynı anda düzenleyebildiği gösterilmiştir (Jaganathan ve ark., 2018). Wang W. ve ark. (2018)

hekszaplidi buğdayda birden fazla gen bölgesi hedefli genom düzenleme yoluyla üretilen mutasyonların sıklığını ve kalıtılabilirliği bildirmiştir.

Model bitkilerin yanı sıra, CRISPR / Cas9 genom düzenleme yaklaşımı, temel özellikleri iyileştirmek için diğer monokot bitki türlerine uygulanmıştır. Kapusi ve ark. (2017), arpada hem partikül bombardımanı hem de Agrobacterium aracılı transformasyon yöntemleri kullanılarak endo-N-asetilb-D-glukozaminidaz (ENGase)'yi ifadesini durdurmak için beş gRNA seti tasarlanmıştır ve CRISPR / Cas9 temelli yöntemle ENGase geninin susturulduğunu göstermişlerdir. Bu tür gen susturulma işlemleri yapılan bitkiler, işlevsel genetikte genlerin işlevini incelemek için yararlı olacaktır.

6.2. Dikotlar

CRISPR / Cas9 temelli genom düzenleme yöntemi ilk kez Feng ve ark. (2013) tarafından *Arabidopsis*'te gösterilmiştir. BRI1 (brassinosteroid insensitive1), JAZ1 (jasmonate-zim-domain protein1) ve GAI (gibberellic acid insensitive) *Arabidopsis* genleri 'floral dip' yöntemi kullanılarak düzenlenmiştir ve Restriction Fragment Length Polymorphism kullanılarak genotiplenmiştir. Başka bir çalışmada Mao ve ark. (2013) *Arabidopsis*'te bulunan albinizmle ilgili CHLI1 (magnesium-chelatase subunit I) ve CHLI2 genlerini CRISPR / Cas9 genom düzenleme yöntemiyle düzenlenmiştir ve mutant bitkiler Amplified Fragment Length Polymorphism ile taranmıştır. CRISPR / Cas9 genom düzenlemesini kullanarak değiştirilmiş genlerin verimliliğini, kalıtımını, özgüllüğünü ve modelini incelemek için Feng ve ark. (2014) *Arabidopsis*'te sonraki nesiller boyunca 12 lokusu hedef alan yedi genin akışını izlemişlerdir. T1 ile T3 nesillerinde yüksek mutasyon oranları (yaklaşık %58-79) olan genomu düzenlenmiş hatlar arasında ağırlıklı olarak 1bp insersiyonlar (eklemeler) ve küçük delesyonlar (çıkarmalar) gözlemlenmişlerdir. Homozigot mutantlar, herhangi bir değişiklik olmadan bir sonraki nesle geçmişlerdir ve hedef dışı mutasyonun olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışma bitkilerde CRISPR / Cas9 genom düzenleme yoluyla kalıtsal değişikliklerin oluştuğunu göstermiştir.

Pamuk (*Gossypium hirsutum*) lif bitkisi olmasının yanı sıra tohumları önemli miktarda yağ rezervi içerdiğinden, biyoyakıt üretimi için de iyi bir kaynaktır (Oliveira ve ark., 2016). *Gossypium hirsutum*'un genom yayınlanmasıyla (Li F. ve ark., 2015) kesin DNA modifikasyonları elde etmek için CRISPR araçlarından yararlanmak mümkün hale gelmiştir. Janga ve ark. (2017) CRISPR / Cas9 sistemini kullanarak pamukta hedeflenen gen düzenlemesinin mümkün olduğunu belirtmişlerdir. Yeşil floresan protein (GFP) entegre transgenik pamuğun fenotipik karakterizasyon için markör olarak GFP dizisinde üç hedef bölge seçilerek genom düzenleme için belirlenmiştir. gRNA tarafından gen susuturulması için incelenen dokuz T0 bitkisinde homozigot

değişiklikler görülürken, diğer yedi tanesinde bi-allelilik insersiyon veya delesyon olduğunu göstermişlerdir.

Patates, dünya gıda güvenliği için önemli bir gıda bitkisidir ve iklim değişikliklerine ve üretim bölgesinin artırılması için adaptasyon sağlanması açısından ıslah edilmesi gereken bir bitkidir. Mumsu nişasta içeriği bulunan hekzaploid patates genotipleri CRISPR / Cas9 temelli genom düzenleme yöntemi kullanılarak GBSS (granule-bound starch synthase) geninin mutasyonu ile elde edilmiştir (Jaganathan ve ark., 2018). Benzer şekilde patatesteki Acetolactate Synthase1 (StALS1) mutasyonu uğratılarak multi-allelilik mutagenез elde edilmiştir (Butler ve ark., 2016).

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yeni ıslah teknikleri bilim insanlarına istenen özellikleri geleneksel yetiştirmeye göre daha hassas ve hızlı bir şekilde ekleme yeteneği sağlamaktadır. CRISPR / Cas9 temelli genom düzenleme teknolojisi, bitki araştırması ve bitki ıslahı alanında devrim niteliğinde bir etkiye sahip olmuştur. Son 7 yılda, birçok bitki türünde fonksiyonel çalışmalar ve biyotik ve abiyotik streslerle mücadele gibi önemli tarımsal özellikleri iyileştirmek için uygulanmaktadır. Ancak CRISPR / Cas9 vektör platformu oluşturulmuş ve genom düzenlemedeki etkinlikleri test edilmiş olsa da CRISPR / Cas9 sisteminin potansiyeli tam olarak keşfedilmemiştir. Bu teknoloji ile yapılan çeşitli modifikasyonların hedefe yönelik verimliliğin artmasına yol açmasına rağmen yapılan işlerin çoğu başlangıç niteliğindedir ve iyileştirilmesi gerekmektedir. Gelecekte CRISPR / Cas9 ile genom düzenleme teknolojisi verimi, besin değerini, hastalık direncini ve diğer agronomik özellikleri artırmak için bitki ıslahında uygulanması önemli bir çalışma alanı olacaktır. Bununla birlikte CRISPR / Cas9 temelli genom düzenleme tekniği popülerlik kazanacak ve büyüyen insan popülasyonunu beslemeye yardımcı olacak bitkileri elde etmek için gerekli bir teknik olacaktır.

KAYNAKLAR

Ali, Z., Abul-Faraj, A., Li, L., Ghosh, N., Piatek, M., Mahjoub, A., ... & Dinesh-Kumar, S. 2015. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. *Molecular plant*, 8(8), 1288-1291.

Butler, N. M., Balthes, N. J., Voytas, D. F., and Douches, D. S. 2016. Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases. *Frontiers in plant science*, 7, 1045.

Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., ... and Voytas, D. F. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research*, 39(12), e82-e82.

Chen, K., and Gao, C. 2013. TALENs: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(6), 271-279.

Engler, C., Kandzia, R., and Marillonnet, S. 2008. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS one*, 3(11), e3647.

Fausser, F., Schiml, S., and Puchta, H. 2014. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 79(2), 348-359.

Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D. L., Wei, P., ... and Zhu, J. K. 2013. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell research*, 23(10), 1229-1232.

Feng, Z., Mao, Y., Xu, N., Zhang, B., Wei, P., Yang, D. L., ... and Zeng, L. 2014. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(12), 4632-4637.

Gaj, T., Gersbach, C. A., and Barbas III, C. F. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*, 31(7), 397-405.

Gao, Y., and Zhao, Y. 2014. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *Journal of integrative plant biology*, 56(4), 343-349.

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., and Smith, H. O. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, 6(5), 343-345.

Gil-Humanes, J., Wang, Y., Liang, Z., Shan, Q., Ozuna, C. V., Sánchez-León, S., ... and Voytas, D. F. 2017. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *The Plant Journal*, 89(6), 1251-1262.

Govindan, G., and Ramalingam, S. 2016. Programmable site-specific nucleases for targeted genome engineering in higher eukaryotes. *Journal of cellular physiology*, 231(11), 2380-2392.

Hiei, Y., and Komari, T. 2008. Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature protocols*, 3(5), 824-834.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. 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(12), 5429-5433.

Jaganathan, D., Ramasamy, K., Sellamuthu, G., Jayabalan, S., and Venkataraman, G. 2018. CRISPR for crop improvement: an update review. *Frontiers in plant science*, 9, 985.

Janga, M. R., Campbell, L. M., and Rathore, K. S. 2017. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Molecular Biology*, 94(4-5), 349-360.

Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., and Weeks, D. P. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic acids research*, 41(20), e188-e188.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. 2012. A programmable dual-

- RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 337(6096), 816-821.
- Kapusi, E., Corcuera-Gómez, M., Melnik, S., and Stoger, E. 2017. Heritable genomic fragment deletions and small indels in the putative ENGase gene induced by CRISPR/Cas9 in barley. *Frontiers in plant science*, 8, 540.
- Kim, D., Alptekin, B., and Budak, H. 2018. CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Functional and integrative genomics*, 18(1), 31-41.
- Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N., Li, C., Østergaard, L., Patron, N., ... and Harwood, W. 2015. Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome biology*, 16(1), 258.
- Li, F., Fan, G., Lu, C., Xiao, G., Zou, C., Kohel, R. J., ... and Liang, X. 2015. Genome sequence of cultivated Upland cotton (*Gossypium hirsutum* TM-1) provides insights into genome evolution. *Nature biotechnology*, 33(5), 524-530.
- Li, J. F., Norville, J. E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., ... and Sheen, J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology*, 31(8), 688-691.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P., and Yang, B. 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature biotechnology*, 30(5), 390.
- Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Q., ... and Gao, C. 2017. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature communications*, 8(1), 1-5.
- Liang, Z., Chen, K., Zhang, Y., Liu, J., Yin, K., Qiu, J. L., and Gao, C. 2018. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 in vitro transcripts or ribonucleoproteins. *Nature protocols*, 13(3), 413.
- Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., and Wei, J. 2017. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta pharmaceutica sinica B*, 7(3), 292-302.
- Liu, D., Chen, X., Liu, J., Ye, J., and Guo, Z. 2012. The rice ERF transcription factor OsERF922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3899-3911.
- Lloyd, A., Plaisier, C. L., Carroll, D., and Drews, G. N. 2005. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(6), 2232-2237.
- Lowder, L. G., Zhang, D., Baltus, N. J., Paul, J. W., Tang, X., Zheng, X., ... and Qi, Y. 2015. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant physiology*, 169(2), 971-985.
- Ma, X., Chen, L., Zhu, Q., Chen, Y., and Liu, Y. G. 2015a. Rapid decoding of sequence-specific nuclease-induced heterozygous and biallelic mutations by direct sequencing of PCR products. *Molecular plant*, 8(8), 1285-1287.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., ... and Xie, Y. 2015b. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular plant*, 8(8), 1274-1284.
- Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y., and Liu, Y. G. 2016. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Molecular plant*, 9(7), 961-974.
- Malzahn, A., Lowder, L., and Qi, Y. 2017. Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell and bioscience*, 7(1), 21.
- Mao, Y., Zhang, H., Xu, N., Zhang, B., Gou, F., and Zhu, J. K. 2013. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Molecular plant*, 6(6), 2008-2011.
- Mojica, F. J., García-Martínez, J., and Soria, E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174-182.
- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J. D., and Kamoun, S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature biotechnology*, 31(8), 691-693.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., ... and Nureki, O. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949.
- Oliveira, M. A. C., Duarte, J. B., Morello, C. D. L., Suassuna, N. D., and Oliveira, A. B. 2016. Mixed inheritance in the genetic control of ramulosis (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) resistance in cotton. *Embrapa Algodão-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Ricroch, A., Clairand, P., and Harwood, W. 2017. Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(2), 169-182.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., ... and Gao, C. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(8), 686-688.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., and Gao, C. 2014. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature protocols*, 9(10), 2395-2410.
- Shen, L., Hua, Y., Fu, Y., Li, J., Liu, Q., Jiao, X., ... and Wang, K. 2017. Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Science China Life Sciences*, 60(5), 506-515.
- Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., Ishii, H., ... and Ezura, H. 2017. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature biotechnology*, 35(5), 441-443.
- Stephens, J., and Barakate, A. 2017. Gene editing technologies—ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9.
- Svitashev, S., Young, J. K., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S. C., and Cigan, A. M. 2015. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant physiology*, 169(2), 931-945.
- Voytas, D. F. 2013. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual review of plant biology*, 64.
- Waltz, E. 2018. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. *Nature Biotechnology*, 36(1), 6-8.
- Wang, W., Pan, Q., He, F., Akhunova, A., Chao, S., Trick, H., and Akhunov, E. 2018. Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene

- editing in allopolyploid wheat. *The CRISPR journal*, 1(1), 65-74.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., and Qiu, J. L. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature biotechnology*, 32(9), 947-951.
- Wang, Z. P., Xing, H. L., Dong, L., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Wang, X. C., and Chen, Q. J. 2015. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome biology*, 16(1), 144.
- Wong, G. K. S., Wang, J., Tao, L., Tan, J., Zhang, J., Passey, D. A., and Yu, J. 2002. Compositional gradients in Gramineae genes. *Genome research*, 12(6), 851-856.
- Xie, K., and Yang, Y. 2013. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Molecular plant*, 6(6), 1975-1983.
- Xing, H. L., Dong, L., Wang, Z. P., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Liu, B., ... and Chen, Q. J. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC plant biology*, 14(1), 327.
- Yin, K., Han, T., Liu, G., Chen, T., Wang, Y., Yu, A. Y. L., & Liu, Y. 2015. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Scientific reports*, 5, 14926.
- Zhang, Z., Mao, Y., Ha, S., Liu, W., Botella, J. R., and Zhu, J. K. 2016. A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis*. *Plant cell reports*, 35(7), 1519-1533.
- Zhang, Z., Ge, X., Luo, X., Wang, P., Fan, Q., Hu, G., ... and Wu, J. 2018. Simultaneous editing of two copies of *Gh14-3-3d* confers enhanced transgene-clean plant defense against *Verticillium dahliae* in allotetraploid upland cotton. *Frontiers in plant science*, 9, 842.
- Zhou, H., Liu, B., Weeks, D. P., Spalding, M. H., and Yang, B. 2014. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic acids research*, 42(17), 10903-10914.
- Zong, Y., Wang, Y., Li, C., Zhang, R., Chen, K., Ran, Y., ... and Gao, C. 2017. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nature biotechnology*, 35(5), 438.