

## Yeni Nesil Genom Düzenleme Teknikleri: ZFN, TALEN, CRISPR'lar ve Bitkilerde Kullanımı

\*M. Aydın AKBUDAK

Kübra KONTBAY

Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya  
\*Sorumlu yazar e-posta (Corresponding author; e-mail): akbudak@akdeniz.edu.tr

Geliş Tarihi (Received): 22.03.2017

Kabul Tarihi (Accepted): 30.04.2017

### Öz

ZFN, TALEN ve CRISPR'lar DNA'da hedeflenen bölgeye bağlanabilmeleri sayesinde genomda düzenleme yapmaya imkân veren yeni nesil genom düzenleme teknikleridir. Bu tekniklerin kullanımı sayesinde hedef genler mutasyona uğratılarak ya da genomdan kesilerek susturulabilmekte, ayrıca genlerde istenilen nükleotidlerin değiştirilmesi de mümkün olabilmektedir. Yapılan genom düzenlemeleri hâlihazırda kullanılan metotlara kıyasla daha hızlı, daha kolay, etkin ve ucuzdur. Bu makalede yeni nesil genom düzenleme tekniklerinin çalışma prensipleri, kullanıldıkları alanlar, tekniklerin birbirleriyle kıyaslanması ve bu teknikler kullanılarak genetik mühendisliği ve ıslahı alanında şu ana kadar yapılmış çalışmalara yer verilmiştir. Makalenin son bölümünde bu tekniklerle yapılan düzenlemeler sonucunda elde edilen bitkilerin doğaya salınımı ve bu konuda mevcut düzenlemelere de değinilmiştir. Yeni nesil genom düzenleme tekniklerinin bağlanma ve kesim etkinliklerinin artırılması mevcut çalışmalarını bir adım daha ileriye taşıyarak, daha verimli, kaliteli ve çevresel faktörlere karşı toleranslı çeşitlerin geliştirilmesine imkân tanıyacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** ZFN, TALEN, CRISPR, gen susturma, genetik modifikasyon

## New Generation Genome Editing Techniques: ZFNs, TALENs, CRISPRs and Their Use in Plant Research

### Abstract

ZFNs, TALENs and CRISPRs are the new generation genome editing tools functioning by binding a specified target region on DNA. Using one of these techniques, target genes could be edited by insertion/deletions. It is also possible to replace nucleotides in target genes via homologous recombination. Compared to the current methods, new generation genome editing is faster, easier, more efficient and less expensive. This review covers how and where new generation genome editing techniques can be used, comparison one to another, and highlights applications in plant genetic engineering and plant breeding. Furthermore, the release of genome edited plants to the environment and current regulations in the world are discussed. It is predicted that improvements in binding and excising efficacy of new generation genome editing techniques would take the current research one step further, and would be a major aid to plant breeding that would lead to generating crop varieties with higher yield, quality and tolerance to biotic and abiotic stresses.

**Keywords:** ZFN, TALEN, CRISPR, gene silencing, genome modification

### Giriş

**D**izi spesifik nükleazlar (ZFN, TALEN ve CRISPR) tıp, moleküler biyoloji ve bitki ıslahında son 3-4 yıldır yaygın olarak kullanılmaya başlanılan yeni nesil genom düzenleme araçlarıdır. Bu nükleazlar DNA kesim (restriction) enzimlerine benzer şekilde, genomda düzenleme yapılmak istenen bölgede DNA'yı çift iplikli olarak keserler.

Oluşan bu çift iplik kesikleri, hücrenin DNA tamir mekanizmaları olan HR (Homologous Recombination = Homolog Rekombinasyon) ya da NHEJ (Non-Homologous End Joining= Homolog Olmayan Uçların Birleşmesi) yoluyla tamir edilirken, hücre tarafından hangi tamir mekanizmasının kullanıldığına bağlı olarak genomda farklı modifikasyonlar meydana gelir

(Bortesi ve ark. 2015; Lawrenson ve ark. 2015). Tamir sırasında NHEJ'nin HR'ye bir baskınlığı söz konusu olup, tamir olaylarının %99,9'u NHEJ yoluyla gerçekleşir. Bu yolla meydana gelen birleşme sonrasında kesim yapılan bölgede nükleotid kayıpları ve kazanımları oldukça sık görülmektedir. NHEJ yoluyla gerçekleşen bu kusurlu tamir genomdan büyük parçaların silinmesine, nükleotid kazanımı ve kaybı nedeniyle okuma çerçevesi kaymasına (frame-shift) ve nihayetinde oluşan mutasyon nedeniyle hedef bölgedeki genin ifadesinin değişmesine neden olmaktadır (Belhaj ve ark. 2015; Zhang ve ark. 2016a).

HR'den yararlanmak suretiyle yapılmak istenen modifikasyon çalışmalarında (amaca uygun olarak gendeki nükleotid diziliminin değiştirilmesi, gen aktarılması, DNA aktarılacak genin susturulması vb.) genomda hedeflenen bölgeyle homolog diziler içeren bir donör parça hücreye gönderilir ve HR mekanizması sayesinde bu parça genoma entegre edilebilir (Voytas 2013). Diğer yandan, somatik hücrelerde kesik kromozomların onarımı NHEJ yoluyla gerçekleştirilmektedir. NHEJ özellikle insanlar ve bitkiler gibi yüksek ökaryotlarda baskın tamir mekanizmasıdır (Ray ve ark. 2002; Shen ve Strunks 2016).

NHEJ ve HR'yi birbirinden ayıran temel fark, tamir için DNA homolojisine ihtiyaç duyulup-duyulmadığıdır (Takata ve ark. 1998). HR ile DNA kesikleri orijinaline uygun olarak onarılmakla birlikte, bu mekanizmanın kullanılabilmesi için genomun herhangi bir yerinde homolog kromozom ya da kardeş kromatit gibi homolog dizilerin yer alması gerekir (Takata ve ark. 1998). DNA replikasyonu sırasında kardeş kromatitler birbirine yakın olduğu için replikasyon sırasında meydana gelen çift iplik kesikleri genellikle HR yoluyla onarılır. Radyasyon gibi çevre faktörlerinin yol açtığı çift iplik kesikleri ise çoğunlukla NHEJ ile tamir edilir. Bunun en büyük sebebi kardeş kromatitlerin replikasyonda olduğu gibi birbirine yakın olmaması ve de hâlihazırda paketlenmiş olmasıdır (Sonada ve ark. 2006). Gerçekleştirilen tamir orijinaline uygun olmasa da, NHEJ'de HR gibi DNA'nın onarımında görevlidir ve genom bütünlüğünün korunmasını sağlamaktadır.

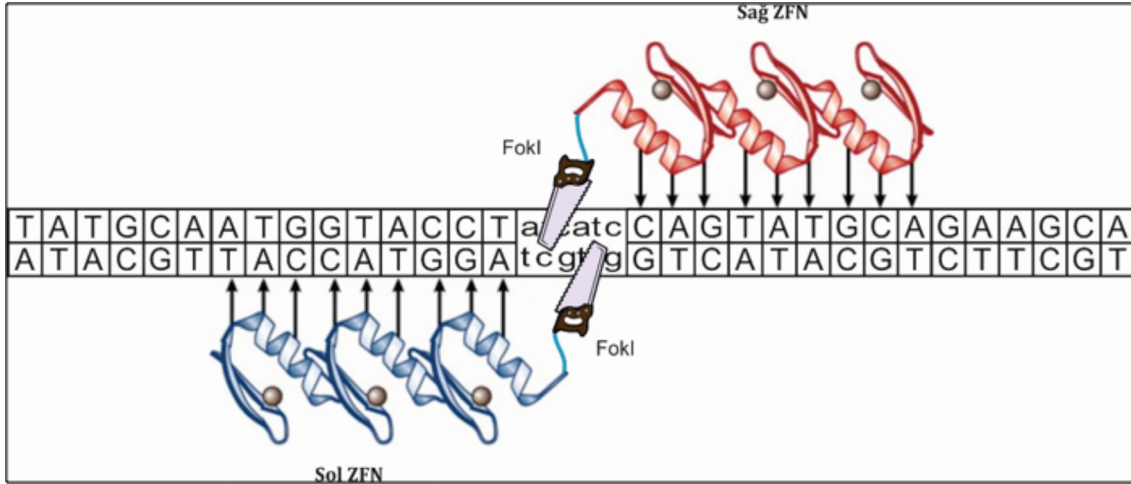
Radyasyon, kanserojenler veya toksik elementler nedeniyle meydana gelen çift iplik kesikleri, dizi spesifik nükleazlar (ZFN, TALEN ve CRISPR) yardımıyla da genomda istenen bölgede yapay olarak oluşturulabilmektedir.

Oluşan bu kesikler hücrede çoğunlukla NHEJ yoluyla onarıldığı için onarılan bölgede insersiyon-delesyon (in-del) nedeniyle mutasyonlar meydana gelmektedir. Oluşan mutasyonlar ise genellikle onarılan bölgedeki genin fonksiyonunu kaybetmesiyle sonuçlanmaktadır (Voytas 2013). Negatif gibi görünen bu durum, gen fonksiyonu araştırmalarında (fonksiyonel genomik) ve yeni genetik kompozisyona sahip bitkilerin elde edilmesinde çok önemli olup moleküler biyoloji ve bitki ıslahında yeni bir çağın başlangıcına işaret etmektedir.

### ZFN'ler (Zinc Finger Nucleases)

ZFN'ler (Zinc Finger Nucleases) kullanıcının genomda modifiye etmek istediği bölgeye göre dizayn edilen ilk dizi spesifik nükleazlardır. ZFN'ler DNA'ya spesifik olarak bağlanan bir domain (binding= bağlanma domaini) ve bir nükleaz (cleavage=kesim) domaini olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. DNA'ya spesifik olarak bağlanan kısım ZF (Zinc Finger) proteinlerden oluşur (Samanta ve ark. 2016). Her ZF birimi 30 amino asit içerir ve bu amino asitler bir adet çinko atomuna bağlıdır. Zinc finger proteinler  $\beta\beta\alpha$  yapısıyla katlanmış.  $\alpha$  helix yüzeyinde bazı spesifik pozisyonlarda bulunan amino asitler ZF proteinlerin DNA ile spesifik interaksiyonunu sağlamaktadır (Szczeppek ve ark. 2007; De Pater ve ark. 2009; Gaj ve ark. 2013). Diğer amino asitlerin bir konsensüs iskeleti olarak bırakılıp sadece bu spesifik aminoasitlerin değiştirilmesi ile farklı sekanslara bağlanan zinc finger proteinler elde edilebilir (Wu ve ark. 2007; Szczeppek ve ark. 2007). Şekil 1'de de görüldüğü gibi üç ya da daha fazla zinc finger birimi dizi halindedir ve her ayrı zinc finger üç spesifik nükleotidi tanıyabilir (Voytas 2013). Böylelikle 18-24 bp kadar bir tanıma bölgesi oluşturulabilir ki bu uzunlukta bir hedef bölge bitki veya memeli genomunda muhtemelen tek olacaktır. *FokI* endonükleaz ise kesim domainini oluşturur.

*FokI*, *Flavobacterium okeanoites* bakterisinden izole edilen bir kesim enzimidir (Wah ve ark. 1998). Zinc finger dizisi ile kombine edilmiş bu enzimin çift iplik kesimi oluşturabilmesi için dimerize (tıpkı bir makas gibi) olması gerekir. Bu nedenle ZF protein dizisinin bir monomeri çift iplikli DNA'ya üstten bağlanırken diğer monomer aralarında 5-7 bp açıklık olacak şekilde alttan bağlanır ve dimer oluşturur (Osakabe ve ark. 2015). Böylece bu alt ve üst iplikten bağlanan ZF proteinleri arasında kalan bölgede (ki burası hedef bölge olarak seçilmiştir) *FokI* çift iplik



Şekil 1. ZFN'nin DNA'yı kesmesi: İki ZFN, DNA'nın alt ve üst ipliklerine yapışarak *FokI* kesim domaininin dimerize olmasını ve DNA'yı her iki iplikçğinden kesmesini sağlar. Kesim bölgesi iki ZFN'nin tanıma bölgeleri arasında kalan 6 baz çiftinden oluşan bölgedir.

Figure 1. DNA cleavage by ZFNs: Binding of two ZFNs to lower and upper strands of DNA at target region results in dimerization of *FokI* and cutting DNA in both strands. Restriction site is a 6-bp spacer sequence between recognition sites of two ZFNs.

kesiği oluşturabilir. İleride bahsedilecek TALEN sisteminde de kesim işlemi *FokI* tarafından gerçekleştirilmekle olup, ZFN ve TALEN sistemleri arasındaki fark DNA'yı tanıyan kısımlarının (binding domainlerin) yapısal farklılığıdır (Samanta ve ark. 2016).

*FokI*'in DNA'da oluşturduğu çift iplik kesiklerinin hücrenin tamir yollarını uyarması sonucunda NHEJ ve HR yoluyla tamir edilirler. NHEJ ile gerçekleşen tamir ile gen knock-outları oluşurken, HR mekanizması yoluyla da genoma parça entegrasyonu (gene targeting) gerçekleştirilebilir (Shukla ve ark. 2009; De Pater ve ark. 2009; Schneider ve ark. 2016).

ZFN sisteminin çalışabilmesi için alt ve üst ZFN proteinlerinin dimerize olması gerekliliği spesifikite açısından bir avantajdır. İki farklı amino asit dizisinin DNA'ya alttan ve üstten bağlanıp kesim yapması anlamına gelen bu durum, çok kompleks bir genomda bile yanlış bağlanma olmadan tek bir hedef bölgenin modifiye edilebilmesine imkan sağlamaktadır (Carroll 2011; Gaj ve ark. 2013).

ZFN sistemi kullanılarak yapılan ilk başarılı çalışmada *Drosophila melanogaster*'in somatik eşey hücrelerinde mutagenез gerçekleştirilmiştir (Carroll 2011). Bu çalışmayı takiben ZFN sistemi ile *C. elegans*, zebra balığı ve insan hücrelerinin yanı sıra *Arabidopsis*, tütün, mısır ve soya fasulyesini de içeren birçok bitkide etkili ve sonraki jenerasyonlara aktarılabilen mutagenез yapılmıştır (Miller ve ark. 2007; Ramalingam ve ark. 2011; Kumar

ve ark. 2015). Hedeflenmiş mutagenезin oranı organizmadan organizmaya değişmektedir (Carroll 2011).

Townsend ve ark. (2009) tütünde yaptıkları çalışmada asetohidroksiasit sentaz (*SuRA* and *SuRB*) genlerini ZFN sistemini kullanarak başarıyla hedeflemiştir. Bu genlerde mutasyon oluşması sonucu bitkiler imidazolinol (IMI) ve sulfonylurea (SU) temelli herbisitlere karşı dirençli hale getirilmiştir. Yine, Shukla ve ark. (2009) ZFN'ler yardımıyla mısır da IPK1 lokusuna bir herbisit tolerans geni aktarmışlar ve T1 jenerasyonunda hem herbisite dayanıklılık hem de IPK1 geninin mutasyona uğraması nedeniyle inositol fosfat profilinde farklılıklar bulunan bitkiler elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Spesifik DNA sekanslarını tanıyan ZF dizileri oluşturmak için birden fazla metot bulunmaktadır. Oligomerized Pool ENgineering (OPEN) genetik seleksiyonla ZF dizisinin inşası için kullanılan kombinasyonel seleksiyon tabanlı bir metottur (Townsend ve ark. 2009; Voytas 2013; Osakabe ve ark. 2015). ZFN oluşturmak için daha basit bir platform ise Context-Dependent Assembly (CoDA) olarak bilinen metottur (Sander ve ark. 2011). CoDA önceden seçilmiş iki finger ünitesini kullanır ve basit tekniklerle, hızlıca ZF dizisinin birleştirilmesine imkân tanır. İsteğe göre ZFN'leri dizayn etmeyi sağlayan başka metotlar ve ticari kitler de mevcuttur (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/zinc-finger-nuclease-technology/custom-zfn.html>).

ZFN dizaynını kolaylaştıran metotlar çoğalsa da genomda istenilen her sekansın hedeflenememesi tüm ZFN tabanlı metotlar için hala sınırlayıcı bir faktördür (Osakabe ve ark. 2015). Ayrıca zincir fingerlar bağlanmaları tercih edilenler dışında başka üçlü nükleotidlere de bağlanabilmektedirler (hedef dışı bağlanma). Bu sebeple genomda hedef dışı yerlerde meydana gelen kesim sayısı hücrenin tamir edebilme kapasitesini aştığında, hücre içinde oluşan toksisite hücre veya organizmanın ölümüne neden olmaktadır (Szczeppek ve ark. 2007; Urnov ve ark. 2010). Gerek dizaynlarının zor olması gerekse hedef-dışı etki nedeniyle toksisite oluşturması, ZFN'leri dizi spesifik nükleazlar içinde en az tercih edilen teknik haline getirmiştir (Petolino 2015).

### TALEN'ler (Transcription Activator Like Effector Nucleases)

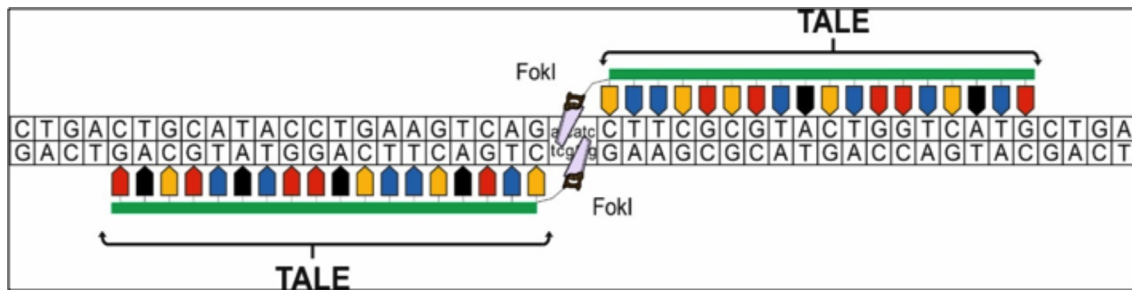
Dizi spesifik nükleaz ailesinin ikinci üyesi olan TALEN sistemi ZFN sistemine bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Joung ve ark. 2013). TALEN sistemi de ZFN sistemi gibi bir DNA bağlanma domaini ve *FokI* DNA kesim domaininden oluşmaktadır (Budhagatapalli ve ark. 2015). TALEN sisteminde DNA'ya bağlanmayı sağlayan TAL efektörleri ilk olarak bir bitki patojeni olan *Xanthomonas* bakterisinin türlerinde keşfedilmişlerdir (Boch ve ark. 2009; Moscou ve ark. 2009). Enfeksiyon sırasında *Xanthomonas* türüne ait bakteriler transkripsiyon aktivatör benzeri (Transcription Activator-Like = TAL) efektörleri (seçici olarak DNA/proteinlere bağlanan ve onların biyolojik aktivitelerini düzenleyen küçük moleküller) bitki hücresine göndermekte ve bu efektörler spesifik bitki geni promotorlarına bağlanarak bu genleri aktive etmektedirler.

*Xanthomonas* türleri bu yolla bitkilerde hastalık yapmaktadırlar (Scholze ve ark. 2011; Voytas 2013).

Bitki patojeninde doğal olarak bulunan TALE (Transcription Activator-Like Effector) proteinlerinin genom modifikasyonunda kullanılabileceği ilk defa bitki genomik DNA'sının manipülasyonu ile gösterilmiştir. Böylece TALE proteinlerinin DNA bağlanma mekanizmasının anlaşılmasında ilk adımlar atılmıştır (Cermak ve ark. 2011; Miller ve ark. 2011).

Genom modifikasyonu aracı olarak kullanılan TALEN'ler, her biri farklı bir nükleotidi tanıyıp bağlanan TALE protein dizisi ve *FokI* endonükleazının birleştirilmesiyle oluşturulmuştur (Pattanayak ve ark. 2014). TALE proteinleri çeşitli kopya sayılarında her biri 33-35 amino asitten oluşan tekrarlar içerirler. Her tekrarın 12. ve 13. pozisyonunda "repeat variable diresidue (RVDs)" olarak adlandırılan ikili aminoasit, hedef DNA sekansı ile baz eşleşmesini sağlar (Kumar ve ark., 2015). En yaygın RVD'ler, yani aminoasitler, NI, NG, NN ve HD'dir. Bunlar sırasıyla adenin, timin, guanin ya da sitozine bağlanırlar (Voytas 2013).

DNA'nın istenen bölgesinde kesim yapmak için alt ve üst ipliklerden karşılıklı DNA ipliklerine bağlanan bir çift TALEN gereklidir. Alt ve üst DNA ya bağlanan TALEN'ler dimerize olmadan (birbirleriyle temas kurmadan) TALEN' in nükleaz aktivitesi gerçekleşemez. Yani tek bir TALEN kendi başına kesim etkinliğine sahip değildir. Karşılıklı olarak bağlanan iki TALEN yapısı arasında 14–18 bp kadar mesafe olmalıdır. Bu dimerize yapı oluştuğunda *FokI* endonükleazları hedeflenen DNA sekansında çift iplik kesikleri oluşturur (Şekil 2).



Şekil 2. TALEN'lerin DNA'yı kesmesi: TALEN'ler genomda arzu edilen hedef bölgeyi kesmek için alt ve üst ipliklere bağlanacak şekilde tasarlanırlar. TALE'lerin alt ve üst ipliklere bağlanması sonucu dimerize olan *FokI*, DNA'yı iki bağlanma bölgesi arasında kalan spacer (12-20 bp) bölgesinden keser. Dört farklı RVD dört nükleotidden birini tanıyabilir.

Figure 2. DNA cleavage by TALENs: TALENs are designed as to bind upper and lower DNA strands to cut the DNA in target region. Binding of TALENs to both strands results in dimerization of *FokI* and a double stranded break in the spacer region (12-20 bp). Four different RVD recognizes one of each nucleotides.

Her biri farklı bir bazı tanıyan RVD'lerden oluşturulmuş TAL efektör proteinleri, hedeflenecek DNA dizisine göre yeniden oluşturulabilirler (Reyon ve ark. 2012). İsteğe göre tasarlanan TAL efektörlerinin inşası kolay değildir. TALE proteinlerindeki tekrarların sekansı birbirine çok benzer olduğundan PCR stratejisi kullanarak RVD'leri sıralı bir biçimde birleştirmek neredeyse imkânsızdır. Birçok grup TAL efektör tekrarlarını kodlayan kasetlerin birleştirilmesi için ligasyon temelli birleştirme metotları önermiştir. Bunlar arasında en popüler olanı Golden Gate Assembly metodudur (Cermak ve ark. 2011). Bu yaklaşımda TAL efektörü (TALE) kodlayan farklı RVD sekansları tek reaksiyonla birleştirilebilir (Voytas 2013). TALEN sisteminde kullanıcının belirlediği hemen hemen her sekans hedeflenebilir (Gaj ve ark. 2013; Joung ve ark. 2013).

Her ne kadar TALEN sisteminin spesifikliğı oldukça yüksek olsa da TALEN kullanılarak genom düzenlemede hedef-dışı mutasyonların olabileceği rapor edilmiştir (Clasen ve ark. 2016). DNA'ya bağlanacak TALE sekanslarının belirlenmesinde hedef sekansa olan spesifisiteyi sağlamak ve aynı zamanda hedef-dışı sekanslara bağlanmayı önlemek için bazı web temelli programlar geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanları TALE-NT (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen>) ve E-TALEN (<http://www.e-talen.org/E-TALEN/index.html>)'dir.

TALEN sistemi DNA üzerinde istenen bölgeye bağlanıp çift iplik kesiği oluşturduğunda bu kesiğin NHEJ ya da HR tamiri ile mayada, bitkilerde, nematodlarda, zebra balığına, farelerde, insan somatik hücrelerinde ve pluripotent kök hücrelerde endojen genlerin değiştirilebileceği gösterilmiştir (Reyon ve ark. 2012; Char ve ark. 2015).

Ekonomik öneme sahip çeşitli bitkilerde hastalıklara dayanıklılık kazandırılarak verimin artırılması için TALEN teknolojisinin kullanımı bilimsel çalışmalarla ortaya konulmuştur. Wang ve ark. (2014) poliploid bir genoma sahip olan buğdayda eş zamanlı olarak MLO (Mildew Locus O) genini her üç allelde de mutasyon oluşturmak suretiyle susturmuş ve bu sayede mildiyö hastalığına karşı bir dayanıklılık geliştirmiştir. Li ve ark. (2012) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise bakteriyel küf duyarlılık geninin promotörü hedeflenmiş ve patojene dirençli ve aynı zamanda TALEN T-DNA'sını içermeyen dolayısıyla transgenik olmayan çeltikler elde edilmiştir.

TALEN'ler verim artışı yanında tarım ürünlerinde kalitenin artırılmasında ve pazar payının yükseltilmesinde de kullanılabilirler. Soya fasulyesi çoklu doymamış yağ asitlerince çok zengindir ve bu yağ asitleri soya yağının raf ömrünü uzatmak ve oksidatif stabiliteyi geliştirmek için hidrojenlenir. Hidrojenlenme sırasında oluşan trans yağ asitleri ise insan sağlığı açısından sakıncalıdır. Haun ve ark. (2014) TALEN'lerden yararlanarak tekli doymamış yağların çoklu doymamış yağlara çevrilmesinde görevli iki yağ asidi desaturaz geninde (*FAD2-1A* ve *FAD2-1B*) mutasyon oluşturarak çoklu doymamış yağları az olan soya fasulyesi hatları elde etmişlerdir. Yine, çeltikte TALEN teknolojisi kullanılarak *OsBADH2* geninin knock-out edilmesiyle piyasa değeri kokusuz pirinçlere kıyasla daha yüksek olan kokulu pirinç üretilmiştir (Shan ve ark. 2015).

Fitat tek mideli canlılar tarafından sindirilemediği için vücuttan atılan ve bu nedenle toprakta fosfor kirlenmesine sebep olan bir bileşiktir. Ayrıca bunu tüketen at gibi tek mideli canlılar sindirim sistemlerinde fitaz (phytase) aktivitesi olmadığı ya da çok az olduğundan bu hayvanlar fitatı sindiremeyip fosfordan yararlanamazlar (Dionisio ve ark. 2011). Wendt ve ark. (2013) TALEN sistemini kullanarak Gramineae familyasından olan arpada fitat miktarını başarılı bir şekilde azaltmışlardır. Çalışmada fitat geninin promotöründe bulunan regülatör diziler hedeflenmiş ve bu dizilerde delesyon oluşturularak söz konusu regülatör dizilerin fitat geninin ekspresyonunu değiştirmeye ve bu mutasyonun tane gelişimine nasıl yansıtacağı belirlenmeye çalışılmıştır.

Çeltik ve *Brachypodium*'da TALEN'lerden yararlanılarak gen modifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Shan ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada özellikle tahıllar ve monokotiledon bitkiler için bir model organizma olan *Brachypodium*'da ve çeltikte birden çok gende TALEN sayesinde hedeflenmiş mutagenезin ve gen knock-out (susturmalarının) başarılı bir şekilde yapılabileceğini göstermişlerdir. Lor ve ark. (2014) ise domateste giberellin yolağının negatif regülatörü olan Della proteinini kodlayan *Procera* genini (domateste bu genden bir tane vardır) TALEN sistemi ile hedeflemiş ve sonuçta *Procera* mutanti homozigot hatlar elde etmişlerdir. Dellanın fonksiyonunu kaybetmesi nedeniyle bitkilerin giberellic aside tepkileri artmış ve uzun boylu, gövdesi ince domates hatları elde edilmiştir.

TALEN'lerin tarımsal değeri yüksek olan mısır bitkisinde etkin bir şekilde çalıştığını ise Char ve ark. (2015) ortaya koymuştur. Mısırdaki *glossy2 (gl2)* lokusunu TALEN sistemi ile hedefleyen araştırmacılar T1 jenerasyonunda TALEN T-DNA'sı içermeyen bitkiler elde etmişlerdir. Glossy lokusunda mutasyon oluşturulduğunda bu, fidelerin yapraklarında epikutiküler mumsu tabakanın azalması şeklinde fenotipe kolayca yansımaktadır.

Soğuk depoda bekletilen patateslerde şekerler indirgenmekte ve indirgenen şekerlerin serbest amino asitler ile reaksiyona girmesiyle kahverengi, tadı acı ve yüksek akrilamid (sinir sistemini etkileyen bir toksin) seviyesine sahip patatesler oluşmaktadır ki bu hem sağlık açısından hem de ticari açıdan arzu edilmeyen bir durumdur. Clasen ve ark. (2016) TALEN sistemini kullanarak soğuk depoda bekletilen patateslerde oluşan bu problemin önüne geçmeyi başarmış, yaptıkları çalışmayla şekeri indirgeyen proteini kodlayan *Vlnv* genini knock-out ederek tespit edilemeyecek derecede indirgenmiş şeker içeren transgensiz patates hatları oluşturmuşlardır.

Nükleaz domaini olmayan TALE'ler gen ifadesinin düzenlenmesinde kullanılmaktadır. TALE'ler yardımıyla genlerin ekspresyonunu güçlendirmek, azaltılmak ya da tamamen durdurulabilmek mümkün olmaktadır. Bu amaç için kesim domaini TALEN vektörüne eklenmemekte, uzaklaştırılmakta veya inaktive edilmektedir. Bunu takiben TALE dizisi, transkripsiyonel aktivatörler ya da represörler ile birleştirilip oluşan füzyon protein, promotor ve çevresine bağlanacak şekilde düzenlendiğinde ilgili genin ekspresyonu kontrol altına alınabilmektedir (Baltes ve ark. 2015).

TALEN teknolojisi CRISPR'ların maliyet ve kolay elde edilebilme gibi avantajlarına rağmen, hedef lokustaki yüksek spesifitesi nedeniyle (Char ve ark. 2016) yine de birçok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir. Farklı TALEN yapılarının geliştirilmesi ve başka bakteri türlerinden doğal TALE proteinlerinin elde edilerek TALEN'lerin etkinliğinin artırılmasına yönelik çalışmalar halen devam etmektedir (Lee ve ark. 2016).

#### **CRISPR'lar (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)**

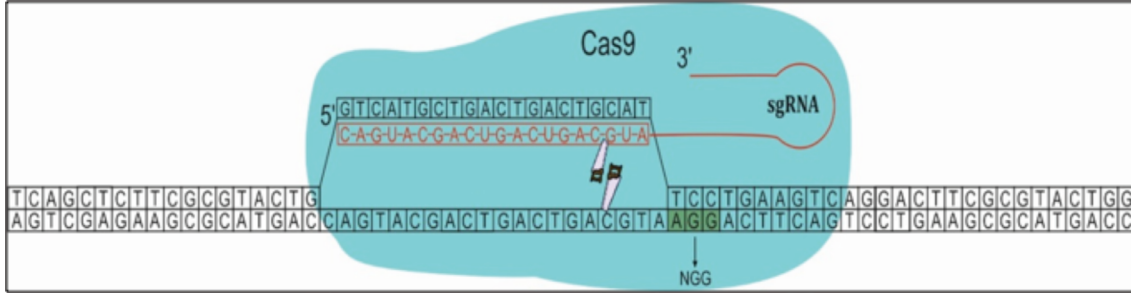
Kullanıma başlanmasıyla genom mühendisliği çalışmalarını oldukça hızlandırarak bitki biyoteknolojisinde çığır açan CRISPR'ların

çalışma prensibi RNA aracılı nükleazlara dayanır (Bortesi ve ark. 2015). En yaygın kullanılan sistem, *Streptococcus pyogenes*'de keşfedilen CRISPR/Cas9 sistemidir (Rani ve ark. 2016; Nejat ve ark. 2016). CRISPR sistemi bakteri ve arkelerin kendi genomlarını korumaya yönelik bağışıklık sistemlerinin bir parçasıdır. Bu sistem yabancı DNA'yı sekansına bağlı olarak keserek, bakteri ve arkeleri istilacı nükleik asitlerden (virüsler gibi) korur (Jinek ve ark. 2012; Hwang ve ark. 2013).

Mikroorganizmalardaki orijinal CRISPR sisteminde Cas9 proteinine rehberlik eden crRNA ve tracrRNA olmak üzere iki CRISPR RNA'sı bulunur. Genom düzenlemede kullanılan yeniden programlanmış CRISPR sisteminde ise crRNA'nın 3' bölgesi ile tracrRNA'nın 5' ucunun birleştirilmesiyle meydana getirilen sgRNA (single guide RNA) olarak adlandırılan tek bir RNA söz konusudur (Bortesi ve ark., 2015). Bu sayede CRISPR teknolojilerinden yararlanmak için Cas9 olarak adlandırılan DNA endonükleaz ve genomda hangi bölge hedeflenecekse ona göre dizayn edilen 20 nükleotidlik bir RNA dizisi yeterli olmaktadır. Sistemin bu iki elemanının DNA'daki hedef bölgeye bağlanıp bir protein (Cas 9) – RNA (SgRNA) – DNA (genomik DNA) kompleksi oluşturmasıyla hedef bölgede çift iplik kesikleri meydana gelir (Fichtner ve ark. 2014; Schaeffer ve ark. 2015). Hedef bölgenin tanınması ve Cas9/sgRNA kompleksinin DNA üzerinde kesim yapabilmesi için tek ön koşul hedef bölgenin 3' ucunda PAM ismi ile adlandırılmış bir NGG sekansının bulunmasının gerekliliğidir (Gasiunas ve ark. 2012; Mahfouz ve ark. 2014). CRISPR sisteminin çalışma mekanizması Şekil 3' de gösterilmiştir.

2013 yılının başlarında Cas9 sisteminin insan hücre kültürlerinin genom modifikasyonu için kullanılabileceği gösterilmesiyle CRISPR sisteminin diğer ökaryot organizmalarda kullanılabileceği de anlaşılmıştır (Schiml ve ark. 2016). Aynı yılın Ağustos ayında ise CRISPR sisteminin bitkilerde kullanılabileceğini rapor eden 3 makale yayımlanmıştır (Bortesi ve ark. 2015; Schiml ve ark. 2016). Bu farklı gruplar *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, çeltik ve buğday protoplastı kullanılarak Cas9 proteininin bitki genomunda aktif bir şekilde kesim yaptığını ortaya koymuşlardır (Bortesi ve ark. 2015; Samanta ve ark. 2016).

Bugüne kadar birçok bitkinin genomu CRISPR teknolojisi kullanılarak modifiye edilmiştir. Modifiye edilen bitki türleri arasında çeltik (Jiang ve ark. 2013; Zhang ve ark. 2014;



Şekil 3. CRISPR sistemiyle DNA'nın kesilmesi: Cas9 proteini (mavi renkli), sgRNA (single guide RNA) yardımıyla genomdaki hedef DNA sekansına yönlendirilir. sgRNA'nın yaklaşık 20 nükleotidlik kısmı genomdaki hedef DNA sekansı ile komplementerdir. Cas9/sgRNA kompleksinin hedef DNA'ya bağlanması sonucunda Cas9, DNA'yı hedef bölgeden keser. Hedeflenen DNA bölgesinin devamında PAM sekansın (yeşil renkli) (NGG) bulunması DNA'nın Cas9 tarafından kesmesi için gerekmektedir.

Figure 3. DNA cleavage by CRISPRs: Cas9 protein is (in blue) directed to target DNA region by sgRNA (single guide RNA). Approximately 20 nucleotides of sgRNA are complementary to target DNA sequence. Binding of Cas9/sgRNA complex to target DNA region results in a double stranded break. Presence of PAM sequence (in green) (NGG) at the target region is required for Cas9 to cleave DNA.

Sun ve ark. (2016) buğday, (Zhang ve ark. 2016c), mısır (Svitashev ve ark. 2016), sorgum (Jiang ve ark. 2013), domates (Cermak ve ark., 2015; Pan ve ark., 2016;), patates (Wang ve ark., 2015; Butler ve ark., 2015), hıyar (Chandrasekaran ve ark. 2016), asma (Wang ve ark. 2016; Ren ve ark. 2016; Malnoy ve ark. 2016), elma (Nishitani ve ark. 2016; Malnoy ve ark. 2016), şeker portakalı (Jia ve ark. 2014), limon (Jia ve ark. 2016), kavak (Fan ve ark. 2015) soya fasulyesi (Michno ve ark. 2015), ketencik (Jiang ve ark. 2016), yonca (Michno ve ark. 2015) ve tütün (Nekrasov ve ark. 2013; Jiang ve ark. 2013) gibi önemli tarım ürünleri mevcuttur.

Zhou ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada CRISPR sistemiyle çeltik bitkisinde büyük delesyonlar oluşturulabileceğini gösterirken aynı yıl Schiml ve ark. (2014) CRISPR teknolojisinin bitki genomuna HR yoluyla bir direnç kaseti eklenebileceğini bildirmiştir. Tüm bu çalışmalar CRISPR sisteminin mutagenез oluşturma etkinliği, kesim özgülüğü, kromozomal delesyonlar oluşturma ya da gen ekleme potansiyeli gibi özelliklerini içeren karşılaştırmalı veriler sağlamıştır (Bortesi ve ark. 2015).

CRISPR'larla yapılan başka çalışmada ise yine çeltikte asetolaktaz sentaz enzimini kodlayan ALS geni homolog rekombinasyon yoluyla hedeflenmiştir. Asetolaktat sentaz enziminin klorsulfuron ve Bispyribac-Sodyum (BS) gibi herbisitlerin hedefi olmasından dolayı, bu gende yapılan değişikliklerle herbisite dirençli çeltik bitkileri elde edilmiştir (Sun ve ark. 2016). Jia ve ark. (2014) ise CRISPR sisteminin turunçgillerde de etkili bir genom düzenleme

aracı olduğunu şeker portakalında *CsPDS* geninde hedef-dışı etki olmadan mutagenез oluşturarak kanıtlamışlardır.

Mikroalgler ileri jenerasyon biyoyakıt üretiminde hammadde olarak kullanılabilirler. Yapılan çalışmalar *Chlamydomonas reinhardtii* genomunda CRISPR aracılığıyla sitotoksititeye yol açmadan knock-in ve knock-out yoluyla mutasyonlar yapılabileceğini ortaya koymuştur (Jiang ve ark. 2014; Shin ve ark. 2016).

CRISPR'dan temel biyoloji çalışmalarında da yararlanılmaktadır. Haşhaştta CRISPR teknolojisi ile metabolik yolların manipüle edilebileceği gösterilmiştir (Alagöz ve ark. 2016). Sugano ve ark. (2014) ise kara bitkilerinin evrimi ile ilgili çalışmalarda model olarak kullanılan damarsız bir bitki türü olan *Marchantia polymorpha* L.'da auxin response factor 1 (ARF1) geninde CRISPR sistemiyle mutagenез yapılabileceğini göstermiştir. Yine, damarsız bitkilerden *Physcomitrella patens* de CRISPR'lar kullanılarak endojen genlerin tek veya çoklu şekilde %100'e yakın bir etkinlikle susturabileceği gösterilmiştir (Collonier ve ark. 2016; Lopez-Obando ve ark. 2016).

CRISPR yoluyla ürünlerin kalitelerinin artırılmasına yönelik çalışmalar da mevcuttur. Ito ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada CRISPR kullanarak domateste *RIN* geninde başarıyla mutasyonlar oluşturmuşlardır. Meyve olgunlaşması ile ilgili olan *RIN* genin susturulması domateste raf ömrünü uzatmıştır.

Hedef-dışı etki genom düzenleme çalışmalarının başlıca sorunudur (Zhang ve ark. 2016b; Zhang ve ark. 2016c). Bu durum genom modifikasyon araçlarının (her ne kadar

genomda belli bir bölgeye göre tasarlanmış olsa da) genomda yanlış yere bağlanıp kesim yapması ve istenmeyen diğer mutasyonları da oluşturmasıdır. Bu yanlış kesimin nedeni çoğunlukla genomda hedeflenen dizinin sekansına benzeyen başka dizi veya dizilerin bulunmasıdır. Genomda böyle yanlış eşleşme ve akabinde yanlış kesim oluşturabilecek dizilerin varlığı çeşitli bilgisayar programları yardımıyla önceden tahmin edilebilmektedir (Zhang ve ark. 2016b; Zhang ve ark. 2016c). Bu programların kullanılabilmesindeki en önemli kısıt DNA'sı kesilmek istenen bitki türünün genomunun sekanslanmış olmasının gerekliliğidir.

Üzerinde çalışılan organizmanın tam genom dizisi biliniyorsa BLAST uygulaması ile olası non-spesifik dizilerin genomda varlığı ve sıklığı belirlenebilir (Jia ve ark. 2014; Nejat ve ark. 2016). Bu sıklığı belirlemek için bilim insanları tarafından değişik algoritmalar geliştirilerek web tabanlı bilgisayar programları oluşturulmuştur. CRISPR için en yaygın olarak kullanılan programlardan ikisi CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>) ve CRISPR-DESIGN'dır (<http://crispr.mit.edu/>).

Hedef-dışı etkinin rapor edildiği ve CRISPR sisteminin spesifikliğini sorgulayan raporlar olduğu gibi hedef-dışı etkinin görülmediği çalışmalarda rapor edilmiştir (Ceasar ve ark. 2016; Pan ve ark. 2016). Oluşan hedef-dışı aktivite organizmadan organizmaya değişmektedir (Pan ve ark. 2016). CRISPR sisteminin çalışma mekanizmasından kaynaklanan hedef-dışı aktiviteyi azaltmak için birçok farklı yol önerilmiştir. Yirmi nükleotidden kısa sgRNA kullanmak, her biri tek iplik kesimi oluşturan ikili Cas9 nickase kullanmak bu yollara örnek olarak verilebilir (Lawrenson ve ark. 2015; Paul ve ark. 2016; Rani ve ark. 2016).

CRISPR sisteminin en önemli avantajlarından biri, tek bir sgRNA ile homolog genlerin eş zamanlı susturulabilmesidir (Endo ve ark. 2015; Zhang ve ark. 2016b). Diğer yandan, çoklu sgRNA'lar içeren Cas9/sgRNA ekspresyon vektörlerinin kullanılmasıyla bir gen ailesi üyelerinin görev aldıkları yollardaki fonksiyonları incelenebilir (Xing ve ark. 2014; Zhang ve ark. 2016b; Zhang ve ark. 2016d).

Cas9 ve sgRNA'nın hücre içerisine protein ve RNA olarak yollanabilmesi sayesinde GDO (Genetiği Değiştirilmiş Organizma)'lardaki endişenin temel nedenlerinden biri olan,

organizmalar arası gen aktarımı ve bunun getireceği muhtemel sorunların önüne geçilebileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Woo ve ark. (2015) CRISPR sistemiyle *Arabidopsis*, tütün, marul ve çeltikte yaptıkları çalışmada Cas9 proteini ve sgRNA'yı direkt olarak PEG (polietilen glikol) varlığında bitki protoplastlarına göndermiş ve %46'ya varan oranlarda hedeflenmiş mutagenез yapılabileceğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Cas9-sgRNA ribonükleoprotein kompleksini biolistik yolla mısır embriyolarına gönderen Svitashv ve ark. (2016), bu embriyolardan rejenere olan bitkilerde hedeflenen mutasyonlar gözlemlemiştir. Her iki çalışmayla da istenen modifikasyonu içeren ama yabancı DNA'sız ve markörsüz bitkilerin elde edilebileceği gösterilmiştir. İlerideki bölümlerde de bahsedileceği üzere bu şekilde gerçekleştirilen transformasyonda genoma entegre olabilecek rekombinant bir DNA kullanılmadığı için elde edilmiş bitkiler GDO yönetmeliğinden muaf tutulabilir.

Daha kesin ve etkili genom düzenleme için CRISPR teknolojisinin optimizasyonuna yönelik çalışmalar devam etmekte olup, CRISPR sistemi kullanılarak yapılan genom mühendisliği çalışmalarına her gün bir yenis eklenmektedir.

### **ZFN, TALEN ve CRISPR Sistemlerinin Karşılaştırılması**

CRISPR ile kıyaslandığında, ZFN ve TALEN'leri dizayn etmek ve hazırlamak hem zor hem zaman alıcıdır (Fichtner ve ark. 2014). Özellikle ZFN konstraktlarının manipüle edilmelerinin zor ve pahalı olması (Schimpl ve ark. 2016) bitkiler dâhil birçok organizmada kullanımını kısıtlamıştır. TALEN'lerin oluşturulması ZFN'lere kıyasla kolay olmakla birlikte, yine de deneyim istemektedir (Ma ve ark. 2016).

CRISPR vektörlerinin hazırlanmasının kolaylığı yanında, Cas9 nükleazın kesim yapabilmesi için dimerize olmasına ihtiyaç olmaması bu sistemin önemli avantajları arasında yer almaktadır. Cas9 hedef DNA'yı ona rehberlik eden sgRNA ile hedef dizi arasındaki Watson-Crick baz eşleşmesine göre tanımaktadır (Ding ve ark. 2016). Bu sayede ZFN ve TALEN'lerde olduğu gibi iki ayrı yapının hazırlanmasına ihtiyaç duyulmamaktadır.

Maliyetlerine bakıldığında ZFN ve TALEN sistemleri CRISPR sistemine göre daha pahalıdır (Ceasar ve ark. 2016). Protein



dizaynının ve sentezinin zorluğu ZFN ve TALEN'lerin rutin olarak kullanılmalarını engellemiştir. Oysa CRISPR da farklı bir hedef için sadece 20 nükleotidlik bir sgRNA modifiye edilmesi yeterli olup, yoğun bir iş gücü gerektirmemektedir (Samanta ve ark. 2016). Hedef-dışı etki oranı en düşük olan teknoloji TALEN'dir. Fakat ZFN ve CRISPR sistemlerinin de hedef spesifiteleri artırılabilir (Kumar ve ark. 2014; Fichtner ve ark. 2014).

CRISPR teknolojisinin avantajları ve uygulama alanları maddeler halinde aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

a) CRISPR ile birden fazla sgRNA kullanılarak eş zamanlı olarak genomda birden fazla gen hedeflenebilir (multiplex genome engineering). (Cong ve ark. 2013; Wang ve ark. 2015a Schaeffer ve ark. 2016; Weeks ve ark. 2016; Zhang ve ark. 2016d).

b) CRISPR sistemiyle organizmanın genomunda delesyonlar oluşturulabilir (Zhou ve ark. 2014; Jia ve ark. 2014).

c) CRISPR sistemiyle bitki genomunda istenen bir bölgeye HDR (Homology Directed Recombination) yoluyla DNA fragmanı eklemek mümkün olmakla birlikte (Schiml ve ark. 2014), bunun başarılı olduğu çalışma sayısı çok azdır (Ma ve ark. 2016). Rapor edilen yayınlarda daha çok bitkinin kendi genomunda bulunan bir genin tahrip edilerek susturulmasına çalışılmıştır.

d) Organizmanın genomunda CRISPR sistemiyle daha ilk jenerasyonda, herhangi bir değişikliğe uğramadan sonraki jenerasyonlara aktarılabilen biallelik sağlanabilir, heterozigot ve homozigot mutasyonlar oluşturulabilir (Zhang ve ark. 2016c). Bu durum özellikle üreme döngüsü uzun olan odunsu bitkilerde ilk jenerasyonda fenotipik mutasyon elde etmeyi mümkün kılar (Ma ve ark. 2016).

e) CRISPR sistemi bitkilerde verim, yapı, besin maddesi kullanımı, hastalıklara direnç ve stres koşullarına adaptasyon gibi özelliklerin genetik ıslahında kullanılabilir. Buğdayda TALEN'lerle de gösterildiği gibi TaMLO homologlarının (A, B ve D genomlarında) eş zamanlı knock-out edilmesi ile mildiyö hastalığına dirençli buğday üretilmiştir (Ma ve ark. 2016; Schaeffer ve ark. 2016).

f) CRISPR teknolojisi bitkilerde metabolik ve gelişimsel yollarda görevli genlerin anlaşılması için de kullanılabilir. Örneğin, fotosentezin iki anahtar proteini olan magnezyum şelat subunit I (CHLI) genleri,

*CHLI1* (At4g18480) ve *CHLI2* (At5g45930) eş zamanlı olarak susturulmak üzere hedeflenmiş ve sonuçta albino bitkiler elde edilmiştir. Böylelikle enzimlerin klorofil biyosentezindeki rolleri anlaşılmasının önü açılmıştır (Mao ve ark. 2013; Weeks ve ark. 2016).

g) CRISPR sistemi bitkilerde metabolik yolları manipüle etmek için kullanılabileceği gibi bu sistemle gen ekspresyonu da kontrol edilebilir (Qi ve ark. 2013; Alagöz ve ark. 2016).

h) CRISPR sistemi DNA metilasyonuna duyarlı olduğu için epigenetik regülasyon altındaki genomik bölgeler de düzenlenebilir (Lowder ve ark. 2015).

### **Yeni Nesil Genom Düzenleme Araçları ile Elde Edilen Bitkilerin Doğaya Salınımı ve Tüketimi ile İlgili Düzenlemeler**

ZFN, TALEN ve CRISPR ile elde edilen bitkilerin GDO olarak sayılıp sayılmayacağı, dolayısıyla bu tekniklerle elde edilen ticari varyetelerin doğaya salınımı ve tüketiminde GDO'lara uygulanan denetimlerin uygulanıp uygulanmayacağı dünyadaki pek çok düzenleme kuruluşunun gündemini yoğun olarak işgal eden bir sorudur. Bu sorunun çözüme ulaştırılması yönünde ülkeler farklı yaklaşımlar benimsemekle birlikte düzenlemelerde temel olarak iki yaklaşım ön plana çıkmaktadır (Voytas ve Gao 2014; Araki ve Ishii 2015; Wolt ve ark. 2016).

İlk yaklaşımda yeni varyetelerin elde edilmesinde hangi tekniklerin kullanıldığı göz önünde bulundurulmaktadır. Bu yaklaşıma göre eğer yeni varyetelerin elde edilmesinde bitkiye nükleik asitler transfer edilmişse ya da rekombinant DNA teknolojileri kullanılmışsa bu yolla elde edilen bitkiler için düzenleme mekanizması devreye sokulmaktadır. Bu düzenlemelerin (mevzuatın) uygulanmasında FAO gibi uluslararası kuruluşlar tarafından hazırlanmış olan ya da Cartagena Biyogüvenlik Protokolü gibi anlaşmalarda yer alan tanımlamalar ve yönetmelikler esas alınmaktadır. Uygulanan tekniğe göre düzenlemeleri temel alan bu yaklaşım Avrupa Birliği, Arjantin, Brezilya ve başka birkaç ülke tarafından daha benimsenmiştir (Voytas ve Gao 2014; Wolt ve ark. 2016).

İkinci yaklaşımda ise uygulanan teknikten çok ortaya çıkan ürünün sahip olduğu risklere yani, meydana getirilen yeni özelliğin potansiyel riskine ve bu özelliğin insan sağlığına ve doğaya zarar verip vermeyeceğine odaklanılmıştır.

ABD ve Kanada ürün temelli bu ikinci yaklaşımı benimsemiştir ve düzenlemelerini bu çerçevede yapmaktadır (Voytas ve Gao 2014; Wolt ve ark. 2016).

Bu noktada NHEJ ile elde edilmiş bitki varyeteleri ile ilgili sorunların çözümü nispeten daha kolay gözükmemektedir. Çünkü yeni nesil genom düzenleme teknikleri ile DNA'da oluşturulan mutasyonlar doğal olarak oluşan ya da kimyasallar ve X ya da gama ışınlarıyla oluşturulan mutasyonlardan herhangi bir şekilde farklılık arz etmemektedir. Ayrıca bu yolla gerçekleştirilen mutasyonlar daha kontrollü olmakta, islah da daha az zaman almaktadır (Araki ve Ishii 2015). Dahası NHEJ ile oluşturulan modifikasyonlar ZFN, TALEN ve CRISPR'ların hücrede geçici olarak (transiently) ifade edilmesiyle oluşturulabileceği için bitki genomuna herhangi bir DNA'nın entegrasyonuna ihtiyaç da duymamaktadır. Vektörler hücreye aktarılıp ZFN, TALEN veya CRISPR'lar sitoplazmada ifade edildikten sonra bu vektörler hücre içinde parçalanmakta ve genoma entegre olmadan kaybolmaktadırlar (1). Vektörler genoma entegre olsalar bile çoğunlukla modifikasyonun yapıldığı lokusa bağlantılı olmayan bir lokusa entegre olmakta ve segregasyon neticesinde ZFN, TALEN ve CRISPR genlerini içermeyen fakat genomlarında halen modifikasyon yapılan bölgeyi taşıyan bitkiler elde edilebilmektedir (2). Hedef lokusta gerçekleştirilen bu mutasyonlar ZFN, TALEN ve CRISPR'ların viral vektörler içerisinde geçici olarak ifade edilmesiyle (3) ya da bunların hücre içine mRNA ya da protein olarak aktarılmasıyla da oluşturulabilir (4). Protein olarak aktarılma olanağı ilk yaklaşımdaki nükleik asit olarak aktarılma yaklaşımındaki kısıtlamayı baypas ettiği için özellikle ilgi çekici bir teknik olarak öne çıkmaktadır. Proteinler nükleik asitler gibi sonraki nesillere aktarılmayacağından ZFN, TALEN ve CRISPR'ların protein olarak aktarılması hâlihazırda kullanılan standart mutajenlerin kullanımından çok farklı değildir (Voytas ve Gao 2014). Çoğu ülkedeki düzenleme kuruluşları (Kanada gibi istisnalar hariç) basit nokta mutasyonlarını ve mutagenizle elde edilen bitkilerin GDO'larla aynı kategoride değerlendirilmemesi gerektiğini düşünmektedirler (Wolt ve ark. 2016).

Bitkilerde HR yoluyla meydana getirilecek düzenlemelere bakış açısı NHEJ'den farklılık arz etmektedir. HR ile yapılacak düzenlemelerde genomdaki hedef lokusta tek

bir nükleotidlik bir değişiklik yapılacak olsa bile kalıp (template) olarak nükleik asitlerin hücre içine aktarılması gerekecektir ki bu birinci kategoride yer alan kullanılan teknik temelli düzenleme kurallarını devreye sokacaktır. Bazı bilim insanları başka bir varyetede aynı sekansa sahip ortolog bir genin kullanılması ya da yabancı çeşitlerdeki hastalık genlerinde tanımlanan birkaç nükleotidlik değişikliklerin HR yoluyla aktarılması ve hassas varyetelerin dayanıklı hale getirilmesi gibi uygulamalarda bu bitkilerin GDO'lar için uygulananlardan farklı düzenleme mekanizmalarına tabi tutulmalarının gerekliliğine dikkat çekmektedirler (Voytas ve Gao 2014; Araki ve Ishii 2015; Wolt ve ark. 2016).

ZFN, TALEN ve CRISPR ile elde edilen bitkilere yeni kurallar uygulanması yönünde kararlar Arjantin, Avustralya, Avrupa Birliği Yeni Zelanda'da ya alınmış ya da alınması düşünülmektedir (Araki ve Ishii 2015). ABD Tarım Bakanlığı (USDA) ZFN'ler yoluyla NHEJ uyarılarak yapılan değişikliklerinin kendileri tarafından denetlenmesine gerek olmadığını, TALEN ve CRISPR'ların yakın gelecekte bitkilere yeni özellikler kullanımında artan bir şekilde kullanılacağını yönünde görüş belirtmiştir. USDA bu konuda FDA (Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi) ile geniş çerçeveli çalışmalar yürütmektedir. ABD'de GDO'lara uygulanan, yıllık masrafı 35 milyon doları bulan, süresi 5,5 yıla kadar sürebilen izin işlemlerinin yeni nesil genom düzenleme teknikleriyle elde edilecek bitkiler söz konusu olduğunda daha kısa ve az masraflı olacak olması nedeniyle ABD'deki tarımsal biyoteknoloji şirketlerinin yeni nesil genom düzenleme tekniklerini hızlıca benimseyecekleri öngörülmektedir (Voytas ve Gao 2014; Wolt ve ark. 2016).

AB ise sınırları içerisinde GDO'ların ekimine izin vermemenin yanı sıra yeni nesil genom düzenleme teknikleriyle elde edilen bitkilerin üretilmesine de temkinli yaklaşmaktadır. Avrupalı bilim insanları bu durumun Avrupa'yı islah ve tarımsal üretim konusunda dezavantajlı bir noktaya getirebileceği konusunda görüş belirtmekte ve yeni nesil genom düzenleme teknikleriyle elde edilen bitkiler için mevcut düzenlemelerin değiştirilmesi gerektiğine dikkat çekmektedirler (Heap 2013; Hartung ve Schiemann 2014).

Türkiye'de yeni genom düzenleme teknikleriyle elde edilen bitki varyeteleri için özel bir mevzuat henüz mevcut değildir. ZFN,

TALEN ve CRISPR ile elde edilen bitkilerin üretimi, salınımı ve kullanımı tıpkı GDO'larda olduğu gibi 13 Ağustos 2010 tarihli Resmi Gazete de yayınlanan "Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik" ile düzenlenmektedir. Bu haliyle Türkiye' deki uygulama, ilk yaklaşım şeklindeki düzenlemeyle ve dolayısıyla AB ile paralellik arz etmektedir.

### Sonuç

İklim değişikliği, tatlı su kaynaklarının ve tarım yapılabilir alanların azalması gibi olumsuzluklara rağmen dünya nüfusu her geçen gün katlanarak artmaya devam etmektedir. 1980'ler itibarıyla yeşil devrimin sonuna geldiği, gen aktarımı yoluyla bitkiler ve hayvanlarda verim artışını hedefleyen biyoteknoloji devriminin de sınırlarının zorlandığı günümüzde, mevcut ıslah yöntemleriyle artan dünya nüfusunu beslemeye yetecek kadar tarımsal ürünün elde edilmesi oldukça güçleşmiştir. Yanı sıra, gen aktarılarak yapılan iyileştirmeler sonucunda elde edilen ürünlerin tüketimi ile ilgili olarak toplumun endişeleri de tam olarak giderilememiştir.

Üçüncü devrim olarak niteleyebileceğimiz, yeni nesil genom düzenleme tekniklerinin bitki ıslahında kullanımı, klasik ıslah yöntemleri ve hâlihazırda kullanılan biyoteknolojik yöntemlere göre daha hızlı, ucuz ve güvenli bir alternatif sunmaktadır. Bu yöntemler, verim ve kalitenin artırılması, hastalıklara, zararlılara ve abiyotik streslere dayanım sağlamak için genomda yapılmak istenilen düzenlemelere herhangi bir gen aktarımına gerek kalmaksızın imkân vermektedir. Nükleotid seviyesinde yapılabilecek bu genetik değişiklikler sayesinde, seleksiyon, geri-melezleme gibi yoğun emek gerektiren işlemler için gereken zaman ve paradan da büyük ölçüde tasarruf sağlanabilecektir.

Yeni nesil genom düzenleme tekniklerinin kısa bir geçmişe sahip oldukları düşünüldüğünde, yüksek bir geliştirilme kapasitesine ve ıslah alanında da oldukça geniş bir yenilik potansiyeline sahip oldukları aşikârdır. Bu tekniklerle elde edilen bitkilerden elde edilen ürünlerin, genetiği değiştirilmiş organizmalardan (GDO) farkının anlaşılıp güvenirlüklerinin onaylanmasıyla, toplum tarafından kabul göreceği, herhangi bir endişeye meydan vermeyecek şekilde tüketimlerinin önünün açılacağı düşünülmektedir.

### Teşekkür

Şekillerin çizilmesindeki yardımlarından dolayı Durmuş ÇETİN'e teşekkür ederiz.

### Kaynaklar

- Alagoz Y., Gurkok T., Zhang BH. and Unver T., 2016. Manipulating the Biosynthesis of Bioactive Compound Alkaloids for Next-Generation Metabolic Engineering in Opium Poppy Using CRISPR-Cas 9 Genome Editing Technology, Scientific Reports 6, Article number: 30910 (DOI:10.1038/srep30910)
- Araki M. and Ishii T., 2015. Towards social acceptance of plant breeding by genome editing. Trends in Plant Science, 20(3):145-149
- Baltes N.J. and Voytas DF., 2015. Enabling plant synthetic biology through genome engineering. Trends in Biotechnology, 33(2):120-131
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Patron NJ. and Nekrasov V., 2015. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. Current Opinion in Biotechnology, 32:76-84
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A. and Bonas U., 2009. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. Science, 326(5959):1509-1912
- Bortesi L. and Fischer R., 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnology Advances, 33(1):41-52
- Budhagatapalli N., Rutten T., Gurushidze M., Kumlehn J. and Hensel G., 2015. Targeted Modification of Gene Function Exploiting Homology-Directed Repair of TALEN-Mediated Double-Strand Breaks in Barley. G3-Genes Genomes Genetics, 5(9):1857-1863
- Butler N.M., Atkins PA., Voytas D.F. and Douches D.S., 2015. Generation and Inheritance of Targeted Mutations in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using the CRISPR/Cas System. Plos One 10(12): e0144591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144591>
- Carroll D., 2011. Efficient Genome Engineering with Zinc-finger Nucleases. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 188(4):773-782
- Cesar S.A., Rajan V., Prykhozhij S.V., Berman J.N. and Ignacimuthu S., 2016. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 1863(9):2333-2344

- Cermak T., Balthes N.J., Cegan R., Zhang Y. and Voytas D.F., 2015. High-frequency, precise modification of the tomato genome, *Genome Biology* 16:232 (DOI:10.1186/s13059-015-0796-9)
- Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanov A.J. 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(17):7879 (DOI:10.1093/nar/gkr739)
- Chandrasekaran J., Brumin M., Wolf D., Leibman D., Klap C., Pearlsman M., Sherman A., Arazi T. and Gal-On A., 2016. Development of broad virus resistance in non transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular plant pathology*, 17.7 (2016): 1140-1153
- Char S.N., Unger-Wallace E., Frame B., Briggs S.A., Main M., Spalding M.H., Vollbrecht E., Wang K. and Yang B., 2015. Heritable site-specific mutagenesis using TALENs in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 13(7):1002-1010
- Clasen B.M., Stoddard T.J., Luo S., Demorest Z.L., Li J., Cedrone F., Tibebu R., Davison S., Ray E.E., Daulhac A., Coffman A., Yabandith A., Retterath A., Haun W., Balthes N.J., Mathis L., Voytas D.F. and Zhang F., 2016. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnology Journal*, 14(1):169-176
- Collonnier C., Epert A., Mara K., Maclot F., Maclot F., Guyon-Debast A., Charlot F., Charles White C., Schaefer D.G. and Nogué F., 2016. CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD51-dependent and RAD51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnology Journal* 15(1):122-131. (DOI: 10.1111/pbi.12596)
- Cong L., Ran FA., Cox D., Lin S.L., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A. and Zhang F., 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121):819-823 (DOI: 10.1126/science.1231143)
- De Pater S., Neuteboom L.W., Pinas J.E., Hooykaas P.J.J and van der Zaal B.J., 2009. ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium-mediated* floral dip transformation. *Plant Biotechnology Journal*, 7(8):821-835 (DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00446.x.)
- Ding Y.D., Li H., Chen L.L. and Xie K.B., 2016. Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas9. *Frontiers in Plant Science*, 7:703
- Dionisio G., Madsen C.K., Holm P.B., Welinder K.G., Jørgensen M., Stoger E., Arcalis E. and Brinch-Pedersen H., 2011. Cloning and Characterization of Purple Acid Phosphatase Phytases from Wheat, Barley, Maize, and Rice. *Plant Physiology*, 156(3):1087-100 (DOI: 10.1104/pp.110.164756)
- Endo M., Mikami M. and Toki S., 2015. Multigene Knockout Utilizing Off-Target Mutations of the CRISPR/Cas9 System in Rice. *Plant and Cell Physiology*, 56(1):41-47
- Fan D., Liu T.T., Li C.F., Jiao B., Li S., Hou Y.S. and Luo K., 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in Populus in the First Generation. *Scientific Reports*, 5:12217 (DOI: 10.1038/srep12217)
- Fichtner F., Castellanos R.U. and Ulker B., 2014. Precision genetic modifications: a new era in molecular biology and crop improvement. *Planta*, 239(4):921-39
- Gaj T., Gersbach C.A. and Barbas C.F., 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7):397-405
- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P. and Siksnys V., 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39):E2579-E86
- Hartung F. and Schiemann J., 2014. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant Journal*, 78(5):742-52
- Haun W., Coffman A., Clasen BM., Demorest Z.L., Lowy A., Ray E., Retterath A., Stoddard T., Juillerat A., Cedrone F., Mathis L., Voytas D.F. and Zhang F., 2014 Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnology Journal*, 12(7):934-940 (DOI: 10.1111/pbi.12201)
- Heap B., 2013 Europe should rethink its stance on GM crops. *Nature*. 498(7455):409 (DOI:10.1038/498409a.)
- Huang S., Weigel D., Beachy RN. and Li J., 2016. A proposed regulatory framework for genome-edited crops. *Nature Genetics*, 48(2):109-111
- Hwang W.Y., Fu Y.F., Reyon D., Maeder M.L., Tsai S.Q., Sander J.D., Peterson R.T., Yeh J-R J. and Joung J.K., 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3):227-229 (DOI:10.1038/nbt.2501)

- Ito Y., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Mikami M. and Toki S. 2015. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(1):76-82
- Jia H.G. and Wang N., 2014. Targeted Genome Editing of Sweet Orange Using Cas9/sgRNA. *Plos One*, 9(4): e93806 (DOI:10.1371/journal.pone.0093806)
- Jia H., Zhang Y., Orbović V., Xu J., White F.F., Jones J.B. and Wang N., 2016. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal*, DOI: 10.1111/pbi.12677
- Jiang W.Z., Brueggeman A.J., Horken K.M., Plucinak T.M. and Weeks D.P., 2014. Successful Transient Expression of Cas9 and Single Guide RNA Genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 13(11):1465-1469
- Jiang W.Z., Zhou H.B., Bi H.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. (DOI: 0.1093/nar/gkt780)
- Jiang W.Z., Henry I.M., Lynagh P.G., Comai L., Cahoon E.B. and Weeks D.P., 2016. Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, 15: 648–657. (DOI:10.1111/pbi.12663)
- 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
- Joung J.K. and Sander J.D., 2013. INNOVATION TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(1):49-55
- Kumar V. and Jain M., 2015. The CRISPR-Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. *Journal of Experimental Botany*, 66(1):47-57
- Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C.D., Ostergaard L., Patron N., Uauy C. and Harwood W., 2015. Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biology*, 16(1):258 (DOI 10.1186/s13059-015-0826-7)
- Lee H.B., Sundberg B.N., Sigafos A.N. and Clark K.J., 2016. Genome Engineering with TALE and CRISPR Systems in Neuroscience. *Frontiers in Genetics*, 7 (DOI: 10.3389/fgene.2016.00047)
- 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):390-392
- Lopez-Obando M., Hoffmann B., Géry C., Guyon Debast A., Téoulé E, Rameau C, Bonhomme S, and Nogué F., 2016. Simple and Efficient Targeting of Multiple Genes Through CRISPR-Cas9 in *Physcomitrella patens*. *G3: Genes Genomes Genetics*, 6(11): 3647-3653 (DOI: 10.1534/g3.116.033266)
- Lor V.S., Starker C.G., Voytas D.F., Weiss D. and Olszewski N.E., 2014. Targeted Mutagenesis of the Tomato PROCERA Gene Using Transcription Activator-Like Effector Nucleases. *Plant Physiology*, 166(3):1288-1291
- Lowder L.G., Zhang D.W., Baltés N.J., Paul J.W., Tang X., Zheng X.L., Voytas D.F., Hsieh T.-F., Zhang Y. and Qi Y., 2015. A CRISPR/Cas9 Toolbox for Multiplexed Plant Genome Editing and Transcriptional Regulation. *Plant Physiology*, 169(2):971-985 (DOI: 10.1104/pp.15.00636)
- Ma X.L., Zhu Q.L., Chen Y.L. and Liu Y.G., 2016. CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications. *Molecular Plant* 9(7):961-74
- Mahfouz M.M., Piatek A. and Stewart C.N., 2014. Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant Biotechnology Journal*, 12(8):1006-1014
- Malnoy M., Viola R., Jung M.H., Koo O.J., Kim S., Kim J.S., Velasco R. and Kanchiswamy C.N., 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins. *Frontiers in Plant Science*, 7:1904 (DOI=10.3389/fpls.2016.01904)
- Mao YF., Zhang H., Xu NF., Zhang BT., Gou F. and Zhu JK., 2013. Application of the CRISPR/Cas System for Efficient Genome Engineering in Plants. *Molecular Plant*, 6(6):2008-2011
- Michno J.M., Wang X.B., Liu J.Q., Curtin S.J., Kono T.J.Y. and Stupar R.M., 2015. CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. *GM Crops & Food-Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*, 6(4):243-52

- Miller J.C., Holmes M.C., Wang J.B., Guschin D.Y., Lee Y.L., Rupniewski I., Beausejour C.M., Waite A.J., Wang N.S., Kim K.A., Philip D., Gregory P.D., Pabo C.O. and Rebar E.J., 2007. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology* 25(7):778-85 (DOI:10.1038/nbt1319)
- Miller J.C., Tan S., Qiao G., Barlow K.A. and Wang J., 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology*, 1;29(2):143-148.
- Moscou M.J. and Bogdanove A.J., 2009. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science*, 326(5959):1501
- Nejat N., Rookes J., Mantri N.L. and Cahill D.M., 2016. Plant-pathogen interactions: toward development of next-generation disease-resistant plants. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2):229-237. (DOI: 10.3109/07388551)
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D.G. and Kamoun S., 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31(8):691-693
- Nishitani C., Hirai N., Komori S., Wada M., Okada K., Osakabe K., Yamamoto T. and Osakabe Y., 2016. Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 6, Article number: 31481 (DOI: 10.1038/srep31481)
- Osakabe Y. and Osakabe K., 2015. Genome Editing with Engineered Nucleases in Plants. *Plant and Cell Physiology*, 56(3):389-400
- Pan C., Ye L., Qin L., Liu X., He Y.J., Wang J., Chen L. and Lua G., 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Scientific Reports* 6:24765 (DOI: 10.1038/srep24765)
- Pattanayak V., Guilinger J.P. and Liu D.R., 2014. Determining the Specificities of TALENs, Cas9, and Other Genome-Editing Enzymes. Use of CRISPR/Cas9, ZFNs, and TALENs in Generating Site-Specific Genome Alterations. *Methods in Enzymology*, 546:47-78
- Paul J.W. and Qi Y.P., 2016. CRISPR/Cas9 for plant genome editing: accomplishments, problems and prospects. *Plant Cell Reports*, 35(7):1417-1427
- Petolino J.F., 2015 Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *Invitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 51(1):1-8 (DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.022)
- Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P. and Lim W.A., 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, 152(5):1173-1183 (DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.022).
- Ramalingam S., Kandavelou K., Rajenderan R. and Chandrasegaran S. 2011. Creating Designed Zinc-Finger Nucleases with Minimal Cytotoxicity. *Journal of Molecular Biology*, 405(3):630-41
- Rani R., Yadav P., Barbadikar K.M., Baliyan N., Malhotra E.V., Singh B.K., Kumar A. and Singh D., 2016. CRISPR/Cas9: a promising way to exploit genetic variation in plants. *Biotechnology Letters*, 38(12):1991-2006 (DOI: 10.1007/s10529-016-2195-z)
- Ray A. and Langer M., 2002. Homologous recombination: ends as the means. *Trends in Plant Science*, 7(10):435-40
- Ren C., Liu X.J., Zhang Z., Wang Y., Duan W., Li S.H. and Liang Z., 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Scientific Reports* 6:32289 (DOI: 10.1038/srep32289).
- Reyon D., Tsai S.Q., Khayter C., Foden J.A., Sander J.D. and Joung J.K., 2012. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology*, 30(5):460-465
- Samanta MK., Dey A. and Gayen S., 2016. CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes. *Transgenic Research*, 25(5):561-73
- Sander J.D., Dahlborg E.J., Goodwin M.J., Cade L., Zhang F., Cifuentes D., Curtin S.J., Blackburn J.S., Thibodeau-Beganny S., Qi Y., Pierick C.J., Hoffman E., Maeder M.L., Khayter C., Reyon D., Dobbs D., Langenau D.M., Stupar R.M., Giraldez A.J., Voytas D.F., Peterson R.T., Yeh J.R. and Joung J.K., 2011. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nature Methods*, 8(1):67-69 (DOI: 10.1038/nmeth.1542)
- Schaeffer S.M. and Nakata P.A., 2015. CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. *Plant Science*, 240:130-42
- Schaeffer S.M. and Nakata P.A., 2016. The expanding footprint of CRISPR/Cas9 in the plant sciences. *Plant Cell Reports*, 35(7):1451-68

- Schimpl S., Fauser F. and Puchta H., 2014. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant Journal*, 80(6):1139-1150 (DOI: 10.1111/tpj.12704)
- Schimpl S. and Puchta H., .2016. Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant Methods*, 12:8 (DOI: 10.1186/s13007-016-0103-0)
- Schneider K., Schiermeyer A., Dolls A., Koch N., Herwartz D., Kirchhoff J., Rainer F., Sean M. R., Zehui C., David R.C., Lakshmi S.D., Michael A.W., Steven W.R., Helga S. and Stefan S., 2016. Targeted gene exchange in plant cells mediated by a zinc finger nuclease double cut. *Plant Biotechnology Journal*, 14(4):1151-1160 (DOI: 10.1111/pbi.12483)
- Scholze H. and Boch J., 2011. TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1):47-53
- Shan Q., Wang Y., Chen K., Liang Z., Li J., Zhang Y., Zhang K., Liu J., Voytas D.F., Zheng X., Zhang Y. and Gao C., 2013. Rapid and Efficient Gene Modification in Rice and *Brachypodium* Using TALENs. *Molecular Plant*, 6(4):1365-1368
- Shan Q.W., Zhang Y., Chen K.L., Zhang K. and Gao C.X., 2015. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. *Plant Biotechnology Journal*, 13(6):791-800(DOI: 10.1111/pbi.12312)
- Shen H., Strunks G.D., Klemann B.J., Hooykaas P.J. and de Pater S., 2016. CRISPR/Cas9-Induced Double Strand Break Repair in *Arabidopsis* Non-homologous End-Joining Mutants. *G3: Genes Genomes Genetics*, 7(1):193-202
- Shin S.E., Lim J.M., Koh H.G., Kim E.K., Kang N.K., Jeon S., Kwon S., Shin W.S., Lee B., Hwangbo K., Kim J., Ye S.H., Yun J.Y., Seo H., Oh H.M., Kim K.J., Kim J.S., Jeong W.J., Chang Y.K. and Jeong B.R., 2016. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific Reports* 6:27810. (DOI: 10.1038/srep27810)
- Shukla V.K., Doyon Y., Miller J.C., DeKolver R.C., Moehle E.A., Worden S.E., Mitchell J.C., Arnold N.L., Gopalan S, Meng X, Choi V.M., Rock J.M., Wu Y.Y., Katibah G.E., Zhifang G., McCaskill D., Simpson M.A., Blakeslee B., Greenwalt S.A., Butler H.J., Hinkley S.J., Zhang L., Rebar E.J., Gregory P.D. and Urnov F.D., 2009. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 459(7245):437-441 (DOI: 10.1038/nature07992).
- Sonoda E., Hochegger H., Saberi A., Taniguchi Y. and Takeda S., 2006. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair*, 5(9-10):1021-1029
- Sugano S.S., Shirakawa M., Takagi J., Matsuda Y., Shimada T., Hara-Nishimura I. and Kohchi T., 2014. CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant and Cell Physiology*, 55(3):475-481
- Sun Y.W., Zhang X., Wu C.Y., He Y.B., Ma Y., Hou H., Guo X., Du W., Zhao Y. and Xia L., 2016. Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase. *Molecular Plant*, 9(4):628-631 (DOI: 10.1016/j.molp.2016.01.001)
- Svitashev S., Schwartz C., Lenderts B., Young J.K. and Cigan A.M., 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*, 7, Article number: 13274 (DOI: 10.1038/ncomms13274)
- Szczepek M., Brondani V., Buchel J., Serrano L., Segal D.J. and Cathomen T., 2007. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 25(7):786-93
- Takata M., Sasaki M.S., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A. and Takeda S., 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo. Journal*, 17(18):5497-5508 (DOI: 10.1093/emboj/17.18.5497)
- Townsend J.A., Wright D.A., Winfrey R.J., Fu F.L., Maeder M.L., Joung J.K. and Voytas D.F., 2009. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*, 459(7245):442-445 (DOI: 10.1038/nature07845)
- Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., Zhang H.S. and Gregory P.D., 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11(9):636-46
- Voytas D.F., 2013. Plant Genome Engineering with Sequence-Specific Nucleases. *Annual Review of Plant Biology*, 64: 327-50
- Voytas D.F. and Gao C.X., 2014. Precision Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Regulatory Challenges. *Plos Biology*, 12(6): e100187 (DOI: 10.1371/journal.pbio.1001877)

- Wah D.A., Bitinaite J., Schildkraut I. and Aggarwal A.K., 1998. Structure of *FokI* has implications for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18):10564-10569
- Wang C., Shen L., Fu Y.P., Yan C.J. and Wang K.J., 2015a. A Simple CRISPR/Cas9 System for Multiplex Genome Editing in Rice. *Journal of Genetics and Genomics*, 42(12):703-706
- Wang S.H., Zhang S.B., Wang W.X., Xiong X.Y., Meng F.R. and Cui X., 2015b. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Reports*, 34(9):1473-1476
- Wang Y.P., Cheng X., Shan Q.W., Zhang Y., Liu J.X., Gao C.X. 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 Y., Liu X.J., Ren C., Zhong G.Y., Yang L., Li S.H. and Liang Z., 2016. Identification of genomic sites for CRISPR/Cas9-based genome editing in the *Vitis vinifera* genome. *BMC Plant Biology*, 16:96 (DOI: 10.1186/s12870-016-0787-3)
- Weeks D.P., Spalding M.H. and Yang B., 2016. Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnology Journal* 14(2):483-495
- Wendt T., Holm P.B., Starker C.G., Christian M., Voytas D.F., Brinch-Pedersen H. and Holme I.B., 2013. TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Molecular Biology* 83(3):279-285 (DOI: 10.1007/s11103-013-0078-4)
- Wolt J.D., Wang K. and Yang B., 2016. The Regulatory Status of Genome-edited Crops. *Plant Biotechnology Journal* 14(2):510-518
- Woo J.W., Kim J., Kwon S., Corvalán C., Cho S.W., Kim H., Kim S.G., Kim S.T., Choe S. and Kim J.S., 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*, 33(11):1162-1164. (DOI: 10.1038/nbt.3389)
- Wu J., Kandavelou K. and Chandrasegaran S., 2007. Custom-designed zinc finger nucleases: What is next? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(22):2933-2944
- Xing H.L., Dong L., Wang Z.P., Zhang H.Y., Han C.Y., Liu B, Wang X.C. and Chen Q.J., 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 14.1 (2014): 327(DOI: 10.1186/s12870-014-0327-y)
- Zhang B., Yang X., Yang C.P, Li M.Y. and Guo Y.L., 2016a. Exploiting the CRISPR/Cas9 System for Targeted Genome Mutagenesis in *Petunia*. *Scientific Reports* 6 Article number: 20315 (DOI: 10.1038/srep20315)
- Zhang D.D., Li Z.X. and Li J.F., 2016b. Targeted Gene Manipulation in Plants Using the CRISPR/Cas Technology. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(5):251-62
- Zhang H., Zhang J.S., Wei P.L., Zhang B.T., Gou F., Feng Z.Y., Mao Y., Yang L., Zhang H., Xu N. and Zhu J.K., 2014. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6):797-807 (DOI: 10.1111/pbi.12200)
- Zhang Y., Liang Z., Zong Y., Wang Y.P., Liu J.X., Chen K.L., Chen, Qiu J.L. and Gao C., 2016c. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature Communications*, 7 Article number: 12617 (DOI: 10.1038/ncomms12617)
- Zhang Z.J., Mao Y.F., Ha S., Liu W.S., Botella J.R. and Zhu J.K., 2016d. A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 35(7):1519-1533
- Zhou H.B., 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