



**BAZI CANAVAR OTU POPÜLASYONLARININ MOLEKÜLER BELİRTEÇLER
İLE GENETİK KARAKTERİZASYONU**

TUĞBA ARI

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Behiye Banu BİLGEN

2022

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BAZI CANAVAR OTU POPÜLASYONLARININ MOLEKÜLER BELİRTEÇLER
İLE GENETİK KARAKTERİZASYONU

TUĞBA ARI

ORCID: 0000-0001-7702-6549

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Danışman: Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN

TEMMUZ-2022
Her hakkı saklıdır.

ÖZET

BAZI CANAVAR OTU POPÜLASYONLARININ MOLEKÜLER BELİRTEÇLER İLE GENETİK KARAKTERİZASYONU

Tuğba ARI

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN

Orobanche cumana Wallr. (canavar otu) başta ayçiçeği bitkisi (*Helianthus annuus* L.) olmak üzere tarım yapılan arazilerde çok büyük verim kayıplarına neden olan parazitik bir bitkidir. Ayçiçeği tarlalarında hızlı bir şekilde bulaşıklığa neden olabilen *O. cumana*'da yapılan genetik karakterizasyon çalışmaları sınırlıdır. Bu tez çalışmasında Edirne, Kırklareli, Tekirdağ ve Adana illerinden örneklenen orobanş popülasyonlarına ait tohumlar ile canavar otuna hassas Özdemirbey ayçiçeği çeşidi kullanılarak bitkilerin yetiştirilmesi sağlanmıştır. Orobanş popülasyonlarının genetik karakterizasyonu ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesi için sekiz mikrosatellit (SSR) lokusu (Ocum-52, Ocum-70, Ocum-81, Ocum-87, Ocum-108, Ocum-141, Ocum-160 ve Ocum-196) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan sekiz SSR lokusunun tamamı polimorfik olarak bulunmuştur. Analiz edilen 146 örnekte 22 allel gözlenmiştir. Genetik çeşitlilik parametreleri; $N_a=2,016$ (lokus başına düşen ortalama allel sayısı), $N_e=1,404$ (ortalama etkili allel sayısı), $I=0,386$ (ortalama Shannon Sabiti), $H_o= 0,199$ (ortalama gözlenen heterozigotluk), $H_e=0,241$ (ortalama beklenen heterozigotluk) ve $PIC=0,199$ (ortalama polimorfik bilgi içeriği) hesaplanmıştır. Yapılan AMOVA (Moleküler varyans analizi) sonucunda popülasyonların genetik çeşitliliğinin %53 oranında popülasyon içerisinde olduğu bulunmuştur. UPGMA yöntemi kullanılarak oluşturulan dendrograma ve STRUCTURE analizine göre popülasyonlar 2 gruba ayrılmıştır. 1. grupta AE2003, AD2018, T2018, MT2013, LE2013 ve K2019 popülasyonları yer alırken, 2. grupta LK2013 ve HT2016 popülasyonları yer almıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar çalışılan popülasyonlar hakkında önemli genetik çeşitlilik bilgilerine ulaşmamızı sağlamıştır, ulaşılan bilgiler planlanacak olan yeni çalışmalar için önemli katkılar sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Genetik Çeşitlilik, *Helianthus annuus*, *Orobanche cumana*, SSR, STRUCTURE, UPGMA

ABSTRACT

GENETIC CHARACTERIZATION OF SOME BROOMRAPE POPULATIONS VIA MOLECULAR MARKERS

Tuğba ARI

Department of Agricultural Biotechnology

MSc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Behiye Banu BİLGEN

Orobanche cumana Wallr. (sunflower broomrape) is a parasitic plant that causes huge yield losses in agricultural lands, especially sunflower (*Helianthus annuus* L.). Genetic characterization studies in *O. cumana*, which can cause contamination in sunflower fields, are limited. In this thesis, the broomrape plants were grown by using the seeds of the broomrape populations sampled from Edirne, Kırklareli, Tekirdağ, and Adana provinces. The sensitive Özdemirbey sunflower variety was used for growing broomrapes. Eight microsatellite (SSR) loci (Ocum-52, Ocum-70, Ocum-81, Ocum-87, Ocum-108, Ocum-141, Ocum-160, and Ocum-196) were used for genetic characterization and determination of the genetic diversity of broomrape populations. All eight SSR loci used in the study were found to be polymorphic. 22 alleles were observed in 146 samples analyzed. Genetic diversity parameters; $N_a=2.016$ (mean number of alleles per locus), $N_e=1.404$ (mean effective alleles), $I=0.386$ (mean Shannon Constant), $H_o=0.199$ (mean observed heterozygosity), $H_e=0.241$ (mean expected heterozygosity), and $PIC=0.199$ (mean polymorphic information content) were calculated. As a result of AMOVA (Molecular variance analysis), it was found that the genetic diversity of the populations was 53% within the population. Populations were divided into 2 groups according to the dendrogram created using the UPGMA method and STRUCTURE analysis. Group 1 included AE2003, AD2018, T2018, MT2013, LE2013, and K2019 populations, while group 2 included LK2013 and HT2016 populations. The results we obtained have enabled us to reach important genetic diversity information about the studied populations, and the information obtained will provide important contributions for planned studies in the future.

Keywords: Genetic Diversity, *Helianthus annuus*, *Orobanche cumana*, SSR, STRUCTURE, UPGMA

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
TEŞEKKÜR.....	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	2
1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı	9
2. MATERYAL VE YÖNTEM	10
2.1 Ayçiçeği ve <i>O. cumana</i> Popülasyonlarına ait Bitkilerin Yetiştirilmesi	10
2.2 DNA İzolasyonu	13
2.3 İzole Edilen DNA Örneklerinde Miktar ve Kalite Tayini.....	16
2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Elektroforez.....	17
2.5 Verilerin İstatistiksel Analizleri.....	20
3. BULGULAR	21
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR.....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çalışılan <i>Orobanche cumana</i> popülasyonlarına ait bilgiler	10
Çizelge 2.2. Çalışılan popülasyonlarda saksılara ekilen <i>O. cumana</i> tohum miktarları	11
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan özütleme tamponu içeriği	13
Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan SSR primerlerine ait bilgiler	17
Çizelge 2.5. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için PCR reaksiyon koşulları	18
Çizelge 2.6. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilen PCR döngüleri	18
Çizelge 3.1. Çalışmada analiz edilen 8 SSR lokusuna ait allellerin canavar otu popülasyonlarındaki frekansları	28
Çizelge 3.2. Çalışılan canavar otu popülasyonlarına ait genetik çeşitlilik parametreleri	31
Çizelge 3.3. Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi sonuçları	34
Çizelge 3.4. Nei (1987)'ye göre hesaplanan genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri ..	34
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan SSR primerlerine ait gözlenen allel sayısı ve polimorfik bilgi içeriği (PIC) değerlerinin karşılaştırılması	40
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan SSR primerlerine ait genetik çeşitlilik parametrelerinin karşılaştırılması	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Ayçiçeği tohumlarının çimlendirilmesi.....	11
Şekil 2.2. Torf, perlit ve <i>O. cumana</i> tohumu karışımlarını içeren üzeri streç film ile kapatılmış saksılar.....	11
Şekil 2.3. Ayçiçeği fidelerinin saksıya ekilmesi.....	12
Şekil 2.4. Ayçiçeği ve <i>O. cumana</i> populasyonlarına ait bitkilerinin kontrollü koşullarda yetiştirilmesi ve canavar otu bireylerinin örnekleme.....	12
Şekil 2.5. DNA izolasyonunun aşamaları.....	15
Şekil 2.6. DNA miktarı ve kalitesinin belirlenmesi.....	16
Şekil 2.7. Spektrofotometrik ölçümü yapılan örneklerin sulandırılması.....	16
Şekil 2.8. PCR analizi aşamaları.....	18
Şekil 2.9. Agaroz jel elektroforezi işlemleri.....	19
Şekil 3.1. OCUM-52 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	21
Şekil 3.2. OCUM-70 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	21
Şekil 3.3. OCUM-81 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	21
Şekil 3.4. OCUM-87 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	22
Şekil 3.5. OCUM-108 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	22
Şekil 3.6. OCUM-141 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	22
Şekil 3.7. OCUM-160 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	23
Şekil 3.8. OCUM-196 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	23
Şekil 3.9. OCUM-52 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü.....	24
Şekil 3.10. OCUM-70 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü.....	24
Şekil 3.11. OCUM-81 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü.....	25
Şekil 3.12. OCUM-87 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü.....	25
Şekil 3.13. OCUM-108 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü.....	26
Şekil 3.14. OCUM-141 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü.....	26
Şekil 3.15. OCUM-160 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü.....	27
Şekil 3.16. OCUM-196 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü.....	27

Şekil 3.17. Canavar otu popülasyonlarının genetik mesafe değerlerine göre oluşturulmuş UPGMA dendrogramı.....	35
Şekil 3.18. STRUCTURE analizi için ideal K değerinin belirlendiği DeltaK grafiği.....	36
Şekil 3.19. Structure Harvester programından elde edilen K değeri tablosu	36
Şekil 3.20. SSR lokus verilerinin STRUCTURE analizi (K=2) sonucunda çalışılan canavar otu popülasyonlarının benzerliklere göre dağılımı (2 farklı grup; Kırmızı ve Yeşil).....	36



SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
±	Standart hata
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
A	Adenin nükleotidi
C	Sitozin nükleotidi
dk	Dakika
f	Frekans
G	Guanin nükleotidi
g	Gram
M	Molarite
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
pmol	Pikomol
rpm	Dakikadaki devir sayısı
T	Timin nükleotidi
U	Ünite
Volt	Voltaj

KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Artırılmış Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi)
AMOVA	Analysis of Molecular Variance (Moleküler Varyans Analizi)
Bç	Baz çifti (Base pair)
C:I	Chloroform isoamylalcohol
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FAM	6-carboxyfluorescein
HCl	Hidroklorik asit
H _e	Beklenen heterozigotluk değeri
H _o	Gözlenen heterozigotluk değeri
I	Shannon sabiti
IMI	Imidazolinone
L.	Linnaeus
MCMC	Monte Carlo Markow Chain
MgCl ₂	Magnezyum klorür
N	Örnek sayısı
N _a	Gözlenen allel sayısı
NaCl	Sodyum klorür
N _e	Etkili allel sayısı
<i>O. crenata</i>	<i>Orobancha crenata</i> (Beyaz çiçekli canavar otu)
<i>O. cumana</i>	<i>Orobancha cumana</i> (Boğumlu canavar otu)
<i>O. ramosa</i>	<i>Orobancha ramosa</i> (Mavi çiçekli canavar otu)
PCR	Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PGU	Poligalakturonaz
PIC	Polymorphic Information Content (Polimorfik Bilgi İçeriği)
PME	Pektin Metilesteraz
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA

	(Rastgele Artırılmış Polimorfik DNA)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmiş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi)
spp.	Species (Türler)
SSR	Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
TBE	Tris-Borat-EDTA tamponu
TE Tamponu	Tris-EDTA tamponu
T_M	DNA'nın erime sıcaklığı
TNKÜ	Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
UPGMA	Unweighted Pair Group Mean Arithmetic (Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış Çift Grup Yöntemi)
UV	Ultraviyole ışığı
vd.	ve diğerleri

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini bana aktaran, ne zaman bir sorunla karşılaşsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını yapan, yanına çekinmeden gidebildiğim, bize sadece hoca gibi olmayıp bir arkadaş, bir anne ve en önemlisi bir dost olan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekte mesleki hayatım boyunca bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağım kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Behiye Banu BİLGEN'e teşekkürü bir borç bilirim. Bu zamana kadar benim yanımda olup, beni her zaman destekleyen, her zaman maddi manevi desteklerini hiç düşünmeden benim için kullanan, her düştüğümde beni daha güçlü ayağa kaldıran canım babam Emrullah ARI ve canım annem Fatma ARI başta olmak üzere bütün aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Tezimin son şeklini almasında değerli katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Yalçın KAYA'ya (Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü) ve Dr. Öğr. Üyesi Sefer DEMİRBAŞ'a (TNKÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca laboratuvar çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyip, tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan yüksek lisans arkadaşım Hazal NASİRİAN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tuğba ARI

Ziraat Mühendisi

1. GİRİŞ

Ayçiçeği yağlık ve çerezlik olarak üretimi yapılan dünya ve ülkemiz için önemli yağ bitkilerinden biridir. Ülkemizde ve dünya üzerinde sürekli artan nüfus nedeniyle bitkisel yağa olan ihtiyaç sürekli artmaktadır. Ülkemizde 2020 yılı verilerine göre ayçiçeği ekim alanı yaklaşık 729 bin ha'dır (Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK, 2020]). Türkiye'de yağlık olarak tüketilen bitkiler incelendiğinde ayçiçeği üretim alanı, üretim miktarı ve verimi bakımından ilk sırada yer almaktadır (Ayçiçeği, Susam, Yerfıstığı, Soya, Haşhaş, Kolza ve Aspir olarak sıralanmaktadır (Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK, 2020]). Türkiye'deki yağ üretiminin yarısından fazlası ayçiçeğinden karşılanmaktadır.

Ekimini yapıp, büyütmek istediğimiz bitkilerimizin yanında isteğimiz dışında çıkan bitkilere yabancı ot denmektedir (Aksoy, Öztemiz ve Uygur, 2006). Yabancı otlar her ortama uyum sağlayabilme yeteneklerinden dolayı tarım alanı yapılan bölgelerde büyük zarara neden olmaktadır. Yabancı otların konukçusu olduğu bitkilerde çeşitli hastalıklara neden olduğu gözlenmektedir. Yabancı otlar su, mineral maddeler, ışık, alan vb. nedenler ile diğer bitkilerle rekabet içindedir, bu rekabet sonrasında kültür bitkilerine sağlanan üstünlük verim ve kalitenin ciddi oranda azalması ile sonuçlanmaktadır (Özer, Kadioğlu, Önen ve Tursun, 2001). Ülkemiz ekonomisinde önemli bir yere sahip olan ayçiçeği tarımını olumsuz etkileyen biyotik ve abiyotik faktörler bulunmaktadır. Canavar otu bitkileri (*Orobancha* spp., orobanş) ayçiçeği bitkisi başta olmak üzere tarım bitkilerinde önemli ölçüde verim ve kalite kaybına neden olan, tarımı olumsuz etkileyen biyotik stres faktörlerinden biridir (Aksoy vd., 2006; Dor vd., 2020). Ayçiçeğinin başlıca sorunu olan *O. cumana* (canavar otu) parazit bitkisi ayçiçeği tarımında bulaşın kontrol altına alınamaması sonucunda büyük bir problem oluşturmaktadır. Bunun kalıcı bir çözümü olarak hastalık etmenine karşı dirençli yeni çeşitler geliştirilmesi olmaktadır (Melchinger, 1990).

Canavar otu türleri zorunlu kök paraziti olduğundan besin ihtiyacının tümünü konukçusundan sağlamaktadır. Toprak altında geçirdiği zaman boyunca besin ihtiyacını karşılayıp gelişimini sürdürür ve toprak yüzeyinde görülmeye başladığında bitkiye verdiği zarar daha fazla görülmeye başlamaktadır. Enfekte olan kültür bitkisi su ihtiyacı karşılanmamış gibi sararır solabilir, diğer bitkilere oranla gelişimi daha geride olabilir veya veriminde çok büyük kayıplar olabilir. En büyük etkisi ise yüksek bulaş durumunda enfekte ettiği bitkinin ölmesidir (Reizelman-Lucascen, 2003).

Orobanche cumana Wallr., konakçı bitkinin savunma yanıtlarını bastırıp bitki köklerini kullanarak kendi besinini konakçıdan sağlamaktadır (Yang vd., 2020). Canavar otları tarafından kültür bitkilerinde meydana gelen verim kaybı birçok faktöre bağlı olarak (tutunma zamanı, yoğunluğu vb.) değişkenlik gösterebilmektedir. Canavar otu zararlarının %5 ile %100 arasında değiştiği bildirilmektedir. Verim kaybının önlenmesinde canavar otu için en uygun olan mücadele şeklini belirleyip, uygun zamanda işlem yapılması gerekmektedir (Barut, 2017).

1.1 Literatür Özeti

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Ukrayna, Rusya, Avrupa ülkeleri, ABD, Arjantin, Hindistan ve Çin gibi ülkelerde yetiştirilen önemli bir yağ bitkisidir (Prasad, Sujatha, Alivelu ve Sujatha, 2017). Türkiye başlıca ayçiçeği üreticisi olan önemli ülkelere biridir ve ayçiçeği tarım alanlarımızın %70'inden fazlası Trakya bölgesinde yer almaktadır. Trakya ve Marmara Bölgesi ayçiçeği tarımında ilk sırada olmasına rağmen özellikle Adana ve Konya illerinde de üreticiler tarafından tercih edilmekte, buğday ve arpa gibi bitkilerle münavebeli olarak ekilmektedir. Ayçiçeği bitkisine istila genelde ekim alanında sık aralıklarla ayçiçeği yetiştirilmesi nedeniyle olmaktadır ve bunun önüne geçebilmek için genellikle dirençli çeşit kullanılmaktadır (Evcı, Sezer, Pekcan, Yılmaz ve Kaya, 2011). Türkiye'de ayçiçeğinin başlıca zararlısı bütün bölgelerde yaygın olan canavar otu (*Orobanche* spp.)'dur. Türkiye dışında bazı ülkelerde de ayçiçeği tarlalarında dönem dönem canavar otu görüldüğü bildirilmiştir (Kadıoğlu, 2009).

Canavar otu Doğu Avrupa, Türkiye ve İspanya başta olmak üzere çoğu bölgedeki ayçiçeği üretimini sınırlayan faktörlerden birisi olarak kabul edilmiştir (Kaya, 2014a, 2014b). Canavar otu kendi besinini kendi üretmediğinden bitkiye çok büyük zararlar vermektedir (Kadıoğlu, 2009). Bu zararları fotosentez yapabilme kabiliyetleri olmadığından konukçusunda su, mineral ve karbon kaynağını kullanarak çok büyük düzeye çıkarmaktadır (Takagi vd., 2009).

Orobanchaceae familyasında yer alan *Orobanche* cinsi, çoğunlukla ılıman Kuzey Yarımküre'ye özgü 200'den fazla parazitik otsu bitki türünü içermektedir. Ağırlıklı olarak Akdeniz havzasında, Kuzey Afrika, Güneybatı Asya ve Akdeniz tipi iklime sahip diğer bazı bölgelerde bulunmaktadır. Canavar otu türlerinin yedi tanesi (*O. crenata*, *O. cernua*, *O. cumana*, *O. foetida*, *O. minor*, *P. aegyptiaca* ve *P. ramosa*) önemli tarımsal zararlılar olarak kabul edilmektedir (Parker, 2009). Canavar otunun konakçı olarak etki ettiği başlıca

famlyalar: Asteraceae (papatyagiller), Fabaceae (baklagiller), Solanaceae (patlıcangiller), Apiaceae (maydanozgiller) ve Cucurbitaceae (kabakgiller) famlyalarıdır. Bu famlyaların gelişimlerini etkileyen başlıca faktör olarak bilinmektedir. Bulaşmaya bağılı olarak canavar otlarından dolayı %5 – 100 gibi büyük oranda verim kaybı gözlenmektedir (Kadioğlu, 2009; Evcı vd., 2011). Örneğın Trakya Bölgesinde ayçiçeğı tarımı yapılan alanlarda %70'lere ulaşan oranda verim kayıplarının gerçekleştiğı bildirilmiştir (Kaya, Demirci ve Evcı, 2004; Kaya, Evcı, Pekcan ve Gücer, 2004). Orobanş geçmişten günümüze ayçiçeğı bitkisinin üretimine zarar veren önemli bir parazitik bitkidir. Yirminci yüzyılda çeşitli orobanş türlerine dayanıklı çeşitler geliştirilmiştir. Yirmi birinci yüzyılın başlarında ayçiçeğı ekim alanları genişlemeye başlamıştır. Bunun sonucunda da eski mahsul uygulamalarına son verilmiştir. Bu da İspanya, Rusya, Ukrayna, Türkiye gibi ülkelerde canavar otu popülasyonlarında ani bir şekilde değışimlere yol açmıştır. Son 15 yıldır birçok ülkede canavar otu popülasyonlarındaki değışimler yeni ırkların (G ve H) oluşumuna neden olmuştur (Skoric, Joița-Pacureanu, Gorbachenkoa, Gorbachenko ve Masirevic, 2021).

Gen-için-gen teorisine göre bitkiler patojene karşı direnç geni taşırlar ve bu genden üretilen proteinler patojen genleri tarafından üretilen ürünlerin spesifik olarak tanınmasını ve direnç oluşumunu sağlar. Bu teoriye göre bitki-patojen genlerinin etkileşimi tarafından yönetilen bitki-patojen etkileşimleri açıklanmaktadır. Baklagillerde, domateste, tütünde canavar otuna karşı direncin poligenik ve ırka spesifik olmayan bir genetik kontrol ile oluştuğı bildirilmiştir. Ayçiçeğı ve canavar otu arasındaki genetik etkileşim yani bitki-patojen etkileşimi gen-gen tarafından yönetilip; direnç reaksiyonları, konakçı genleri ve avirülansa karşılık gelmekte olan patojen genleri tarafından yönetilmektedir (Rodriguez-Ojeda vd., 2013). Bu etkileşim sayesinde dayanıklı ayçiçeğı çeşitlerinin geliştirilmesi sağlanmış ve ayçiçeğı bitkisinin dirençli genleri tarafından kontrol edilmekte olan fizyolojik orobanş ırklarının oluşumu ortaya çıkmaktadır (Fernandez-Martinez, Perez-Vich ve Velasco, 2015). Direnç mekanizması sayesinde ayçiçeğı parazitik bitkinin üstesinden kolayca gelebilmektedir. Uzun vadeli düşünıldüğünde bitki-parazit etkileşimini anlamak çok önemlidir.

Canavar otları yaşamlarının büyük çoğunluğunu toprak altında geçirmektedir. Tek bir canavar otu bitkisinin yaklaşık 500.000 tohumu etrafa yayabildiğı ve uzun yıllar boyunca çimlenmeden toprak altında sakladığı bilinmektedir (Habimana, Nduwumuremyi ve Chinama, 2014). Orobanş tohumu çimlendikten sonra ise 2–3 mm çevresinde konukçusunu bulabiliyorsa konukçunun köklerini çok rahat parazitlemektedir. Daha uzakta konukçusu var

ise o zaman parazitleyemeyip, ölmektedir. Canavar otlarının çimlenip, toprak yüzeyine çıkma zamanı 30–100 gün olarak bilinmektedir (Aksoy, 2010).

Canavar otu toprak yüzeyine çıktıktan sonra mücadelesi çok zor olmaktadır. Çünkü canavar otu zararı ilk görüldüğünde bulaşmanın aslında günler önce olduğunu bize göstermektedir (Kadioğlu, 2009). Canavar otunun mücadelesi yönünde çok fazla engeller bulunmaktadır. Bunlardan biriside dayanıklı ayçiçeği bitkisine karşı geliştirilen yeni ırk potansiyelidir. Dünya üzerinde *O. cumana*'nın 8 ırkı (A – H) olduğu bilinmektedir. F, G ve H ırklarının çok ciddi zararlar meydana getirdiği tespit edilmiştir (Kaya, 2014a; Molinero-Ruiz vd., 2015). Orobanş son yıllarda Fransa (Jestin, Lecomte ve Duroueix, 2014), Tunus (Amri vd., 2012) ve Fas (Nabloussi, Velasco ve Assissel, 2018) gibi bazı ülkelerde görülmeye başlanmıştır (Fernandez-Escobar, Rodriguez-Ojeda, Fernandez-Martinez ve Alonso, 2009; Malek, del Moral, Fernandez-Escobar, Perez-Vich ve Velasco, 2017). Yeni canavar otlarının belirlenmesinde ise rekombinasyon, mutasyon, gen akışı, genetik çeşitlilik artışı ve gen havuzlarında seçim gibi mekanizmalar olduğu bilinmektedir (Pineda-Martos vd., 2013; Pineda-Martos vd., 2014a).

Canavar otunun tohum oluşturmada önce tarım alanlarından elle toplanması gibi mücadele yöntemleri pahalıdır ve fazla iş gücü gerektirmektedir. Buna rağmen kültürel olarak ele alınması gereken uygulamalardandır. Tohumların 15 – 20 yıl gibi uzun süre toprakta canlı kaldığı bilindiğinden ekim nöbeti uygulamalarında verimi büyük bir oranda azaltacaktır. Bunun için en uygun kültürel işlem ise, orobanş tohumlarının derine gömülüp, ekim yapılmadan hemen öncede derin sürüm işlemlerinin yapılması olarak bilinmektedir. Ayrıca kullanılan tohumlar, gübreler veya tüm tarımsal alet ve makinelerin canavar otundan arındırılmış olması çok önemlidir. Bu da yaygınlaşmayı engellemek için olan yöntemler arasındadır (Kadioğlu, 2009). Orobanş ile mücadele de en etkili yöntemler arasında olan diğer yöntem ise canavar otu bitkisinin çiçek organlarını ve kapsüllerini yiyerek zarara uğratan *Phytomyza orobanchia* Kalt. böceğidir. Bu böceğin orobanş üzerinde %37 – 69 oranında etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca orobanşın %90'ın üzerinde kapsül bağlamasına engel olduğu bilinmektedir (Aksoy, 2010; Giray ve Nemli, 1983).

Canavar otu virülansının ve ırk sınıflandırmasının değerlendirilmesi parazitin farklı direnç genlerine sahip ayçiçeği hatlarını enfekte etmesine dayanmaktadır. *O. cumana* popülasyonlarının patojenitesi ve ırk sınıflandırması ile ilgili araştırmalar, farklı yerlerde ve farklı çalışmalarda devam etmektedir (Martin-Sanz vd., 2016). Son yıllarda bazı

araştırmacılar direnç için üreme ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde katkılarda bulunmuştur. Yeni parazitik bitkilerinin tanımlanması ve karakterizasyonunun genetik ve moleküler düzeyde yeni direnç kaynaklarını karakterize etmekte faydası olmaktadır (Fernandez- Martinez, 2012). Canavar otuna karşı şimdiye kadar yapılan çalışmalarda çoğunlukla ayçiçeği bitkisinin sahip olduğu direnç geni kullanılmaktadır. En son verilere göre ise ayçiçeği bitkisinin canavar otuna karşı direnç genine sahip 20'den fazla türü bulunmaktadır. Canavar otuna karşı direnç genini bulmak için yabancı ayçiçeği türleri kullanılmaktadır (Jan ve Fernandez-Martinez, 2002).

Son yıllarda canavar otu ile ilgili çalışmalarda popülasyon yapısı ve genetik çeşitliliğin belirlenmesine odaklanıldığı gözlenmektedir (Bilgen, Barut ve Demirbaş, 2019; Guchetl, Antonova ve Tchelustnikova, 2014a, 2014b; Molinero-Ruiz vd., 2014; Martin-Sanz, Malek, Fernandez-Martinez, Perez-Vich ve Velasco, 2016; Pineda-Martos, Velasco, Escobar, Fernandez-Martinez ve Perez-Vich, 2013; Pineda-Martos, Velasco ve Perez-Vich, 2014). Çalışmalarda, ayçiçeği bitkisini parazitleyen popülasyonların popülasyon içi çeşitliliğinin nispeten düşük olduğu, popülasyonlar arasında ise düşük genetik farklılaşma ile karakterize olduğu ortaya çıkmıştır. Yerel popülasyonlardaki tek gen mutasyonları (Pineda-Martos vd., 2013) veya avirülans genlerinin genetik rekombinasyonu (Martin Sanz vd., 2016) gibi ırk evrimini açıklamak için farklı mekanizmalar da ele alınmıştır. Ayçiçeğinde canavar otuna dirençli genlerinin belirlenmesi/geliştirilmesine ek olarak, bitki organlarının anatomisi, biyokimyasal parametreleri (hormonlar vb.), parazit bitkinin üreme sistemi, genetiği gibi karakterlere yönelik araştırmalarında yapılması önemlidir. Çeşitli herbisitlere dirençli (IMI gibi) hibrit tohum kullanımı canavar otuna karşı verimli bir kontrol yöntemi olarak bilinmektedir (Kaya, 2014b).

Ayçiçeği ışlahçıları tarafından yabancı *Helianthus* cinsleri kullanılarak orobanşa dayanıklı hibritler geliştirilmiştir. Bu süreçte klasik ışlah metotları kullanılmıştır. Fakat orobanş ırkları hızlı geliştiğinden klasik ışlah sürecini kısaltmak gerekmektedir. Bunun sonucunda da moleküler teknikler kullanılarak moleküler ve klasik ışlah çalışmalarının birlikte yapılması gerekmektedir (Bilgen vd., 2018).

Orobanş türlerinin daha iyi tanımlanması için moleküler araştırmaların yapılması gerekmektedir (Ivanovic vd., 2021). Orobanş türlerinin genetik karakterizasyonu ve daha iyi anlaşılması amacıyla bazı çalışmalarda moleküler belirteç olarak rbcL nükleotid dizisi kullanılmıştır ve genetik karakterizasyonu yapılmıştır (Manen, Habashi, Jeanmonod, Park ve

Schneeweiss, 2004; Wolfe ve Pamphilis, 1997). Orta İspanya'dan örneklenen *O. cumana* popülasyonunda tanımlanan antosiyanin pigmentasyonundan yoksun olan doğal bir mutant izole edilmiştir (Rodriguez-Ojeda, Velasco, Alonso, Fernandez-Escobar ve Perez-Vich, 2011). Pigmentasyonu kodlayan Pg olarak adlandırılan tek bir lokus belirlenmiş, baskın aleller tarafından kontrol edildiği saptanmıştır. Bunun sonucunda da, monogenik bir kalıtım gösteren bu özellik ortaya çıkmıştır.

Moleküler belirteçler, bitkilerde genetik analizin hızında ve kesinliğinde çok önemli şekilde ilerleme kaydettirmiştir, son yıllarda belirteçlerin tespiti konusunda çok büyük ilerlemeler olduğu gözlenmiştir (Mammadov, Aggrwal, Buyyarapu ve Kumpatla, 2012). 2019 yılında yapılan bir çalışmada Türkiye'nin Trakya bölgesinden farklı yerlerden toplanan *O. cumana* popülasyonlarının genetik çeşitliliği 8 SSR belirteci ile belirlenmiştir. Tüm SSR'lar polimorfik olarak bulunmuştur. Çalışmanın amacı ise, Trakya bölgesindeki *O. cumana* popülasyonlarının yeni bir ırkının olup olmayacağını belirlemektir. 8 SSR lokusunda toplamda 23 alel belirlenmiştir. Sonuç olarak, incelenen popülasyonların bazılarında genetik yapının belirlenmesi, özel alellerin varlığı yeni canavar otları ırkının varlığı için kanıt olarak gösterilebileceği bildirilmiştir (Bilgen vd., 2019).

Ziadi vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada, Türkiye'deki 9 canavar otu popülasyonunda 24 SSR belirteci kullanılmıştır ve *O. cumana* popülasyonlarının moleküler genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısı incelenmiştir. Moleküler analiz sonucunda Türkiye'deki *O. cumana* popülasyonları 4 gruba (1; Yeniköy 2; Adana 3; Şahinköyü Malkara, Gözsüz Köyü Malkara ve Sambro Havsa 4; İskenderköy, Ürünlü, Budakdoğanca ve Ballıhoca Muratlı) sahip olduğu gösterilmiştir. Coğrafik kökene göre 6 kümeye (1; Gözsüz Köyü Malkara ve Şahinköyü Malkara 2; Ballıhoca Muratlı ve Budakdoğanca 3; Ürünlü ve İskenderköy 4; Adana 5; Sambro Havsa 6; Yeniköy) ayrılmıştır. İstila derecelerine göre de 6 farklı ırk (İskenderköy/Ürünlü (D), Şahinköyü Malkara/Gözsüz Köyü Malkara (E), Adana (H-I), Sambro Havsa (H), Budakdoğanca/Ballıhoca Muratlı (A) ve Yeniköy (F)) için gruplandırma yapılmıştır. SSR belirteç kullanımının popülasyonlar arasındaki genetik varyasyonu tahmin etmek ve ırkları moleküler düzeyde değerlendirmek için iyi bir araç olduğu ortaya çıkmıştır (Ziadi, Çabuk Şahin, Aydın, Evcı ve Altinkut Uncuoğlu, 2018).

Atanasova vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada, *Orobanche* türlerinin incelenmesi için 6 RAPD belirteç uygulaması yapılmıştır. Güneydoğu Avrupa ve Orta Doğu'dan alınan farklı tohum örnekleri kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı farklı bölgelerden gelen orobans

tohumlarının DNA'larını RAPD belirteci ile incelemek ve türlerin etkin ayrımlarını sağlamaktır. Bulgaristan, Batı ve Güneydoğu Avrupa'da tarım ürünlerine çok ciddi zarar veren orobanş türlerinin farklılaşmaları hızlı ve verimli genetik analizler ile ortaya konulduğu bildirilmiştir (Atanasova, Batchvarova, Todorovska ve Atanassov, 2014).

2014 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise, Rusya, Romanya ve Kazakistan'dan *O. cumana*'nın moleküler genetik çeşitliliği kodominant belirteçler ile incelenmiştir. Çalışılan örnekler 2 grupta; birinci grup Rusya ve Kazakistan'dan 19 örnek, ikinci grup Romanya'dan 5 örnek olarak incelenmiştir. Çalışmanın amacı, Rusya'da yaygın olan *O. cumana*'nın Romanya ve Kazakistan popülasyonları ile karşılaştırmak ve genetik çeşitliliğini analiz etmektir. Rusya ve Kazakistan'dan gelen canavar otlarının Romanya'dan gelen popülasyonlara göre daha yüksek düzeyde popülasyon içi çeşitliliğe sahip olduğu bulunmuştur (Guchetl vd., 2014a, 2014b).

Pineda-Martos vd. (2014a) tarafından *O. cumana* parazitinde mikrosatellitlerin genetik karakterizasyonda kullanımını araştırmak üzere yapılan çalışmada, 298 SSR primeri tasarlanmış ve bu primerlerden 79 tanesinin 18 farklı bölgeden toplanan *O. cumana* popülasyonunda polimorfik olduğu ve genetik çeşitlilik çalışmaları için güçlü bir araç olduğu belirtilmiştir. Pineda-Martos vd. (2014b) tarafından Bulgaristan'da hem ayçiçeği tarlalarından hem de yabani Asteraceae türlerinin olduğu alanlarda belirlenen *O. cumana* popülasyonlarının genetik çeşitliliği ve bu popülasyonlar arasında etkin gen alış verişinin varlığı SSR lokusları (15 SSR primeri) kullanılarak çalışılmıştır (Pineda-Martos vd., 2014b).

Molinero-Ruiz vd. (2014) tarafından Macaristan (1 popülasyon), Romanya (1 popülasyon), İspanya (4 popülasyon) ve Türkiye (5 popülasyon)'den toplam 11 *O. cumana* popülasyonunun genetik olarak dirençli ayçiçeği çeşitlerini enfekte etme yönünden karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca yine bu çalışmada Macaristan, İspanya ve Türkiye'den 39 *O. cumana* popülasyonunun 18 RAPD primeri kullanılarak moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (Molinero-Ruiz vd., 2014).

Roman vd. (2001) tarafından İspanya'dan 6 *O. crenata* popülasyonu üzerinde 23 RAPD primeri kullanılarak yapılan çalışmada genetik çeşitliliğin büyük oranda (%94.29) popülasyon içi bireyler arası çeşitlilikten kaynaklandığı bildirilmiştir (Roman, Rubiales, Torres, Cuberto ve Satovic, 2001). Roman vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada orobanş türlerinin (3 tür) kloroplast DNA (cpDNA) belirteçleri kullanılarak PCR-RFLP tekniği ile belirlenebileceği bildirilmiştir. Roman vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada plastit DNA

belirteçlerinin türleri belirlemede, özellikle morfolojik olarak ayırt edilmesi zor olan orobanş türlerinde, basit ve güvenilebilir bir tanımlayıcı araç olduğu vurgulanmıştır (Roman vd., 2007). Brault vd. (2007) tarafından Fransa'dan örneklenen 3 *O. ramosa* popülasyonunda 2 RAPD primeri kullanılarak genetik çeşitlilik belirlenmiştir (Brault, Betsou, Jeune, Tuquet ve Salle, 2007). Vaz-Patto vd. (2008) Fas'ta 5 *O. foetida* popülasyonunda AFLP belirteçleri kullanarak genetik çeşitliliği belirlemiştir (Vaz-Patto vd., 2008).

Belay vd. (2020)'nin çalışmasında Etiyopya'da 4 bölgeden örneklenen 96 *O. crenata* bireyinde 30 SSR belirteci kullanılarak genetik çeşitlilik belirlenmiştir. Etiyopya'da gözlenen *O. crenata* popülasyonlarında saptanan gen akışı ve canavar otunun yakın zamanda ülkede yaygınlaşmasının popülasyonun çeşitliliğinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Belay vd., 2020). Abdalla vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada Mısır'da *O. crenata* istilası olan tarlalardan örneklemeler yapılarak ISSR belirteçleri ile genetik varyasyonun ve farklılaşmanın ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda örneklenen popülasyonların birbirine genetik olarak yakın olduğu bildirilmiştir (genetik benzerlik değeri 0,837) (Abdalla, Saleh ve Khater, 2020).

1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

O. cumana Türkiye’de ve diğer Avrupa ülkelerinde ayçiçeği veriminde %100’e varan düşümlere sebep olan bir canavar otu türüdür. Bu tür, çok sayıda ırklar oluşturmakta ve çok küçük ve fazla sayıda tohum içerdiğinden, kolayca yayılmakta ve böylelikle ayçiçeği üretimi yapılan alanlarda hızlı epidemilere neden olmaktadır. Canavar otu popülasyonlarının moleküler karakterizasyonu ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesi üzerine yapılan moleküler çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada, ülkemizde yoğun olarak ayçiçeği yetiştiriciliği yapılan Trakya Bölgesinden ve yeni ırkın varlığı bilinen Adana bölgesinden ayçiçeği tarlalarından toplanan *O. cumana* bitkisine ait tohumlar, genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasının temel amacı, örneklenen canavar otu popülasyonlarının moleküler belirteçler kullanılarak genetik yapılarının ortaya konulması, genetik parametrelerinin tahmin edilmesi ile genetik çeşitlilik düzeylerinin belirlenmesi, elde edilen verilerin literatürde mevcut olan diğer çalışmalarla karşılaştırılması ve moleküler belirteç analizleri ile ırk tayininin yapılma olasılığının araştırılmasıdır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Ayçiçeği ve *O. cumana* Popülasyonlarına ait Bitkilerin Yetiştirilmesi

Tez çalışmasında farklı illerden farklı yıllarda toplanmış *O. cumana* popülasyonlarına ait tohumlar kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Canavar otu popülasyonlarına ait tohumlar Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve Dr. Öğr. Üyesi Sefer Demirbaş'tan temin edilmiştir. Her bir popülasyona ait tohumlar 'bulk' olarak temin edilmiş ve plastik tüplerde +4°C'de karanlıkta saklanmıştır. *O. cumana* bitkilerinin yetiştirilmesi için canavar otuna hassas Özdemirbey ayçiçeği çeşidi kullanılmıştır. Ayrıca TNKÜ kampüsümüzden 2019 yılında örneklenen 3 adet *Phelipanche aegyptiaca* (Pers.) Pomel bireyine ait doku örnekleri dış grup (K2019) olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışılan *Orobancha cumana* popülasyonlarına ait bilgiler

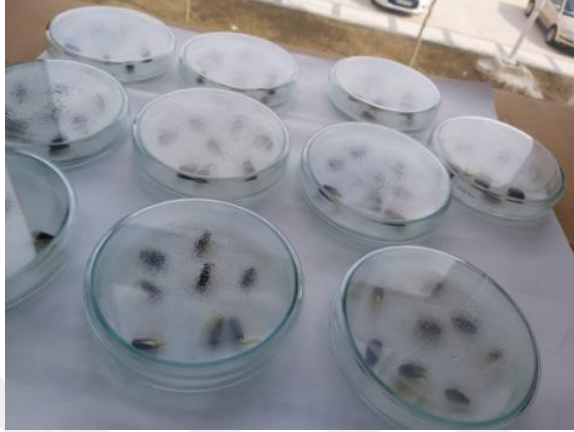
Populasyon Numarası	Populasyon Kodu	Populasyon Adı	Toplanma Yılı	Birey sayısı
1	AE2003	Avarız/Edirne	2003	17
2	LK2013	Lüleburgaz/Kırklareli	2013	21
3	AD2018	Adana Bölgesi	2018	21
4	T2018	Tekirdağ Bölgesi	2018	21
5	MT2013	Muratlı/Tekirdağ	2013	21
6	LE2013	Sarıdanışment/Lalapaşa/Edirne	2013	21
7	HT2016	Hayrabolu/Tekirdağ	2016	21

Ayçiçeği tohumları laboratuvarında %5'lik çamaşır suyu ile 3 tekrarlı olarak 5 dk steril edilmiş ve 100 ml dH₂O'da yıkanmıştır. Ayçiçeği tohumları her petride 10 tohum olacak şekilde Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarında çimlenmesi için bırakılmıştır (Şekil 2.1).

Yeterli miktarda *O. cumana* bireyleri elde edebilmek için canavar otu tohumları tartılmış (Çizelge 2.2) ve 1:2 oranında perlit ve torf içeren homojen karışım hale getirilmiştir. Her popülasyon için 3 tekrarlı olacak şekilde *O. cumana* içeren torf-perlit karışımları saksılara dağıtılmış, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü iklimlendirme odasında saksıların üzeri streç film ile kapatılarak bırakılmıştır (Şekil 2.2).

Çizelge 2.2. Çalışılan popülasyonlarda saksılara ekilen *O. cumana* tohum miktarları

Populasyon Kodu	AE2003	LK2013	AD2018	T2018	MT2013	LE2013	HT2016
<i>O. cumana</i> Tohum Miktarı (mg)	157	177	342	331	313	100	100



Şekil 2.1. Ayçiçeği tohumlarının çimlendirilmesi



Şekil 2.2. Torf, perlit ve *O. cumana* tohumu karışımlarını içeren üzeri streç film ile kapatılmış saksılar

Ayçiçeği tohumlarının petride çimlenmeye başlamasından 3 gün sonra petrilerde çimlenen ayçiçeği tohumları alınıp, iklimlendirme odasında saksılara ekim işlemleri yapılmıştır (Şekil 2.3). Her saksıya 3 tohum olacak şekilde ekimleri yapılmış ve ekim yapılan saksılar sulandıktan sonra üzeri streç film ile kapatılıp iklimlendirme odasına bırakılmıştır. İklimlendirme odası 16 saat ışık 8 saat karanlık, gündüz 24 °C gece ise 18 °C olacak şekilde ayarlanmıştır. Saksılarda bitki çıkışları her gün kontrol edilmiş, yaklaşık bir ay süre ile belli oranda ve günlerde her saksıya eşit miktarda su verilmiştir. Bir ayın sonunda ise ilk canavar otlarının çıkışı gözlenmiştir (Şekil 2.4). Düzenli olarak her saksıda canavar otu çıkışları takip

edilmiş ve yeterli büyüklükte olan canavar otları örneklenerek, populasyon adı ve birey numarası ile etiketlenmiş alüminyum folyaya sarılarak DNA izolasyonuna kadar -20 °C’de saklanmıştır. Örnek toplanmasına her bir popülasyon için yeterli sayıda örnek elde edilene kadar devam edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen popülasyonlarda canavar otu çıkışlarında herhangi bir sorunla karşılaşılmamış, tohum toplama yılı çok eski olsa dahi (Örneğin; Avarız/Edirne 2003) tohumların yeterli miktarda örnek sağlayacak şekilde canavar otu bireyine dönüştüğü gözlenmiştir. 2 ayın sonunda saksılardan bütün örnekler toplanmış ve yetiştirme işine son verilmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.3. Ayçiçeği fidelerinin saksıya ekilmesi



Şekil 2.4. Ayçiçeği ve *O. cumana* populasyonlarına ait bitkilerinin kontrollü koşullarda yetiştirilmesi ve canavar otu bireylerinin örneklenmesi

2.2 DNA İzolasyonu

Tez çalışmasında DNA izolasyonuna örneklerin hazırlanması için *O. cumana* popülasyonuna ait örnekler -20 °C'den alınıp önce bistüri ile mekanik parçalama sonrasında santrifüj tüpünün içerisine 100 ml dH₂O ve 2 metal bilye eklenerek Retch MM400 Vibrasyonlu öğütücü'de 30 frekansta 2 dk ezme işlemi uygulanmıştır. Tam olarak homojenize olan örnekler cihazdan alınmış, tam homojenize olmayan örneklere 2 dk daha 30 frekansta ezme işlemi uygulanmıştır. Örnekleri vibrasyonlu öğütücüden aldıktan sonra çok kısa bir santrifüj yapıp, kapakta kalan örneklerin tüp içerisine indirilmesi sağlanmıştır. DNA izolasyonunda Dellaporta, Wood ve Hicks (1983) ile Doyle ve Doyle (1990) DNA izolasyon metodunun birlikte kullanıldığı modifiye metot kullanılmıştır.

DNA izolasyonunda kullanılan yöntemin basamakları:

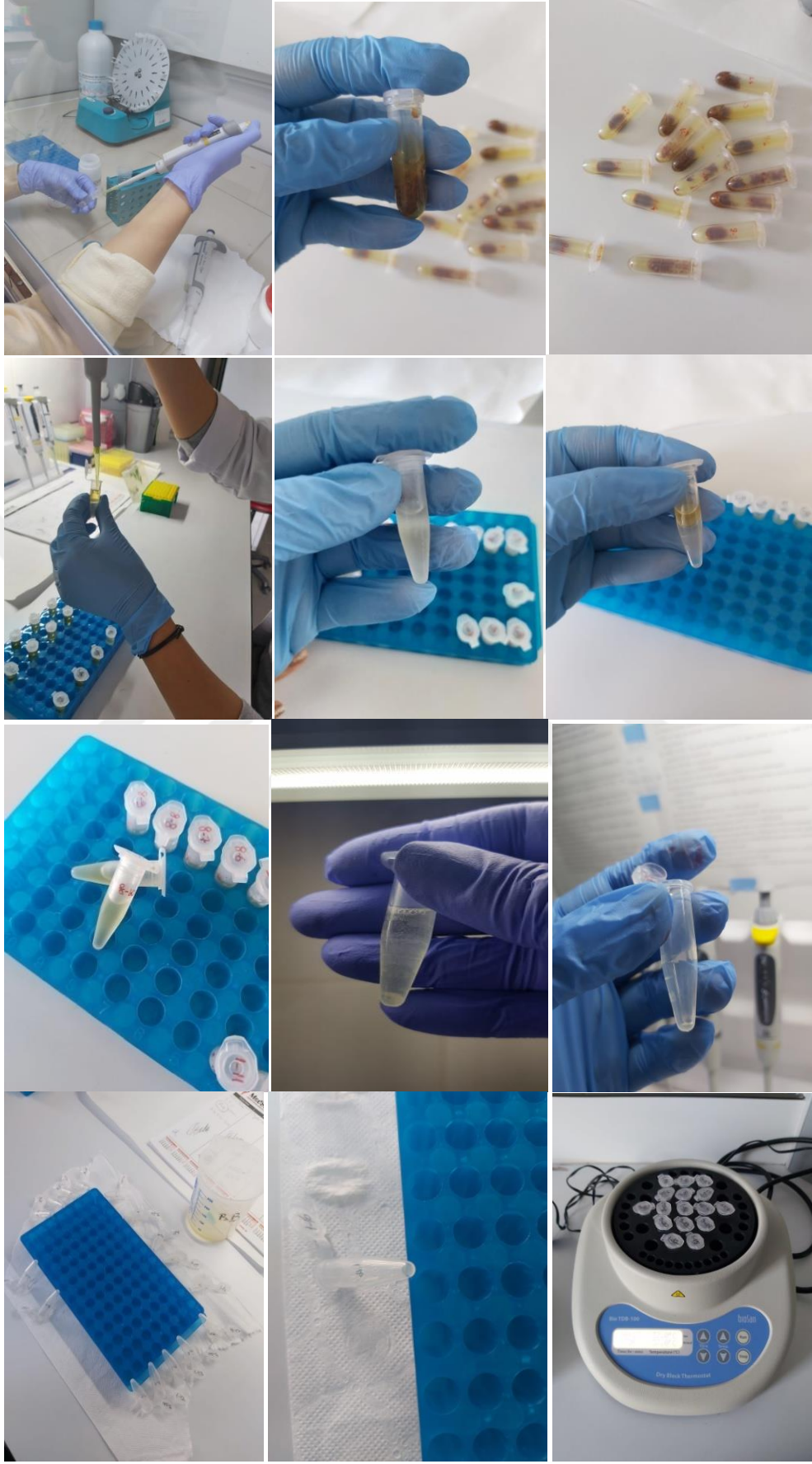
- 1) İyice ezildiğine emin olunan örneklerin üzerine önceden hazırlanmış olan ve 65 °C'de bir süre ısıtılmış olan özütleme tamponundan 750 µl eklenmiştir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan özütleme tamponu içeriği

Ana Stok	1X	Son Konsantrasyon
1 M Tris-HCl	0,2 ml	200 mM
0,5 M EDTA	0,1 ml	50 mM
4 M NaCl	0,5 ml	2 M
%20 CTAB	0,1 ml	%2
14,3 M β- Mercaptoethanol	3 µl	%0,3
dH ₂ O	0,1 ml	-
Total	1 ml	-

- 2) Metal bilyeler mıknatıs yardımıyla çıkartılarak ve her bir tüpe 0,025 g PVP eklenip, iyice karışması için vorteks yapılmıştır.
- 3) Örnekler 65 °C ısıtıcılı blokta 60 dk 700 rpm'de çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır.
- 4) İnkübasyon işlemi bittikten sonra örneklerin üzerine 700 µl kloroform:izoamilalkol (C:I) (24:1) eklenmiş ve 10 dk vortekslenerek iyice karışması sağlanmıştır.

- 5) 10 dk 10.000 rpm'de santrifüj yapılmış ve süpernatant kısmından 700 µl alınıp 1,5 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- 6) Örneklerin üzerine 700 µl C:I (24:1) eklenmiş ve 10 dk vortekslenerek iyice karışması sağlanmıştır.
- 7) 10 dakika 10.000 rpm'de santrifüj yapılmış ve süpernatant kısmından 400 µl alınıp 1,5 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- 8) Örneklerin üzerine 500 µl soğuk isopropanol, 60 µl 3 M sodyum asetat, 50 µl 5 M potasyum asetat eklendikten sonra tüpler nazikçe karıştırılmıştır ve -20 °C'de 2 saat bekletilmiştir.
- 9) 10 dk 13.000 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra pelletin düşmemesine dikkat edilerek üstteki sıvı kısım dökülmüştür ve tüpler ters çevrilerek pellet kısa bir süre kurutulmuştur.
- 10) Pellet nazikçe yerinden oynatıldıktan sonra üzerine 1000 µl %70'lik etil alkol eklenmiştir ve 10 dk 13.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.
- 11) 10. Basamak 2 veya 3 kez tekrar edilmiştir.
- 12) Pelletin düşmemesine dikkat edilerek üstteki sıvı kısım dökülmüş ve tüpler ters çevrilerek pellet tamamen kuruyuncaya kadar ortalama 2 saat kurutulmuştur.
- 13) Pellet 100 µl TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH:8) tamponu içinde çözülmüş ve 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İzole edilen DNA'lar +4 °C'de saklanmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. DNA izolasyonunun aşamaları

2.3 İzole Edilen DNA Örneklerinde Miktar ve Kalite Tayini

DNA miktarı ve kalite tayini NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 kullanılarak Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü Biyometri Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılmıştır (Şekil 2.6). İzole edilen genomik DNA örnekleri 50 ng/μl olacak şekilde sulandırıldıktan sonra -20 °C’de muhafaza edilmiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.6. DNA miktarı ve kalitesinin belirlenmesi



Şekil 2.7. Spektrofotometrik ölçümü yapılan örneklerin sulandırılması

2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Elektroforez

Çeşitli literatür araştırmaları sonucunda (Pineda-Martos vd., 2013; Pineda-Martos vd., 2014a; Pineda-Martos vd., 2014b) *O. cumana* popülasyonlarının genetik çeşitliliğini belirlemek için kullanabileceğimiz SSR lokusları taranmış ve 8 SSR primer çifti tezte kullanılmak üzere belirlenmiştir. Tez çalışmasında kullanılmak için seçilen SSR primerlerine ait bilgiler Çizelge 2.4'te verilmiştir. Primer çiftlerinin forward (ileri) primeri 5' uçlarından DNA parça (fragment) analizi için uygun olan boya ile (Applied Biosystems tarafından tescilli olan PET, NED, VIC ve FAM) işaretli olarak sentezletirilmiş ve örneklerin analizinde bu primeler kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan SSR primerlerine ait bilgiler

SSR primerleri	Primer dizisi (sekansı) 5' → 3' [F: Forward (ileri) primer, R: Reverse (geri) primer]	Tekrar motifi	T _M (°C)*
OCUM-52	F: 5'-PET-CATGTCTAAGCTTTTGGCTCG-3' R: CAAGACTTGAACAAGCAAATC	(AG) ₁₀	
OCUM-87	F: 5'-VIC-TTCTCGACAGCTTTGGGTA-3' R: ATGCCAACTTCGAGTGATCC	(TTC) ₁₃	
OCUM-141	F: 5'-6-FAM-CAGCAACTGTTTCTTCCATAGAG-3' R: TCCAAGAAGAGGAAAAGAAGTGA	(CTT) ₆	62
OCUM-160	F: 5'-NED-TGAGGGTTTGTAAAGTGGGC-3' R: CGTACCTTATCCCTCCGTCA	(AG) ₇	
OCUM-70	F: 5'-NED-AAGCTGTAAACAATGCCTGAA-3' R: CCTCCTCCAGTACCACTAGGC	(TG) ₁₁	
OCUM-81	F: 5'-6-FAM-TTACAAGGTGAAACCACCCA-3' R: CAGCTACTGTCCGCAAGAAA	(CA) ₁₃	
OCUM-108	F: 5'-VIC-TCGTTAATAAGTGGTTCACGAAAA-3' R: TGAATAAAAATAAAAATGTACGGGTG	(GTAT) ₆	58
OCUM-196	F: 5'-PET-GTATGTGCGCCCGTCTTG-3' R: GGGGATGACTGTGTTTCGAT	(GT) ₇	

*T_M= DNA'nın erime sıcaklığı

PCR analizleri Pineda-Martos vd., (2014b) çalışmasındaki reaksiyon koşullarında ve PCR döngülerinde gerektiğinde uygun optimizasyonlar kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için PCR reaksiyon koşulları (Çizelge 2.5) ve PCR döngüleri (Çizelge 2.6) ilgili çizelgelerde sunulmuştur. PCR analizinde PCR tüplerine 2 µl her bir DNA örneğinden ve 13 µl PCR karışımından eklenerek örnekler hazırlanmıştır. PCR analizleri Applied Biosystems® Veriti® Thermal Cycler ve Applied Biosystems® ProFlex™ PCR System Thermal Cycler kullanılarak yapılmıştır (Şekil 2.8).

Çizelge 2.5. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için PCR reaksiyon koşulları

PCR Karışımı	1X	Son Konsantrasyon
10X Dream Taq Buffer	1,5 µl	1X
dNTPs (10 mM)	0,45 µl	0,3 mM
İleri Primer (10 pmol/µl)	0,8 µl	8 pmol
Geri Primer (10 pmol/µl)	0,8 µl	8 pmol
Taq DNA Polimeraz (5 U/µl)	0,3 µl	1,5 U
DNA (50 ng/µl)	2 µl	100 ng
dH ₂ O	9,15 µl	-
Total	15 µl	-

Çizelge 2.6. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilen PCR döngüleri

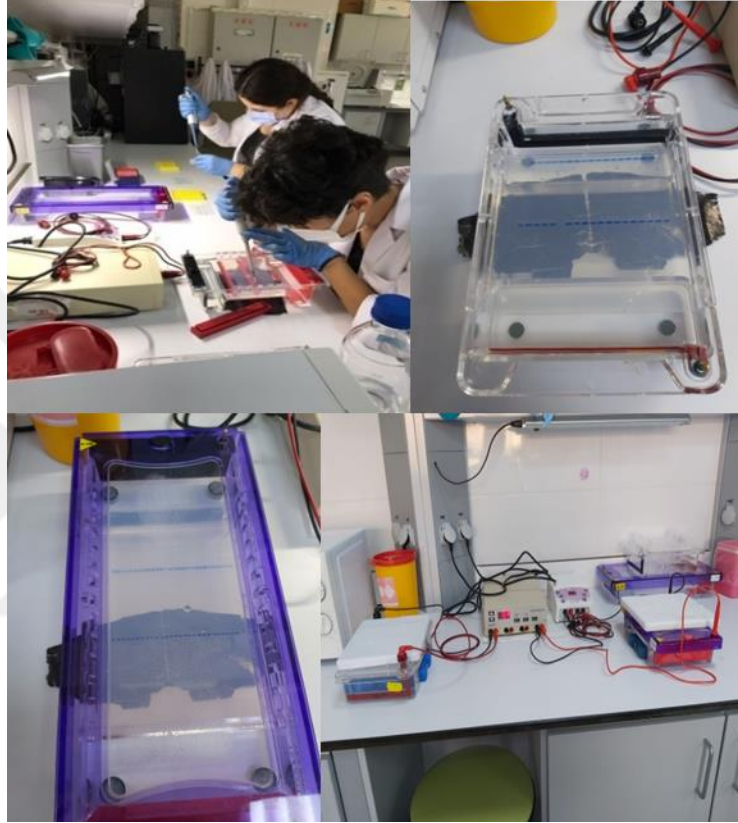
Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
1	95 °C	5 dk	1
2	95 °C	1 dk	
3	T _M °C*	1 dk	35
4	72 °C	1 dk	
5	72 °C	10 dk	1

*T_M= DNA'nın erime sıcaklığı



Şekil 2.8. PCR analizi aşamaları

PCR sonrasında elde edilen amplifikasyon ürünleri elektroforez işlemine kadar alüminyum folyoya sarılıp +4 °C'de bekletilmiştir. PCR amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kontrol edebilmek için, PCR ürünleri 2,5 µl Redsafe Nucleic Acid Staining Solution içeren %2'lik agaroz jelinde 100 ml 1X TBE tamponunda 100 Voltta 60 dk yürütülmüştür (Şekil 2.9). Elektroforez işleminden sonra jeller UV ışık altında Gel Imaging System Vilber Lourmat Quantum ST5 ile görüntülenmiştir.



Şekil 2.9. Agaroz jel elektroforezi işlemleri

PCR ürünlerinin DNA parça (fragment) büyüklüklerinin belirlenmesi hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir. DNA parça analizi farklı florasan boya ile işaretlenmiş primer bağlanma sıcaklığı aynı olan primerler multipleks olacak şekilde gruplanarak yapılmıştır. Grup 1 primerlerinin (Ocun-52, Ocun-87, Ocun-141 ve Ocun-160) bağlanma sıcaklığı 62 °C'dir. Grup 2 primerlerinin (Ocun-70, Ocun-81, Ocun-108 ve Ocun-196) bağlanma sıcaklığı 58 °C'dir. Çalıştığımız popülasyonlardaki örneklerden fragment analizleri sonuçları laboratuvarımız da GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programını kullanarak değerlendirilmiştir ve bir primer için oluşturulan parçaların baz büyüklükleri belirlenmiştir.

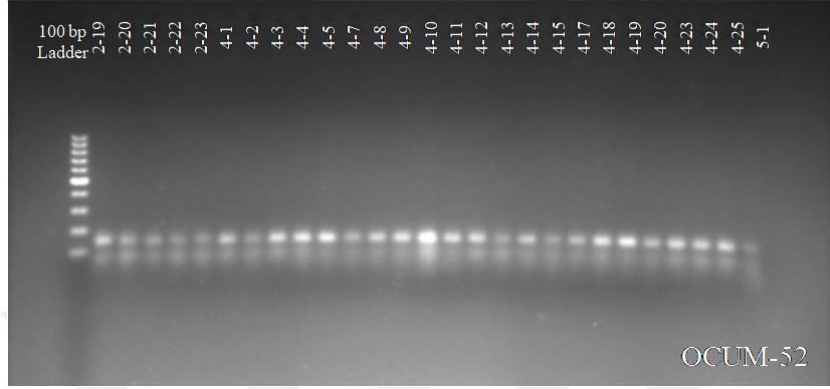
2.5 Verilerin İstatistiksel Analizleri

Popülasyonların çeşitliliğini ve genetik yapısını belirlemek için her popülasyonun polimorfik lokuslarını ve yüzdelerini, polimorfik lokuslardaki gözlenen allel sayılarını (N_a), etkili olan allel sayılarını (N_e), beklenen (H_e) ve gözlenen (H_o) heterozigotluk, Shannon sabitini (I) ve standart hataları hesaplanmıştır. Popülasyondaki polimorfizm değerinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir değişken olan Polimorfik Bilgi İçeriği (PIC) değeri Botstein vd. (1980)'nin formülü kullanılarak hesaplanmıştır. İstatistiki analizler ile elde edilen veriler GenAEx [(Version 6.3) (Peakall ve Smouse, 2006) istatistik paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Basamaklı mutasyon modeline göre moleküler varyans analizinde (AMOVA) GenAEx (Version 6.3) istatistik programından yararlanılmıştır. Nei'nin (1987) popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşma düzeyini belirleyebilmek için Nei'nin tarafsız genetik mesafe ve benzerlik katsayıları hesaplanmıştır (Nei, 1987). Sonuçların görsel bir grafik üzerinde görülebilmesi için, Nei'nin tarafsız genetik mesafe katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average) kümelendirme yöntemi kullanılarak bir dendrogram oluşturulmuştur (Sneath ve Sokal, 1973). Bu dendrogramın oluşturulmasında MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 programından yararlanılmıştır (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski ve Kumar, 2013).

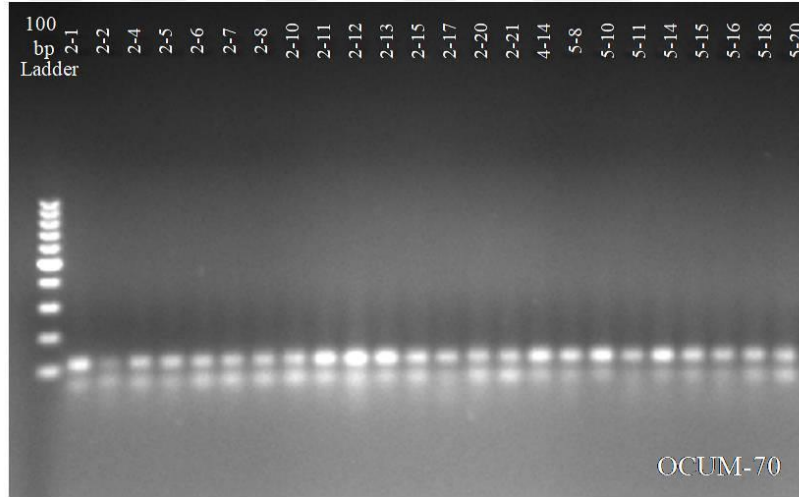
SSR lokus verileri kullanılarak çalışılan *O. cumana* popülasyonlarının benzerliklere göre dağılımının belirlenmesi için STRUCTURE 2.3.4 istatistik programı kullanılmıştır (Pritchard, Stephens ve Donnelly, 2000). Bayesian temelli STRUCTURE analizi sonucunda ayırt edici alleller kullanılarak çalışılan örnek grubundaki farklı gruplar belirlenmektedir. MCMC (Monte Carlo Markow Chain) zinciri sayısı 500.000, periyot uzunluk değeri 100.000 alınmış ve her K değeri için 10 tekrar olacak şekilde program çalıştırılmıştır. Eldeki veri setine en uygun K değerinin belirlenmesi için K=1'den K=10'a kadar analizler yapılmıştır (Evanno, Regnaut ve Goudet, 2005). STRUCTURE HARVESTER programı kullanılarak en uygun K değeri belirlenmiştir (Earl ve vonHoldt, 2012).

3. BULGULAR

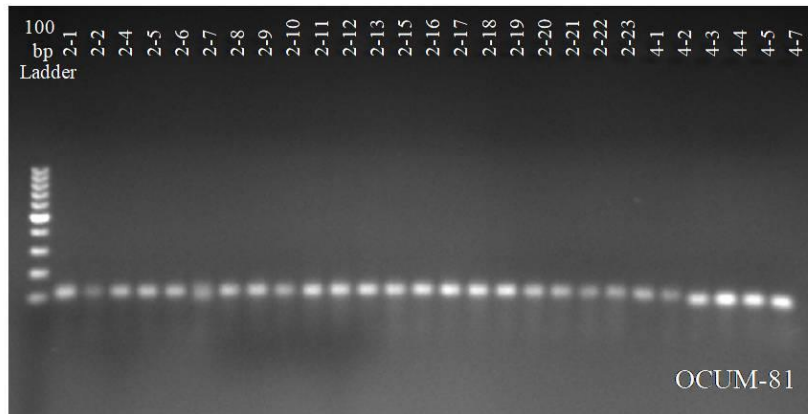
Tez çalışması kapsamında çalışılan bazı canavar otu bireylerine ait (Jel üzerinde popülasyon numarası-birey numarası ile etiketlenmiş) PCR analizleri sonucu elde edilen PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 3.1-3.8'de verilmiştir.



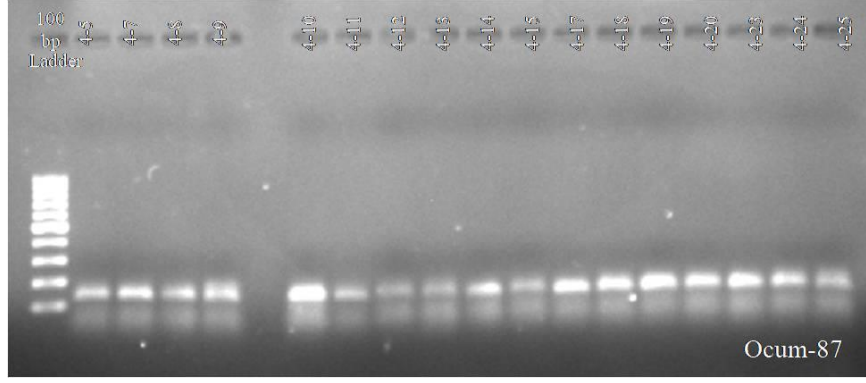
Şekil 3.1. OCUM-52 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü



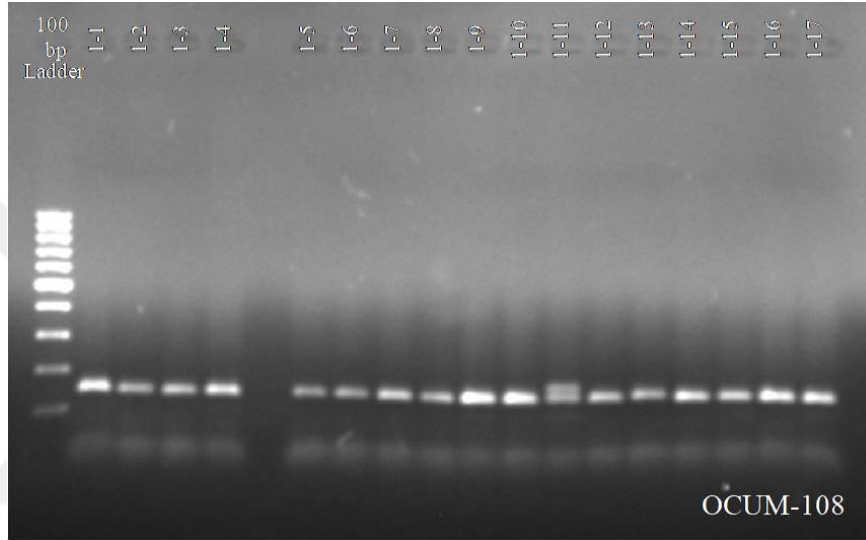
Şekil 3.2. OCUM-70 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü



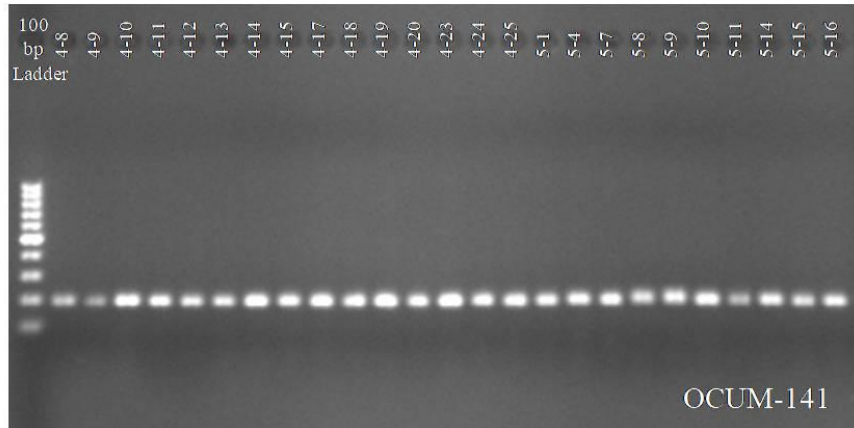
Şekil 3.3. OCUM-81 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü



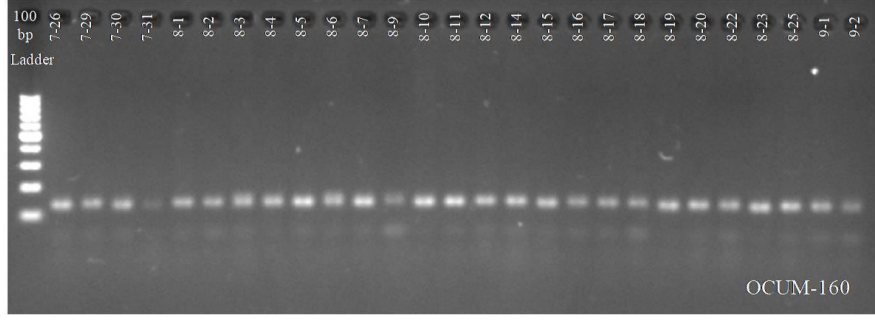
Şekil 3.4. OCUM-87 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü



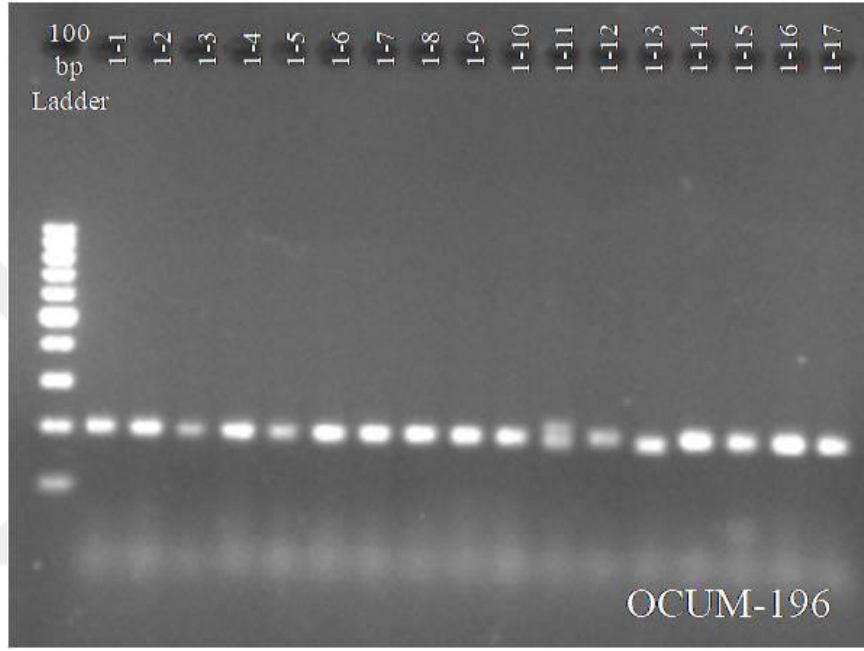
Şekil 3.5. OCUM-108 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü



Şekil 3.6. OCUM-141 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü

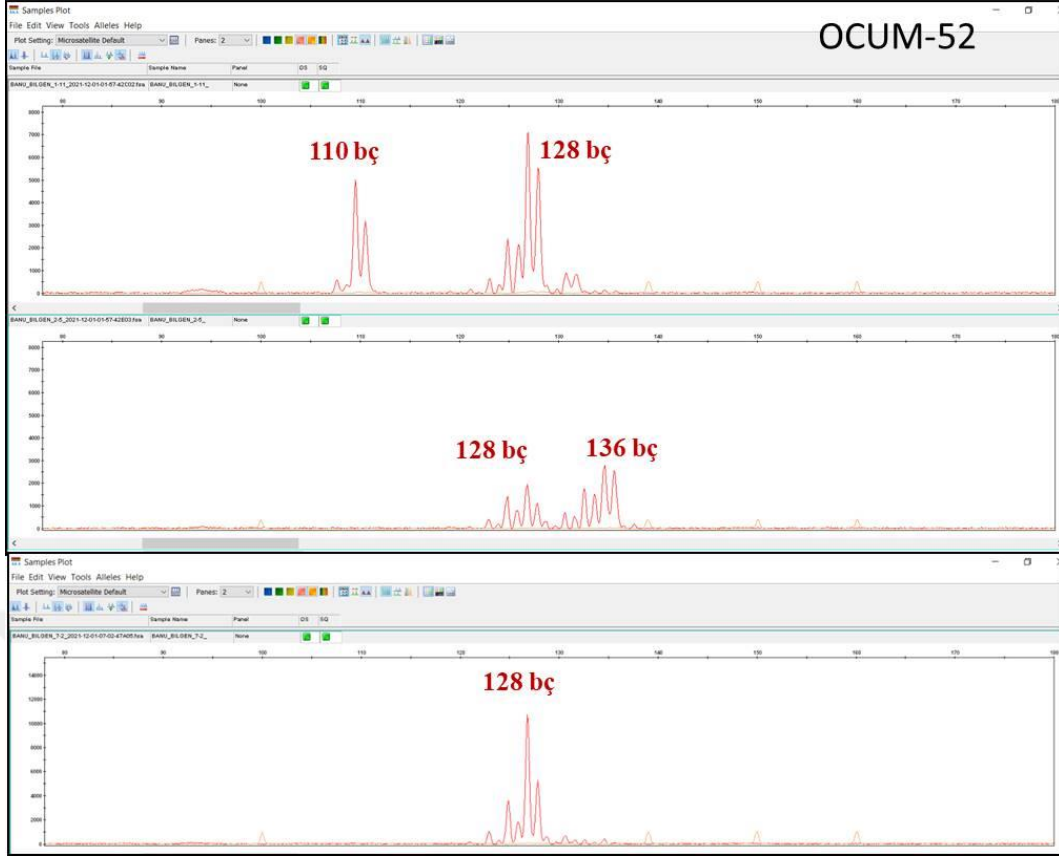


Şekil 3.7. OCUM-160 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü

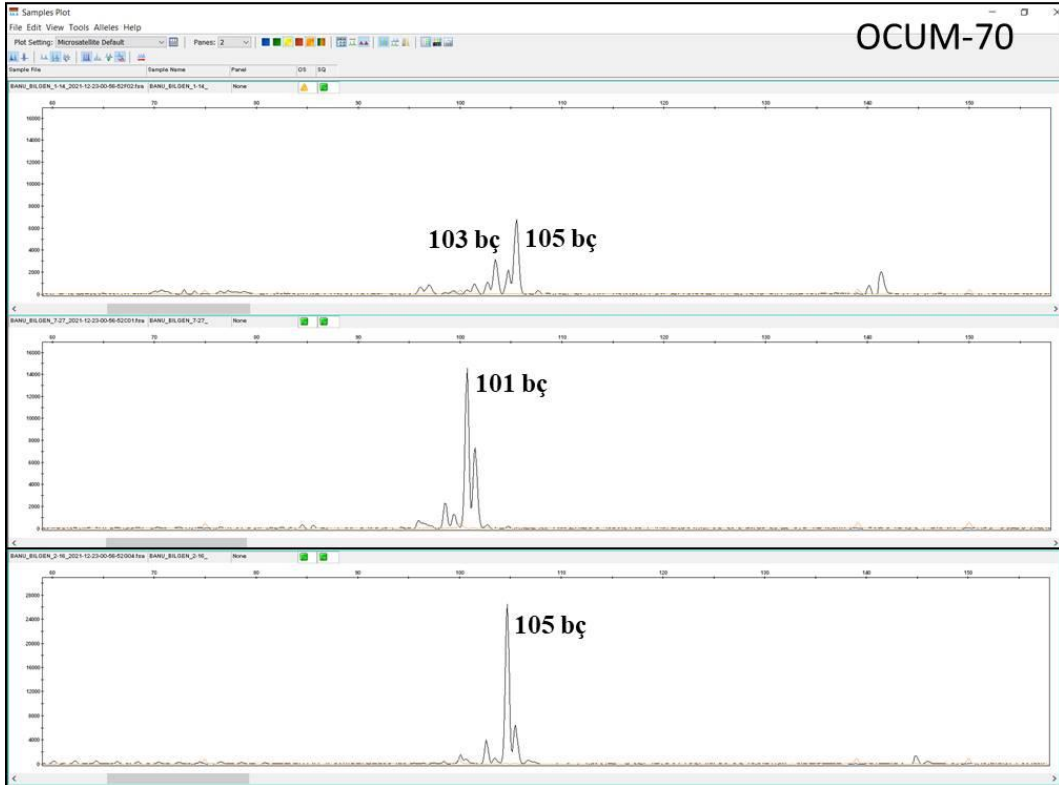


Şekil 3.8. OCUM-196 primerine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü

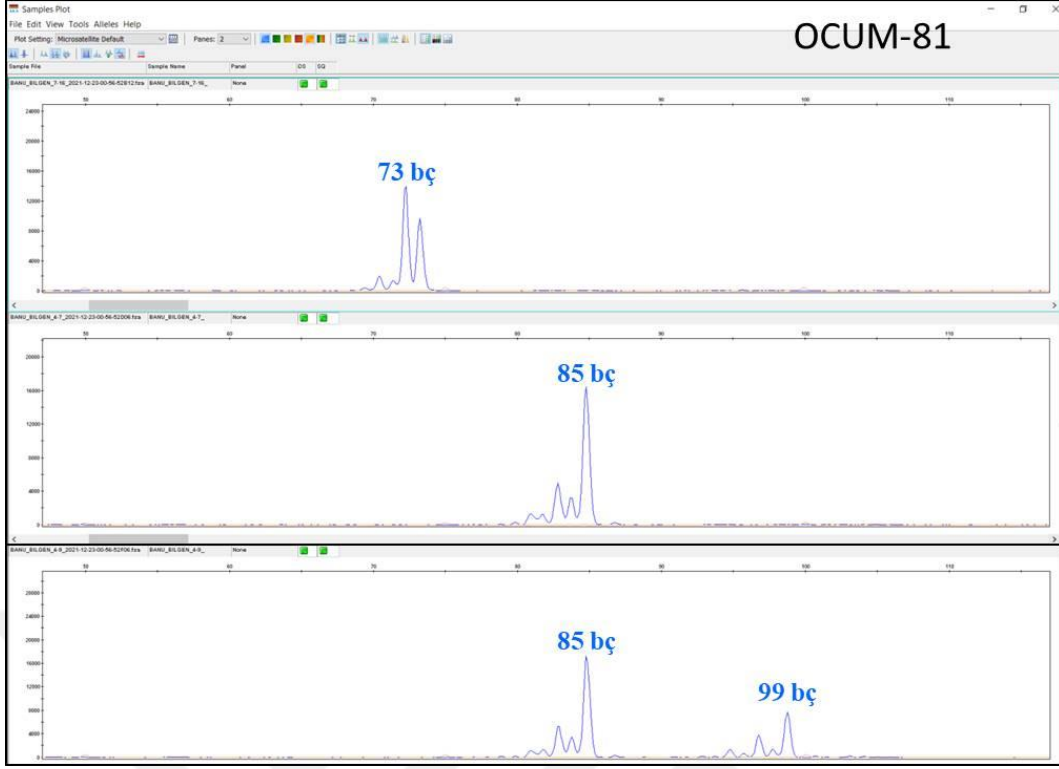
Agaroz jel elektroforezi sonuçlarına göre her bir SSR lokusu için beklenen büyüklükte PCR ürünü varlığı kontrol edildi. PCR ürünü gözlenemeyen örneklerde PCR analizleri tekrar edildi. Bütün bireylerde beklenen baz çifti (bç) aralığında bantlar gözlemlendikten sonra DNA parça (fragment) analizi yapıldı. DNA parça analizi sonucu GeneMapper Software 5.0 programı yardımıyla incelenen SSR primerlerine ait allellerin büyüklükleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 3.9-3.16).



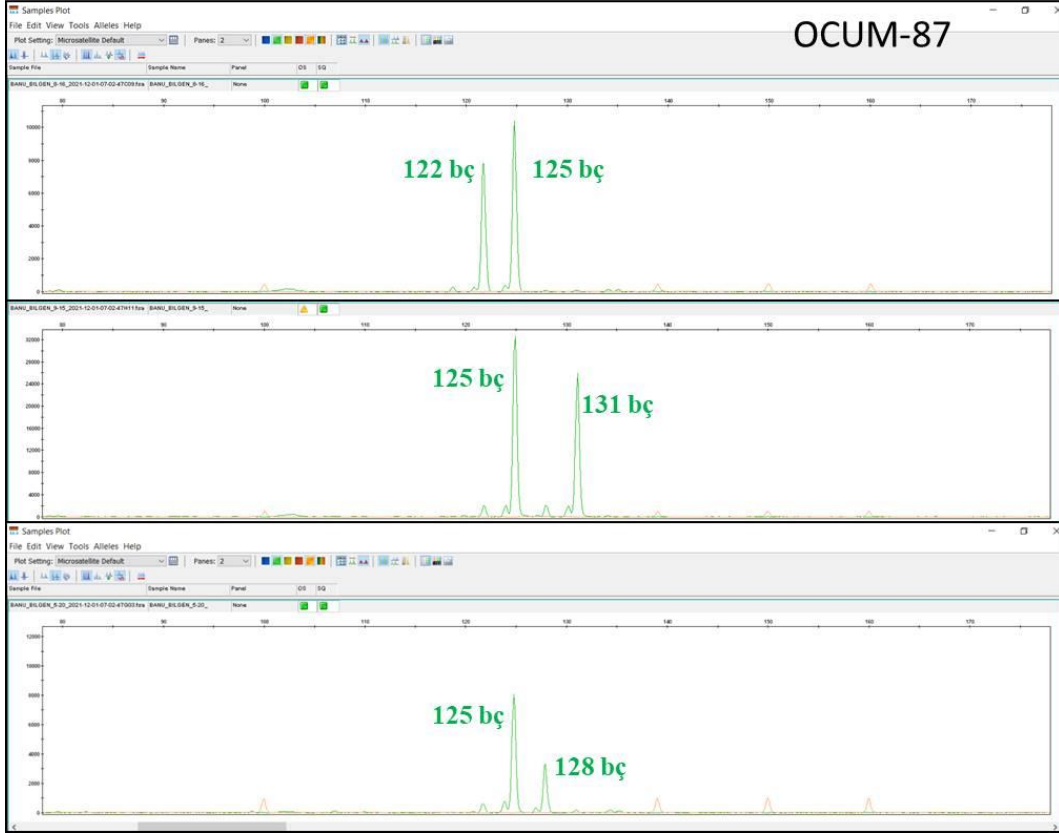
Şekil 3.9. OCUM-52 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü



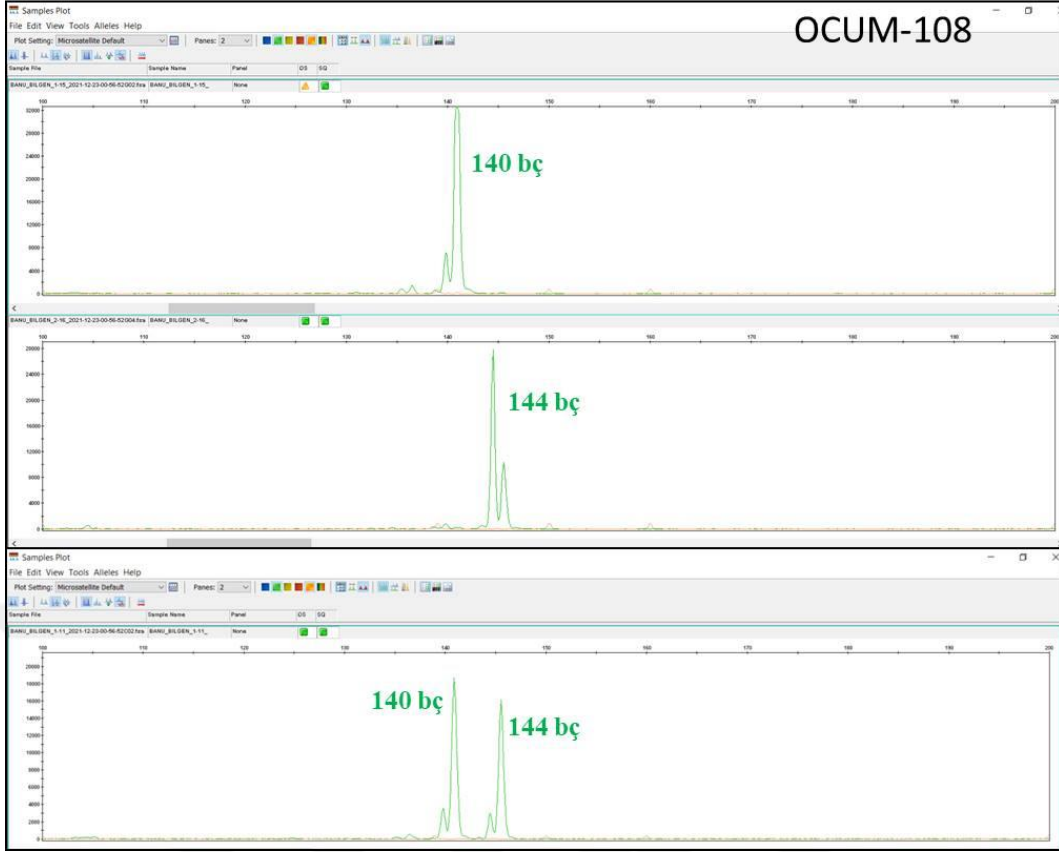
Şekil 3.10. OCUM-70 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü



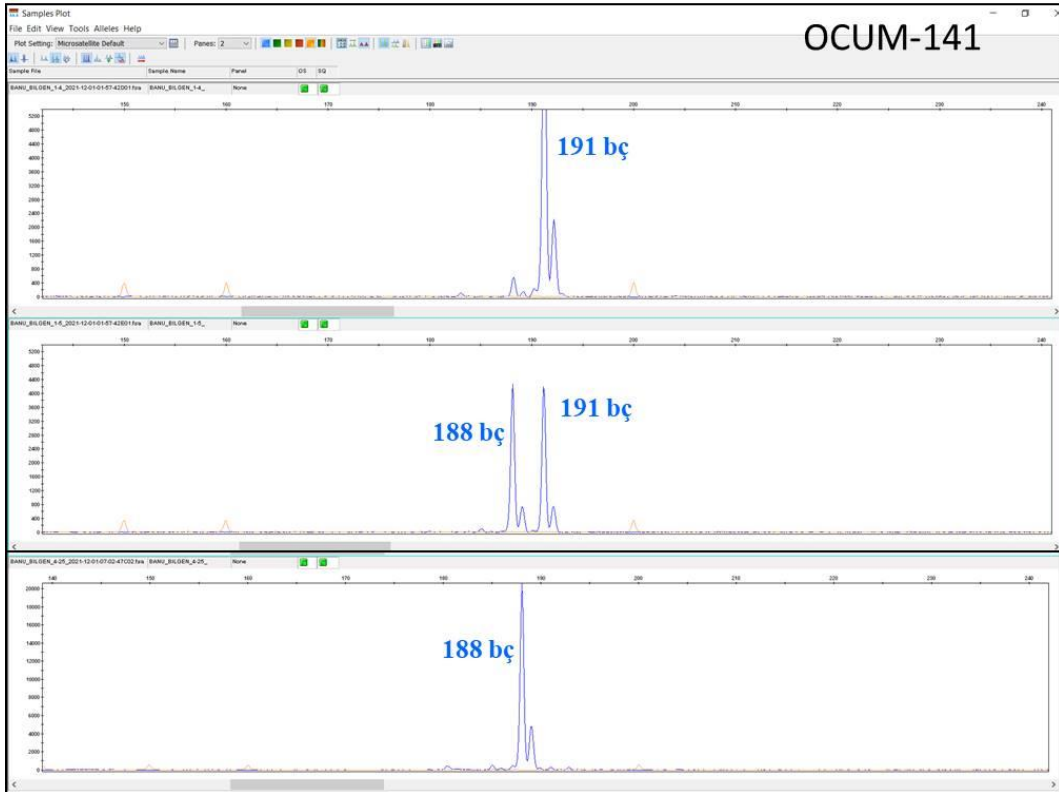
Şekil 3.11. OCUM-81 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü



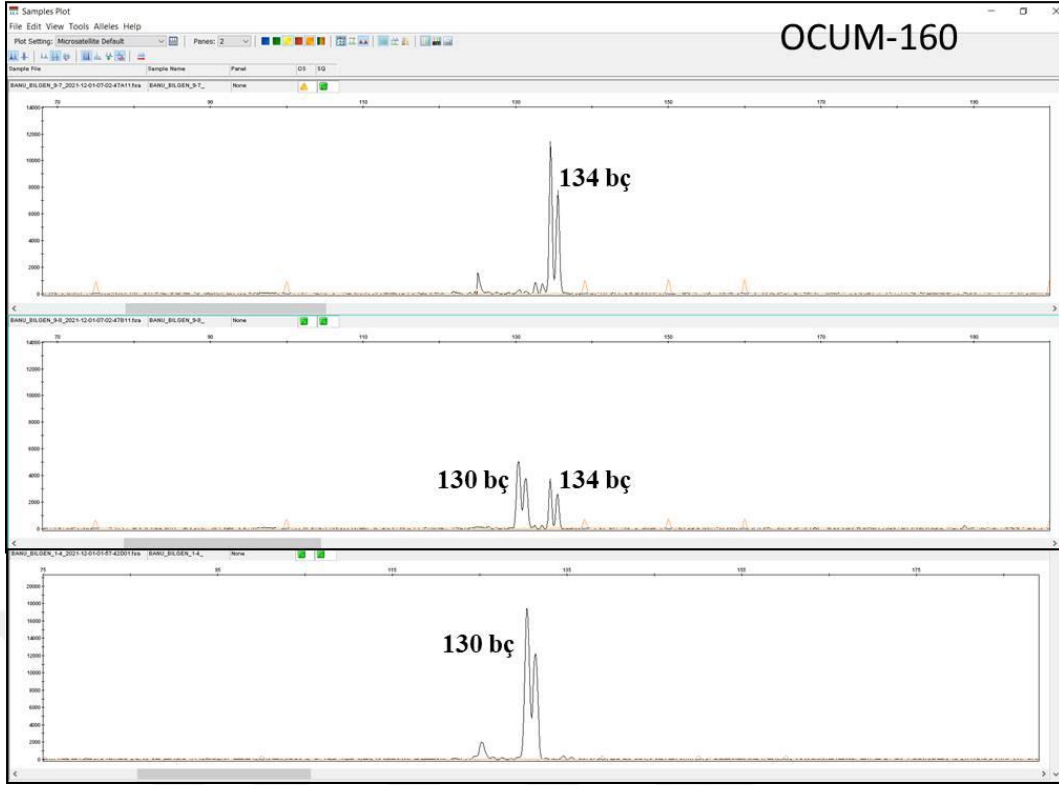
Şekil 3.12. OCUM-87 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü



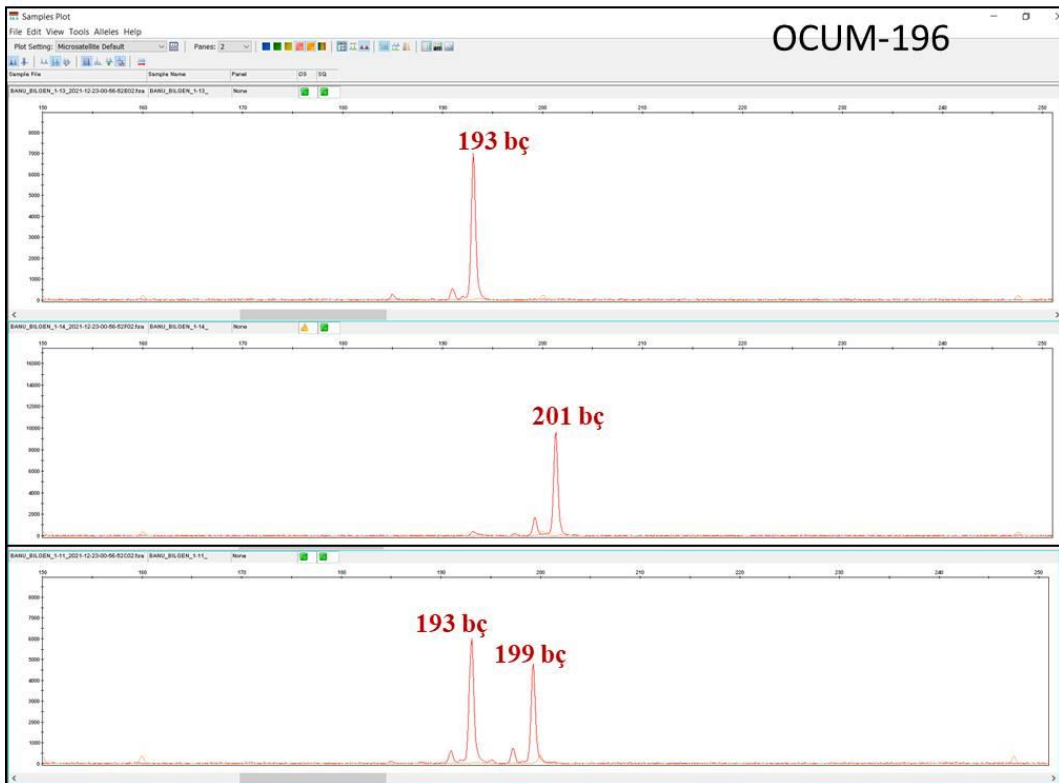
Şekil 3.13. OCUM-108 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 3.14. OCUM-141 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 3.15. OCUM-160 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 3.16. OCUM-196 no'lu primere ait allellerin elektroferogram görüntüsü

Bu tez çalışmasında 8 popülasyona (AE2003, LK2013, AD2018, T2018, MT2013, LE2013, HT2016 ve K2019) ait canavar otu bireylerinin her birinin çalışılan sekiz SSR (Ocum-52, Ocum70, Ocum-81, Ocum-87, Ocum-108, Ocum-141, Ocum-160 ve Ocum-196) lokusunun sahip olduğu alleller belirlenmiş ve frekansları hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada analiz edilen 8 SSR lokusuna ait allellerin canavar otu popülasyonlarındaki frekansları

SSR Lokusu	Allel	Allel Frekansları (f)							
		AE2003	LK2013	AD2018	T2018	MT2013	LE2013	HT2016	K2019
Ocum-52	110	0,029	0,000	0,000	0,075	0,024	0,167	0,024	0,500
	128	0,971	0,524	1,000	0,650	0,929	0,714	0,524	0,500
	136	0,000	0,476	0,000	0,275	0,048	0,119	0,452	0,000
Ocum-70	101	0,000	0,000	0,000	0,000	0,048*	0,000	0,000	0,000
	103	0,088	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000
	105	0,912	0,929	1,000	1,000	0,952	1,000	0,929	1,000
Ocum-81	73	0,765	0,000	0,000	0,000	0,048	0,095	0,119	0,000
	85	0,029	0,024	0,762	0,548	0,881	0,071	0,024	0,500
	99	0,206	0,976	0,238	0,452	0,071	0,833	0,857	0,500
Ocum-87	122	0,000	0,000	0,000	0,000	0,024	0,024	0,000	0,000
	125	0,765	0,976	0,310	0,786	0,952	0,595	0,952	1,000
	128	0,000	0,000	0,000	0,071*	0,000	0,000	0,000	0,000
	131	0,235	0,024	0,690	0,143	0,024	0,381	0,048	0,000
Ocum-108	140	0,912	0,143	1,000	0,643	0,976	0,857	0,214	1,000
	144	0,088	0,857	0,000	0,357	0,024	0,143	0,786	0,000
Ocum-141	188	0,294	0,833	0,143	0,571	0,071	0,833	0,952	0,500
	191	0,706	0,167	0,857	0,429	0,929	0,167	0,048	0,500
Ocum-160	130	0,647	0,000	0,119	0,214	0,619	0,452	0,095	0,500
	134	0,353	1,000	0,881	0,786	0,381	0,548	0,905	0,500
Ocum-196	193	0,088	0,000	0,000	0,000	0,000	0,024	0,000	0,000
	199	0,029	0,000	0,000	0,143	0,357	0,119	0,048	0,000
	201	0,882	1,000	1,000	0,857	0,643	0,857	0,952	1,000

* Popülasyona özgü (private) alleller

Bütün popülasyonlara [Avarız/Edirne (AE2003), Lüleburgaz/Kırklareli (LK2013), Adana (AD2018), Tekirdağ (T2018), Muratlı/Tekirdağ (MT2013), Sarıdanışment/Lalapaşa/Edirne (LE2013), Hayrabolu/Tekirdağ (HT2016) ve Kampüs/Tekirdağ (K2019)] bakıldığında SSR lokuslarının hepsi polimorfik olarak gözlenmiştir. Popülasyonlar tek tek incelendiğinde ise K2019 ve AD2018 popülasyonlarının polimorfizm yüzdesi %50, LK2013 popülasyonunun polimorfizm yüzdesi %75, T2018 ve LE2013 popülasyonlarının polimorfizm yüzdesi %87,50 ve AE2003, MT2013 ve HT2016 popülasyonlarının polimorfizm yüzdesi ise %100 olarak hesaplanmıştır.

Çalışılan SSR lokuslarında Ocum-52 primeri AD2018 popülasyonunda, Ocum-70 primeri AD2018, T2018, LE2013 ve K2019 popülasyonlarında, Ocum-87 primeri K2019 popülasyonunda, Ocum-108 primeri AD2018 ve K2019 popülasyonlarında, Ocum-160 primeri LK2013 popülasyonunda ve Ocum-196 primeri LK2013, AD2018 ve K2019 popülasyonlarında monomorfik olarak gözlenmiştir. Analizi yapılan canavar otu popülasyonlarına ait bireylerin 8 SSR lokusunda toplam 22 allel olarak belirlenmiştir. Tez için kullanılan SSR lokuslarında en çok allel Ocum-87 (4) primerinde gözlenmiştir. Ocum-52, Ocum-70, Ocum-81 ve Ocum-196 primerlerinde 3'er allel, Ocum-108, Ocum-141 ve Ocum-160 primerlerin de ise 2'şer allel gözlenmiştir (Çizelge 3.1).

Ocum-52 primerinde hesaplanan allel frekanslarına bakıldığında 110, 128 ve 136 bç'lik alleller AD2018 popülasyonu dışındaki tüm popülasyonlarda gözlenmiştir. 110 bç allelin en yüksek frekansı K2019 popülasyonunda ($f=0,500$), 128 bç allelin en yüksek frekansı AE2003 popülasyonunda ($f=0,971$), 136 bç allelin ise en yüksek frekansı LK2013 popülasyonunda ($f=0,476$) gözlenmiştir (Çizelge 3.1).

Ocum-70 primerinde hesaplanan allel frekansları incelendiğinde 101 bç allel sadece MT2013 popülasyonunda gözlenmiş ve popülasyona özgü allel (private allel) olarak değerlendirilmiştir ($f=0,048$). 103 bç allel 3 popülasyonda (AE2003, LK2013 ve HT2016) gözlenmiş olup en yüksek frekans değeri 0,088 (AE2003) olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.1). 105 bç'lik allel ise tüm popülasyonlarda gözlenen yaygın alleldir ($f>0,912$).

Ocum-81 primerinde 73 bç'lik allel dört popülasyonda gözlenmiştir (AE2003, MT2013, LE2013 ve HT2016). 85 ve 99 bç'lik alleller ise tüm popülasyonlarda gözlenmiştir. 73 bç allelin en yüksek frekansı AE2003 popülasyonunda ($f=0,765$), 85 bç allelin en yüksek

frekansları MT2013 popülasyonunda ($f=0,881$) ve 99 bç allelin en yüksek frekansları LK2013 popülasyonunda ($f=0,976$) hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

Ocum-87 primerinde hesaplanan allel frekanslarına bakıldığında 125 bç'lik allel tüm popülasyonlarda gözlenmiştir ($f>0,310$). 122 bç allel sadece MT2013 ve LE2013 popülasyonlarında düşük frekansta gözlenmiştir ($f=0,024$). 128 bç allel sadece T2018 popülasyonunda gözleendiğinden ($f=0,071$) popülasyona özgü (private) allel olarak değerlendirilmektedir (Çizelge 3.1). 131 bç allel K2019 dışında diğer popülasyonlarda gözlenmiştir (en yüksek $f=0,690$).

Ocum-108 primerinde 140 ve 144 bç'lik iki allel gözlenmiştir. 140 bç allel bütün popülasyonlarda gözlenen yaygın alleldir. AD2018 ve K2019 popülasyonları dışındaki altı popülasyonda 144 bç allel gözlenmiştir. 144 bç allelin en yüksek frekansları LK2013 popülasyonunda ($f=0,857$) hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

Ocum-141 primerinde 188 ve 191 bç olmak üzere toplam iki allel tüm popülasyonlarda gözlenmiştir. 188 baz çiftinin en yüksek frekansları HT2016 popülasyonunda ($f=0,952$), 191 baz çiftinin en yüksek frekansları ise MT2013 popülasyonunda ($f=0,929$) hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

Ocum-160 primerinde hesaplanan allel frekanslarına bakıldığında 130 ve 134 bç'lik alleller gözlenmiştir. 130 bç allel LK2013 popülasyonu dışında diğer popülasyonların tümünde bulunmaktadır. 134 bç allel ise bütün popülasyonlarda farklı frekanslarda gözlenen yaygın alleldir. 130 bç allelin en yüksek frekansları AE2003 popülasyonunda ($f=0,647$) hesaplanmıştır. 134 bç allelin en yüksek frekansları ise LK2013 popülasyonunda ($f=1,000$) hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

Ocum-196 primeri incelendiğinde 193, 199 ve 201 bç'lik alleller gözlenmiştir. 193 bç allel AE2003 ve LE2013 popülasyonlarında düşük frekansta gözlenmiştir. 199 bç allel 5 popülasyonda gözlenmiş olup en yüksek frekansları 0,357 ile MT2013 popülasyonunda hesaplanmıştır (Çizelge 3.1). 201 bç allel bütün popülasyonlarda gözlenen yaygın alleldir ($f>0,643$).

Çalışmada kullanılan canavar otu popülasyonlarının genetik çeşitlilik parametreleri ve PIC değerleri Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Çalışılan canavar otu popülasyonlarına ait genetik çeşitlilik parametreleri

Populasyon	Lokus	N*	N _a *	N _e *	I*	H _o *	H _e *	PIC*
AE2003	OCUM52	17	2,000	1,061	0,133	0,059	0,057	0,055
	OCUM70	17	2,000	1,192	0,298	0,176	0,161	0,148
	OCUM81	17	3,000	1,592	0,634	0,059	0,372	0,321
	OCUM87	17	2,000	1,562	0,546	0,118	0,360	0,295
	OCUM108	17	2,000	1,192	0,298	0,059	0,161	0,148
	OCUM141	17	2,000	1,710	0,606	0,118	0,415	0,329
	OCUM160	17	2,000	1,841	0,649	0,353	0,457	0,353
	OCUM196	17	3,000	1,270	0,428	0,059	0,213	0,199
	Ortalama	17	2,250 (±0,164)	1,427 (±0,101)	0,449 (±0,067)	0,125 (±0,036)	0,274 (±0,051)	0,231
LK2013	OCUM52	21	2,000	1,995	0,692	0,952	0,499	0,374
	OCUM70	21	2,000	1,153	0,257	0,143	0,133	0,123
	OCUM81	21	2,000	1,049	0,113	0,048	0,046	0,046
	OCUM87	21	2,000	1,049	0,113	0,048	0,046	0,046
	OCUM108	21	2,000	1,324	0,410	0,000	0,245	0,215
	OCUM141	21	2,000	1,385	0,451	0,048	0,278	0,240
	OCUM160	21	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	OCUM196	21	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Ortalama	21	1,750 (±0,164)	1,244 (±0,119)	0,254 (±0,087)	0,155 (±0,115)	0,156 (±0,062)	0,130
AD2018	OCUM52	21	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	OCUM70	21	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	OCUM81	21	2,000	1,569	0,549	0,190	0,363	0,297
	OCUM87	21	2,000	1,747	0,619	0,238	0,427	0,336
	OCUM108	21	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	OCUM141	21	2,000	1,324	0,410	0,000	0,245	0,215
	OCUM160	21	2,000	1,265	0,365	0,048	0,210	0,188
	OCUM196	21	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Ortalama	21	1,500 (±0,189)	1,238 (±0,104)	0,243 (±0,096)	0,060 (±0,035)	0,156 (±0,063)	0,130
T2018	OCUM52	21	3,000	1,985	0,829	0,500	0,496	0,427
	OCUM70	21	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	OCUM81	21	2,000	1,982	0,689	0,429	0,495	0,373
	OCUM87	21	3,000	1,556	0,656	0,429	0,357	0,325
	OCUM108	21	2,000	1,849	0,652	0,143	0,459	0,354
	OCUM141	21	2,000	1,960	0,683	0,286	0,490	0,370
	OCUM160	21	2,000	1,508	0,520	0,143	0,337	0,280
	OCUM196	21	2,000	1,324	0,410	0,000	0,245	0,215
	Ortalama	21	2,125 (±0,227)	1,645 (±0,128)	0,555 (±0,091)	0,241 (±0,070)	0,360 (±0,061)	0,293

Çizelge 3.2 (Devam)

Populasyon	Lokus	N*	N _a *	N _e *	I*	H _o *	H _e *	PIC*
MT2013	OCUM52	21	3,000	1,156	0,303	0,143	0,135	0,130
	OCUM70	21	2,000	1,100	0,191	0,000	0,091	0,087
	OCUM81	21	3,000	1,276	0,0445	0,048	0,217	0,205
	OCUM87	21	3,000	1,101	0,224	0,095	0,092	0,091
	OCUM108	21	2,000	1,049	0,113	0,048	0,046	0,046
	OCUM141	21	2,000	1,153	0,257	0,048	0,133	0,123
	OCUM160	21	2,000	1,893	0,665	0,095	0,472	0,360
	OCUM196	21	2,000	1,849	0,652	0,143	0,459	0,354
	Ortalama	21	2,375 (±0,183)	1,322 (±0,122)	0,356 (±0,074)	0,077 (±0,018)	0,205 (±0,059)	0,174
LE2013	OCUM52	21	3,000	1,811	0,792	0,429	0,448	0,405
	OCUM70	21	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	OCUM81	21	3,000	1,411	0,564	0,143	0,291	0,272
	OCUM87	21	3,000	2,000	0,765	0,810	0,500	0,397
	OCUM108	21	2,000	1,324	0,410	0,095	0,245	0,215
	OCUM141	21	2,000	1,385	0,451	0,143	0,278	0,240
	OCUM160	21	2,000	1,982	0,689	0,143	0,495	0,373
	OCUM196	21	3,000	1,334	0,474	0,095	0,251	0,229
	Ortalama	21	2,375 (±0,263)	1,531 (±0,127)	0,518 (±0,090)	0,232 (±0,093)	0,313 (±0,059)	0,266
HT2016	OCUM52	21	3,000	2,085	0,787	0,952	0,520	0,408
	OCUM70	21	2,000	1,153	0,257	0,143	0,133	0,123
	OCUM81	21	3,000	1,334	0,474	0,095	0,251	0,229
	OCUM87	21	2,000	1,100	0,191	0,095	0,091	0,087
	OCUM108	21	2,000	1,508	0,520	0,238	0,337	0,280
	OCUM141	21	2,000	1,100	0,191	0,000	0,091	0,087
	OCUM160	21	2,000	1,208	0,314	0,095	0,172	0,157
	OCUM196	21	2,000	1,100	0,191	0,000	0,091	0,087
	Ortalama	21	2,250 (±0,164)	1,323 (±0,120)	0,366 (±0,075)	0,202 (±0,110)	0,211 (±0,054)	0,182
K2019	OCUM52	3	2,000	2,000	0,693	1,000	0,500	0,375
	OCUM70	3	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	OCUM81	3	2,000	2,000	0,693	1,000	0,500	0,375
	OCUM87	3	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	OCUM108	3	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	OCUM141	3	2,000	2,000	0,693	1,000	0,500	0,375
	OCUM160	3	2,000	2,000	0,693	1,000	0,500	0,375
	OCUM196	3	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Ortalama	3	1,500 (±0,189)	1,500 (±0,189)	0,347 (±0,131)	0,500 (±0,189)	0,250 (±0,094)	0,188
Toplam	Ortalama	-	2,016 (±0,079)	1,404 (±0,046)	0,386 (±0,033)	0,199 (±0,037)	0,241 (0,023)	0,199

*N = örnek sayısı, N_a = gözlenen allel sayısı, N_e = etkili allel sayısı, I = Shannon sabiti, H_o = gözlenen heterozigotluk, H_e = beklenen heterozigotluk (Nei 1987), PIC = Polimorfik bilgi içeriği, ± standart hata.

Çizelge 3.2'deki genetik çeşitlilik parametreleri incelendiğinde; lokus başına düşen ortalama allel sayısı (N_a) 1,500 (K2019 popülasyonu) ile 2,375 (MT2013 ve LE2013 popülasyonları) arasında, lokus başına düşen etkili allel sayısı (N_e) ise 1,238 (AD2018 popülasyonu) ile 1,645 (T2018 popülasyonu) arasında değiştiği gözlenmiştir. Gözlenen en yüksek allel sayısı MT2013 ve LE2013 popülasyonlarında (19 allel), en düşük allel sayısı ise K2019 popülasyonunda (12 allel) olarak belirlenmiştir. Tüm popülasyonlara bakıldığında ortalama N_e değeri $1,404 \pm 0,046$ olarak bulunmuştur. Popülasyonların içindeki varyasyonların belirlenmesi için kullanılan Shannon sabiti (I), en yüksek değeri T2018 popülasyonunda ($0,555 \pm 0,091$), en düşük değeri ise AD2018 popülasyonunda ($0,243 \pm 0,096$) hesaplanmıştır. Çalışılan sekiz popülasyon için Shannon sabiti ortalaması $0,386 \pm 0,033$ olarak bulunmuştur. Nei (1987)'ye göre H_e (beklenen) ve H_o (gözlenen) heterozigotluk değerleri tek tek hesaplanmıştır (Çizelge 3.2). Gözlenen heterozigotluk değeri (H_o) en yüksek $0,500 \pm 0,189$ olarak K2019 popülasyonunda, en düşük ise $0,060 \pm 0,035$ olarak AD2018 popülasyonunda bulunmuştur. Beklenen heterozigotluk değeri (H_e) ise en yüksek $0,360 \pm 0,061$ olarak T2018 popülasyonunda, en düşük ise LK2013 popülasyonunda $0,156 \pm 0,062$ ve AD2018 popülasyonunda $0,156 \pm 0,063$ olarak bulunmuştur. Ortalama beklenen heterozigotluk değeri ($0,241 \pm 0,023$) ortalama gözlenen heterozigotluk değerinden ($0,199 \pm 0,037$) bir miktar yüksek bir değerde gözlenmiştir. Tez çalışmasında kullanılan sekiz SSR lokusuna ait PIC (Polimorfik Bilgi İçeriği) değerleri tüm popülasyonlar için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Çizelge 3.2). En yüksek değer $0,293$ olarak T2018 popülasyonunda, en düşük değer ise $0,130$ olarak LK2013 ve AD2018 popülasyonlarında hesaplanmıştır. Ocum-52, Ocum-81, Ocum-141 ve Ocum-160 primerlerinin PIC değerleri diğerlerine göre daha yüksek oranda hesaplanmıştır (sırası ile $0,272$, $0,265$, $0,247$, $0,261$).

Genetik çeşitliliğin kaynakğını belirlemek için çalışılan sekiz canavar otu popülasyonunda basamaklı mutasyon modeline göre moleküler varyans analizi (AMOVA) yapılmıştır. AMOVA sonuçlarına göre, genetik çeşitliliğin %53 oranında popülasyon içinde olduğu, %47 oranında ise popülasyonlar arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.3). Bütün lokuslar ele alındığında F_{ST} değeri $0,371$, F_{IS} değeri $0,342$ ve F_{IT} değeri ise $0,586$ olarak bulunmuştur. Populasyonlar arası gen akımı oranı (N_m) genetik çeşitliliğin dağılımını belirleyen önemli faktörlerdendir. Bu tez çalışmasında F_{ST} değerleri kullanılarak tüm popülasyonlar hep birlikte değerlendirildiğinde N_m değeri her bir kuşakta ortalama $0,424$ olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.3. Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Varyans (%)
Populasyonlar-arası	7	313,522	2,343	%47
Populasyonlar-içi	138	368,266	2,669	%53
Toplam	145	681,788	5,012	%100

Popülasyonlar arasındaki genetik uzaklık veya benzerlik Nei'nin tarafsız genetik benzerlik veya farklılık katsayıları kullanılarak belirlenmiştir (Nei, 1987). Çalışmada kullanılan SSR lokusuna ait bilgiler ile genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri (Çizelge 3.4) verilmiştir. Genetik uzaklık değerleri 0,001 ile 0,536 arasında, genetik benzerlik değerleri ise 0,585 ile 0,999 arasında değişmektedir. Çizelge 3.4'te verildiği üzere genetik mesafe değeri en düşük (0,001) Hayrabolu/Tekirdağ (HT2016) ile Lüleburgaz/Kırklareli (LK2013) popülasyonları arasında, en yüksek (0,536) Muratlı/Tekirdağ (MT2013) ile Lüleburgaz/Kırklareli (LK2013) popülasyonları arasında bulunmuştur.

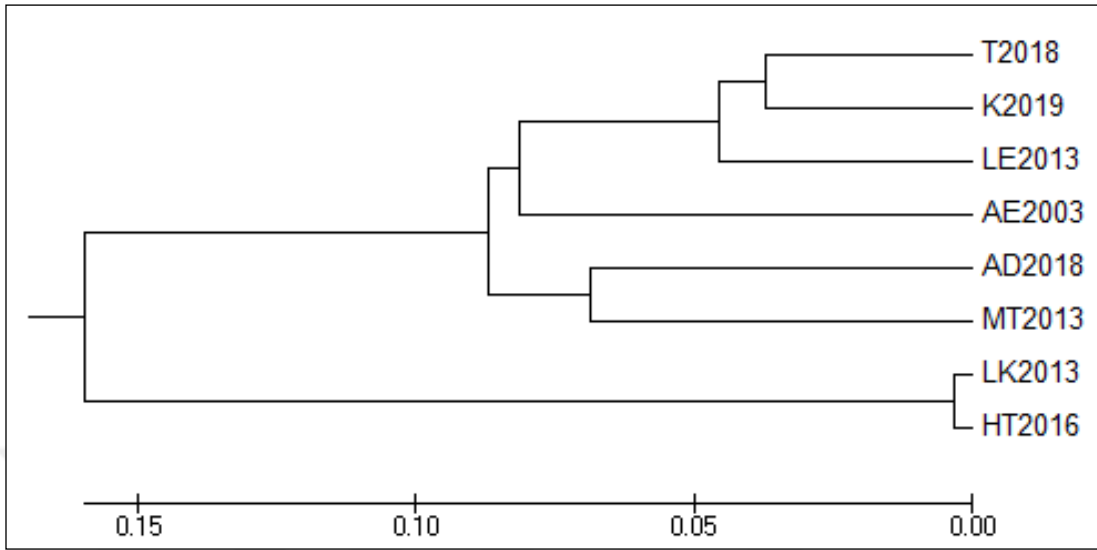
Çizelge 3.4. Nei (1987)'ye göre hesaplanan genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri

Populasyonlar	AE2003	LK2013	AD2018	T2018	MT2013	LE2013	HT2016	K2019
AE2003	***	0,411	0,181	0,167	0,134	0,150	0,364	0,108
LK2013	0,663	***	0,445	0,111	0,536	0,162	0,001	0,244
AD2018	0,834	0,641	***	0,117	0,131	0,204	0,447	0,145
T2018	0,846	0,895	0,890	***	0,133	0,071	0,101	0,032
MT2013	0,874	0,585	0,877	0,876	***	0,271	0,515	0,083
LE2013	0,861	0,850	0,815	0,931	0,762	***	0,129	0,058
HT2016	0,695	0,999	0,640	0,904	0,598	0,879	***	0,219
K2019	0,898	0,784	0,865	0,968	0,921	0,943	0,803	***

-sol alt diyagonal: genetik benzerlik, sağ üst diyagonal: genetik mesafe değerlerini göstermektedir.

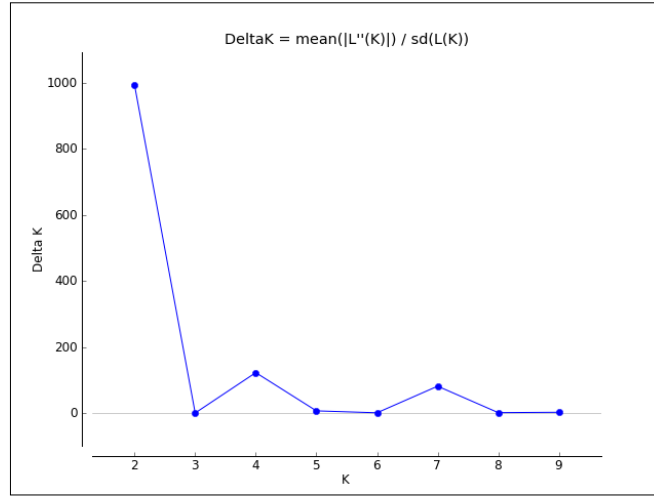
UPGMA kümelendirme yöntemi kullanılarak elde edilen veriler sınıflandırılmış ve genetik farklılaşmanın görsel olarak izlenebilmesi için dendrogram oluşturulmuştur (Şekil 3.17). UPGMA dendrogramı incelendiğinde çalışılan popülasyonların 2 gruba ayrıldığı gözlenmiştir. 1. grupta Edirne, Tekirdağ ve Adana'dan örneklenen 6 popülasyon [Avarız/Edirne (AE2003), Adana (AD2018), Tekirdağ (T2018), Muratlı/Tekirdağ (MT2013), Sarıdanışment/Lalapaşa/Edirne (LE2013) ve Kampüs/Tekirdağ (K2019)] yer alırken, 2. grupta Kırklareli ve Tekirdağ'dan örneklenen 2 popülasyonun [Lüleburgaz/Kırklareli (LK2013) ve Hayrabolu/Tekirdağ (HT2016)] yer aldığı gözlenmiştir. *P. aegyptiaca*'ya ait

örnekler dış grup olarak çalışmaya dahil edilmiş olmasına rağmen dendrogramda ayrı bir grup olarak gözlenmemiştir.



Şekil 3.17. Canavar otu popülasyonlarının genetik mesafe değerlerine göre oluşturulmuş UPGMA dendrogramı

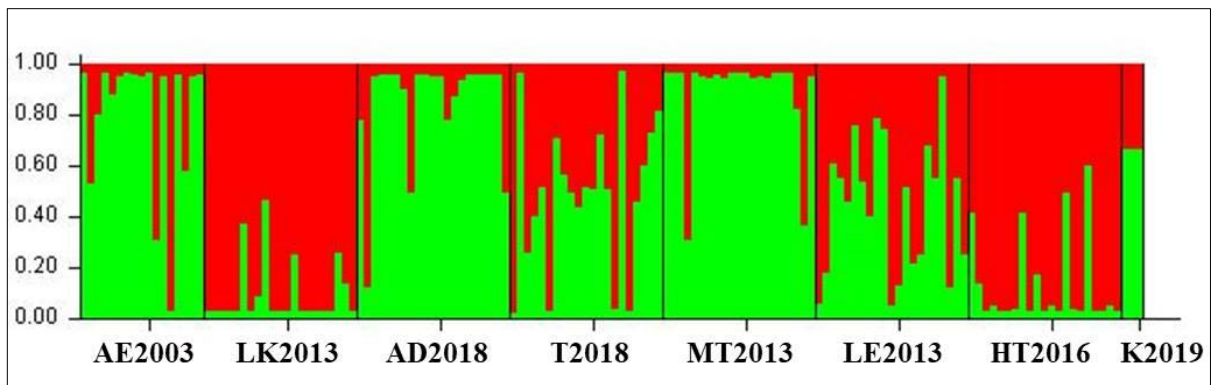
SSR lokus verilerine göre popülasyonların genetik yapısını ve popülasyondaki bireylerin hangi grupta yer aldığı belirlenmesi için STRUCTURE analizi yapılmıştır. K değeri 1-10 olarak programa girilmiş, en ideal K değeri STRUCTURE HARVESTER programı kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 3.18). Çalışılan popülasyonlarda en yüksek ΔK değerinin elde edildiği grup sayısı iki ($K=2$) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.19). Bayesian temelli STRUCTURE analizine göre çalışılan sekiz popülasyonun 2 farklı gruba ayrıldığı gözlenmiş olup, elde edilen sonuçların UPGMA dendrogramı ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.20). 1. grupta (Yeşil) Avarız/Edirne (AE2003), Adana (AD2018), Tekirdağ (T2018), Muratlı/Tekirdağ (MT2013), Sarıdanışment/Lalapaşa/Edirne (LE2013) ve Kampüs/Tekirdağ (K2019) popülasyonları yer alırken, 2. grupta (Kırmızı) Lüleburgaz/Kırklareli (LK2013) ve Hayrabolu/Tekirdağ (HT2016)] popülasyonlarının yer aldığı gözlenmiştir (Şekil 3.20).



Şekil 3.18. STRUCTURE analizi için ideal K değerinin belirlendiği DeltaK grafiği

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	10	-1418.500000	0.221108	—	—	—
2	10	-1083.210000	0.251440	335.290000	249.580000	992.601442
3	10	-997.500000	2.796029	85.710000	0.160000	0.057224
4	10	-911.630000	0.743938	85.870000	90.930000	122.227851
5	10	-916.690000	4.804963	-5.060000	31.270000	6.507855
6	10	-890.480000	62.448322	26.210000	43.060000	0.689530
7	10	-821.210000	1.125907	69.270000	91.420000	81.196757
8	10	-843.360000	9.494115	-22.150000	10.800000	1.137547
9	10	-854.710000	11.394487	-11.350000	25.790000	2.263375
10	10	-891.850000	14.834962	-37.140000	—	—

Şekil 3.19. Structure Harvester programından elde edilen K değeri tablosu



Şekil 3.20. SSR lokus verilerinin STRUCTURE analizi (K=2) sonucunda çalışılan canavar otu popülasyonlarının benzerliklere göre dağılımı (2 farklı grup; Kırmızı ve Yeşil)

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında farklı illerden (Edirne, Kırklareli, Tekirdağ ve Adana) örneklenen yedi *O. cumana* popülasyonlarına ait tohumlar ve üniversitemiz kampüsünden örneklenen *P. aegyptiaca*'ya ait bireylerin doku örnekleri kullanılmıştır. Çalışılan popülasyonlara ait tohumlar kontrollü olarak canavar otuna hassas Özdemirbey ayçiçeği çeşidi kullanılarak yetiştirilmiştir. Çiçeklenmeden önce toplanan doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapılarak, Ocum-52, Ocum-70, Ocum-81, Ocum-87, Ocum108, Ocum-141, Ocum-160 ve Ocum-196 SSR primerleri ile genetik karakterizasyon ve çeşitlilik analizi yapılmıştır. Genetik çeşitliliğin belirlenmesi için her bir popülasyondaki örnek sayısı (N), gözlenen allel sayısı (N_a), etkili allel sayısı (N_e), Shannon sabiti (I), gözlenen heterozigotluk (H_o), beklenen heterozigotluk (H_e) ve polimorfik bilgi içeriği (PIC) gibi genetik olan parametreler belirlenmiştir. AMOVA analizi ile genetik varyasyonun kaynağı belirlenmiş, Nei (1987)'ye göre hesaplanan genetik benzerlik ve mesafe değerleri ile dendogram oluşturulmuştur. Populasyonların genetik yapısını ortaya çıkarmak için STRUCTURE analizi yapılmıştır. Yapılan istatistikî analizlere göre ülkemizden örneklenen canavar otu popülasyonlarının genetik yapısı ve çeşitliliği hakkında değerli bilgiler elde edilmiştir.

Literatür taramaları sonucunda canavar otunun zararları, mücadele yöntemleri, biyolojik ve kimyasal mücadelenin etkileri, tarlalardaki bulaş riskleri ve yoğunlukları, canavar otu konakçı ilişkisi, ırk belirleme gibi çeşitli çalışmalara rastlanmıştır. Bitki biyoteknolojisi alanında özellikle moleküler belirteçlerin gelişmesi ile birlikte birçok bitki türünde genetik karakterizasyon, genetik çeşitlilik ve filogenetik ilişki ile ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde yapılmaya başlanmıştır. Canavar otu ile ilgili genetik çeşitlilik üzerine yapılan ilk çalışmalar biyokimyasal belirteçlerin kullanımı ile başlamıştır. İzoenzim belirteçlerini kullanarak *Orobancha* cinsinde genetik çeşitliliğin belirlendiği çalışmalar bu alandaki ilk çalışmalar olarak bilinmektedir (Castejon-Munoz, Suso, Romero-Munoz ve Garcia-Torres, 1991; Verkleij, Janssen ve Pieterse, 1986).

Moleküler belirteç teknolojisinin gelişmesi ile dominant belirteç tipleri kullanılarak çalışmalar devam etmiştir. Canavar otu türlerinde RAPD (Brault vd., 2007; Gagne vd., 1998; Ivanovic vd., 2021; Katzir, Portnoy, Tzuri, Castejon-Munoz ve Joel, 1996; Molinero-Ruiz vd., 2014; Paran, Gidoni, Jacobsohn, 1997; Roman vd., 2001; Roman vd., 2002), ISSR (Benharrat, Thalouarn, Theodet ve Veronesi, 2002), AFLP (Gagne vd., 2000; Vaz-Patto vd., 2008), SSR (Belay vd., 2020; Bilgen vd., 2019; Guchetl, Antonovave Tchelustnikova, 2014a;

2014b; Martin-Sanz vd., 2016; Pineda-Martos vd., 2013; Pineda-Martos vd., 2014a; Pineda-Martos vd., 2014b) belirteçleri kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. SSR belirteçlerinin son yıllarda kullanımı yüksek derecede polimorfik olmaları, kodominant ve çok allelli olması gibi avantajları nedeniyle tercih edilmektedir.

Bu tez çalışmasında kullanılan SSR lokusları polimorfik olarak belirlenmiştir. Popülasyon düzeyinde incelediğimizde AD2018 popülasyonunda Ocum-52, AD2018, T2018, LE2013 ve K2019 popülasyonlarında Ocum-70, K2019 popülasyonunda Ocum-87, AD2018 ve K2019 popülasyonları Ocum-108, LK2013 popülasyonu Ocum-160 ve AD2018 ve K2019 popülasyonları ise Ocum-196 primerleri monomorfik olarak belirlenmiştir. AE2003, MT2013 ve HT2016 popülasyonlarının polimorfizm oranı %100 olarak belirlenmiştir. İspanya'da 50 *O. cumana* popülasyonunun genetik çeşitliliğini belirlemek üzere 15 SSR lokusu ile yapılan çalışmada, tez çalışmamızda kullandığımız aynı SSR lokusları kullanılmış ve tüm lokusların polimorfik olduğu bildirilmiştir (Pineda-Martos vd., 2013). Guchetl vd. (2014a, 2014b) tarafından Rusya, Kazakistan ve Romanya'dan örneklenen *O. cumana* popülasyonlarında genetik benzerliği belirlemek üzere 9 SSR lokusu (7 tanesi tez çalışmamız ile aynı) kullanılmış ve lokuslar polimorfik olarak saptanmıştır. Pineda-Martos vd. (2014a; 2014b) tarafından yapılan çalışmalarda da çalışılan SSR lokuslarının polimorfik olduğu belirtilmiştir. Bilgen vd. (2019) tarafından Trakya Bölgesinden örneklenen 6 popülasyonda tez çalışmamız ile aynı SSR lokusları kullanılmış ve polimorfizm oranı %100 olarak hesaplanmıştır.

Polimorfik bilgi içeriği (PIC), moleküler belirteçlerin sahip olduğu allellere ve bu allellerin popülasyondaki dağılımına dayalı olarak moleküler belirtecin polimorfizmi saptamadaki gücünü gösteren önemli bir değerdir. Bu tez çalışmasında kullanılan sekiz SSR lokusunun N_a ve PIC değerleri ile literatürde aynı lokuslarla yapılan çalışmaların N_a ve PIC değerlerinin karşılaştırılması Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Tez çalışmasında en yüksek PIC değeri Ocum-52 primerinde (0,272), en düşük PIC değeri Ocum-70 primerinde (0,060) hesaplanmıştır. Bilgen vd. (2019) çalışmasında PIC değeri Ocum-81 primerinde en yüksek (0,532), Ocum-141 primerinde ise en düşük (0,157) olarak bildirilmiştir. Pineda-Martos vd., (2014a)'da ise PIC değeri Ocum-160 primerinde en yüksek (0,685), Ocum-52 primerinde ise en düşük (0,449) olarak bildirilmiştir. Çalışmaların sonuçlarına göre çalışılan SSR lokuslarının sahip olduğu alleller göz önüne alındığında PIC değeri hesaplamalarına göre seçilen belirteçlerin orta derecede ($0,25 < PIC < 0,5$) bilgi verici (informative) olduğu söylenebilmektedir. Örnekleme yapıldığı coğrafik alan ve çalışılan örnek sayısı farklı

olması nedeniyle çalışmalar arasında ufak farklılıkların meydana çıkması ve PIC değerlerinin nispeten düşük çıkması muhtemeldir. Ziadi vd. (2018)'nin çalışmasında Türkiye'den örneklenen 9 *O. cumana* popülasyonunda 24 SSR belirteci ile analizler yapılmış ve tez çalışmamızla ortak olan 4 SSR lokusunda ($0,849 > PIC > 0,484$) nispeten daha yüksek oranda PIC değerleri hesaplanmıştır. Duca vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada Moldova, Romanya, Bulgaristan, Sırbistan, Türkiye ve Çin'den örneklenen toplam 33 popülasyonda 15 SSR lokusu kullanılarak yapılan çalışmada PIC değeri 0,490 (Ocum-206) ile 0,897 (Ocum-197) arasında bulunmuştur (Ortalama PIC değeri=0,745) (Duca, Mutu ve Clapco, 2021).

Çalışmada kullanılan sekiz SSR lokusunda toplamda 22 allel gözlenmiştir (Lokus başına düşen ortalama allel sayısı 2,75). En yüksek allel sayısı Ocum-87 primerinde olup 4 allel olarak bulunmuştur. Ocum-52, Ocum-70, Ocum-81 ve Ocum-196 primerinde 3 allel gözlenirken, en düşük allel sayısı olarak Ocum-108, Ocum-141 ve Ocum-160 primerinde 2 allel gözlenmiştir. Bilgen vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada aynı SSR lokusunda toplam allel sayısı 23 olarak bildirilmiştir. Çalışmada en yüksek allel sayısı Ocum-81 primerinde 6 allel olarak bulunmuştur. Ocum-52, Ocum-87 ve Ocum-196 primerleri 3 allel iken, en düşük allellere sahip olan Ocum-70, Ocum-108, Ocum-141 ve Ocum-160 primerlerinde 2 allel bulunmuştur. Pineda-Martos vd. (2014a) makalesinde ise yine aynı SSR lokuslarında toplam 32 allel gözlenmiştir. Ocum-70, Ocum-81 ve Ocum-87 primerlerinde en yüksek sayıda allel gözlenirken, en düşük sayıda allel Ocum-52, Ocum-108 ve Ocum-196 primerlerinde gözlenmiştir. Kalan 2 (Ocum-141 ve Ocum-160) primerde ise 4 allel bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Guchetl vd. (2014a)'nin 24 *O. cumana* popülasyonunda yaptığı çalışmasında Ocum-87 için 4 allel, Ocum-70 için 3 allel ve diğer primerler için 2 allel gözlendiği belirtilmiştir. Ziadi vd. (2018)'nin çalışmasında tez çalışmamızla ortak olan 4 SSR lokusunda (Ocum-52, Ocum-81, Ocum-87 ve Ocum-196) 4 ile 8 arasında allel gözlendiği bildirilmiştir. Toplamda çalışılan 24 SSR lokusunun allel sayıları ve PIC değerleri göz önüne alındığında çalışılan popülasyonların genetik çeşitlilik açısından 3 gruba bölüneceği belirtilmiştir. Belay vd. (2020)'nin *O. crenata* türünde 96 birey kullanarak yaptığı çalışmada ise Ocum-52 için 7 allel, Ocum-81 için 11 allel gözlenmiştir. Literatürde *O. cumana* için farklı coğrafik bölgelerden toplanan farklı sayıda bireyle yapılan çalışmaların gözlenen SSR alleli sayısı bakımından birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür. *O. crenata* gibi farklı türde aynı SSR lokuslarının daha yüksek allel sahibi olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan SSR primerilerine ait gözlenen allel sayısı ve polimorfik bilgi içeriği (PIC) değerlerinin karşılaştırılması

SSR Lokus	Tez Çalışması		Bilgen vd. 2019		Pineda-Martos vd. 2014a	
	N _a	PIC	N _a	PIC	N _a	PIC
Ocum-52	3	0,272	3	0,268	3	0,449
Ocum-70	3	0,060	2	0,217	5	0,672
Ocum-81	3	0,265	6	0,532	5	0,542
Ocum-87	4	0,197	3	0,263	5	0,642
Ocum-108	2	0,157	2	0,318	3	0,489
Ocum-141	2	0,247	2	0,157	4	0,625
Ocum-160	2	0,261	2	0,338	4	0,685
Ocum-196	3	0,136	3	0,172	3	0,535

Genetik çeşitliliğin belirlenmesinde popülasyona özgü (private) alleller en önemli ölçütlerden birisidir. Bu tür alleller popülasyonda ilk defa karşılaşıyorsa takibi yapılarak canavar otu türlerinde ırk teşhisine yardımcı olabilmek için kullanılabilirler. Tez çalışmasında T2018 (Tekirdağ-2018) ve MT2013 (Muratlı/Tekirdağ-2013) popülasyonlarında sırayla Ocum-87 (128 bç allel) ve Ocum-70 (101 bç allel) lokuslarına ait birer tane popülasyona özgü allel belirlenmiştir. Bilgen vd. (2019) tarafından Trakya popülasyonlarında yapılan çalışmada da Ocum-196 (193 bç), Ocum-52 (124 bç) ve Ocum-81 (77 bç) lokuslarına ait toplam 3 adet popülasyona özgü allel bildirilmiştir. Bilgen vd. (2019)'nin Avarız/Edirne2012 popülasyonunda Ocum-196 primerinde gözlenen 193 bç allel, tez çalışmamızda yine aynı bölgenin farklı yılda toplanmış olan (AE2003) popülasyonunda ve yakın bölgedeki diğer bir popülasyonda (LE2013) nispeten düşük frekansta gözlenmiştir. Pineda-Martos vd. (2014b) tarafından yapılan çalışma ise 14 popülasyondan sadece 1 tanesinde popülasyona özgü allel bildirilmiştir.

Tez çalışmasında, popülasyonların içindeki varyasyonların belirlenmesi için genetik çeşitlilik parametrelerinden olan Shannon sabiti (I), en yüksek değeri T2018 popülasyonunda ($0,555 \pm 0,091$), en düşük değeri ise AD2018 popülasyonunda ($0,243 \pm 0,096$) hesaplanmıştır. Çalışılan sekiz popülasyon için Shannon sabiti ortalaması $0,386 \pm 0,033$ olarak bulunmuştur. Shannon sabitinin ortalama değerine göre popülasyon içindeki çeşitliliğin nispeten düşük olduğu söylenebilir. Pineda-Martos vd. (2014b) tarafından yabancı konukçu bitkilerden örneklenen *O. cumana* bireyleri kullanılarak yapılan çalışmada ortalama Shannon sabiti (I) $0,299$ olarak bildirilmiştir. Çalışmaların Shannon sabiti (I) karşılaştırıldığında birbirine uyumlu sonuçlar gözlenmekte ve türün gen havuzunun dar olduğu şeklinde yargıya varılabilmektedir. Canavar otu popülasyonlarının oluşumunda etkili olan kurucu etkisi

nedeniyle düşük allel sayısı, düşük frekansta allellerin varlığı ve düşük popülasyon içi çeşitlilik gözlenmesi olasıdır ve bu nedenle çeşitliliğe katkı sağlayacak allellerin kaybolması ile tür karşı karşıya kalabilmektedir (Pineda-Martos vd. 2014b). Guchetl vd. (2014a, 2014b) tarafından Rusya, Kazakistan ve Romanya'dan örneklenen *O. cumana* popülasyonlarında Shannon sabiti (I) değeri Kazakistan ve Rusya popülasyonları için diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında nispeten yüksek olarak bulunmuş, yüksek olmasının nedeni olarak bölgede yoğun bir şekilde orobanş bulaşının olması gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında ortalama gözlenen heterozigotluk değeri (H_o) 0,199 ve ortalama beklenen heterozigotluk değeri (H_e) ise 0,241 olarak hesaplanmıştır. Bilgen vd. (2019)'da H_o 0,207 ve H_e 0,349 olarak bildirilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan sekiz SSR lokusunun genetik çeşitlilik parametreleri ile literatürde aynı lokuslarla yapılan çalışmaların değerlerinin karşılaştırılması Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Sonuçlara göre en yüksek H_o (ortalama gözlenen heterozigotluk) değeri tez çalışmasında Ocum-52 primerinde 0,504 olarak, Bilgen vd. (2019) çalışmasında Ocum-108 primerinde 0,408 olarak, Pineda-Martos vd. (2014b) çalışmasında ise Ocum-160 primerinde 0,018 olarak verilmiştir. En düşük H_o değerleri tez çalışmasında Ocum-196 primerinde 0,037 olarak, Bilgen vd. (2019) çalışmasında Ocum-196 primerinde 0,067 olarak, Pineda-Martos vd. (2014b) çalışmasında ise Ocum-87 primerinde 0,000 olarak verilmiştir. H_e (ortalama beklenen heterozigotluk) değerinde en yüksek değerler tez çalışmasında Ocum-52 primerinde 0,332 olarak, Bilgen vd. (2019) çalışmasında Ocum-81 primerinde 0,589 olarak, Pineda-Martos vd. (2014b) çalışmasında ise Ocum-160 ve Ocum 196 primerlerinde 0,187 olarak verilmiştir. En düşük H_e değerleri ise tez çalışmasında Ocum-70 primerinde 0,065, Bilgen vd. (2019) çalışmasında Ocum-141 primerinde 0,185, Pineda-Martos vd. (2014b) çalışmasında ise Ocum-108 primerinde 0,024 olarak verilmiştir. Hesaplanan F_{st} değerleri karşılaştırıldığında en yüksek değerler tez çalışmasında Ocum-108 primerinde 0,539, Bilgen vd. (2019) çalışmasında Ocum-141 primerinde 0,551, Pineda-Martos vd. (2014b) çalışmasında ise Ocum-108 primerinde 0,910 olarak verilmiştir. En düşük F_{st} değerleri ise; tez çalışmasında Ocum-70 primerinde 0,044, Bilgen vd. (2019) çalışmasında da Ocum-70 primerinde 0,151 ve Pineda-Martos vd. (2014b) çalışmasında ise Ocum-160 primerinde 0,564 olarak verilmiştir. Heterozigotluğun düşük oranda tespit edilmesi çalışmalarda analiz edilen SSR lokuslarda ciddi bir şekilde heterozigot eksikliği olduğunun göstergesidir. Bunun en büyük nedeninin bu popülasyonlarda nispeten yüksek oranda kendi kendine tozlaşmanın (self polinasyon) görülmesi olduğu bildirilmektedir (Pineda-Martos vd., 2014b).

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan SSR primerlerine ait genetik çeşitlilik parametrelerinin karşılaştırılması

SSR Lokus	Tez Çalışması			Bilgen vd. 2019			Pineda-Martos vd. 2014b		
	H _o	H _e	F _{st}	H _o	H _e	F _{st}	H _o	H _e	F _{st}
Ocum-52	0,504	0,332	0,233	0,192	0,326	0,236	0,011	0,148	0,761
Ocum-70	0,058	0,065	0,044	0,392	0,267	0,151	0,006	0,095	0,813
Ocum-81	0,251	0,317	0,463	0,192	0,589	0,207	0,008	0,138	0,762
Ocum-87	0,229	0,234	0,302	0,183	0,345	0,344	0,000	0,091	0,847
Ocum-108	0,073	0,187	0,539	0,408	0,401	0,182	0,004	0,024	0,910
Ocum-141	0,205	0,304	0,391	0,083	0,185	0,551	0,008	0,169	0,646
Ocum-160	0,235	0,330	0,254	0,142	0,401	0,177	0,018	0,187	0,564
Ocum-196	0,037	0,157	0,146	0,067	0,203	0,201	0,008	0,187	0,699

Moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçlarına göre, çalışılan sekiz canavar otu popülasyonunda genetik çeşitliliğin %53'ü popülasyon içinde, %47'si ise popülasyonlar arasında olarak hesaplanmıştır. Bilgen vd. (2019)'nin çalışmasında popülasyon içi çeşitlilik %66, popülasyonlar arası çeşitlilik %34 olarak bildirilmiştir. Molinero-Ruiz vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada gruplar arası ve gruplar içi çeşitlilik değerlendirilmiştir. İspanya, Macaristan ve Türkiye popülasyonlarında popülasyonlar arası çeşitliliğin %60, Türkiye popülasyonlarında popülasyon içi çeşitliliğin %87 olduğu bildirilmiştir. Guchetl vd. (2014a, 2014b) tarafından yapılan çalışmada ise farklı ülkelerin popülasyonlarında genetik çeşitliliğin kaynağının %78 gibi büyük bir oranda popülasyonun içinde olduğu bulunmuştur ve %22'si de popülasyonlar arasındaki çeşitlilik olarak saptanmıştır ($F_{ST}=0,219$). Gagne vd. (1998) çalışmasında ise İspanya, Bulgaristan, Romanya ve Türkiye'de alınan *O. cumana* örneklerinde popülasyon içindeki genetik çeşitliliğin düşük olduğu gözlenmiştir. Belay vd. (2020), *O. crenata* türünde SSR analizi sonucunda popülasyon arası çeşitliliği %2, bireyler arası çeşitliliği %55 ve bireyler içi çeşitliliği %43 olarak bildirmiştir. Çalışılan *O. crenata* popülasyonlarında yüksek oranda gen akımının (düşük F_{ST}) olduğu ve bölge bazlı farklılaşmanın olmadığı belirtilmiştir. Farklı coğrafik alanlarda yayılış gösteren popülasyonlarda gen akımı oranına göre genetik çeşitlilik düzeyleri ve genetik çeşitliliğin popülasyon içi veya arasındaki dağılımı değişmektedir. Popülasyonlar arasındaki gen akımının düşük oranda olması, popülasyonlar arası genetik çeşitliliğin oranını etkilemekte, popülasyonu genetik çeşitliliğini azalmasına neden olabilmektedir. Bu tez çalışmasında F_{ST} değerleri kullanılarak tüm popülasyonlar hep birlikte değerlendirildiğinde N_m değeri her bir kuşakta ortalama 0,424 olarak düşük bir oranda hesaplanmıştır. Bilgen vd. (2019)'da N_m değeri 1,741 olarak bildirilmiştir.

Tez çalışmasında çalışılan popülasyonlar arasındaki genetik uzaklığı veya yakınlığı Nei'nin tarafsız genetik benzerlik/farklılık katsayıları hesaplanarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan sekiz SSR lokusuna dayanarak hesaplanan genetik uzaklık değerleri 0,001 ile 0,536 arasında, genetik benzerlik değerleri de 0,585 ile 0,999 arasında değişmektedir. Genetik mesafe 0,001 ile LK2013-HT2016 popülasyonları arasında en düşük değer, LK2013-MT2013 popülasyonları arasında 0,536 ile en yüksek değerdedir. Genetik mesafe değerlerine ve UPGMA kümelendirme yöntemine göre oluşturulan dendrogram sekiz popülasyon 2 ana gruba (gen havuzuna) ayrılmıştır. 1. grupta Edirne, Tekirdağ ve Adana'dan örneklenen 6 popülasyon (AE2003, AD2018, T2018, MT2013, LE2013 ve K2019) yer alırken, 2. grupta Kırklareli ve Tekirdağ'dan örneklenen 2 popülasyonun (LK2013 ve HT2016) yer aldığı gözlenmiştir. *P. aegyptiaca*'ya ait örnekler dış grup olmasına rağmen dendrogramda ayrı bir grup olarak gözlenmemiştir. *O. cumana* popülasyonları ile aynı grupta yer alması *P. aegyptiaca*'ya ait çalışılan örnek sayısının az olması ve kullanılan sekiz SSR lokusunun genetik farklılaşmayı tespit edememesi gibi faktörlerin etki etmesi ile açıklanabilmektedir.

Bilgen vd. (2019)'da yapılan çalışmada da Trakya bölgesi popülasyonları 2 gruba ayrılmış benzer bir gruplanma gözlenmiştir. Ziadi vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada ise UPGMA kümelendirme yöntemine göre filogenetik ağaç oluşturulmuş, Türkiye *O. cumana* popülasyonları 6 kümeye ayrılmıştır. Çalışmada genetik benzerlik değeri 0,02 ile 0,97 arasında bildirmiştir. Dendrograma göre Yeniköy, Sambro Havsa ve Adana popülasyonlarının diğerlerine oranla düşük genetik benzerliğe sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca İskenderköy, Ürünlü, Budakdoğanca, Ballıhoca Muratlı, Şahinköyü Malkara ve Gözsüz Köyü Malkara popülasyonlarının yüksek benzerliğe sahip olduğu bildirilmiştir.

Guchetl vd. (2014a, 2014b)'nin oluşturduğu dendrograma göre Rusya ve Kazakistan popülasyonları 1 grupta, Romanya popülasyonları ise diğer grupta yer almaktadır. Molinero-Ruiz vd. (2014) tarafından yapılan çalışma sonucunda ise *O. cumana* popülasyonlarında yakın coğrafik bölgede olan popülasyonların genetik olarak birbirinden ayrıldıkları tespit edilmiştir. Pineda-Martos vd. (2014a) tarafından yapılan çalışmada canavar otu popülasyonlarının moleküler belirteç analizi sonucunda genetik olarak gruplandırılmasında coğrafik köken ve enfekte ettiği türe göre bir gruplanmanın meydana geldiği ve SSR belirtecinin bu ayrımları yapmada güçlü bir belirteç olduğu bildirilmiştir.

Bayesian temelli STRUCTURE analizi sonucunda ayırt edici alleller kullanılarak çalışılan canavar otu popülasyonlarında farklı gruplar belirlenmiş ve popülasyon benzerlik

dağılımları analiz edilmiştir. K değeri 1-10 arasında 10 tekrarlı olarak analizler yapılmış ve en ideal değer (K=2) belirlenmiştir. STRUCTURE analizi sonucunda UPGMA analizinde olduğu gibi 2 farklı grup oluşmuştur. 1. grupta AE2003, AD2018, T2018, MT2013, LE2013 ve K2019 popülasyonları, 2. grupta ise LK2013 ve HT2016 popülasyonları yer almaktadır. Bilgen vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada da canavar otu popülasyonları için en ideal K değeri 2 olarak bulunmuş, 1. grupta Edirne ve Kırklareli popülasyonları, 2. grupta ise Tekirdağ popülasyonları yer almıştır. Pineda-Martos vd. (2014a) tarafından yapılan çalışmada K değeri 1-14 arasında analiz edilmiş, en ideal K değeri yine 2 olarak bulunmuştur. Çalışmada Bulgaristan popülasyonları ile İspanya popülasyonları farklı grupta yer almıştır.

Parazit bitkiler ne kadar yüksek genetik çeşitliliğe sahip ise o kadar konukçu bitkinin direnç mekanizmasının üstesinden gelerek bitkiyi enfekte edebilme yeteneğine sahiptir. Ayçiçeği gibi her konukçu bitkinin direnç mekanizmalarını geliştirmeyi amaçlayan, yeni dirençli çeşitler elde etmeyi hedefleyen sürdürülebilir ve uzun vadeli ıslah programlarına ihtiyaç vardır. Farklı ekolojik ve coğrafik bölgelerde yayılış gösteren parazit bitki popülasyonlarına karşı dirençli çeşitlere sahip olmak önemlidir (Kaya 2003). *Orobanche* türleri gibi parazitik bitki türlerinde genetik karakterizasyon, genetik çeşitlilik ve çeşitliliğin popülasyon içi ve popülasyonlar arası dağılımını belirlemek, belirli sürede oluşan yeni ırkları teşhis edebilmek büyük önem taşımaktadır. Başlangıçta yabancı bitkiler için tehdit olan parazit bitkilerin zamanla tarım bitkilerini enfekte eden bir tür haline gelmesinde etkili olan evrimsel mekanizmaların ortaya çıkarılması için genetik çalışmalar önem arz etmektedir. Ülkemizde canavar otu ile ilgili yapılan çalışma sınırlıdır. Çalışma sonucunda *O. cumana* türü hakkında elde edilen bilgiler ileride planlanacak farklı konukçudaki bütün canavar otu görülen bölgeler örneklenerek, genetik yapı, genetik çeşitlilik ve yeni ırkların oluşumunun evrimi ile ilgili diğer çalışmalara değerli bilimsel katkılar sağlayacaktır. Yabancı ot kontrol programlarının genel verimliliği ve etkililiğinin ve ayrıca yabancı otlarla mücadelenin en uygun araçlarının, yerel ve bölgesel *O. cumana* popülasyonlarında mevcut olan genetik akrabalık veya çeşitlilik hakkındaki bilgilerle geliştirileceğini unutmamak gerekir. Bu nedenle moleküler belirteçlerin amaçlanan çalışmaya en uygun çeşidi seçilerek genetik çeşitliliği ortaya çıkartmaya hedefleyen araştırma çalışmaları literatüre önemli katkılar sunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdalla, M. M. F., Saleh, H. A. M. A. ve Khater, M. A. (2020). Detection of genetic variations in *Orobanche crenata* using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Bulletin of the National Research Centre*, 44, 139.
- Aksoy, A. (2010). Türkiyedeki canavar otları ve mücadelesi. *TÜBİTAK 105G 080 nolu Ülkesel Canavar Otu Projesi Çıktısı Broşürü*.
- Aksoy, E., Öztemiz, S. ve Uygur, F. N. (2006). Canavar otu türlerinin (*Orobanche* spp.) doğal düşmanı olan böcek türlerinin saptanması ve *Phytomyza Orobanchia* Kalt. (Diptera: Agromyzidae)'nın canavar otunun biyolojik mücadelesinde kullanılma olanağının araştırılması. *Türkiye Herboloji Dergisi*, 9(2), 10-17.
- Amri, M., Abbes, Z., Ben Youssef, S., Bouhadida, M., Ben Salah, H. ve Kharrat, M. (2012). Detection of the parasitic plant, *Orobanche cumana* on sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 11, 4163-4167.
- Atanasova, R., Batchvarova, R., Todorovska, E. ve Atanassov, A. (2014). Molecular study of broomrape (*Orobanche* spp.) by RAPD analyses. *Biotechnology&Biotechnological Equipment*, 19(3), 51-60.
- Barut, A. K. (2017). *Trakya bölgesine ait Orobanche cumana* Wallr. popülasyonlarının genetik çeşitliliğinin moleküler belirteçler yardımı ile belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi), Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Belay, G., Tesfaye, K., Hamwih, A., Ahmed, S., Dejene T. ve Oliveira Junior, J. (2020). Genetic diversity of *Orobanche crenata* populations in Ethiopia using microsatellite markers. *International Journal of Genomics*, 2020, 8.
- Benharrat, H., Thalouarn, P., Theodet, C. ve Veronesi, C. (2002). *Orobanche* species and population discrimination using inter simple sequence repeat (ISSR). *Weed Research*, 42, 470-475.
- Bilgen, B. B., Barut, A. K. ve Demirbaş, S. (2019). Genetic characterization of *Orobanche cumana* populations from the Thrace region of Turkey using microsatellite markers. *Turkish Journal of Botany*, 43, 38-47.
- Bilgen, B. B., Daneshvar, S., Evcı, G., Pekcan, V., Yılmaz, M. İ. ve Kaya, Y. (2018). Determination of high oleic type and broomrape resistant sunflower hybrids By DNA Markers. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics*, 4(1), 22-30.
- Brault, M., Betsou, F., Jeune, B., Tuquet, C. ve Salle, G. (2007). Variability of *Orobanche ramosa* populations in France as revealed by crossinfestations and molecular markers. *Environmental and Experimental Botany*, 61, 272-280.
- Castejon-Munoz, M., Suso, M. J., Romero-Munoz, F. ve Garcia-Torres, L. (1991). *Isoenzymatic study of broomrape (Orobanche cernua) populations infesting sunflower (Helianthus annuus)*. Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds, Nairobi, Kenya. Erişim adresi: [Isoenzymatic studies of Mediterranean populations of sandflies of the subgenus Larrousius] - PubMed (nih.gov).

- Dellaporta, S. L., Wood, J. ve Hicks, J. B. (1983). A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.
- Dor, E., Plakhine, D., Joel, D. M., Larose, H., Westwood, J. H., Smirnov, E., Ziadna, H., Hershenhorn, J. (2020). A new race of sunflower broomrape (*Orobanche cumana*) with a wider host range due to changes in seed response to strigolactones. *Weed Science*, 68, 134-142.
- Doyle, J. J. ve Doyle, J. I. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Duca, M., Mutu, A. ve Clapco, S. (2021). Efficiency of microsatellite markers in genotyping of *Orobanche cumana* populations. *Lucrari Stiintifice seria Agronomie*, 64(1), 25-30.
- Earl, D. A. ve vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Technical Note*, 4, 359-361.
- Evanno, G., Regnaut, S. ve Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.
- Evcı, G., Sezer, N., Pekcan, V., Yılmaz, M. I. ve Kaya, Y. (2011). Broomrape control in sunflower production in Turkey. *Basic Articles*, 314, 111-117.
- Fernandez-Escobar, J., Rodriguez-Ojeda, M. I., Fernandez-Martinez, J. M. ve Alonso, L. C. (2009). Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in Castilla-Leon, a traditionally non-broomrape infested area in Northern Spain. *Helia*, 51, 57-64.
- Fernandez-Martinez, J. M. (2012). *Progress in research on breeding for resistance to broomrape*. In: 18th Inter. Sunflower Conference. Mar del Plata and Balcarce (Argentina), February 27 – March 1, 2012, Abstract. ISA, Paris, France, p. 48.
- Fernandez-Martinez, J. M., Perez-Vich, B. ve Velasco, L. (2015). Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower oilseed. *Chemistry, Production, Processing and Utilization*, eds E. Martinez-Force, N. T. Dunford, and J. J. Salas (Champaign, IL: AOCS Press) 129-156.
- Gagne, G., Roeckel-Drevet, P., Grezes-Besset, B., Shindrova, P., Ivanov, P., Grand-Ravel, C., Vear, F., Tourvielle de Labrouhe, D., Charmet, G. ve Nicolas, P. (1998). Study of the variability and evolution of *Orobanche cumana* populations infesting sunflower in different european countries. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 1216-1222.
- Gagne, G., Roeckel-Drevet, P., Grezes-Besset, B., Shindrova, P., Ivanov, P., Grand-Ravel, C., Vear, F., Charmet, G. ve Nicolas, P. (2000). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) as suitable markers to study *Orobanche cumana* genetic diversity. *Journal of Phytopathology*, 148, 457-459.
- Giray, H. ve Nemli, Y. (1983). İzmir ilinde *Orobanche*'nin doğal düşmanı olan *Phytomyza orobanchia* Kalt. (Diptera, Agromyzidae)'ın morfolojik karakterleri, kısaca biyolojisi ve etkinliği üzerinde araştırmalar. *Türkiye Bitki Koruma Dergisi*, 7, 183-192.

- Guchetl, S. Z., Antonova, T. S. ve Tchelustnikova, T. A. (2014a). Interpopulation genetic differentiation *Orobanche cumana* Wallr. from Russia, Kazakhstan and Romania using molecular genetic markers. *Helia*, 37(61), 181-191.
- Guchetl, S. Z., Antonova, T. S. ve Tchelustnikova, T. A. (2014b). Genetic similarity and differences between the *Orobanche cumana* Wallr. populations from Russia, Kazakhstan, and Romania revealed using the markers of simple sequence repeat. *Russian Agricultural Sciences*, 40(5), 326-330.
- Habimana, S., Nduwumuremyi, A. ve Chinama, R. J. D. (2014). Management of *Orobanche* in fieldcrops. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 14(1), 43-62.
- Hartl, D. L. ve Clark, A. G. (1989). Principles of population genetics. *Sinauer Ass. Inc., Sunderland* (2. Baskı). Sunderland: Massachusetts.
- Ivanovic, Z., Marisavljevic, D., Marinkovic, R., Mitrovic, P., Blagojevic, J., Nikolic, I. ve Pavlovic, D. (2021). Genetic diversity of *Orobanche cumana* populations in Serbia. *The Plant Pathology Journal*, 37(6), 512-520.
- Jan, C. C. ve Fernandez-Martinez, J. M. (2002). Interspecific hybridization, gene transfer, and the development of resistance to the broomrape race F in Spain. *Helia*, 25, 123-136.
- Jestin, C., Lecomte, V. ve Duroueix, F. (2014). "Current situation of sunflower broomrape in France," in Proceedings of the 3rd International Symposium on Broomrape (*Orobanche spp.*) in Sunflower. *International Sunflower Association*, 28-31.
- Kadioğlu, İ. (2009). Canavar otunun (*Orobanche spp.*) tanımı, zararları ve mücadelesi. *Türkiye Herboloji Dergisi*, 12(2), 1-6.
- Katzir, N., Portnoy, V., Tzuri, G., Castejon-Munoz, M. ve Joel, D. M. (1996). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the study of the parasitic weed *Orobanche*. *Theoretical and Applied Genetics*, 93, 367-372.
- Kaya, Y. (2003). Ayçiçeğinde orobanş ve mücadelesi. *Tarım İstanbul Dergisi*, 84, 26-28.
- Kaya, Y. (2014a). *The situation of broomrape infestation, control methods in the sunflower production area in Turkey*. In: Third International symposium on Broomrape (*Orobanche spp.*) in sunflower. Cordoba (Spain), 03 to 06 June 2014. Abstract, p. 10.
- Kaya, Y. (2014b). Currentsituation of sunflower broomrapearound the world. In: current situation of Sunflower Broomrapearoundthe world, Proceedings of the third international symposium on Broomrape (*Orobanche spp.*) in Sunflower, 3–6 June, Cordoba, Spain. Paris, France. *International Sunflower Association*, pp. 9-18.
- Kaya, Y., Demirci, M. ve Evci, G. (2004a). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding in Turkey for broomrape (*Orobanche cernua* Loeffl.) and herbicide resistance. *Helia*, 27, 199-210.
- Kaya, Y., Evci, G., Pekcan, V. ve Gucer T (2004b). Determining new broomrape-infested areas, resistant lines and hybrids in Trakya Region in Turkey. *Helia*, 27, 211-218.

- Malek, J., del Moral, L., Fernandez-Escobar, J., Perez-Vich, B. ve Velasco, L. (2017). Racial characterization and genetic diversity of sunflower broomrape populations from northern Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, 56, 70-76.
- Mammadov, J., Aggarwal, R., Buyyarapu, R. ve Kumpatla, S. (2012). SNP markers and their impact on plant breeding. *International Journal of Plant Genomics*, 10.1155/728398.
- Manen, J. F., Habashi, C., Jeanmonod, D., Park, J. M. ve Schneeweiss, G. M. (2004). Phylogeny and intraspecific variability of holoparasitic *Orobanche* (Orobanchaceae) inferred from plastid *rbcL* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 482-500.
- Martin-Sanz, A., Malek, J., Fernandez-Martinez, J. M., Perez-Vich, B. ve Velasco, L. (2016). Increased virulence in sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations from Southern Spain is associated with greater genetic diversity. *Frontiers Plant Science*, 7, 589.
- Melchinger, A. E. (1990). Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding*, 104(1), 1-19.
- Mendels, D. A., Evanno, N. M. P. ve Cuenat, A. (2005). Determination of the elastic properties of multilayered foils by the four-point micro-bending test. *Philosophical Magazine*, 1478-6435.
- Molinero-Ruiz, L., Delavault, P., Perez-Vich, B., Pacureanu-Joita, M., Bulos, M., Altieri, E. ve Dominguez, J. (2015). History of the structure of *Orobanche cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed: a review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13, 4.
- Molinero-Ruiz, L., Garcia-Carneros, A. B., Collado-Romero, M., Raranciuc, S., Dominguez, J. ve Melero-Vara, J. M. (2014). Pathogenic and molecular diversity in highly virulent populations of the parasitic weed *Orobanche cumana* (sunflower broomrape) from Europe. *Weed Research*, 54, 87-96.
- Nabloussi, A., Velasco, L. ve Assissel, N. (2018). First report of sunflower broomrape, *Orobanche cumana* Wallr in Morocco. *Plant Disease Resistance*, 102, 457.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University. 512 p.
- Özer, Z., Kadioğlu, İ., Önen, H. ve Tursun, N. (2001). *Herboloji (Yabancı Ot Bilimi)* (10th ed.). Gaziosmanpaşa Üniversitesi: Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Paran, I., Gidoni, D. ve Jacobsohn, R. (1997). Variation between and within broomrape (*Orobanche*) species revealed by RAPD markers. *Heredity*, 78, 68-74.
- Parker, C. (2009). Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. *Pest Management Science*, 65, 453-459.
- Peakall, R. ve Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.

- Pineda-Martos, R., Velasco, L., Escobar, J., Fernandez-Martinez, J. M. ve Perez-Vich, B. (2013). Genetic diversity of *Orobanche cumana* populations from Spain assessed using SSR markers. *Weed Research*, 53, 279-289.
- Pineda-Martos, R., Velasco, L. ve Perez-Vich, B. (2014a). Identification, characterization and discriminatory power of microsatellite markers in the parasitic weed *Orobanche cumana*. *Weed Research*, 54, 120-132.
- Pineda-Martos, R., Pujadas-Salva, A. J., Fernandez-Martinez, J. M., Stoyanov, K., Velasco, L. ve Perez-Vich, B. (2014b). The genetic structure of wild *Orobanche cumana* Wallr. (Orobanchaceae) populations in eastern Bulgaria reflects introgressions from weedy populations. *The Scientific World Journal*, 150432.
- Prasad, M. S. L., Sujatha, M., Alivelu, K. ve Sujatha, K. (2017). Sources of resistance to Alternaria leaf blight in sunflower pre-breeding lines derived from interspecific crosses and wild *Helianthus species*. *Crop Protection*, 92, 70-78.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. ve Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Reizelman-Lucascen, A. (2003). *Synthesis and Function of Germination Stimulants for Seed of Parasitic Weeds Striga and Orobanche spp.* (Doktora Tezi), Nijmegen University Organic Chemistry Department, Nijmen.
- Rodriguez-Ojeda, M. I., Pineda-Martos, R., Alonso, L. C., Fernandez-Escobar, J., Fernandez-Martinez, J. M. ve Perez-Vich, B. (2013). A dominant avirulence gene in *Orobanche cumana* triggers Or5 resistance in sunflower. *Weed Research*, 53, 322-327.
- Rodriguez-Ojeda, M. I., Velasco, L., Alonso, L. C., Fernandez-Escobar, J. ve Perez-Vich, B. (2011). Inheritance of the unpigmented plant trait in *Orobanche cumana*. *Weed Research*, 51, 151-156.
- Roman, B., Rubiales, D., Torres, A. M., Cubero, J. I. ve Satovic, Z. (2001). Genetic diversity in *Orobanche crenata* populations from Southern Spain. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 1108-1114.
- Roman, B., Satovic, Z., Rubiales, D., Torres, A. M., Cubero, J. I., Katzir, N. ve Joel, M. J. (2002). Variation among and within populations of the parasitic weed *Orobanche Crenata* from Spain and Israel revealed by inter simple sequence repeat markers. *Phytopathology*, 92, 1262-1266.
- Roman, B., Gonzalez Verdejo, C. I., Satovic, Z., Madrid, M. D., Cubero, J. I. ve Nadal, S. (2007). Detecting *Orobanche Species* by using cpDNA diagnostic markers. *Phytoparasitica*, 35(2), 129-135.
- Skoric, D., Joita-Pacureanu, M., Gorbachenkoa, F., Gorbachenko, O. ve Masirevic, S. (2021). Dynamics of change in broomrape populations (*Orobanche cumana* Wallr.) in Romania and Russia (Black Sea area). *Helia*, 44(74), 1-14.
- Sneath, P. H. A. ve Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. San Francisco: Freeman.

- Takagi, K., Okazawa, A., Wada, Y., Mongkolchaiyaphruek, A., Fukusaki, E., Yoneyama, K., Takeuchi, Y. ve Kobayashi, A. (2009). Unique phytochrome responses of the holoparasitic plant *Orobanche minor*. *New Phytologist*, 182(4), 965-74.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Türkiye İstatistik Kurumu (2020). (TUIK), Tarımsal İstatistikleri Özeti. Erişim adresi <http://www.tuik.gov.tr/> [Erişim tarihi: 07 Mayıs 2022]
- Vaz-Patto, M. C., Diaz-Ruiz, R., Satovic, Z., Roman, B., Pujadas-Salva, A. J. ve Rubiales, D. (2008). Genetic diversity of Moroccan populations of *Orobanche foetida*: evolving from parasitising wild hoststocrop plants. *Weed Research*, 48, 179-186.
- Verkleij, J. A. C., Janssen, J. ve Pieterse, A. H. (1986). *A Preliminary Study on Orobanche crenata and aegyptiaca from Syria*. In: Proceedings of a Workshop on the Biology and Control of Orobanche, Wageningen, the Netherlands, 154-159.
- Wolfe, A. D. ve Pamphilis, C. W. (1997). Alternate paths of evolution for the photosynthetic gene *rbcL* in four nonphotosynthetic species of *Orobanche*. *Plant Molecular Biology*, 33, 965-977.
- Yang, C., Fu, F., Zhang, N., Wang, J., Hu, L., Islam, F., Bai, Q., Yun, X. ve Zhou, W. (2020). Transcriptional profiling of under ground interaction of two contrasting sunflower cultivars with the root parasitic weed *Orobanche cumana*. *Plant Soil*, 450, 303-321.
- Ziadi, S., Çabuk Şahin, E., Aydın, Y., Evcı, G. ve Altınkut Uncuoğlu, A. (2018). Molecular assessment in estimation of race composition and genetic polymorphism in *Orobanche cumana* causal agent of sunflower broomrape. *Interciencia Journal*, 43(3), 301-324.