

Genom Düzenleme Teknolojileri ve Bitkilerdeki Uygulamaları

Feyza TUFAN^{1*}, Esra Nur KELEŞ¹

¹Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik, İstanbul, Türkiye

Geliş Tarihi: 06.02.2019

***Sorumlu Yazar e mail:** feyzatufan@halic.edu.tr

Kabul Tarihi: 08.03.2019

Atıf/Citation: Tufan, F. ve Keleş, E. N. "Genom Düzenleme Teknolojileri ve Bitkilerdeki Uygulamaları", Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 2019, 2/1: 113-133

Özet

İklim değişiklikleri, tarım arazilerinin azalması, biyotik ve abiyotik stres etmenlerinin artması tarım ve gıda üretimi için önemli engeller arasındadır. Üretim ve gıda güvenliğinin, küresel nüfustaki hızlı artış ve öngörülemeyen iklim koşulları karşısında güvence altına alınması için biyotik ve abiyotik streslere daha fazla tolerans gösteren ürünlere ihtiyaç duyulmaktadır. Genom düzenleme teknolojileri, biyotik ve abiyotik stres koşulları altında ürünlerin yüksek verimde üretilmesine yardımcı olma potansiyeline sahiptir. Bu derlemede, genom düzenleme teknolojilerine genel bir bakış sunulacak olup, bitkilerde CRISPR/Cas9 ile yapılan son genom düzenleme uygulamalarına değinilecektir.

Anahtar Kelimeler: Genom düzenleme teknolojileri, Bitkilerde genom düzenleme, CRISPR/Cas sistemleri, TALEN, ZFN, Meganükleaz

Genome Editing Technologies and its Applications in Plants

Abstract

Climate change, decreasing agricultural fields, increasing biotic and abiotic stress factors are major obstacles for agriculture and food production. In order to secure production and food safety against the rapid increase in global population and unpredictable climatic conditions, products with higher tolerance to biotic and abiotic stresses are needed. Genome editing technologies have the potential to produce high yields of products under biotic and abiotic stress conditions. In this review, an overview of

genome editing technologies will be presented, and the recent genome editing applications with CRISPR/Cas9 systems in plants will be mentioned.

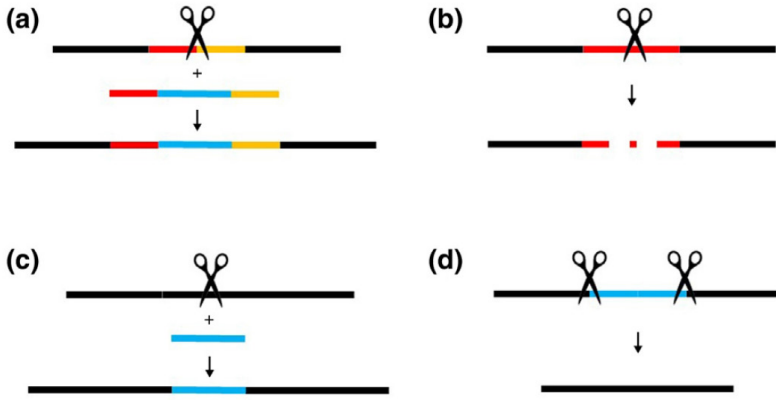
Keywords: Genome editing technologies, Plant genome editing, CRISPR/Cas systems, TALEN, ZFN, Meganuclease

1. Giriş

Tarih öncesi çağlardan beri doğal türlerin genetik yapıları çaprazlamalar yoluyla hem niteliksel hem de niceliksel özellikler bakımından iyileştirilmeye çalışılmıştır. Bitki türlerinin evrimi ve ehlileşmesi sırasında meydana gelen bu çeşitlilik genom düzenlemesinin ilk örnekleri olup doğal rastgele mutasyonlara dayanmaktadır. 1950'li yıllardan bu yana, yeni alelik varyasyon oluşturmak için fiziksel, kimyasal ve biyolojik (T-DNA yerleştirme / transpozonlar) mutagenler kullanılmıştır [1- 4]. Bununla birlikte, mutasyonlar rastgele ve kendiliğinden ortaya çıktığı için, mutasyon indüksiyonu fenotip sadece bir veya birkaç genden kaynaklanıyorsa faydalı olmaktadır. 1980'li yılların başında, hem temel bitki biyolojisini anlamak hem de bitkisel ürünlerin iyileştirilmesi için transgenik teknikler kullanılmaya başlanmıştır [5- 8]. Bu sayede daha verimli, çeşitli hastalıklara daha dayanıklı, zor stres koşullarına yüksek toleranslı bitkiler ile ilaç sanayi gibi gıda dışında da farklı sektörlere ham madde desteği sağlanmıştır [9- 11]. Bununla birlikte, transgenik tekniklerle organizmaya aktarılan transgenin konak genoma girişi rastgeledir. Her ne kadar yapılan araştırmalarda transgenik bitkilerin zararlı olduğu kanıtlanmasa da, gen aktarımı yapılan ürünlerin yenilebilir ürünler olduğu durumlarda halk, genetiği değiştirilmiş ürünleri endişeyle karşılamaktadır. 2000'li yıllarda yapay ya da doğal bölgeye özgü nükleazlar ile genom düzenleme teknolojilerinin kullanımı ile hem hayvan hem de bitki sistemlerinin genom düzenlemesi başarıyla gerçekleştirilmiştir [12]. Rastgele giriş ve sıklıkla rastgele fenotiplere yol açan transgenik yaklaşımın aksine, genom düzenleme yöntemleri ile tanımlanmış mutantlar üretilmekte ve böylece bu yöntemler

işlevsel genomik ve ürün ıslahı çalışmalarında güçlü bir araç haline gelmektedir.

Genom düzenlemesinde kullanılan bölgeye özgü nükleazlar ile hedef genomda çift zincir kırıkları (“double strand breaks”; DSBs) meydana getirilerek, genomda istenilen genlerin eklenmesi, çıkartılması ya da değiştirilmesi mümkün olmaktadır. Bu amaçla kullanılan endonükleazlar ve sistemler; meganükleazlar, çinko parmak nükleazlar (“zinc finger nucleases”; ZFNs), transkripsiyon aktivatör-benzeri efektör nükleazlar (“transcription activator-like effector nucleases”; TALENs) ve kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (“clustered regularly interspaced short palindromic repeats”; CRISPR)’dır. Bu dört yöntemde de farklı yaklaşımlarla hedef bölgede değişiklik yapılmasına karşın yöntemlerin temel basamakları benzerdir. Öncelikle, DNA’nın her iki zincirinde çift zincir kırıkları oluşturulur. Daha sonra, hücre tarafından bu çift zincir kırıkları homoloji yönlendirmeli onarım (“homology-directed repair”; HDR) ya da homolog olmayan uç bağlanması (“non-homologous end joining”; NHEJ) ile onarılır. NHEJ, hataya eğilimli bir onarım mekanizması olup delesyonlara ya da insersiyonlara sebep olduğu için bir genin işlevini tamamen durdurmak için tercih edilmektedir. HDR ise kusurlu genin sağlam alleli ile değiştirilebilmesi ya da yeni bir genin genoma eklenebilmesi için tercih edilmektedir (Şekil 1) [13]. Her ne kadar hücreler, NHEJ veya HDR’yi kullanarak DSB’leri onarmak için farklı yeteneklere sahip olsalar da, bu yol seçimini büyük ölçüde hücre döngüsünün fazı yönetir. NHEJ baskın olan onarım mekanizması olup G1, S ve G2 fazları sırasında DNA onarımında etkindir. Buna karşın HDR, DNA replikasyonu tamamlandığında geç S ve G2 fazlarıyla sınırlıdır [14]. HDR’de DSB’leri onarmak için kalıp olarak kardeş kromatitler ya da ekzojen DNA parçası kullanılmaktadır. Böylece, HDR ile kusursuz bir şekilde onarım gerçekleşmektedir. Bitkilerde HDR ile gen düzenleme frekansı oldukça düşüktür.



Şekil 1. Çift Zincir Kırığı Aracılı Genom Düzenleme.

Genom düzenleme, homoloji yönlendirmeli onarım (HDR) (a) ya da homolog olmayan uç bağlanması (NHEJ) (b-d) ile sağlanabilir. HDR’de, entegrasyon için genomik dizinin yanı sıra vektör DNA’sında bulunan homoloji bölgeleri kullanılır (a). NHEJ ile onarım mekanizması ise hataya eğilimlidir. Delesyon (b-d) ve insersiyon (c) ile açık okuma çerçevesi değişirse genin işlevi tamamen durdurulur [15].

2. Genom Düzenleme Teknolojileri

2.1. Meganükleazlar

Meganükleazlar (ya da homing endonükleazlar), mobil genetik elementlerin bileşenleri olan doğal restriksiyon endonükleazlardır. Ökaryotlarda, bakterilerde ve arkelerde bulunan ve çoğunlukla mobil sınıf I intron ve inteinlerde kodlanan yüzlerce üye tanımlanmıştır. Nükleer genomun yanı sıra, mitokondri ve kloroplast genomu tarafından da sentezlenmektedir. Meganükleazlar, her biri 160 ila 200 amino asit (aa) bakiyesi boyutunda iki özdeş alt birim içeren homodimerler oluşturur. Bu enzimler, 12 ila 40 bp arasında değişen spesifik DNA

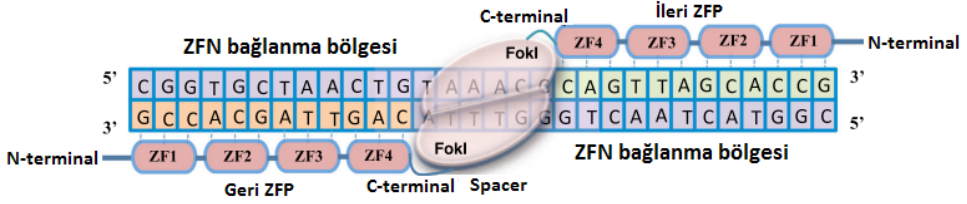
dizilerini tanır ve DNA’da çift zincir kırığı meydana getirir. Tanıma bölgesinin bu kadar uzun olması meganükleazların özgünlüğünü arttırmakta ve genomdaki kesim noktalarının sayısını azaltmaktadır. Tanıma bölgelerinin büyüklüğü göz önüne alındığında, bütün bir bitki genomu, belirli bir nükleaz için hiçbir tanıma bölgesi içermeyebilir veya birkaç tane içerebilir.

Bugüne kadar birçok meganükleaz tanımlanmasına karşın, çalışılmak istenilen her bölgeye uygun bir enzimin doğal olarak bulunması mümkün değildir. Bu nedenle var olan meganükleazların tanıma bölgelerinde çeşitli teknikler ile değişiklikler yapılarak ya da kimerik proteinler oluşturularak ilgili bölgeye uygun enzimler üretilebilmektedir. Homodimer ya da heterodimer formlar ve modifiye meganükleazlar kullanılarak genomda hedeflenebilecek bölge sayısı artırılabilir. Buna karşın, her çalışma için yeni bir enzim tasarımı gerekmektedir. Genom düzenleme ilk olarak uzunluğu 18 bp’ye kadar olan hedef bölgelere sahip doğal meganükleazlar kullanılarak elde edilmiştir [16]. I-CreI ve I-SceI meganükleazları, mısırdaki hedef genom modifikasyonunda başarıyla kullanılmıştır [17, 18]. Yanı sıra, *Arabidopsis* ve bütün dâhil olmak üzere birçok bitki türünde DNA insersiyonlarını hedeflemek için başarıyla kullanılmıştır [19].

2.2. Çinko parmak nükleazlar

Çinko parmak nükleazlar, yapay olarak üretilen nükleazlardır. Çinko parmak motifi, ilk olarak *Xenopus laevis* kurbağasına ait TFIIIA’da bulunmuştur. Çinko parmak (ZF), DNA dizisini tanıyan ve transkripsiyon faktörlerinde sıkça rastlanan bir protein motifidir. DNA bağlama bölgesi ve endonükleaz bölgesi olmak üzere iki alt domen içermektedir. Merkezde bulunan çinko atomu, 3-6 sistein ve 19-23 histidin aa’larına bağlanmakta ve parmak yapısı oluşturmaktadır. Her parmakta 23 aa bulunur ve parmakta yer alan aa’lar özgül DNA dizileri ile eşleşebilir. Her bir ZF motifi 3 nükleotidlik bir diziyi tanıyıp bağlanabilir. Böylece istenilen diziye özgü olacak şekilde çinko parmakları

arka arkaya birleştirilir ve bu şekilde enzimin DNA bağlanma bölgesi tasarlanır. Enzimin DNA bağlanma bölgesi hedef bölgeye uygun olacak şekilde tasarlandıktan sonra kesim yapacak olan katalitik bölge ile birleştirilir. Kesim yapacak olan bu bölge *FokI* enziminden elde edilir. *FokI*, *Flavobacterium okeanoikoites* bakterisinde tanımlanmış olan tip IIIS restriksiyon enzimidir. Kesim yapabilmek için homodimer olarak çalışır. Dimer oluşumunu sağlamak için, 2 tane ZF-*FokI* hibrit proteini üretilip hedef genoma eş zamanlı olarak, birlikte iletilmelidir. Böylece, bir monomer DNA'nın ileri yöndeki zincirine ve diğer monomer de DNA'nın geri yöndeki zincirine bağlanır. Ayrıca dimer oluşumu, katalitik aktivite ve çift zincir kırıklarının oluşması için 2 *FokI* monomeri birbirine çok yakın olmalıdır. Her çalışma için iki farklı ZFN üretilir. Böylece *FokI* enzimi dimer oluşturarak kesim yapabilir. *FokI* kesim domeni özgün bir diziyi ihtiyaç duymadığı için kesim özgünlüğü ZF motifleri ile sağlanır. Kesim sonucunda HDR ya da NHEJ ile ilgili bölgede değişiklik yapılmış olur. ZFN'nin özgüllüğü; sol ZF-DNA bağlanma modülüyle verilen ileri-zincir dizisi, sağ ZF-DNA bağlanma modülüyle verilen geri-zincir dizisi ve iki bağlanma bölgesi arasındaki "spacer" (aralık, ara dizi) ile sağlanır (Şekil 2). Bu üç elementin birleşmiş etkisiyle, genom içinde ZFN bağlanma özgüllüğü oldukça yüksektir. ZFN ile çalışmanın olumsuz taraflarından biri genomda çalışılacak olan her bölge için yeniden ZFN üretilmesinin gerekmesidir. Bu durum maliyeti arttırmakta ve zaman kaybına yol açmaktadır. DNA 4 farklı bazdan oluştuğu için muhtemel bütün 3'lü diziler için 64 farklı ZF motifi gerekmektedir. Bununla birlikte, henüz 64 farklı üçlü nükleotid kombinasyonları için ZF motifi üretilmemiştir. Bu nedenle genomda istenilen her bölge ile çalışmak mümkün değildir. ZFN'ler kullanılarak bitki genom düzenlemesine yönelik birçok araştırma yapılmıştır [20- 24].



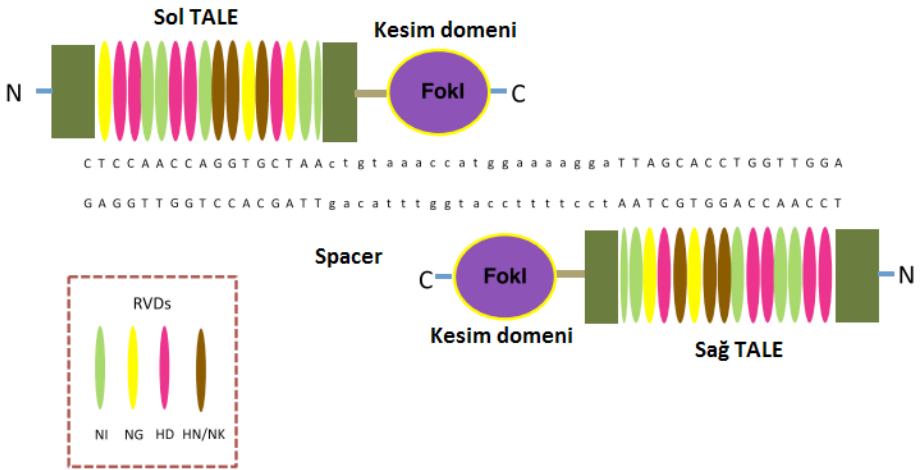
Şekil 2. Çinko Parmak Nükleazlar ile Genom Düzenleme.

Çift zincir kırık oluşumunun sağlanması için N-terminalde 3-6 tane çinko parmak protein (ZFP) ile C-terminalde *FokI* kesim domenini içeren bir çift ZFN gereklidir. İki ZFN tanıma bölgesi, spacer DNA dizisi (5-7 nükleotidlik) ile ayrılmaktadır [25].

2.3. Transkripsiyon aktivatör-benzeri efektör nükleazlar

Transkripsiyon aktivatör-benzeri efektör nükleazların (TALEN) çalışma mekanizması ZFN ile benzerdir. Kesim domeni olarak *FokI* ve tanıma domeni olarak TALE proteinleri kullanılır. TALE proteinleri bitki patojeni olan *Xanthomonas* bakterilerinden elde edilmiştir [26]. *Xanthomonas* bakterisi, bitki hücrelerine efektör proteinlerini enjekte etmek için Tip III sekresyon sistemini kullanmaktadır. Bu efektör proteinlerin bir grubu olan TALE'ler nükleusa hedeflenerek konak hücrede hassaslık genlerini aktive eden promotör kısımlarına bağlanır. TALE'ler yüksek oranda korunmuş 33-39 aa tekrarı içerir ve farklı yapısal özelliklere sahiptir. Bu korunmuş dizinin 12. ve 13. pozisyonundaki aa'lar değişkendir ("Repeat Variable Di-residues-RVDs"). RVD'ler, TALE proteinlerinin DNA'ya bağlanma özgünlüğünü belirler. 12. bakiye, nükleotid bakiyesiyle bağlantıları stabilize etmekte, 13. bakiye ise tanımayı sağlamaktadır. Asparajin-asparajin (ya da lizin) guanin, asparajin-izolösin adenin, histidin-aspartik asit sitozin, asparajin-glisin timin olmak üzere her bir baz için RVD grubu mevcuttur. Genom düzenleme yapma amacı ile TALE proteinleri hedef diziyeye göre birleştirilir ve DNA bağlanma bölgesi oluşturulur. TALE dizisi mutlaka timin bazı ile başlamalıdır. TALE proteinlerinden oluşan

bu domen *FokI* enziminin kesim domeni ile birleştirilir. ZFN sisteminde olduğu gibi *FokI* enzimi dimer olarak çalıştığı için her bir hedef dizi için iki adet TALEN üretilmelidir (Şekil 3). Her dizi için yeni üretim gerekmesi maliyeti yükseltmekte ve zaman kaybına neden olmaktadır. Tek zincir TALEN (“single-chain TALEN”; scTALEN) üretimi ile tek bir TALE dizisine iki adet *FokI* enzimi bağlanarak hedef bölge kesilebilmektedir. Bu teknik maliyeti nispeten azaltmaktadır [27]. TALEN’ler ile genom düzenleme *Arabidopsis* [28], pirinç [29], tütün [30] ve *Brachypodium* [31] gibi model bitkilerin yanı sıra, arpa [32] ve mısır [33] gibi ekonomik açıdan önemli bitkilerde başarıyla uygulanmıştır.



Şekil 3. Transkripsiyon Aktivatör-Benzeri Efektör Nükleazlar ile Genom Düzenleme.

TALEN, hedef DNA’ya bağlanır. Her bir TALEN, N-terminalde TALE’ler ile C-terminalde *FokI* kesim domeni içerir. TALEN çiftinin iki hedef dizisi spacer DNA dizisi ile ayrılmaktadır [25].

2.4. Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) / Cas sistemleri

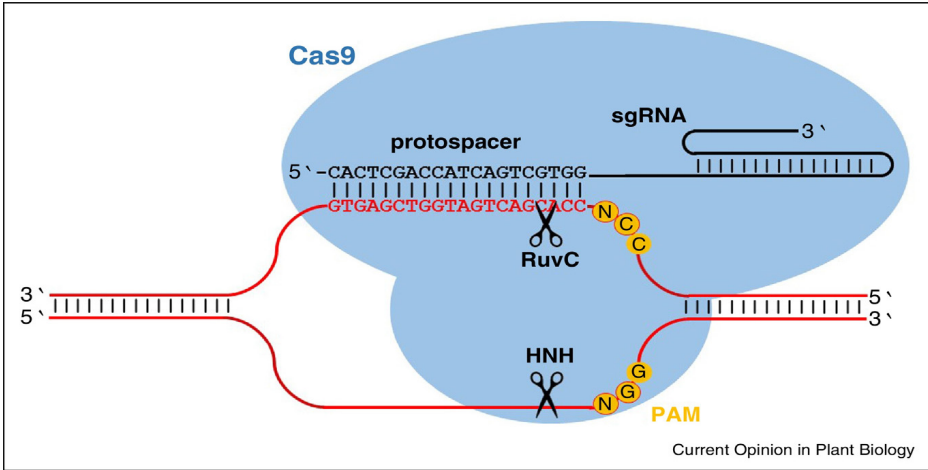
Tüm organizmalar; virüsler ve diğer enfekte eden patojenlerle sürekli çekişme halindedir. Patojenler ve konakları arasındaki sürekli silahlanma yarışının bir parçası olarak iki stratejik bağışıklık yaklaşımı evrimleşmiştir. Doğuştan gelen bağışıklık; patojenlerin genel özelliklerini tanıyan, önceden var olan genetik olarak kodlanmış sistemleri kapsamakta, kazanılmış bağışıklık ise önceden karşılaşılan istilacılara karşı özgül bağışıklık yanıtları ve immünolojik hafıza oluşturma yeteneğindeki sistemleri kapsamaktadır. CRISPR/Cas sistemi bakterinin virüslerden korunmak için geliştirdiği kazanılmış bağışıklık sistemidir. 1987 yılında Ishino ve çalışma grubu tarafından *E. coli* bakterisinde alkalin fosfataz izozim dönüşümünden sorumlu *iap* geni klonlanıp dizilenmiştir. Araştırmacılar *iap* geninin aşağı yönünde 29 nükleotidlik bir dizi tekrarının, tekrarsız ve benzer şekilde kısa dizilerle (“spacer”) ayrıldığını gözlemlemişler ve sonraki çalışmalarda bu dizileri dizilemişlerdir [34, 35]. Daha sonra, birçok araştırmacı tarafından birçok bakteri ve arkelerde de benzer tekrarlar görülmüştür [36- 39]. 2002 yılında ise bu diziler CRISPR olarak adlandırılmıştır [40]. İlerleyen yıllarda bu tekrar elementlerinin bitişiğinde kümelenmiş *Cas* genleri tanımlanmıştır. 2005 yılında ise bu dizilerin bakteri genomuna nasıl entegre olduğu ve doğal süreçteki işlevleri ile ilgili mekanizmalar kısmen anlaşılmıştır [41- 43]. CRISPR-Cas sistemleri, dizilenmiş tüm bakteri genomlarının yaklaşık %45’inde ve arke genomlarının %85’inde bulunmuştur. Bu sistemlerde, CRISPR array, “spacer” biçiminde immünolojik hafızayı depolamaktadır. Spacer’lar; istila eden patojenlerden kökenlenen kısa DNA dizileri olup CRISPR DNA tekrarlarının arasında bulunmaktadır. Bir dizi Cas proteini de, CRISPR–Cas sisteminin sonradan kazanılmış bağışıklık işlevini meydana getirmesinden sorumludur. CRISPR–Cas sistemlerinin etki mekanizması (i) adaptasyon, (ii) ekspresyon ve olgunlaşma ve (iii) interferans olmak üzere 3 aşamaya ayrılabilir [44]. (i) Adaptasyon aşamasında ilk olarak, istila

eden patojenin yabancı DNA'sının konak tarafından «spacer kazanımı» için hedef olarak tanınması gerekmektedir. İkinci olarak, yabancı DNA'dan “protospacer” (spacer'ların kökenlendiği diziler) denilen özgül boyuttaki bir dizinin (genel olarak 30-40 bp) çıkarılması gerekmektedir. Son olarak da, kazanılan bu dizi immünolojik hafıza oluşturmak için CRISPR array'inin içine yeni bir «spacer» olarak girmeli ve bitişik tekrar dizisi de duplike olmalıdır. Bu sistemde, Cas1 ve Cas2 proteinleri; CRISPR array'i içindeki lokus, lider dizi ve ilk CRISPR tekrarı gibi birçok bileşenin evrensel olarak korunduğu düşünülmektedir. Çalışılan tüm CRISPR-Cas sistemlerinde Cas1 ve Cas2 «spacer kazanımı» için gereklidir. Cas1 ve Cas2 genellikle aynı operonda kodlanmakta ve yapısal olarak kararlı bir protein kompleksi oluşturmaktadır. Spacer kazanımı için Cas1'in endonükleaz aktivitesi gereklidir. Cas2'nin de DNA ve RNA kesme aktivitesi olup bu aktivite spacer kazanımı için gerekli değildir. Bu nedenle Cas2'nin spacer kazanımındaki primer rolünün onun katalitik aktivitesiyle ilgili olmadığı düşünülmektedir. Cas1-Cas2 kompleksi genel olarak, yeni spacer'ı, lider dizi ve CRISPR array'in ilk tekrarı arasındaki bağlantıya ekler. Bu bağlantıda eklenme yapılmasının tercih edilmesi sayesinde spacer'lar, array'in lider dizi ucuna doğru olan bir polariteyle CRISPR array'i içine eklenir. Lider dizi AT-dizisinden zengindir ve CRISPR array'inin hemen yukarı yönünde olup genellikle hem crRNA (CRISPR RNA) ekspresyonunu yürüten promotör dizi hem de spacer eklenmesi için tanıma dizisi içermektedir. Bu da kronolojik olarak sıralanmış bir array meydana getirmektedir. En son kazanılan spacer, lider diziye en yakın olan spacer'dır. (ii) Ekspresyon ve olgunlaşma aşamasında, CRISPR array pre-RNA'ya transkribe edilir ve pre-RNA ilave işlemlerle crRNA'lar olarak bilinen daha kısa RNA birimlerine işlenir. Her bir crRNA, tekrar dizisinin bir parçası tarafından kuşatılan tek bir spacer içermektedir. Bu crRNA'lar, aktif Cas-crRNA kompleksi oluşturmak için bir ya da daha fazla Cas proteinleriyle birleşmiştir. (iii) İnterferans aşamasında ise, Cas-crRNA kompleksi, yabancı nükleik asit hedefleri için hücreyi tarar. Tanıma, komplementer crRNA dizileriyle

baz eşleşmesi ile gerçekleşmektedir. Başarılı bir şekilde tanıma olması, hedef nükleik asitin kesilmesine ve parçalanmasına yol açar.

CRISPR sistemleri *cas* gen içeriği ile iki ana sınıf, altı tip ve 20'den fazla alt tipe sınıflandırılmıştır. Altı tipin her biri, yabancı nükleik asitlerin yıkımına aracılık eden işlevsel olarak farklı efektör kompleksleri kullanır. Tip I, tip II ve tip V sistemleri DNA'yı, tip VI sistemi RNA'yı, tip III sistemi ise hem RNA hem de DNA'yı hedefler (tip IV sistemleri henüz deneysel olarak karakterize edilmemiştir) [45]. Adaptasyon mekanizması, farklı CRISPR-Cas sistemleri arasında oldukça iyi korunmuştur. Evrensel Cas1 ve Cas2 proteinleri, spacer kazanımından sorumlu olan bir integras kompleksini içerir [46]. İnterferans mekanizması ise CRISPR-Cas sistemleri arasında önemli ölçüde değişmektedir. Sınıf 1 sistemlerdeki interferans mekanizması (tip I, III ve IV) birden fazla Cas proteininden oluşurken, sınıf 2 sistemlerde (tip II, V ve VI) interferans için tek bir efektör Cas proteini gerekmektedir. Günümüzde genom düzenleme için en yaygın olarak tip II sistemi kullanılmaktadır. CRISPR tip II sistemleri, iki nükleaz domeni olan (RuvC-benzeri domeni ve HNH domeni) çok domenli Cas9 endonükleazı içeren dört Cas proteininden oluşmaktadır. Cas9 ile birlikte bir crRNA ve trans aktive edici crRNA (tracrRNA) bir kompleks oluşturmaktadır. tracrRNA'nın bir bölgesi crRNA'nın CRISPR segmenti ile komplementerdir. crRNA'nın viral kökenli olan kısmı ise tek zincirli olarak kalmakta ve konak hücreyi istila eden viral DNA'yı baz eşleşmesi yaparak tespit etmektedir. Daha sonra RuvC ve HNH tarafından viral DNA'nın her iki zinciri kesilmekte ve ardından viral DNA parçalanmaktadır (Şekil 4). Hedef dizinin seçimindeki tek kısıtlama, kullanılan Cas9 proteininin türünün kökeni tarafından tanımlanan bir protospacer bitişik motife ("protospacer adjacent motif"; PAM) ihtiyacıdır. *Streptococcus pyogenes*'ten elde edilen Cas9 ile standart uygulamalarda, hedefin 3' ucunda "NGG" gereklidir. NGG dizileri herhangi bir kodlama dizisinde nadir bulunmadığından, CRISPR/Cas9 temelli genom düzenleme hemen hemen tüm organizmalarda uygulanabilmektedir Sınıf II CRISPR sisteminin bir başka endonükleazı olan

Cpf1 (*Prevotella* ve *Francisella* bakterilerinde keşfedilen CRISPR) de bitkilerde genom düzenleme için kullanılmaktadır. Cas9 ve Cpf1 arasında birkaç farklılık vardır. Bu farklılıklardan biri, Cpf1’de sadece kısa bir crRNA’nın gerekli olması ve tracrRNA’nın gerekmemesidir. Diğer, Cpf1’in PAM dizisinin T-den zengin bir dizi olmasıdır. Üçüncüsü ise, Cpf1’in, her bir komplementer DNA zincirini farklı bölgelerde, birbirinden beş nükleotit aralıklı olarak kesmesi ve Cas9 tarafından üretilen küt uçlar yerine yapışkan uç oluşmasıdır [47].



Şekil 4. CRISPR/Cas Sistemi Aracılı Genom Düzenleme.

Cas9 proteini RuvC ve HNH domenleriyle hedef DNA’da çift zincir kırığı oluşturmaktadır. Bağlanma özgüllüğü, ilgili hedef bölgeye tamamlayıcı olan sgRNA ile gerçekleşir. Protospacer-bitişik motif (PAM) aracılığıyla DNA, Cas9 proteiniyle etkileşime girer. Bu nedenle, PAM dizisi tanıma bölgesi özgüllüğüne katkıda bulunmaktadır [15].

CRISPR/Cas9 sistemini ilgilenilen organizmada (bitki, memeli, maya v.b.) çalışılabilir hale getirmek için vektörler geliştirilmiştir. Her vektörde olduğu gibi CRISPR/Cas vektörlerinde de mutlaka bir replikasyon orijini ve markır gen bulunmalıdır. Ayrıca güçlü bir promotör ile birlikte Cas genleri ve yine bir promotör ile birlikte crRNA-tracrRNA kimerik yapısını oluşturacak dizi gereklidir. Bu şekilde

bir vektör sadece crRNA (gRNA olarak adlandırılmakta) dizisi değiştirilerek birçok farklı geni hedeflemek için kullanılabilir. Bu nedenle bu yöntemin maliyeti diğer genom düzenleme yöntemlerine göre oldukça düşük olup zaman tasarrufu sağlamaktadır. crRNA ve tracrRNA kimerik yapısı olan tek rehber RNA (“single guide RNA”; sgRNA;) aynı mekanizma ile Cas protein kompleksine rehberlik ederek hedef bölgede çift zincir kırık oluşumunu sağlar. Sistemin çalışabilmesi için tracrRNA ve crRNA arasında meydana gelen hibridizasyon önemlidir. Tek bir zincir halinde olan sgRNA’da bu yapıyı taklit edebilmek için bir ilmek oluşturabilecek diziler eklenmiştir. Bu şekilde tasarlanan vektörler oldukça büyük oldukları için çalışmayı kolaylaştırmak amacı ile Cas ve sgRNA bölgeleri farklı iki vektöre entegre edilerek de kullanılabilir. Hedef bölgeye göre hazırlanan vektör uygun bir teknik ile hücre içine aktarılır. Vektör üzerindeki Cas ve sgRNA ekspresyonu sonucu konak hücre DNA’sı hedef bölgeden kesilir [48].

3. Bitkilerde CRISPR/Cas Aracılı Genom Düzenleme Uygulamaları

CRISPR/Cas9 gen düzenleme sistemi ilk kez 2012’de memeli hücrelerinde gösterilmiş olup [49] kısa sürede en etkili ve geniş çapta kullanılan genom mühendisliği aracı olmuştur. Bitkilerde CRISPR/Cas9 ile genom düzenlenmesiyle ilgili ilk raporlar 2013 yılında bildirilmiştir [50- 52]. Bu makalelerde, model bitkilerden *Nicotiana benthamiana* ve *Arabidopsis* bitki yapraklarında Cas9 ve sgRNA’nın *Agrobacterium* aracılı geçici ekspresyonu ve pirinç kalluslarında fitoen desaturaz enzimini hedeflemede biyolistik yöntemi kullanılmıştır. Cas9 ve sgRNA’nın geçici ekspresyonu için protoplastlara doğrudan DNA transferi ayrıca *Arabidopsis*, tütün ve pirinç bitkilerinde fitoen desaturazın genom düzenlemesi için kullanılmıştır. Bitki hücrelerinde geçici ekspresyon veya kararlı ekspresyon için mikroenjeksiyon, polietilen glikol (PEG), elektroporasyon gibi çeşitli transformasyon teknikleri başarıyla kullanılmaktadır [53]. *Agrobacterium* içermeyen bu doğrudan yöntemlerde genom düzenleme için sadece sgRNA geni ve Cas9

endonükleaz geni gereklidir. Birçok bitkide transformasyonun çok zor gerçekleşmesi, genom modifikasyonlarında engel teşkil etmektedir. Bu nedenle, bitkilerde genom düzenlemesi için yüksek etkinlikli teknolojilere yönelik stratejiler geliştirilmelidir [54].

Yirmiyi aşkın bitki türünde CRISPR/Cas sistemi ile genom düzenleme ile ürün veriminin yanı sıra biyotik ve abiyotik strese dayanıklılığın artırılmasıyla ilgili araştırmalar bulunmaktadır [55]. CRISPR/Cas sisteminin bitki biyolojisinde uygulanabilirliğinin gösterilmesinden sonra asıl odak, ilgili genlerin açık okuma çerçeveleri (ORF) içinde çift zincir kırığını indükleyerek, birçok türde NHEJ aracılı kalıtsal mutasyonların üretimi olmuştur. Her ne kadar CRISPR/Cas9 sisteminin etkinliği diploid bitkilerde yapılan çalışmalar ile gösterilmiş olsa da, bu sistemin poliploid ve kompleks genomlu bitkilerde uygulanmasında zorluklar bulunmaktadır.

Homolog olmayan uç bağlanması tarafından gen düzenlemesi, nükleaz eksprese eden DNA'nın geçici ya da kararlı olarak bitki hücrelerine transformasyonu ile sağlanmıştır. Yabancı DNA genoma entegre edildiğinde, modifiye edilmiş bitki jenerasyonunun ayrışmasıyla elimine edilebilir. Her iki durumda da ürün, transgenik DNA içermemesine karşın, yerel yasalara bağlı olarak, bazı ülkelerdeki mevzuatlarda, bitki üretiminin rekombinant nükleik asitleri kapsamı nedeniyle bitkiler genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu nedenle yıllar içinde, bitki hücrelerinde bölgeye özgü çift zincir kırıklarının indüksiyonu sürecinde nükleazı eksprese eden DNA'nın önlenmesi için yaklaşımlar uygulanmıştır. RNA virüslerini vektör olarak kullanmak ya da işlevsel bir nükleazı doğrudan bitki hücrelerine aktarmak olmak üzere iki ana strateji vardır. Viral stratejinin uygulanabilirliği ilk olarak ZFN'lerin tütün ve petunya bitkilerine dolaylı geçici iletimi için tütün çingirak virüs (TRV) temelli ekspresyon sisteminin kullanılması ile gösterilmiştir. Son zamanlarda, bu teknoloji, CRISPR/Cas sistemi kullanılarak NHEJ aracılı gen düzenlemesi için de kullanılmıştır. Alternatif olarak, istenen mutasyonları elde etmek için aktif enzim molekülleri veya bunların mRNA'ları

doğrudan bitki hücrelerine transfer edilebilir. Yakın zamanda, gen hedeflemesi için, *in vitro* önceden birleştirilmiş Cas9-sgRNA RNP'ler yardımı ile DNA içermeyen teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Böylece, RNP'ler olgunlaşmamış embriyolara biyolistik yöntemiyle aktarılmış ve rejenere olan bitkiler düzenleme olaylarıyla seçilmiştir [56].

Cinko parmak nükleazlar (ZFN), TALEN ve CRISPR gibi genom düzenleme teknolojileri, bazı ülkelerin mevzuatlarında GDO tanımı kapsamına girmemektedir. Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA), CRISPR/Cas9 tarafından düzenlenmiş ürünlerin ücretsiz olarak yetiştirilip satılabileceğini belirtmiştir [57]. USDA'nın düzenleme yapmadığını beyan ettiği CRISPR/Cas9 yaklaşımı ile genomu düzenlenmiş 5 ürün türü vardır. Penn State Üniversitesi'nde Dr. Yining Yang grubu tarafından *Agaricus bisporus* polifenol oksidaz enzimini kodlayan altı genden birinin susturulması ile kararmaya dayanıklı hale getirilmiştir [58]. DuPont Pioneer tarafından amilopektinle zenginleştirilmiş mumsu mısır, amiloz yapımından sorumlu olan endojen *Wx1* geni inaktive edilerek geliştirilmiştir. *Setaria viridis*'in çiçeklenme zamanı, *ZmID1* geninin homoloğu inaktive edilerek geciktirilmiştir. Ketencik bitkisinin (*Camelina sativa*) omega-3 yağ içeriği arttırılmıştır. Soya bitkisinde (*Glycine max*) ise *Drb2a* ve *Drb2b* genleri inaktive edilerek kuraklık ve tuz stresine karşı dayanıklılık kazandırılmıştır [59]. Kanada'da onaylama sürecinin sonuna yaklaşmış toplam 12 ürün çeşidi vardır. Bununla birlikte, genomu düzenlenmiş ürünlerin yasal durumu birçok ülkede belirsizliğini korumaktadır [60].

4. Sonuçlar

Yeni nesil genom düzenleme teknolojileri, bilim insanlarına, organizmalarda istenen özellikleri tam ve hızlı bir şekilde kazandırma imkânı sağlamaktadır. CRISPR/Cas sistemi, hayvan ve bitki biyolojisi araştırmalarında bir devrim niteliğinde olup son yıllarda hedefli olarak genlerde değişiklikler yapmak için en geniş çapta kullanılan genom düzenleme teknolojisi olarak bilinmektedir. 2013 yılından bu

yana, CRISPR/Cas sistemleri sayesinde bitki genom düzenlemesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bununla birlikte, her tarımsal bitkide yeterli genom dizi bilgisinin bulunmaması CRISPR/Cas sisteminin geniş çapta uygulamalarını birçok üründe sınırlamaktadır. Tıbbi ve klinik araştırmalarla karşılaştırıldığında, bitkilerde genom düzenleme, etik konular açısından uygulamalı araştırmalar için daha uygundur. CRISPR/Cas teknolojisi, gün geçtikçe daha hassas ve verimli hale gelmektedir ve işlevsel genomik çalışmalar ile ürünlerin özelliklerinin geliştirilmesinde etkili bir araç olarak kullanılmaya devam edecektir.

5. Kaynaklar

- [1] Stadler, L. J., Mutation in barley induced by X-rays and radium. *Science*, 68(1756), (1928), 186-187.
- [2] Kuromori, T., Wada, T., Kamiya, A., Yuguchi, M., Yokouchi, T., Imura, Y., Takabe, H., Sakurai, T., Akiyama, K., Hirayama, T., Okada, K., Shinozaki, K., A trial of phenome analysis using 4000 Ds-insertional mutants in genecoding regions of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 47, (2006), 640-651.
- [3] Wu, C., Li, X., Yuan, W., Chen, G., Kilian, A., Li, J., Xu, C., Li, X., Zhou, D. X., Wang, S., Zhang, Q., Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *The Plant Journal*, 35, (2003), 418-427.
- [4] Yang Y., Li Y., and Wu C., Genomic resources for functional analyses of the rice genome. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, (2013), 157-63.
- [5] Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M., and Schell, J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*, 303(5914), (1983), 209.
- [6] Bevan, M. W., Flavell, R. B., Chilton, M.D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation.. *Nature*, 304, (1983), 184-187.
- [7] Fraley, R. T., Roger, S. G., Horsch, R. B., Sanders P. S., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffman, N. L. and Woo, S. C., Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, (1983), 4803-4807.
- [8] Vaecck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Montagu, M. V., Leemans, J. ., Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 328, (1987), 33-37.

- [9] Garg, A. K., Kim, J. K., Owens, T. G., Ranwala, A. P., Do Choi, Y., Kochian, L. V., and Wu, R. J., Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), (2002), 15898-15903.
- [10] de las Mercedes Dana, M., Pintor-Toro, J. A., Cubero, B., Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology*, 142(2), (2006), 722-730.
- [11] Knäblein, J., Plant-based expression of biopharmaceuticals, *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*, (2006).
- [12] Durai, S., Mani, M., Kandavelou, K., Wu, J., Porteus, M. H., Chandrasegaran, S., Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 33, (2005), 5978-5990.
- [13] Puchta, H., The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of Experimental Botany*, 56, (2005), 1-14.
- [14] Lin, S., Staahl, B. T., Alla, R. K., and Doudna, J. A., Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife*, 3, (2014), e04766.
- [15] Puchta, H., Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. *Current Opinion in Plant Biology*, 36, (2017), 1-8.
- [16] Smith, J., Grizot, S., Arnould, S., Duclert, A., Epinat, J. C., Chames, P., Prieto, J., Redondo, P., Blanco, F. J., Bravo, J., Montoya, G., Pâques, F. and Duchateau, P., A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Research*, 34, (2006), e149,5.
- [17] D'Halluin, K., Vanderstraeten, C., Stals, E., Cornelissen, M., and Ruiter, R., Homologous recombination: a basis for targeted genome optimization in crop species such as maize. *Plant Biotechnology Journal*, 6(1), (2008), 93-102.
- [18] Gao, H., Smith, J., Yang, M., Jones, S., Djukanovic, V., Nicholson, M. G. and Lyznik, L. A. Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *The Plant Journal*, 61(1), (2010), 176-187.
- [19] Rinaldo, A. R., and Ayliffe, M., Gene targeting and editing in crop plants: a new era of precision opportunities. *Molecular Breeding*, 35(1), (2015), 40.
- [20] Lloyd, A., Plaisier, C. L., Carroll, D., and Drews, G. N., Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, (2005), 2232-2237.
- [21] Zhang, F., Maeder, M. L., Unger-Wallace, E., Hoshaw, J. P., Reyon, D., Christian, M., Li, X., Pierick, C. J., Dobbs, D., Peterson, T., Joung, J. K., Voytas, D. F., High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using

- zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, (2010), 12028-12033.
- [22] Zhang, F., Voytas, D. F., Targeted mutagenesis in Arabidopsis using zinc-finger nucleases. In *Plant Chromosome Engineering*, Humana Press, (pp. 167-177), (2011), Totowa, NJ.
- [23] Petolino, J. F., Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 51, (2015), 1-8.
- [24] Kumar, S., AlAbed, D., Worden, A., Novak, S., Wu, H., Ausmus, C., Beck, M., Robinson, H., Minicks, T., Hemingway, D., Lee, R., Skaggs, N., Wang, L., Marri, P., Gupta, M., A modular gene targeting system for sequential transgene stacking in plants. *Journal of Biotechnology*, 207, (2015), 12-20.
- [25] Samanta, M. K., Dey, A., and Gayen, S., CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes. *Transgenic Research*, 25(5), (2016), 561-573.
- [26] Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U., Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326, (2009), 1509-1512.
- [27] Sun, N., and Zhao, H., A single-chain TALEN architecture for genome engineering. *Molecular BioSystems*, 10(3), (2014), 446-453.
- [28] Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J. A., Somia, N. V., Bogdanove, A. J. and Voytas, D. F., Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, 39, (2011), 82.
- [29] Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P., and Yang, B., High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature Biotechnology*, 30, (2012), 390-392.
- [30] Zhang, Y., Zhang, F., Li, X., Baller, J. A., Qi, Y., Starker, C. G., Bogdanove, A. J., Voytas, D. F., Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiology*, 161, (2013), 20-27.
- [31] Shan, Q., Wang, Y., Chen, K., Liang, Z., Li, J., Zhang, Y., Zhang, K., Liu, J., Voytas, D. F., Zheng, X., Zhang, Y., Gao C., Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Molecular Plant*, 6, (2013), 1365-1368.
- [32] Wendt, T., Holm, P. B., Starker, C. G., et al., TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Molecular Biology*, 83 (2013), 279-285.
- [33] Char, S. N., Unger-Wallace, E., Frame, B., Briggs, S. A., Main, M., Spalding, M. H., Vollbrecht, E., Wang, K., Yang, B., Heritable site-specific mutagenesis using TALENs in maize. *Plant Biotechnol Journal*, 13, (2015), 1002-1010.

- [34] Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. and Nakata, A., 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, (1987), 5429-5433.
- [35] Nakata, A., Amemura, M., and Makino, K., Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of Bacteriology*, 171, (1989), 3553-3556.
- [36] Hermans, P. W. van Soolingen, D., Bik, E. M., de Haas, P. E., Dale, J. W., van Embden, J. D., Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infection and Immunity*, 59, (1991), 2695-2705.
- [37] Mojica, F. J., Ferrer, C., Juez, G. and Rodriguez-Valera, F., Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular Microbiology*, 17, (1995), 85-93.
- [38] Masepohl, B., Gortlitz, K. and Bohme, H., Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochim. Biophys. Acta* 1307, (1996), 26-30.
- [39] Hoe, N., Nakashima, K., Grigsby D., Pan, X., Dou, S. J., Naidich, S., Garcia M., Kahn E., Bergmire-Sweat, D. and Musser, J. M., Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *Streptococcus* strains. *Emerging Infectious Diseases journal*, 5, (1999), 254-263.
- [40] Jansen, R., Embden, J. D., Gaastra, W. and Schouls, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43, (2002), 1565-1575.
- [41] Pourcel, C., Salvignol, G., and Vergnaud, G., CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151, (2005), 653-663.
- [42] Bolotin, A., Quinkis, B., Sorokin, A., and Ehrlich, S.D., Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151, (2005), 2551-2561.
- [43] Mojica, F.J., Dí'ez-Villasen~ or, C., Garcí'a-Martí'nez, J., and Soria, E., Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60, (2005), 174-182.
- [44] Amitai, G., and Sorek, R., CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology* 14(2), (2016), 67.
- [45] McGinn, J., and Marraffini, L. A., Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology*, 1, 2018.

- [46] Ka, D., Jang, D. M., Han, B. W., and Bae, E., Molecular organization of the type II-A CRISPR adaptation module and its interaction with Cas9 via Csn2. *Nucleic Acids Research*, 46(18),(2018), 9805-9815.
- [47] Scheben, A., Wolter, F., Batley, J., Puchta, H., and Edwards, D., Towards CRISPR/Cas crops—bringing together genomics and genome editing. *New Phytologist*, 216(3), (2017), 682-698.
- [48] Jung, C., Capistrano□Gossmann, G., Braatz, J., Sashidhar, N., and Melzer, S., Recent developments in genome editing and applications in plant breeding. *Plant Breeding*, 137(1),(2018), 1-9.
- [49] Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E., A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337,(2012), 816-821.
- [50] Li, J-F, Norville, J. E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G. M., Sheen, J., Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31, (2013), 688-691.
- [51] Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J. D. G., Kamoun, S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31, (2013), 691-693.
- [52] Shan Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Cheni K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi J. J., Qiu, J. L., Gao, C., Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31, (2013), 686-688.
- [53] Jung, C., Capistrano-Gossmann, G., Braatz, J., Sashidhar, N., Melzer, S., Recent developments in genome editing and applications in plant breeding. *Plant Breeding*, (2017), 1-9.
- [54] Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A., Brutnell, T. P., Citovsky, V., Lemaux, P. G., Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell*, (2016), tpc-00196.
- [55] Ricroch, A., Clairand, P., and Harwood, W., Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(2), (2017), 169-182.
- [56] Woo, J. W., Kim, J., Il Kwon, S., Corvalan, C., Cho, S. W., Kim, H., Kim, J. S., DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*, 33, (2015), 1162-U156
- [57] Waltz, E., Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, 532, (2016), 293.
- [58] Waltz, E., With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. *Nature Biotechnology*, 36, (2018), 6–7.

- [59] Jaganathan, D., Ramasamy, K., Sellamuthu, G., Jayabalan, S., and Venkataraman, G., CRISPR for crop improvement: An update review. *Frontiers in plant science*, (2018), 9.
- [60] Scheben, A., and Edwards, D., Bottlenecks for genome-edited crops on the road from lab to farm. *Genome biology*, 19(1), (2018), 178.

