BAHÇE
Dergisi ∘ Journal
www.bahcejournal.org

MAKALE BİLGİLERİ || *ARTICLE INFO*

Dil || *Language*
Türkçe || *Turkish*

Türü || *Type*
Derleme || *Review*

Sorumlu Yazar || *Corresponding Author*
Hüsamettin Aycan ALP
aycanalp81@gmail.com

Anahtar Kelimeler || *Keywords*
Biyoteknoloji, CRISPR/ Cas9, bitki ıslahı || *Biotechnology, CRISPR/ Cas9, plant breeding*

Gönderilme Tarihi || *Received*
03 11 2025

Kabul Tarihi || *Accepted*
17 03 2026

Yayın Tarihi || *Published*
08 06 2026

DOI
https://doi.org/10.53471/bahce.1816350

Lisans || *License*
CC BY 4.0

Genom Düzenleme Teknolojileri ve Süs Bitkilerinde Kullanımı

Hüsamettin Aycan ALP[1], Serap BALIK[2]

[1]Dr., Alata Bahçe Kül. Araş. Ens., Mersin; ORCID: 0000-0002-6061-2979
[2]Dr., Alata Bahçe Kül. Araş. Ens., Mersin; ORCID: 0000-0002-5878-1466

Bitki ıslahı için "Modern Çağ" olarak adlandırılan içinde bulunduğumuz dönem, 1950'lerde DNA'nın çift sarmal yapısının keşfinden sonra başlamış olup, gelişen biyoteknolojik yöntemlerle baş döndürücü bir hızla ilerlemektedir. Model organizma ve bitkilerle geliştirilen teknikler, diğer bitki türlerinde olduğu gibi hızlı bir şekilde süs bitkilerinde de uygulanmaktadır. Genom düzenleme, bitki genomunda hedeflenen modifikasyonun hassas bir şekilde düzenlenmesini sağlayarak bitki ıslahı çalışmalarında devrim yaratmıştır. Günümüz gen düzenleme çalışmalarında en sık kullanılan düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPRs)-ilişkili Cas9 sistemidir. Prokaryot organizmaların pek çoğunda virüslere karşı kullanılan bir bağışıklık mekanizması olarak görev alan bu tekrarlı diziler, süs bitkileri de dahil pek çok türde hedefe yönelik yüksek doğrulukla modifikasyonların yapılmasına imkân sunmaktadır. Birçok süs bitkisinde var olan yüksek kromozom sayısı ve poliploidi, genom büyüklüğü, gen havuzunda spesifik renk genlerinin olmaması, uzun yaşam döngüleri veya etilen hassasiyeti gibi ıslah çalışmalarını sınırlayıcı faktörler bu yeni teknoloji ile aşılabilir hale gelmiştir. Geliştirilmekte olan ortak kılavuz RNA'lar ile CRISPR sistemi kullanarak süs bitkilerindeki homolog genlerin düzenlenmesi, süs bitkileri sektörünün gelişmesi için zaman ve maliyet açısından verimli bir yaklaşım sunmaktadır. Bu derlemede, genom düzenleme teknolojilerinin kökeni ve mekanizmasına genel bir bakış sunularak süs bitkilerinde yapılan genom düzenleme uygulamalarına değinilecektir.

Genome-Editing Technologies and Applications in Ornamental Plants

The period defined as the "Modern Age" for plant breeding, has begun in the 1950s after the discovery of the double helix structure of DNA and booming via developed biotechnological methods. Techniques optimized with model organisms and plants are being rapidly applied to ornamental plants as well as other plant species. Genome editing is a revolution for plant breeding by enabling precise regulation of targeted modifications in the plant genome. The most commonly technology is the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs)-associated Cas9 system. These repetitive sequences, which serve as an immune mechanism in many prokaryotic organisms, allow for highly accurate targeted modifications in many species, including ornamentals. Limiting factors in breeding such as high chromosome number and polyploidy, genome size, lack of specific genes in the gene pool, long life cycles or ethylene sensitivity in many ornamentals have become surmountable by this technology. Editing homologous genes in ornamental plants by CRISPR system offers a time and cost-efficient approach for the development of the ornamental plant sector. In this review, an overview of the origin and mechanism of genome editing technologies will be presented and genome editing applications in ornamental plants will be discussed.

GİRİŞ

Bitki ıslahının geçmişi, tarih öncesi dönemde yaşayan insanların hasat edebilecekleri üstün özellikteki bitkileri arayıp bulmasına kadar uzanmaktadır. Günümüzdeki haliyle ıslah çalışmaları 1800'lerde başlamış olup Mendel'in kalıtım üzerine yaptığı çalışmalar ile hız kazanmıştır. Bitki ıslahı için "Modern Çağ" olarak adlandırılan içinde bulunduğumuz dönem, 1950'lerde DNA'nın çift sarmal yapısının keşfinden sonra başlamış olup, gelişen biyoteknolojik yöntemlerle baş döndürücü bir hızla ilerlemektedir. Doku kültürü çalışmaları, somatik hibridizasyon, moleküler markörler, gen haritalama, gen transferi ve son olarak genom düzenleme (editing) ıslah çalışmalarında yeni bir çağ açmıştır (Anonim, 2023).

Geleneksel genetik çalışmalar çoğunlukla doğal mutasyonların tespiti ve analizi üzerine odaklanmıştır. Yirminci yüzyılın ortalarında yapılan çalışmalarla radyasyon ve kimyasal kullanımı ile bu mutasyon oranlarının arttırıldığı ortaya konulmuştur (Randhawaa & Sengarb, 2021). Genel olarak, DNA çift zincirinin fiziksel veya kimyasal mutajenlerle kırılması ile elde edilen değişiklikler de gen düzenleme olarak adlandırılabilir. Doğal onarım mekanizması ile hasarlı bölge onarılırken yeni özellikler ortaya çıkar ancak bunların tespiti için binlerce birey taranmalıdır. Öte yandan, ortaya çıkan özelliklerin pek çoğu tahmin edilemez özellikler olup, nadiren arzu edilen fenotip elde edilir (Oladosu et al., 2016). Bunun yanında, nükleik asitlerin tamamen sindirilmesi veya kısmen parçalanmasını sağlayan nükleaz enzimlerinin kullanılması ile çift zincirli DNA herhangi bir noktadan kesilip silme, ekleme veya çıkartma işlemleri yapılabilir. Bunun için DNA, özel olarak üretilen restriksiyon enzimleri ile kestikten sonra, doğal onarım mekanizması devreye girer ve modifikasyonlar meydana gelir. Bu işlemi başarılı kılan temel ilkeler kullanılan enzimin ne kadar hassaslıkta kesim yaptığı ve onarım mekanizmasının vereceği tepkidir. Gen düzenleme teknolojilerinde meganükleazlar (MegN), çinko parmak nükleazları (ZFN; Zinc Finger Nucleases), transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN; Transcription activator-like effector nucleases) ve düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR-Cas; Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated protein) olmak üzere dört temel yöntem vardır (Ekici, 2022). Temelde diğer sistemlere benzeyen ve aslında prokaryotların adaptif bağışıklık sisteminin bir parçası olan CRISPR sistemlerin ana bileşeni küçük RNA parçaları ve buna eşlik eden Cas proteinleridir. Kodlanmayan küçük RNA parçaları Cas proteinine kılavuzluk ederken, DNA çift zincirini kesme işlemi bir büyük veya bir grup küçük Cas proteini tarafından gerçekleştirilir (Erpen-Dalla Corte et al., 2019).

Keşfedildikleri günden itibaren gen düzenleme teknikleri, temel araştırmaların yanı sıra hızlı bir şekilde tıp ve ziraat alanlarında kullanılmaya başlanmıştır. Tıp alanında başta kanser olmak üzere, kan hastalıkları, kök hücre tedavileri ve HIV gibi virüs hastalıklarına karşı gen düzenleme tekniklerinin kullanıldığı rapor edilmektedir (Özer vd., 2014). Hayvancılıkta, mastitis direncinin oluşumu (sığır), süt alerjenlerinin ortadan kaldırılması (keçi, sığır) veya kas verimini arttırmak (tavşan) için yapılan ıslah çalışmalarında gen düzenleme teknikleri etkin bir şekilde uygulanmaktadır (Altan, 2021). Bitki ıslahı alanında, yirmiyi aşkın türde CRISPR genom düzenleme sistemiyle verim artışının yanı sıra biyotik ve abiyotik strese dayanıklılığın geliştirilmesine yönelik araştırmalar bulunmaktadır. Arabidopsis ve tütün gibi türlerde, sistemin bitkiler üzerinde çalıştığından emin olan araştırmacılar ilerleyen çalışmalarda ilgili genlerin açık okuma çerçevelerine (ORF) odaklanmışlardır. Bu çalışmalarda, ORF bölgelerinde meydana getirilen çift zincir kırıkları ile birçok türde mutasyonların kalıtsal hale getirilmesinin mümkün olduğu görülmüştür. Her ne kadar diploid bitkilerde etkinliği ispatlanmış olsa da pek çok süs bitkisi gibi poliploid veya büyük/kompleks genom yapısına sahip bitkiler söz konusu olduğunda sistemin uygulamaya aktarımında zorluklar bulunmaktadır (Tufan & Keleş, 2013).

Bahçe bitkileri alanında genom düzenleme tekniklerinin başarılı bir şekilde kullanıldığını raporlayan pek çok araştırma sonucu mevcuttur. Klorofil ve karotenoid genlerinin düzenlenmesi ile albino meyve elde edilmesi (elma, üzüm, kamkat), çiçeklenme lokusuna müdahale edilerek gençlik kısırlığı süresinin kısaltılması ve bodurlaşma (elma, kivi) veya patojenlerin konakçı hücreleri tanımasını sağlayan protein genlerinin düzenlenerek hastalıklara dayanımın arttırılması (muz, turunçgiller, üzüm) gibi çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Erpen-Dalla Corte et al., 2019). Sebze türlerinde ise aroma, raf ömrü ve bitki morfolojisi üzerine başarılı çalışmalar yapılmıştır (Erpen-Dalla Corte et al., 2019; Özer vd., 2014; Tufan & Keleş, 2013; Ito et al., 2015). Marul, lahana, havuç gibi birçok farklı sebzede genom düzenleme teknikleri başarılı bir şekilde uygulansa da (Erpen-Dalla Corte et al., 2019), ekonomik olarak geri dönüş sağlayan asıl çalışmalar, diğer biyoteknoloji araştırmalarında da olduğu gibi domates üzerine gerçekleştirilmiştir. Domatesin sahip olduğu pazar hacmi yanında, bunun en büyük nedeni, bu türde *Agrobacterium* kullanımının kısmen

kolay olmasıdır (Ito et al., 2015). İnsan beslenmeden çok görsel özellikleri ile pazarda alıcı bulan süs bitkilerinde gen düzenleme çalışmaları, bitki morfolojisi, renk, koku, çiçek boyu ve vazo ömrü gibi özelliklerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak, diğer tüm bitkilerde olduğu gibi biyotik ve abiyotik stres dayanımlarının geliştirilmesi, süs bitkileri üzerine yapılan gen düzenleme çalışmalarına da konu olmaktadır. Büyük genom boyutu ve poliploidi gibi nedenler CRISPR tekniğinin uygulanmasını zorlaştırsa da bu teknikle *Phalaenopsis* ve *Petunia* türlerinde çiçek canlılığının uzatılması (Lin et al., 2016) *Petunia* ve *Lilium* türlerinde albino çiçek (Yan et al., 2019), *Chrysanthemum* türünde sarımsı-yeşil floresan çiçek (Kishi-Kaboshi et al., 2017), *Torenia* türünde ise uçuk mavi çiçek renklerinin geliştirilmesi mümkün olmuştur (Nishihara et al., 2018). Çiçeklenme ve çiçek gelişimi süs bitkileri için kritik öneme sahip olduğundan, çiçek özelliklerini iyileştirmek için CRISPR gibi yeni yaklaşımların kullanılması belirgin ekonomik avantaj sunmaktadır.

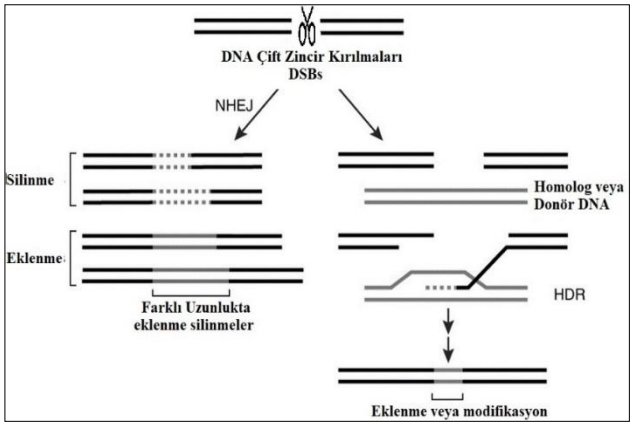
GENOM DÜZENLEMEDE KULLANILAN TEKNİKLER

Genom düzenlemesi ile arzu edilen özelliklerin kazanımı ve hastalıların tedavi edilmesi fikri, 1950'lerde DNA'nın çift sarmal yapısının keşfine dayanır (Oladosu et al., 2016; Ahmad, 2025). Araştırmalar, DNA'nın sahip olduğu genetik kodun büyük oranda korunarak, ancak bazen küçük hatalarla, yeni nesillere aktarıldığını ve bu değişimlerin bazı hastalıklara yol açtığını göstermiştir. Devam eden çalışmalar, bu hataların moleküler olarak tanımlanıp, geri alınabileceği fikrini beraberinde getirmiştir (Ahmad, 2025). DNA zincirini özel palindromik (3'→5' ile 3'←5' okunuşları aynı) dizilerden kesen restriksiyon endonükleaz enzimlerinin 1960'ların sonlarında keşfedilmesi moleküler klonlamayı mümkün hale getirmiştir. 70'li yıllarda gelişen klonlama teknikleri ve 80'lerde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yönteminin keşfi ile moleküler manipülasyon çalışmaları yaygınlaşmıştır (Topçu & Duran, 2021). Hedefe yönelik ilk genom düzenleme denemeleri 70 ve 80'li yıllarda sırasıyla maya ve farelerde yapılmıştır (Urnov, 2018). Meganükleazların kullanıldığı ve homolog rekombinasyona dayalı olan bu yöntem, son derece hassas olmasına rağmen oldukça verimsiz ve elde edilen bireylerin seçimi için oldukça zor prosedürlere ihtiyaç duymaktadır. Öte yandan ilerleyen dönemlerde diğer türlere yaygın olarak uyarlanamamıştır (Randhawaa & Sengarb, 2021). Pratik olarak genom düzenleme uygulamaları ise, 1991 yılında ZFN'lerin keşfedilmesiyle başlamış, ardından TALEN ve son yıllarda CRISPR/Cas9 yöntemiyle günümüzdeki halini almıştır. Bu sistemler, hedef genlerin mutasyona uğratılması, susturulması ve çıkarılması ile hastalıklara dayanıklılık kazanımı veya verim/kalite özelliklerinin iyileştirilmesini mümkün kılmaktadır (Altan, 2021).

Genom düzenleme sistemleri temelde DNA'nın enzimler yardımı ile kırılıp, doğal onarım mekanizmalarının devreye sokulması üzerine kuruludur (Şekil 1). Kullanılan nükleazların ortak özelliği, genomda hedeflenmiş bölgeye özel DNA çift zincir kırıkları (DSB) oluşturduktan sonra homolog rekombinasyon (HDR; Homology-directed Repair) veya homolog olmayan rekombinasyon (NHEJ; Non-homology End Joining) yöntemlerinden biriyle çift zincir kırıkları tamir edilerek genom düzeltmeleri yapmalarıdır (Ruan et al., 2017). Homolog olmayan NHEJ mekanizması hataya meydana gelen nükleotid ilave veya kayıpları sıklıkla genin bozulmasına ve sonuç olarak gen ifadesinde değişikliğe neden olur (Randhawaa & Sengarb, 2021). HDR mekanizmasında ise kırıklar çoğunlukla aslına uygun olarak onarılmaktadır. Bu iki onarım mekanizmasını birbirinden ayıran ana farklılık, tamir için homolog DNA'ya ihtiyaç duyulup-duyulmadığıdır. Bölünme evresindeki hücrelerde meydana gelen kırılmalar için genellikle HDR mekanizması aktif olurken, NHEJ onarımı hem dinlenme hem de bölünme evrelerindeki hücrelerde gözlemlenmektedir (Takata et al., 1998). DNA replikasyonu sırasında kardeş kromatitler birbirine yakın olduğu için replikasyon sırasında meydana gelen DSB'ler genellikle HDR yoluyla onarılır, aslına uygun onarım gerçekleşmede de NHEJ mekanizmasının kullanılmasının en büyük sebebi dinlenme evresinde kromozomların paketli ve kardeş kromatitlerin replikasyonda olduğu gibi birbirine yakın olmamasıdır (Sonoda et al., 2006).

İlk genom düzenleme çalışmaları tanıma aralığı 14-40 baz çiftine kadar olan doğal meganükleazlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Hoban & Bauer, 2016). Meganükleazlar, hücre çekirdeğinin yanı sıra mitokondri ve kloroplast genomu tarafından da sentezlenebilen doğal enzimlerdir. Her biri 160-200 amino asit boyutunda olan iki alt birim içeren bu enzimler, 12 ila 40 baz çifti arasında değişen özel bir DNA sekansını tanıyarak DSB meydana getirirler (Tufan & Keleş, 2013). Tanıma bölgesinin uzunluğu kesim noktasının hassasiyetini arttırmaktadır. Ancak bu durum, belirli bir meganükleaz enzimi için bazı bitki türlerinde kesim yapılacak çok az veya hiçbir bölge bulunmaması ile sonuçlanabilir (Smith et al., 2006). Bu nedenle çeşitli teknikler kullanılarak bu enzimlerin tanıma bölgeleri modifiye edilerek hedef

bölge sayısı arttırılabilir. Bu şekilde elde edilen meganükleazlar ile mısır, Arabidopsis, tütün ve daha birçok bitki türünde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Rinaldo & Ayliffe, 2015). Buna karşın, her yeni çalışma ve tür için yeni bir enzimin modifiye edilerek tasarlanması gerekmektedir (Smith et al., 2006).



Şekil 1. DNA çift zincirinde meydana gelen kırılmaların onarım mekanizması (Araldi et al., 2020)

DSB meydana getirme ve onarımı için tasarlanan ilk spesifik nükleaz sistemi ZNF'lerdir. Yapı, DNA'ya bağlanma ve endonükleaz olmak üzere iki alt bölümden oluşur. Bağlanma işlemi bir protein motifi olan Çinko parmaklar (ZF) tarafından sağlanır. Kesme işlemi için ise özgün bir diziye ihtiyaç duymayan *FokI* endonükleazı ilave edilir. *FokI* enzimi rastgele kesim yaptığı için kesim özgünlüğü ileri ve geri ZF motifleri ile bu iki yapı arasında yer alan 5-7 bazlık ara dizi (spacer) ile belirlenir (Samanta et al., 2016). Her bir gen bölgesi için özel protein bölgelerinin oluşturulması gerekli olan bu sistemin en önemli dezavantajı DNA'nın hatalı kesim ihtimalidir. Öte yandan 4 farklı bazdan oluşan DNA'yı bu sistemle taramak için 3'er bazlık 64 farklı kombinasyonda ZFN hazırlamak gerekir (Tufan & Keleş, 2013). Yüksek maliyet ve uygulama zorluklarına karşın ZFN sistemi; hücre kültürü, kök hücreler, bitki ve hayvan modellerinin düzenlenmesinin temelini oluşturmaktadır (Altan, 2021).

ZNF sisteminin dezavantajları nedeni ile alternatif olarak geliştirilen bir başka genom düzeleme sistemi ise TALEN'lerdir. TALEN proteinleri, *Xanthomonas* cinsinin farklı bitki bakteriyel patojenlerinden izole edilen DNA bağlama alanlarıdır. Bu proteinler enfeksiyon sırasında konakçı bitki hücresinde salgılanarak hassaslık genlerini aktive eden genlerin promotör kısımlarına bağlanır. TALEN'ler yüksek oranda korunmuş 33-39 amino asit tekrarı içerir ve bu dizinin 12. ve 13. pozisyonundaki amino asitler değişkendir ("Repeat Variable Di-residues-RVDs"). RVD'ler, TALEN proteinlerinin DNA'ya bağlanma özgünlüğünü belirler (Tufan & Keleş, 2013). TALEN'ler endonükleaz enzimi ile kombinasyon halinde olan bir TALEN bağlama alanından oluşur. Kesme işlemi için ZFN ile aynı olan *FokI* endonükleaz enzimini kullanılmasına karşın üç baz tanıyan ZFN aksine tek baz tercih edilmektedir. Her birinin avantajları ve dezavantajları vardır, ancak her ikisinin de sistemin karmaşıklığı, hazırlanma süresinin uzunluğu ve yüksek maliyetli oluşları kullanımlarını zorlaştırmaktadır (Erpen-Dalla Corte et al., 2019).

Günümüz gen düzenleme çalışmalarında en sık kullanılan CRISPR-Cas gen kümelerinin varlığı ilk olarak 1980'lerde tespit edilmiştir (Ishino et al., 1987). Organizma içindeki rolleri ise 2005 yılında farklı araştırma ekipleri tarafından CRISPR bölgesindeki aralık sekanslarının bakteriyi daha önce enfekte eden bakteriyofaj (faj) genomları ve plazmidlerdeki diziler ile genellikle aynı olduğunu bildirmesi ile keşfedilmiştir. Bu dizilerin, prokaryot organizmalardan arkelerin tamamında ve bakterilerin pek çoğunda virüslere karşı kullanılan bir bağışıklık mekanizması olarak görev aldığı bilinmektedir (Özer vd., 2014). Yüksek verimlilikle ve hassas bir genom düzenleme aracı olarak keşfedilen CRISPR teknolojisi, temel bileşenlere sahip her laboratuvarda uygulanabilecek kolay bir tekniktir. Yalnızca diğer biyoteknolojik yöntemlere göre değil, klasik ıslah tekniklerine kıyasla da büyük avantajlar sağlamaktadır (Çizelge 1). Son nesil genom düzenleme araçlarının en basiti, en kolayı, en güçlü ve verimlisi olarak son yıllarda ön plana çıkmıştır (Topçu & Duran, 2021).

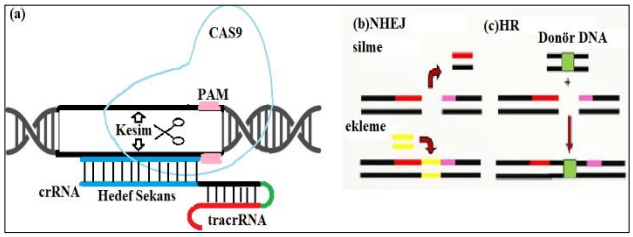
Çizelge 1. Klasik ıslah ve genom düzenleme teknolojilerinin avantaj ve dezavantajları

Teknoloji	Avantaj	Dezavantaj
Klasik Islah	Biyogüvenlik ve halk sağlığı endişesinden uzaktır, özelleşmiş alet ve ekipman gerektirmez.	Zaman alıcı ve pahalıdır, alleller kullanılan çeşit ve hatlarla sınırlıdır, arzu edilmeyen genler devam ettirilebilir.
ZFNs	Hedeflenen homologlarda rekombinasyon sağlanır.	Ribonükleaz proteini kullanılarak spesifik DNA hedeflenir, işçilik ve protein üretim maliyeti yüksektir.
TALENs	Bir nükleotid hedeflemek mümkündür.	Ribonükleaz proteini kullanılarak spesifik DNA hedeflenir, işçilik ve protein üretim maliyeti yüksektir.
CRISPR	Tasarımı kolay, görece ucuz, hızlı, doğru ve basit uygulanabilir.	Hedef dışı mutasyon olasılığı vardır.

CRISPR/Cas Sisteminin Çalışma Mekanizması ve Uygulanışı

Doğada istilaya uğramış olan bir bakteri, adaptasyon, ekspresyon ve interferans olmak üzere 3 aşamada gelişen bir CRISPR-Cas mekanizması ile

kendini savunmaktadır (Marraffini & Sontheimer, 2010). Bu sistemde öncelikle istilacı patojenin genetik kodu spacer kazanımı için hedef olarak tanınır. Ardından yabancı DNA'dan "protospacer" adı verilen spesifik boyutta (30-40 bç) bir dizi çıkarılır. Son olarak da bu dizi savunma amaçlı kullanılmak için CRISPR içine yeni bir «spacer» olarak yerleştirilir ve adaptasyon aşaması tamamlanır. Ekspresyon aşamasında, CRISPR dizisinden pre-RNA'lar ve onlar işlenerek de daha kısa olan crRNA'lar üretilir. Tekrar dizisi parçaları ile kuşatılmış olan her bir crRNA tek bir spacer içerir. Ekspresyon aşamasının son adımında crRNA ve trans aktive edici crRNA (tracrRNA)'lar bir ya da daha çok Cas proteini ile birleşerek aktif Cas-crRNA kompleksi oluşturmaktadır (Javed et al., 2018). Savunma mekanizmasının son aşaması olan interferansta ise Cas-crRNA kompleksi hücreyi tarayarak yabancı nükleik asit hedefleri bulur ve keserek parçalar (Şekil 2).



(a) gRNA (crRNA+tracrRNA) DNA zincirini tarayarak hedef sekansı bulur. gRNA eşleşen dizisini bulduğunda Cas9 endonükleaz enzimi ile birleşir ve sistem DSB meydana getirmek için aktif olur. Ardından PAM sekansının 5-9 bazlık bölgesinde kırılma meydana gelir, (b) Bu kırılmalar homolog sekansın yokluğunda NHEJ onarım mekanizması ile genomda eklenme veya silinmelere yol açar, (c) Yakında homolog kromozom veya dışarıdan ilave edilen tamamlayıcı DNA zinciri varlığında ise HR mekanizması devreye girerek kırılmalar homolog zincire uygun olarak tamir edilir (Javed et al., 2018).

Şekil 2. CRISPR-Cas9 sistemi

Pratikte CRISPR sistemleri iki ana yapıdan oluşur. Bunların ilki hedef bölgeyle eşleşme sağlayacak olan rehber (guide veya single-guide) RNA (gRNA veya sgRNA), diğeri de çift zincir kırılmayı gerçekleştirecek olan DNA endonükleaz (Cas) enzimidir. Sentetik olarak hazırlanan gRNA molekülü, doğada crRNA ve tracrRNA birleşimine karşılık gelmektedir. Yani CRISPR/Cas sisteminin oluşması için gRNA ve Cas enzimi olmak üzere 2 temel elemana ihtiyaç vardır. Ancak aktivasyonun gerçekleşip kırılmanın meydana gelmesi için, kullanılan endonükleaz enzimine bağlı olarak değişen protospacer adjacent motif (PAM) sekanslarına ihtiyaç vardır. Bunun yanında, kırılma sonrası amaç, HDR onarım mekanizması ile düzenleme yapmaksa, bu elemanlara ek olarak istenen mutasyonu içeren bir DNA onarım şablonu sağlanmalıdır. Bu süreci kolaylaştırmak için, hedefin hemen yukarısında ve aşağısında ek bir homolog dizi olmalıdır. Onarım şablonu tek veya çift sarmallı bir oligonükleotid veya çift sarmallı bir DNA plazmidi olabilir (Erpen-Dalla Corte et al., 2019).

Nükleazlar, helikazlar ve RNA bağlanma proteinleri gibi nükleik asitlerle etkileşim halinde olan çok çeşitli Cas proteinleri vardır. Cas proteinlerinin çeşitliliği, çoklu CRISPR bölgelerin varlığı ve canlılar arasındaki geçişi CRISPR-Cas sistemlerinin sınıflandırılmalarını zorlaştırmaktadır (Rath et al., 2015). Tekrarlı bölgenin yapısı ve Cas genlerinin içeriğine göre CRISPR-Cas sistemleri üç ana tipte (I, II ve III) ve 11 alt tipte gruplandırılmaktadır (Gök & Tunalı, 2016). CRISPR sisteminde en sık kullanılan endonükleaz enzimi Cas9 olduğu için bu teknik yaygın olarak CRISPR-Cas9 adıyla bilinmektedir. Cas9 enziminin kullanılması durumunda PAM sekansı olarak hedefin 3' ucunda "NGG" bazları ilave edilmelidir. Bu PAM sekansında yer alacak olan N, herhangi bir baz olabilir (Tufan & Keleş, 2013), ancak devamında iki adet guanine ihtiyaç vardır (Topçu & Duran, 2021). Cas9'un yanı sıra Cpf1 gibi farklı proteinler de bitkilerde genom düzenleme için kullanılmaktadır. Cpf1 proteini için kısa bir crRNA yeterliyken, tracrRNA gerekmemektedir. Bunun yanında PAM dizisi Cas9'dan farklı olarak T bakımından zengin (5′-TTTV-3′; V: A,G veya C olabilir) bir dizi olmalıdır (Scheben et al., 2017).

CRISPR tekniği 2013 yılından beri küçük ekleme-silme, düzenlemeler ve daha büyük kromozom düzenlemeleri için pek çok organizma üzerinde kullanılmaktadır. Son dönemlerde yapılan çalışmalarla daha da geliştirilmiş prime-düzenleme (Topçu & Duran, 2021) ve seekRNA gibi hedef dışı kırılma hatalarını azaltarak hassasiyeti arttırılmış yeni teknikler geliştirilmektedir (Siddiquee et al., 2024).

GENOM DÜZENLEME TEKNİKLERİNİN SÜS BİTKİLERİNDE KULLANIMI

Yeni süs bitkilerinin geliştirilmesi, diğer türlerde olduğu gibi doğadan toplama ile başlayıp, tür içi ve türler arası melezleme ile gen kombinasyonlarının bir araya getirilmesi, mutasyon ıslahı gibi aşamalardan geçmiştir. 80'lerde moleküler tekniklerin geliştirilmesi ile süs bitkileri ıslahında yeni bir kapı aralanmış ve genetik transformasyon ile yeni bir çağ açılmıştır. Dizileme maliyetlerinin düşüşü ile birlikte süs bitkilerinde spesifik genlerin, kloroplastın ve hatta tüm genomun sekanslanması mümkün olmuştur. Günümüzde gül, petunya, karanfil, orkide, orman gülü, krizantem, paeonia gibi pek çok önemli

türde ciddi bir sekans bilgisi üretilmiş durumdadır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Bazı süs bitkilerinde çiçek özelliklerini belirleyen sekanslanmış diziler* (Giovannini et al., 2021)

Tür	Çiçeklenmenin Başlatılması	Organların Gelişimi	Çiçek Rengi	Çiçek Kokusu	Vazo Ömrü
Alstroemeria spp.	-	*<10*	-	*<10*	-
Chrysanthemum × *morifolium*	*<10*	*11-30*	*31-50*	*<10*	*<10*
Dianthus spp.	-	*<10*	*31-50*	-	*<10*
Eustoma exaltatum	*<10*	-	*>50*	-	-
Freesia × *hybrida*	*<10*	*<10*	*11-30*	*<10*	*<10*
Gerbera × *hybrida*	*<10*	*<10*	*11-30*	-	*<10*
Hydrangea macrophylla	*<10*	*<10*	*0-10*	-	-
Lilium spp.	*<10*	*<10*	*>50*	*<10*	*<10*
Rosa × *hybrida*	*<10*	*<10*	*11-30*	*11-30*	*<10*
Tulipa spp.	*<10*	-	*11-30*	-	-

*Çizelgedeki rakamlar belirtilen özelliklere ilişkin kaç farklı genin sekanslandığını göstermektedir.

Islah faaliyetlerini hızlı ve daha kolay hale getiren Marker-assisted selection (MAS) gibi tekniklerin yanı sıra, sekans bilgisi genom düzenleme çalışmaları için son derece gereklidir (Chandler & Tribe, 2022). Günümüzde gen düzenleme çalışmaları gül (Wang et al., 2022), petunya (Li et al., 2023), kasımpatı (Kishi-Kaboshi et al., 2017), zambak (Yan et al., 2019) ve daha pek çok süs bitkisinde başarıyla uygulanmaktadır.

Genom düzenleme çalışmaları için ilk kullanılmış olan süs bitkisi aynı zamanda bir model bitki de olan petunyadır. Yaprak diskleri ve protoplasttan kolayca üretilebilen bir bitki olduğu için pek çok çalışmada model bitki olarak seçilmektedir. Bu türde ZFN yöntemi ile geçici gen ekspresyonu sağlanmıştır (Marton et al., 2010). Süs bitkilerinde yapılan araştırmalar çoğunlukla ekleme, silme veya tek baz değişikliğini içermektedir.

Çiçek Rengi

Çiçek rengi, süs bitkilerinde en önemli özelliklerin başında yer almaktadır. Flavonoidler (özellikle antosiyaninler, antosiyanidinler, flavonol ve flavonlar) ve karotenoidler (karotenler ve ksantofiller) ön plana çıkan çiçek renginden sorumlu pigmetlerdir (Giovannini et al., 2021). Ancak doğada bir türde tüm renkleri görmek mümkün değildir (Liu et al., 2024).

Petunya bitkisinde karotenoid biyosentezinde yer alan fitoen desatüraz (PDS) genini hedef alan çalışmada *Agrobacterium* aracılığı ile aktarılan Cas9 proteini ile %55,6-87,5 oranında albino fenotip elde edilmiştir (Zhang et al., 2016). Başka bir çalışmada, (Subburaj et al., 2016) nitrat redüktaz genini susturmak için Cas9-sgRNA yapısı protoplasta doğrudan aktarılmıştır. Bu şekilde elde edilen mutasyon (silme-ekleme) oranının %11,5 olduğu ortaya konulmuştur. Zambak türleri genellikle petunyadan daha düşük mutasyon oranına sahip olsalar da *Agrobacterium* aracılığı ile somatik embriyo ve adventatif sürgünlerde genom düzenleme mümkün olmaktadır. *L.pumilum* ve *L.longiflorum* 'White Heaven' çeşitlerinde fitoen desatüraz (LpPDS) üzerinde yapılan ekleme silme ve yeniden düzenlemelerle tamamen albino, soluk sarı ve albino-yeşil kimerik mutantlar elde edilmiştir (Yan et al., 2019). Bir başka çalışmada ise çok büyük genomlu hekzaploid krizantem (*C.morifolium*) türünde GFP transgenini hedef alan CRISPR/Cas9'un, transgenik bitkilerde floresansın etkili bir şekilde azalttığı raporlanmıştır (Kishi-Kaboshi et al., 2017).

Çizelge 3. Bazı süs bitkilerinde gerçekleştirilen genom düzenleme çalışmaları

Tür	Aracı	Hedef Gen	Fenotip	Referans
Chrysanthemum	*Agrobacterium*	GA20ox	-	(Li et al., 2018)
	-	CiTFL1a, CiTFL1b	Erken çiçeklenme	(Liu, X. et al., 2023)
	-	CiPDS, eYGFPuv	Kimerik bitki eliminasyonu	(Liu, L. et al., 2023)
	Agrobacterium	CpYGFP	GFP floresan	(Kishi-Kaboshi et al., 2017)
Cichorium intybus	*Agrobacterium*; Protolast	PDS	Biallelik mutasyon	(Guillaume et al., 2019)
Cymbidium	-	PI	-	(Wu et al., 2018)
Dendrobium	*Agrobacterium*	C3H, CL, C4H, CCR, IRX	-	(Kui et al., 2017)
Phalaenopsis	*Agrobacterium*	MADS44, MADS36, MADS8	MADS-null mutasyon	(Tong et al., 2020)
Oncidium	PEG; *Agrobacterium*	OnEIN2	-	(Shi, 2018)
Ipomoea	*Agrobacterium*	DFR-B CCD4	Renk	(Watanabe et al., 2017) (Watanabe et al., 2018)
	Agrobacterium	EPH1	Çiçek ömrü	(Shibuya et al., 2018)
Lilium	*Agrobacterium*	LpPDS, L1PDS	Renk	(Yan et al., 2019)
Lotus corniculatus	*Agrobacterium*	PDS	Homozigot mutant	(Meng et al., 2016)
Petunia	*Agrobacterium*	Skp1	Biallelik mutasyon	(Sun & Kao, 2018)
	Agrobacterium	PH3	-	(Li et al., 2023)
	Agrobacterium	ACO1	Uzun çiçeklenme	(Naing et al., 2019)
	PEG - RNP	PhN	NR gen mutasyonu	(Subburaj et al., 2016)
	Agrobacterium	PhACO1	Çiçek ömrü	(Xu et al., 2020)
Rosa	-	TFL1	Çiçeklenme	(Iwata et al., 2015)
	Agrobacterium	TCP9	Fenotipik mutasyon	(Xie et al., 2017)
	Agrobacterium	EIN2, PDS	Etilen, renk	(Wang et al., 2022)

Torenia	*Agrobacterium*	F3H	Renk	(Nishihara et al., 2018)
	Agrobacterium	TfRAD1	Çiçek şekli ve renk	(Su et al., 2017)

Japon gündüz sefası (Ipomea nil) türünde, dihidroflavonol-4-redüktaz-B'yi (InDFR-B) hedefleyerek beyaz çiçekler elde edilmiştir. Hedeflenen gende biallel kısa indel mutasyonlar ile antosiyanin sentezinin olmadığı tamamen beyaz çiçekler gelişirken, monoallel mutantlarda mor çiçekler oluşmaya devam etmiştir. Bazı durumlarda da kimera çiçeklerin oluştuğu gözlenmiştir. Çalışmada T-DNA bölgesi bir sonraki nesilde genetik açılma ile başarılı bir şekilde çıkartılabilmiştir (Watanabe et al., 2018). Aynı araştırmacılar devam eden çalışmalarında elde etmiş oldukları mutant hatlarda karotenoid dioksijenazı (InCCD4) devre dışı bırakarak yapraklardaki karotenoid miktarını arttırmış ve beyaz taç yapraklarının soluk sarıya dönmesini sağlamışlardır (Watanabe et al., 2018).

Çiçek rengi mutasyonları ayrıca flavonoid biyosentez yolağında anahtar rol oynayan flavanon 3-hidroksilaz (F3H) genini hedef alarak gerçekleştirilebilir. *Torenia* fournieri türünde bu genin *Agrobacterium* aracılığı ile düzenlenmesi ile %80 (20/24) oranında farklı çiçek rengine sahip mutant bitkiler elde edilmiştir. Bu bitkilerden her iki allelde de (biallel) mutasyona uğrayan 15 tanesi beyaza yakın soluk mavi iken, monoallel heterozigot mutantların açık mor renkli olduğu gözlenmiştir. Mutasyona uğramayan bitkiler çalışmada başlangıç materyali olarak kullanılan yabani form ile aynı derecede mor rengi muhafaza ederek rejenere olmuşlardır. Serada kültüre alınan mutant bitkilerde az da olsa flavonoid sentezi tespit edilirken, yabani forma göre çiçeklenme zamanı ve bitki boyu gibi özellikler bakımından bir farklılık tespit edilmemiştir (Nishihara et al., 2018). *Euphorbia pulcherrima* (Atatürk Çiçeği) var. 'Peace' üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada flavonoid 3′-hydroxylase (F3′H) geni çıkarılarak turuncu brakteler ve antosiyanin birikiminde artış hedeflenmiştir (Nitarska et al., 2021). Zigomorfik çiçek yapısına sahip bu türde, TfRAD1 geninin etkisini incelemek için gerçekleştirilen CRISPR/Cas9 aracılı mutasyonda anormal şekil ve asimetrik pigment dağılımına sahip çiçeklerin oluştuğu gözlenmiştir (Su et al., 2017).

Çiçek Ömrü ve Çiçeklenme Kontrolü

Süs bitkileri pazarında son derece önemli olan bir diğer özellik çiçeklenme zamanı ve çiçek ömrüdür. *Agrobacterium* aracılığı ile gerçekleştirilen genom düzenleme çalışmasında 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit oksidaz (ACO1) geni mutasyona uğratılarak ortanca bitkisinde etilen üretimi azaltılmış ve çiçeklenme periyodunda önemli ölçüde uzama sağlanmıştır (Naing et al., 2019). Aynı gen (ACO1) üzerine gerçekleştirilen başka bir çalışmada petunya (*P.hybrida*) türünde daha uzun çiçek ömrüne sahip mutant hatlar elde edilmiştir. Çalışmada yaprak protoplastlarına bu geni hedef alan ribo nükleoproteinler (RNPs) gönderildikten sonra rejenerasyonun ardından *Agrobacterium* aracılı mutasyon gerçekleştirilmiştir. Farklı oranlarda biallel (%2,5) homozigot ve monoallel (%15,0) bitki elde edilirken homozigot bitkilerde monoallel olanlara göre T0 ve T1 neslinde daha düşük etilen üretimi ve daha uzun çiçek ömrü gözlenmiştir. Elde edilen mutant bitkilerin çiçekleri yabani formları ile karşılaştırıldığında çiçek ömrü dışında başka hiçbir farklılık tespit edilmemiştir (Xu et al., 2020).

Gülde yapılan bir çalışmada (Wang et al., 2022), sgRNA ekspresyonunu etkili bir şekilde yönlendirmek için *Arabidopsis*'in U6-29 promotörünü kullanarak CRISPR/Cas9 sistemi modifiye edilmiştir. Bu şekilde etilen yolağındaki RhEIN2 geni düzenlenerek güller etilene karşı daha duyarsız hale getirilmiştir. Kasımpatıda iki farklı homoloğu (CiTFL1a; CiTFL1b) tanımlanmış olan TFL1 geni biallel ve homozigot mutasyona uğratılarak farklı derecede erken çiçek açan mutant bireyler elde edilmiştir (Liu, X. et al., 2023; Liu, L. et al., 2023).

Phalaenopsis orkidelerinde etilen duyarlılığına ilişkin OnEINV2 geni için CRISPR/Cas9 vektörü tasarlanarak bu genin ifadesini bir dereceye kadar azaltan mutasyonlar meydana getirilmiştir. Bu şekilde etilen duyarsızlığı arttırılarak çiçeklenme süresinde uzadığı tespit edilmiştir (Shi, 2018). *P.equestris* türü ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise çiçek oluşumunu başlatma ve gelişiminde rol alan üç MADS geni birden çıkarılmıştır. Üç farklı sgRNA'nın (Çizelge 3) tek bir vektörde birleştirilerek kullanıldığı çalışmada, orkidelerin yüksek heterizot yapısı ve vejetatif periyodunun uzun sürdüğü göz önüne alındığında, elde edilen sonuç umut verici derecede başarılıdır (Tong et al., 2020). Benzer bir çalışmada MADS-box genlerinin mutasyona uğratılması ile taç yaprak sayılarında artış olduğu gözlenmiştir. PLENA geninin (TfPLE) tek başına çıkarılması yalnızca karpellerde morfolojik değişikliklere neden olurken, FALINELLI geninin (TfFAR) mutasyonu gözlemlenebilir bir morfolojik değişikliğe yol açmamıştır. Çift biallel mutasyonların gerçekleştirildiği bitkilerde ise stamen ve karpellerin taç yaprak benzeri yapılara dönüştüğünün gözlenmesi sonucu bu iki genin üreme organlarının gelişiminde

bir arada rol aldığı düşünülmüştür (Sasaki & Ohtsubo, 2020). Dendrobium (*D.officinale*) orkidesinde yapılan bir çalışmada araştırmacılar lignoselüloz içeriğini azaltmak için CRISPR/Cas9 tekniği uygulanmıştır. Kumarat 3-Hidroksilaz (C3H), Sinnamat 4-Hidroksilaz (C4H), 4-Kumarat: Koenzim A Ligaz (4CL), Sinamoil Koenzim A Redüktaz (CCR) ve Düzensiz Ksilem5 (IRX) genlerinin hedef alındığı çalışmada %10 ile %100 arasında ekleme, silme ve yer değiştirme mutasyonlarına sahip bireyler elde edilmiştir (Kui et al., 2017).

SONUÇ

İlk ıslah çalışmalarından beri hedeflenen tek amaç istenilen özellikleri bir araya getirip ihtiyaçlara cevap veren bitkilerin elde edilmesidir. Bu nedenle ilgili genleri eklemek, düzenlemek veya susturmak için pratik ve nokta atışı teknikler uzun süredir araştırılmaktadır (Cardi & Stewart, 2016). Klasik melezleme, fiziksel ve kimyasal mutajenler, transgenik bitkilerin üretimi gibi çalışmaların ardından, aranılan çözüm hiç beklenmedik bir yerde, bakterilerin bağışıklık sisteminde karşımıza çıkmıştır. *Agrobacterium*'un doğal bir genetik mühendisi olması gibi, bakterilerde keşfedilen CRISPR dizileri ve ilişkili Cas enzimleri bitki ıslahçılarının ufkunda sınırsız kapılar açmıştır.

Süs bitkilerinde, büyük genom boyutu, poliploidi, etkin in vitro rejenerasyon protokollerinin eksiklikleri ve daha pek çok nedenle çalışmalar çoğunlukla nispeten kolay dönüştürülebilen *Petunia*, *Phalaenopsis* ve *Torenia* gibi türlerin üzerinde yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte, son zamanlarda, örneğin *Lilium* ve *Ipomoea* gibi daha az uyumlu türlerde de olumlu gelişmeler kaydedilmiştir. *In vitro* protokollerin iyileştirilmesi için rejenerasyonu kontrol eden genetik ve epigenetik mekanizmaların aydınlatılması (Cardi et al., 2017), morfogenetik düzenleyiciler olarak hareket eden transkripsiyon faktörlerinin hem in vitro hem de *in vivo* rejenerasyonu ve dönüşümü teşvik edebildiği (Jha et al., 2020; Ji et al., 2020; Maher et al., 2020) gibi bulgular sistemin gelişimine katkı sunmaktadır.

Model bitkiler, bitki dışı organizmalar, doku kültürü, gen aktarımı, epigenetik ve son yıllarda yapay zekaya dayalı sekanslama ve genetik analiz alanlarında gerçekleştirilmekte olan sayısız çalışmada ümit verici gelişmeler kaydedilmektedir. Ancak, fizikçilerin yüzyılı aşkındır süren Her Şeyin Teorisi (TOE; Theory Of Everything) arayışında olduğu gibi, bizlerin de tüm bitkiler için uygulanabilir CRISPR tekniği arayışımız muhtemelen uzun yıllar devam edecektir.

KAYNAKLAR

Ahmad, F. (2025). Historical perspectives of cutting-edge genome editing techniques. In J. M. Al-Khayri (Ed.), Genome editing for crop improvement: Theory and methodology (pp. 1–16). CABI Books. https://doi.org/10.1079/9781800622517.0001

Altan, H. (2021). Çiftlik hayvanlarının ıslahında kullanılan genom düzenleme sistemleri (ZFN, TALENs ve CRISPR/Cas9). Bioinforange. https://www.bioinforange.com

Anonim. (2023). Bitki ıslahının anlamı ve önemi. Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri.

Araldi, R. P., Khalil, C., Grignet, P. H., Teixeira, M. R., de Melo, T. C., Módolo, D. G., Fernandes, L. G. V., Ruiz, J., & de Souza, E. B. (2020). Medical applications of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR/Cas) tool: A comprehensive overview. Gene, 745, 144636. https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144636

Cardi, T., & Stewart, C. N. (2016). Progress of targeted genome modification approaches in higher plants. Plant Cell Reports, 35, 1401–1416. https://doi.org/10.1007/s00299-016-1975-1

Cardi, T., D'Agostino, N., & Tripodi, P. (2017). Genetic transformation and genomic resources for next-generation precise genome engineering in vegetable crops. Frontiers in Plant Science, 8, 241. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00241

Chandler, S. F., & Tribe, D. (2022). Modern techniques for plant breeding in ornamentals. In S. K. Datta & Y. C. Gupta (Eds.), Floriculture and ornamental plants, handbooks of crop diversity: Conservation and use of plant genetic resources (pp. 528–557). https://doi.org/10.1007/978-981-15-3518-5_19

Ekici, Z. S. (2022). CRISPR-Cas9 gen düzenleme ile genetiği değiştirilmiş mezenkimal kök hücrelerinin üretimi ve karakterizasyonu [Yüksek lisans tezi, İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü].

Erpen-Dalla Corte, L., Mahmoud, L. M., Moraes, T. S., Mou, Z., Grosser, J. W., & Dutt, M. (2019). Development of improved fruit, vegetable, and ornamental crops using the CRISPR/Cas9 genome editing technique.

Plants, 8(12), 601. https://doi.org/10.3390/plants8120601

Giovannini, A., Laura, M., & Nesi, B. (2021). Genes and genome editing tools for breeding desirable phenotypes in ornamentals. Plant Cell Reports, 40, 461–478. https://doi.org/10.1007/s00299-020-02632-x

Gök, Z. G., & Tunalı, B. Ç. (2016). CRISPR-Cas immün sisteminin biyolojisi, mekanizması ve kullanım alanları. *International Journal of Research and Development*, 8(2).

Guillaume, B., David, G., Harmony, A., Audrey, E., Jean-Louis, H., & Caroline, R. (2019). Efficient genome editing using CRISPR/Cas9 technology in chicory. International Journal of Molecular Sciences, 20, 1155.

Hoban, M. D., & Bauer, D. E. (2016). A genome editing primer for the hematologist. Blood, 127(21), 2525–2535. https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-678151

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. Journal of Bacteriology, 169, 5429–5433.

Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Mikami, M., & Toki, S. (2015). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. Biochemical and Biophysical Research Communications, 467, 76–82.

Iwata, H., Amélia, G., Remay, A., Thouroude, T., & Jeauffre, J. (2015). The TFL1 homologue KSN is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. The Plant Journal, 69, 116–125.

Javed, M. R., Sadaf, M., Ahmed, T., Jamil, A., Nawaz, M., Abbas, H., & Ijaz, A. (2018). CRISPR-Cas system: History and prospects as a genome editing tool in microorganisms. Current Microbiology, 75(12), 1675–1683.

Jha, R. K., Udupa, S., & Rai, A. K. (2020). Conditional down-regulation of GreA impacts expression of rRNA and transcription factors, affecting Mycobacterium smegmatis survival. Scientific Reports, 10, 5802. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62703-7

Ji, X., Yang, B., & Wang, D. (2020). Achieving plant genome editing while bypassing tissue culture. Trends in Plant Science, 25, 427–429. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.02.011

Kishi-Kaboshi, M., Aida, R., & Sasaki, K. (2017). Generation of gene-edited Chrysanthemum morifolium using multi-copy transgenes as targets and markers. Plant and Cell Physiology, 58, 216–226.

Kui, L., Chen, H., & Zhang, W. (2017). Building a genetic manipulation tool box for orchid biology: Identification of constitutive promoters and application of CRISPR/Cas9 in the orchid *Dendrobium officinale*. Frontiers in Plant Science, 7, 2036. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02036

Li, C., Hao, F., & Sun, L. (2018). DgGA20ox was effectively silenced by CRISPR/Cas9 technology in Chrysanthemum. Journal of Henan Institute of Science and Technology (Natural Science Edition), 46, 22–26.

Li, K., Huang, C., & Li, Y. (2023). Generation of petunia PhPH3 mutant using CRISPR/Cas9 genome editing system. Molecular Plant Breeding, 1–7.

Lin, C. S., Hsu, C. T., Liao, D. C., Chang, W. J., Chou, M. L., Huang, Y. T., Chen, J. J., Ko, S. S., Chan, M. T., & Shih, M. C. (2016). Transcriptome-wide analysis of the MADS-box gene family in the orchid *Erycina pusilla*. Plant Biotechnology Journal, 14, 284–298.

Liu, H., Wang, Z., Liu, Y., Wei, Y., Hu, Z., Wu, X., Zheng, C., & Wang, C. (2024). Applications of CRISPR/Cas9 technology in ornamental plants. Plant Molecular Biology Reporter, 42, 193–200. https://doi.org/10.1007/s11105-023-01417-2

Liu, L., Xue, Y., Luo, J., Han, M., Liu, X., Jiang, T., Zhao, Y., Xu, Y., & Ma, C. (2023). Developing a UV-visible reporter-assisted CRISPR/Cas9 gene editing system to alter flowering time in Chrysanthemum indicum. Plant Biotechnology Journal, 1–3.

Liu, X., Zhang, S., Sun, M., Guo, Y., Zhao, S., Zhou, X., Bai, X., Dai, K., Li, H., Yuan, X., Shi, W., Guo, P., & Guo, J. (2023). SiMYBS3, encoding a Setaria italica heterosis-related MYB transcription factor, confers drought tolerance in Arabidopsis. International Journal of Molecular Sciences, 24, 5418.

Maher, M. F., Nasti, R. A., & Vollbrecht, M. (2020). Plant gene editing through de novo induction of meristems. Nature Biotechnology, 38, 84–89. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0337-2

Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed

adaptive immunity in bacteria and archaea. Nature Reviews Genetics, 11(3), 181–190. https://doi.org/10.1038/nrg2749

Marton, I., Zuker, A., Shklarman, E., Zeevi, V., Tovkach, A., Roffe, S., & Vainstein, A. (2010). Nontransgenic genome modification in plant cells. Plant Physiology, 154(3), 1079–1087.

Meng, Y., Hou, Y., Wang, H., Ji, R., Liu, B., Wen, J., Niu, L., & Lin, H. (2016). Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula*. Plant Cell Reports, 36, 371–374.

Naing, A., Xu, J., Kang, B., Bae, S., & Chang, K. (2019). CRISPR/Cas9-mediated editing of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase1 enhances Petunia flower longevity. Plant Biotechnology Journal, 18, 287–297.

Nishihara, M., Higuchi, A., Watanabe, A., & Tasaki, K. (2018). Application of the CRISPR/Cas9 system for modification of flower color in Torenia fournieri. BMC Plant Biology, 18, 331.

Nitarska, D., Boehm, R., Debener, T., Lucaciu, R. C., & Halbwirth, H. (2021). First genome edited poinsettias: Targeted mutagenesis of flavonoid 3′-hydroxylase using CRISPR/Cas9 results in a colour shift. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 147, 49–60.

Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H. A., Miah, G., & Usman, M. (2016). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: A review. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 30(1), 1–16.

Özer, O., Bakırcı, Ç. M., Karagözoğlu, M., Aslan, A., Uysal, Ö., & Akgören, K. (2014). CRISPR gen düzenleme yöntemi nedir? CRISPR-Cas9 sistemini kullanarak genleri nasıl düzenleriz? Evrim Ağacı. https://doi.org/10.47023/ea.bilim.407

Randhawaa, S., & Sengarb, S. (2021). The evolution and history of gene editing technologies. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 178. https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.01.002

Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. Biochimie, 117, 119–128.

Rinaldo, A. R., & Ayliffe, M. (2015). Gene targeting and editing in crop plants: A new era of precision opportunities. Molecular Breeding, 35(1), 40.

Ruan, J., Xu, J., Chen-Tsai, R. Y., & Li, K. (2017). Genome editing in livestock: Are we ready for a revolution in animal breeding industry? Transgenic Research, 26(6), 715–726. https://doi.org/10.1007/s11248-017-0049-7

Samanta, M. K., Dey, A., & Gayen, S. (2016). CRISPR/Cas9: An advanced tool for editing plant genomes. Transgenic Research, 25(5), 561–573. https://doi.org/10.1007/s11248-016-9953-5

Sasaki, K., & Ohtsubo, N. (2020). Production of multi-petaled Torenia fournieri flowers by functional disruption of two class-C MADS-box genes. Planta, 251, 1–16. https://doi.org/10.1007/s00425-020-03393-3

Scheben, A., Wolter, F., Batley, J., Puchta, H., & Edwards, D. (2017). Towards CRISPR/Cas crops — bringing together genomics and genome editing. New Phytologist, 216(3), 682–698.

Shi, H. (2018). Molecular characterization and CRISPR/Cas9-mediated editing of Oncidesa OnEIN2 gene. Fujian Agriculture and Forestry University, 3, 1–104.

Shibuya, K., Watanabe, K., & Ono, M. (2018). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the EPHEMERAL1 locus that regulates petal senescence in Japanese morning glory. Plant Physiology and Biochemistry, 131, 53–57. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.036

Siddiquee, R., Pong, C. H., & Hall, R. M. (2024). A programmable seekRNA guides target selection by IS1111 and IS110 type insertion sequences. Nature Communications, 15, 5235. https://doi.org/10.1038/s41467-024-49474-9

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., & Duchateau, P. (2006). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. Nucleic Acids Research, 34(22), e149.

Sonoda, E., Hochegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y., & Takeda, S. (2006). Differential usage of nonhomologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. DNA Repair, 5(9–10), 1021–1029.

Su, S., Xiao, W., & Guo, W. (2017). The CYCLOIDEA-RADIALIS module regulates petal shape and pigmentation, leading to bilateral corolla symmetry in Torenia fournieri (Linderniaceae). New Phytologist, 215, 1582–1593. https://doi.org/10.1111/nph.14673

Subburaj, S., Chung, S. J., & Lee, C. (2016). Site-directed mutagenesis in *Petunia* × *hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. Plant Cell Reports, 35, 1535–1544. https://doi.org/10.1007/s00299-016-1937-7

Sun, L., & Kao, T. (2018). CRISPR/Cas9-mediated knockout of PiSSK1 reveals essential role of S-locus F-box protein-containing SCF complexes in recognition of non-self S-RNases during cross compatible pollination in self-incompatible Petunia inflata. Plant Reproduction, 31, 129–143.

Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., & Takeda, S. (1998). Homologous recombination and nonhomologous 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. https://doi.org/10.1093/emboj/17.18.5497

Tong, C. G., Wu, F. H., & Yuan, Y. H. (2020). High-efficiency CRISPR/Cas-based editing of Phalaenopsis orchid MADS genes. Plant Biotechnology Journal, 18, 889–891. https://doi.org/10.1111/pbi.13264

Topçu, İ., & Duran, T. (2021). Gen düzenleme teknolojileri tarihi. In İ. Topçu (Ed.), Genetik müdahale ve etik tartışmalar (1. baskı, pp. 5–13). Türkiye Klinikleri.

Tufan, F., & Keleş, E. N. (2013). Genom düzenleme teknolojileri ve bitkilerdeki uygulamaları. Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2(1), 113–133.

Urnov, F. D. (2018). Genome editing B.C. (Before CRISPR): Lasting lessons from the "Old Testament". The CRISPR Journal, 1(1), 34–46. https://doi.org/10.1089/crispr.2018.29007.fyu

Wang, C., Li, Y., Wang, N., Yu, Q., Li, Y., Gao, J., Zhou, X., & Ma, N. (2022). An efficient CRISPR/Cas9 platform for targeted genome editing in rose (*Rosa hybrida*). Journal of Integrative Plant Biology, 65, 895–899.

Watanabe, K., Kobayashi, A., & Endo, M. (2017). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B) locus in the Japanese morning glory Ipomoea (Pharbitis) nil. Scientific Reports, 7, 10028. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10715-1

Watanabe, K., Oda-Yamamizo, C., & Sage-Ono, K. (2018). Alteration of flower colour in Ipomoea nil through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4. Transgenic Research, 27, 25–38. https://doi.org/10.1007/s11248-017-0051-0

Wu, L., Lan, X., Zhu, Y., Hu, S., Tian, Y., Feng, L., Liu, X., Wan, X., He, J., & He, F. (2018). Construction of multi-target CRISPR/Cas9 vector for PI gene in *Cymbidium sinense*. Molecular Plant Breeding, 16, 7027–7031.

Xie, L., Wang, S., Hu, B., Xiong, X., & Chen, J. (2017). Transformation of rose TCP9 gene in Arabidopsis thaliana based on CRISPR/Cas9 technology. Molecular Plant Breeding, 15, 928–933.

Xu, J., Kang, B. C., & Naing, A. H. (2020). CRISPR/Cas9-mediated editing of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase1 enhances Petunia flower longevity. Plant Biotechnology Journal, 18, 287–297. https://doi.org/10.1111/pbi.13197

Yan, R., Wang, Z., Ren, Y., Li, H., Liu, N., & Sun, H. (2019). Establishment of efficient genetic transformation systems and application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in *Lilium pumilum* DC. Fisch. and *Lilium longiflorum* White Heaven. International Journal of Molecular Sciences, 20, 2920.

Zhang, B., Yang, X., & Yang, C. (2016). Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in petunia. Scientific Reports, 6, 20315. https://doi.org/10.1038/srep20315