

**TRAKYA BÖLGESİNE AİT *Orobanche cumana*
Wallr. POPULASYONLARININ GENETİK
ÇEŞİTLİLİĞİNİN MOLEKÜLER
BELİRTEÇLER YARDIMI İLE BELİRLENMESİ**

Ahmet Kubilay BARUT

Yüksek Lisans Tezi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. B. Banu BİLGİN

2017

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TRAKYA BÖLGESİNE AİT *Orobanche cumana* Wallr. POPULASYONLARININ
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN MOLEKÜLER BELİRTEÇLER YARDIMI İLE
BELİRLENMESİ**

Ahmet Kubilay BARUT

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGEN

TEKİRDAĞ-2017

Her hakkı saklıdır.

Bu tez çalışması Namık Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **NKUBAP.03.GA.16.029** numaralı proje ile desteklenmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGEN danışmanlığında, Ahmet Kubilay BARUT tarafından hazırlanan “Trakya Bölgesine ait *Orobanche cumana* Wallr. Populasyonlarının Genetik Çeşitliliğinin Moleküler Belirteçler Yardımı ile Belirlenmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Yalçın KAYA

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGEN (Danışman)

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Sefer DEMİRBAŞ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TRAKYA BÖLGESİNE AİT *Orobanche cumana* Wallr. POPULASYONLARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN MOLEKÜLER BELİRTEÇLER YARDIMI İLE BELİRLENMESİ

Ahmet Kubilay BARUT

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN

Orobanche cumana Wallr. (orobanş, canavar otu), ayçiçeği yetiştiriciliği yapılan tarım arazilerinde, ayçiçeği çeşidine ve bulaşıklık seviyesine bağlı olarak ileri düzeyde verim kayıplarına neden olabilen parazit bir bitkidir. Çok sayıda ve küçük boyutlardaki orobanş tohumları ayçiçeği tarlalarında hızlı bir şekilde kontaminasyona (bulaşıklığa) neden olmaktadır. Ülkemizde yayılış gösteren *O. cumana* bitkisinin genetik çeşitliliği hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Trakya Bölgesinden (Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ) örneklenen 6 *O. cumana* popülasyonunun 8 nSSR primeri kullanılarak genetik yapısı ve genetik çeşitliliği belirlendi. Çalışmada kullanılan 8 nSSR lokusunun (Ocum-52, Ocum-70, Ocum-81, Ocum-87, Ocum-108, Ocum-141, Ocum-160 ve Ocum-196) hepsi polimorfik olarak saptandı. Analiz edilen 120 örnekte sekiz lokus için toplam 23 allel bulundu. Genetik çeşitlilik parametrelerinden; lokus başına düşen ortalama allel sayısı ($N_a=2,271$), etkili allel sayısı ($N_e=1,667$), Shannon sabiti ($I=0,547$), gözlenen heterozigotluk ($H_o=0,207$) ve beklenen heterozigotluk ($H_e=0,340$) değerleri hesaplandı. Popülasyonların genetik çeşitliliğinin büyük oranda (%66) popülasyon içerisinde olduğu, popülasyonlar arası çeşitliliğin düşük olduğu (%34) gözlemlendi. Çalışma sonucunda elde edilen UPGMA dendrogramına göre, popülasyonlar iki grup altında değerlendirildi. I. Grupta Babaeski/Kırklareli-2013, Avarız/Edirne-2011, Avarız/Edirne-2012 ve Lüleburgaz/Kırklareli-2013 popülasyonları yer alırken, 2. Grupta Muratlı/Tekirdağ-2012 and Muratlı/Tekirdağ-2013 yer aldı. Elde edilen sonuçlar, çalışılan popülasyonların genetik yapısı hakkında önemli bilgiler içermekte ve diğer *O. cumana* popülasyonlarında yapılacak olan genetik karakterizasyon ve çeşitlilik çalışmalarına katkı sağlayacak niteliktedir.

Anahtar kelimeler: ayçiçeği, canavar otu, genetik çeşitlilik, moleküler belirteçler, nSSR, *Orobanche cumana*

2017, 58 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY IN POPULATIONS OF *Orobanche cumana* Wallr. IN THRACE REGION OF TURKEY

Ahmet Kubilay BARUT

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Behiye Banu BİLGEN

Orobanche cumana Wallr. (broomrape) is a parasitic plant that can lead to advanced losses in yield, in agricultural lands cultivating sunflower, depending on the sunflower varieties and the level of contamination. The numerous and small sized seeds of broomrape causes contamination in sunflower fields quickly. There was not enough knowledge about genetic diversity of *O. cumana* populations in our country in the literature. In this study, genetic structure and genetic diversity of six *O. cumana* populations from Thrace region of Turkey (Edirne, Kırklareli and Tekirdağ) was determined with the help of 8 nSSR loci. Eight nSSR (Ocum-52, Ocum-70, Ocum-81, Ocum-87, Ocum-108, Ocum-141, Ocum-160 and Ocum-196) loci were analyzed and all loci were found to be polymorphic. A total of 23 alleles were determined for the analyzed eight loci in 120 samples. Allele number of each SSR loci ranged from two to six. Genetic diversity parameters; mean number of alleles for each loci ($N_a=2.271$), effective allele number ($N_e=1.667$), Shannon's information index ($I=0.547$), observed heterozygosity ($H_o=0.207$) and expected heterozygosity ($H_e=0.340$) were calculated. Rather high proportion of the genetic diversity (66%) was due to within population variation and the remaining part (34%) was due to variation between populations. According to acquired UPGMA dendrogram, there was two main clusters. Cluster I was classified into three groups contains four populations (Babaeski/Kırklareli/2013, Avarız/Edirne/2011, Avarız/Edirne/2012, Lüleburgaz/Kırklareli/2013). Muratlı/Tekirdağ/2012 and Muratlı/Tekirdağ/2013 populations were in cluster II. The information obtained from this study is valuable to provide significant contribution to other works towards determining the genetic structure and genetic diversity of *O. cumana*.

Keywords: broomrape, genetic diversity, molecular markers, nSSR, *Orobanche cumana*, sunflower

2016, 58 pages

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 <i>Orobanche</i> spp. (Canavar otu türleri).....	3
2.2 Canavar Otu Bitkisinin Biyolojisi	4
2.3 Canavar Otu Bitkisinin Yaşam Döngüsü	5
2.4 Canavar Otu Türlerinin Zarar Şekli ve Oluşturdukları Verim Kayıpları	8
2.5 Canavar Otu Mücadelesi	9
2.6 Canavar Otunun Ayçiçeğinde Meydana Getirdiği Zararlar ve Türkiye'deki Durumu .	11
2.7 Mikrosatellitler (Basit Dizi Tekrarları) ve Kullanım Alanları.....	13
2.8 Canavar Otu Türleri ile İlgili Yapılmış Genetik Çalışmalar	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1 <i>Orobanche cumana</i> Populasyonları.....	17
3.2 Ayçiçeği ve <i>O. cumana</i> Populasyonlarına ait Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	17
3.3 DNA İzolasyonu	20
3.4 İzole Edilen DNA Örneklerinde Miktar ve Kalite Tayini	22
3.5 Nükleer Mikrosatellit (nSSR) Primerlerinin Belirlenmesi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri ve Elektroforez	23
3.6 Verilerin İstatistiksel Analizi.....	30
4. BULGULAR	31
4.1 Nükleer Mikrosatellit (nSSR) Primerlerine ait Allellerin Belirlenmesi	31
4.2 Gen Frekansları ve Genetik Çeşitlilik	36
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	41
6. KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Tarım alanlarında verim kayıplarına neden olan canavar otu türleri ve konukçu olduğu bitkiler	4
Çizelge 2.2. Dünyadaki farklı ülkelerde bulunan <i>Orobanche cumana</i> ırkları	13
Çizelge 3.1. Çalışılan <i>O. cumana</i> populasyonlarına ait lokasyon bilgileri.....	17
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılmak üzere belirlenen nSSR primerlerine ait bilgiler	24
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilmiş PCR koşulları....	25
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilen PCR döngüleri	25
Çizelge 4.1. Çalışmada analiz edilen sekiz (8) nSSR lokusuna ait allellerin altı (6) orobanş populasyonundaki frekansları	32
Çizelge 4.2. Çalışılan altı orobanş populasyonuna ait genetik çeşitlilik parametreleri.....	37
Çizelge 4.3. Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları	39
Çizelge 4.4. <i>O. cumana</i> populasyonları arasında Nei (1987)'ye göre hesaplanan genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Orobanch</i> türlerine ait tohumlar	5
Şekil 2.2. Canavar otu tohumlarının çimlenerek, toprak altındaki konukçu bitkinin köklerine tutunması.....	7
Şekil 2.3. Bitki köklerinden salgılanan strigolaktonlar ve orobanşın köke tutunması	7
Şekil 2.4. <i>Orobanch cumana</i> bitkisinin yaşam döngüsü	8
Şekil 3.1. Ayçiçeği ve <i>O. cumana</i> populasyonlarına ait bitkilerin yetiştirilmesi için torf, perlit ve canavar otu tohumları karıştırılarak hazırlanmış saksılar.....	18
Şekil 3.2. Ayçiçeği tohumlarının çimlendirilmesi ve saksılara ekimi.....	18
Şekil 3.3. Ayçiçeği ve <i>O. cumana</i> populasyonlarına ait bitkilerinin kontrollü koşullarda yetiştirilmesi.....	19
Şekil 3.4. Her bir populasyona ait yetiştirilen orobanş bitkilerinin muhafazası.....	19
Şekil 3.5. DNA izolasyonu öncesinde orobanş örneklerinin küçük parçalara ayrılması	20
Şekil 3.6. Orobanş örneklerinin Retsch® MM400 model vibrasyonlu öğütücü ile homojenizasyonu	21
Şekil 3.7. DNA'nın isopropanol ile çöktürülmesi ve DNA pelletinin kurutulması	22
Şekil 3.8. Orobanş populasyonlarına ait izole edilen bazı DNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri	23
Şekil 3.9. Thermal Cycler cihazlarında DNA amplifikasyonları ve Elektroforez	26
Şekil 3.10. <i>O. cumana</i> populasyonlarına ait bazı örneklerin PCR ürünlerinin UV ışık altındaki jel görüntüsü.....	26
Şekil 3.11. OCUM-70 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	27
Şekil 3.12. OCUM-87 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	27
Şekil 3.13. OCUM-108 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	28
Şekil 3.14. OCUM-141 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	28
Şekil 3.15. OCUM-160 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	29
Şekil 3.16. OCUM-196 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	29
Şekil 4.1. Çalışmada analiz edilen polimorfik nSSR lokuslarının her birindeki allellerin, allel büyüklüklerine göre çalışılan populasyonlardaki frekans dağılımları	34
Şekil 4.2. nSSR lokuslarına ait allellerin altı orobanş populasyonunda frekans dağılımları	36

Şekil 4.3. *O. cumana* populasyonlarının nSSR analizleri sonucunda genetik mesafe değerlerine göre oluşturdukları dendrogram (UPGMA'ya göre) 40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

A	: Adenin nükleotidi
C	: Sitozin nükleotidi
cm	: Santimetre
da	: Dekar
dk	: Dakika
f	: Frekans
g	: Gram
G	: Guanin nükleotidi
kg	: Kilogram
M	: Molarite
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
n	: Tekrar sayısı
ng	: Nanogram
pmol	: Picomol
rpm	: Rounds per minute (Dakikadaki devir sayısı)
T	: Timin nükleotidi
U	: Ünite (Enzim birimi)
Volt	: Voltaj
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
±	: Standart hata

Kısaltmalar

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Artırılmış Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi)
AMOVA	: Analysis of Molecular Variance (Moleküler Varyans Analizi)
ark.	: arkadaşları
bç	: Base pair (Baz çifti)
cpDNA	: Kloroplast DNA'sı
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
<i>Helianthus annuus</i>	: Ayçiçeği
H _e	: Beklenen heterozigotluk değeri
H _o	: Gözlenen heterozigotluk değeri
I	: Shannon sabiti
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat (kısa dizi tekrarları arası)
L.	: Linnee
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mRNA	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
N	: Örnek sayısı
N _a	: Gözlenen allel sayısı
N _e	: Etkili allel sayısı
N _m	: Populasyon çiftleri arasındaki gen akımı
NaCl	: Sodyum klorür
NKÜ	: Namık Kemal Üniversitesi
nSSR	: Nuclear Simple Sequence Repeats (Nükleer Basit Dizi Tekrarları)
<i>Orobancha</i> spp.	: Canavar otları
<i>O. cumana</i>	: <i>Orobancha cumana</i> (Boğumlu canavar otu)
<i>O. cernua</i>	: <i>Orobancha cernua</i> (Boğumlu canavar otu)
<i>O. crenata</i>	: <i>Orobancha crenata</i> (Beyaz Çiçekli Canavar Otu)
<i>O. ramosa</i>	: <i>Orobancha ramosa</i> (Mavi Çiçekli Canavar Otu)

<i>O. aegyptica</i>	: <i>Orobancha aegyptica</i> (Mısırlı Canavar Otu)
<i>P. ramosa</i>	: <i>Phelipanche ramosa</i>
<i>P. aegyptica</i>	: <i>Phelipanche aegyptica</i>
PCR	: Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PIC	: Polymorphic Information Content (Polimorfik Bilgi İçeriği)
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA (Rastgele Artırılmış Polimorfik DNA)
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş fragmentlerin uzunluk polimorfizmi)
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RNase	: Ribonükleaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
spp	: Species (Türler)
SSR	: Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
STR	: Short Tandem Repeats (Kısa Bitişik Tekrarlar)
T.C.	: Türkiye Cumhuriyeti
TBE	: Tris-Borat-EDTA tamponu
TE Tamponu	: Tris-EDTA tamponu
T_M	: DNA'nın erime sıcaklığı
TTAE	: Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü
TÜBİTAK	: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UV	: Ultraviyole ışığı
vb.	: Ve benzeri

ÖNSÖZ

Son yıllarda dünya nüfusunun hızla artmasına paralel olarak bitkisel üretimin yapıldığı alanlar da giderek daralmaktadır. Bunun yanı sıra kültür bitkileri üretiminin yapıldığı alanlarda bulunması istenmeyen ve faydadan çok zararı olan bitkilerin de bulunması dünya nüfusunun gıda ihtiyacının karşılanmasında yetersizlikler doğurmaktadır. Kültür bitkileri yetiştiriciliğinde ışık, su ve besin maddesi açısından kültür bitkileri ile rekabete giren yabancı otlar, kültür bitkilerinin etkinliklerini azaltarak büyük oranlarda verim ve kalite kayıpları neden olmaktadır. Canavar otu, ıslah edilen ayçiçeği çeşitlerine karşı sürekli yeni bir ırk geliştirdiği için ıslahçıların en büyük uğraşı canavar otuna karşı dayanıklı çeşit geliştirmek olmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalar sonucunda sadece tek başına hiç bir mücadele yönteminin canavar otunu kontrol altına almadığı belirlenmiştir.

Orobanche cumana Wallr. (orobanş, verem otu, canavar otu) parazit bitkisi, ayçiçeği çeşidine ve verdiği zarar seviyesine bağlı olarak ayçiçeği yetiştiriciliği yapılan tarım alanlarında, toprakta uzun yıllar kalabilmesi, küçük boyutlarda binlerce tohum oluşturması gibi özellikleriyle ileri düzeyde verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır. Bu verim kayıplarının önüne geçebilmek için canavar otlarıyla en uygun mücadele şeklini bilmek ve bunu en uygun zamanda uygulamak, gerektiğinde de birkaç mücadele yöntemini entegre etmek gerekmektedir. Canavar otlarının sorun olduğu her kültür bitkisinde etkili ve ekonomik mücadele yönteminin olmaması nedeniyle öncelikle canavar otu ile bulaşık alanlardan temiz alanlara canavar otlarının bulaşması önlenmelidir. Tarım alanlarındaki başlıca zararlılardan olan canavar otları ile mücadele edebilmek için öncelikle onları iyi tanıyor olmalıyız. Bizim de canavar otu ile mücadele edebilmemiz için öncelikle canavar otunun genetik açıdan karakterizasyonunu yapmamız gerekmektedir.

Ülkemizde yayılış gösteren *O. cumana* bitkisinin genetik çeşitliliği hakkında yeterli bilgi literatürde yer almamaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada ise, genetik karakterizasyonu belirlemede izlenebilecek en etkili ve kullanışlı yöntemlerden biri olan nükleer mikrosatellit belirteçleri (nSSR) ile türün Trakya bölgesinden (Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ) örneklenen 6 popülasyona ait 120 birey kullanılarak genetik çeşitliliği ortaya konulmuştur. Çalışılan 120 bireyin her biri için çiçeklenmeden önce toplanın taze dokulardan DNA izole edilmiş ve nükleer mikrosatellit belirteçleri (nSSR) kullanılarak yapılan PCR analizleri sonucunda elde edilen lokuslar ve alleller belirlenerek genotipleme yapılmıştır. Bu çalışmada elde edilen veriler çalışılan popülasyonların genetik yapısı hakkında önemli bilgiler içermekte ve diğer *O. cumana*

populasyonlarında yapılacak olan genetik karakterizasyon ve çeşitlilik çalışmalarına katkı sağlayacak niteliktedir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, iki yıl boyunca değerli bilgilerini bizlerle paylaşan saygıdeğer Namık Kemal Üniversitesi (NKU), Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü hocalarıma, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer akademik danışmanım Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN'e (NKÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü) minnetlerimi sunarım. Ayrıca tezin son şeklini almasıyla yapıcı eleştirileri ve önerileriyle değerli katkılarını esirgemeyen Tez Savunma Sınav Jüri Üyeleri Prof. Dr. Yalçın KAYA'ya (Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü) ve Yrd. Doç. Dr. Sefer DEMİRBAŞ'a (NKÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Araştırma Görevlisi Ceren ELİBOL (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü) ve Selman ÖZKAN'a, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2017

Ahmet Kubilay BARUT

1. GİRİŞ

Yabancı otlar, çeşitli ekosistemlere uyum sağlayabilme kabiliyetlerinden dolayı tarım alanlarında yüksek düzeyde verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır. Sahip oldukları parazitik etkiler sayesinde kültür bitkilerini etkilemekte, çeşitli hastalık ve zararlılara konukçuluk yapmaktadırlar. Bunun yanısıra yabancı ot mücadelesi için yapılan çalışmalar nedeniyle zaman ve kaynaklar israf edilmekte, insan ve çevre sağlığı için negatif etkiler oluşturmaktadır (Özer ve ark. 2001, Güncan 2009).

İnsanların istemediği tarla/bahçe vb. alanlarda yetişen ve diğer canlılara özellikle de bitkilere zararı yararından fazla olan bitkilere yabancı ot denir. Parazit bitkiler, farklı kültür bitkilerinde ortalama olarak %30-70 oranında zarar meydana getirmektedir. Mercimek, ayçiçeği, tütün ve domatesle birlikte diğer birçok bitkide canavar otu kaynaklı önemli ölçüde verim ve kalite kayıpları oluşmaktadır (Aksoy ve ark. 2006).

Tarım tekniklerinin dünyada ve ülkemizde hızlı bir şekilde gelişmesi ile çeşitli nedenlerle yeni kimyasalların ortaya çıkması sonucu tarım alanlarında gözlenen yabancı ot popülasyonlarında devamlı değişiklikler oluşmaktadır. Bu değişimlerin sonucunda normalde ekonomik zarara neden olmayan türler, belirli dönemlerde daha büyük problemlere neden olabilecek hal almaktadır (Eşitmez ve Işık 2016).

Orobanch spp. zorunlu kök paraziti olduğu için tüm besin ihtiyacını konukçusundan temin eder. Canavar otu toprak altında geçirdiği sürede konukçusu olan kültür bitkisinden su ve besin maddelerini alarak gelişmesini sürdürür ve toprak yüzeyine çıktığında, konukçu bitkide canavar otunun verdiği zarar gözle görülebilecek boyuta gelmiş olur. Kültür bitkisinde ki canavar otundan dolayı meydana gelen büyük zarar, canavar otu sürgünleri toprak yüzeyinde görülmeden önce gerçekleşir. Kültür bitkisi susuz kalmış gibi sararıp solabilir, diğer bitkilere göre gelişmesi geri kalır, verimi düşer, çok ağır bulaşmalarda kültür bitkisi çok zayıf düşerek ölebilir. Özellikle su stresinde olan parazitlenmiş bir konukçu bitkide solgunluk erken dönemde görülmeye başlar. Canavar otundan dolayı oluşan zarar sınırlı besin ve su olan ortamlarda daha da ağır olur. Canavar otları konukçu bitkideki verim kaybının yanı sıra tütün ve ayçiçeğinde olduğu gibi kalitenin de düşmesine neden olabilir (Reizelman-Lucascen 2003).

Canavar otlarının kültür bitkilerinde oluşturdukları verim kaybı, bu parazit yabancı otun kültür bitkisine tutunma zamanına ve yoğunluğuna göre değişebilir. Yapılan çalışmalarda bu zararın %5-100 arasında değiştiği bildirilmektedir (Linke ve ark. 1989, Press ve Graves 1995, Press ve Phoenix 2005, Joel ve ark. 2007, Gibot-Leclerc ve ark. 2008). Canavar otu nedeniyle meydana gelen verim kaybı ile ilgili yapılan çalışmalarda; tütünde %33 (Emiroğlu

ve ark. 1987), baklada %66-83 (Abbes ve ark. 2008), ayçiçeğinde %80'nin üstünde (Louarn ve ark. 2016), havuçta %50 (Bernhard ve ark. 1998), domateste ise Türkiye'de %10-40 (Aksoy ve Uygur 2008) olarak verim kayıpları olduğu bildirilmiştir.

Canavar otları dünyanın farklı bölgelerinde farklı kültür bitkilerinde önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu verim kayıplarının önüne geçebilmek için canavar otlarıyla en uygun mücadele şeklini bilmek ve bunu en uygun zamanda uygulamak, gerektiğinde de birkaç mücadele yöntemini entegre etmek gerekmektedir. Canavar otlarının sorun olduğu her kültür bitkisinde etkili ve ekonomik mücadele yönteminin olmaması nedeniyle öncelikle canavar otu ile bulaşık alanlardan temiz alanlara canavar otlarının bulaşması önlenmelidir. Tarım alanlarındaki başlıca düşmanlarımızdan olan canavar otları ile mücadele edebilmek için öncelikle onların genetik yapılarını iyi bilmemiz gerekmektedir.

Yapılan literatür taraması sonucunda ülkemizde orobanş türlerinde yapılmış moleküler çalışmanın tam olarak mevcut olmadığı, sadece yabancı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ülkemizin bazı bölgelerindeki *O. cumana* populasyonlarından örnekler alınarak çalışmalarına dahil edildiği görülmüştür. Bu bağlamda; tez çalışması kapsamında Trakya Bölgesinden (Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ) örneklenen 6 orobanş populasyonunun nükleer mikrosatellit belirteçleri (nSSR) kullanılarak genetik yapısının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasında;

1. Altı farklı *O. cumana* populasyonunun ilgili nükleer mikrosatellit lokusları (nSSR) açısından genetik yapılarının ortaya konulması,
2. Çalışılan populasyonların genetik parametrelerinin tahmin edilmesi ile genetik çeşitlilik düzeylerinin belirlenmesi,
3. Çalışılan populasyonların nSSR belirteçleriyle belirlenen genetik çeşitlilik düzeylerinin literatürde mevcut olan diğer çalışmalarla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Orobanche* spp. (Canavar otu türleri)

Orobanche, çoğunlukla ılıman Kuzey Yarımküre'ye özgü *Orobanchaceae* familyasında yer alan 200'den fazla parazitik otsu bitki türünü içeren cinsdir. Akdeniz bölgesi *Orobanche* türlerinin gen merkezlerinden biri olarak bilinmektedir. *Orobanche* türleri özellikle Akdeniz ikliminin hakim olduğu ılıman iklimlerden yarı kurak tropiklere kadar dünya çapında yayılış göstermektedir (Musselman 1994, Elzein ve Kroschel 2003). Canavar otları (*Orobanche* spp. ve *Phelipanche* spp.) *Orobanchaceae* familyası içinde yer alan, tamamen klorofilden yoksun geniş bir konukçu dizisine sahip, tam bağımlı (obligat) kök paraziti bitkilerdir. Bu türler arasından dört tanesi tarım alanlarında önemli sorun oluşturmaktadır (Parker ve Riches 1993). *O. crenata* genellikle Akdeniz bölgesi, Orta doğu ve doğu Afrika'da yayılış gösterirken, diğer canavar otu türleri daha geniş bir yayılışa sahiptir (Elzein ve Kroschel 2003). Ülkemizde de bu cinse ait 39 tür bulunmaktadır (Davis ve ark. 1988, Zare ve Dönmez 2013). Dünya çapında yayılış gösteren bu bitkiler dört seksiyon altında bulunmaktadır. Bu seksiyonlar;

sect. *Orobanche* (sect. *Osproleon* Wallr.),

sect. *Trionychon* Wallr. (Eski Dünya Canavar Otları),

sect. *Gymnocaulis* Nutt.,

sect. *Myzorrhiza* (Philippi) Beck. (Yeni Dünya Canavar Otları) seksiyonlarıdır.

Canavar otu bitkileri son yıllara kadar yapılan taksonomik çalışmalarda, yalnızca *Orobanche* cinsi altında toplanmaktaydı. Taksonomik karakter ve gelişen filogenetik analiz teknikleriyle *rbcL* ve *rps2* sekanslarının kullanılması, eski dünya canavar otu bitkilerinin *Orobanche* ve *Phelipanche* olarak iki cins altında isimlendirilmesine neden olmuştur. *Phelipanche* ismi ilk olarak *Phelipanche ramosa* türünde 1821-1898 yılları arasında kullanılmıştır. Daha sonraları yapılan moleküler çalışmalar ile bu türlerin isimleri yeniden düzenlenmiştir. Buna göre; *Orobanche ramosa* ve *O. aegyptiaca*, *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel ve *P. aegyptiaca* (Pers.) Pomel şeklinde düzenlenirken, *O. crenata* Forsk., *O. cernua* Loefl., *O. cumana* Wallr., *O. minor* Smith ve *O. foetida* Poir. bitkilerinin isimlerinde herhangi bir değişim olmamıştır (Joel 2009). Tarım alanlarında ekonomik kayıplara neden olan ana biyotik faktörlerden *P. ramosa*, *P. aegyptiaca*, *O. cumana*, *O. cernua*, *O. crenata*, *O. minor* ve *O. foetida* bitkileri ve konukçu bitkilerine örnekler Çizelge 2.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Tarım alanlarında verim kayıplarına neden olan canavar otu türleri ve konukçu olduğu bitkiler

Canavar otu türü	Konukçu bitkiler	Kaynakça
<i>O. cumana</i> ve <i>O. cernua</i>	<i>Helianthus annuus</i> (ayçiçeği) <i>Lycopersicon esculentum</i> (domates) <i>Nicotiana tabacum</i> (tütün) <i>Solanum melongena</i> (patlıcan)	Elzein ve Kroschel 2003 Labrousse ve ark. 2004 Bülbül ve ark. 2009 Fernandez-Aparicio ve ark. 2009 Parker 2009
<i>O. crenata</i>	<i>Vicia faba</i> (bakla) <i>Pisum sativum</i> (bezelye) <i>Lens culinaris</i> (mercimek) <i>Cicer arietinum</i> (nohut) <i>Daucus carota</i> (havuç)	Eizenberg ver ark. 2001 Elzein ve Kroschel 2003 Bülbül ve ark. 2009 Fernandez-Aparicio ve ark. 2009 Parker 2009 Bouhadida ve ark. 2015
<i>P. ramosa</i> ve <i>P. aegyptiaca</i>	<i>L. esculentum</i> (domates) <i>N. tabacum</i> (tütün) <i>Cannabis sativa</i> (kenevir) <i>S. melongena</i> (patlıcan) <i>S. tuberosum</i> (patates) <i>L. culinaris</i> (mercimek) <i>Brassica oleracea</i> (karnabahar) <i>B. juncea</i> (hardal) <i>B. napus</i> (kanola) <i>D. carota</i> (havuç)	Eizenberg ver ark. 2001 Elzein ve Kroschel 2003 Bülbül ve ark. 2009 Fernandez-Aparicio ve ark. 2009 Parker 2009
<i>O. minor</i>	<i>Medicago sativa</i> (yonca) <i>Trifolium</i> spp. (üçgül) <i>Lotus corniculatus</i> (gazel boynuzu) <i>D. carota</i> (havuç)	Fernandez-Aparicio ve ark. 2009 Parker 2009 Thorogood ve ark. 2009
<i>O. foetida</i>	<i>V. faba</i> (bakla) <i>L. culinaris</i> (mercimek) <i>C. arietinum</i> (nohut) <i>Lotus</i> sp.	Fernandez-Aparicio ve ark. 2009 Parker 2009

2.2 Canavar Otu Bitkisinin Biyolojisi

Canavar otları tek yıllık olup tohumla çoğalır ve bitkiler âleminde bilinen en küçük tohumlu bitkilerdendir (Aksoy ve Pekcan 2014). Tohumların ağırlıkları 0,004-0,009 mg arasında olup, oval biçimde ve yaklaşık olarak 0,3 x 0,2 mm büyüklüğündedir (Saghir 1986). *Orobanch* cinsine ait türler yapraktan yoksundur (Pamphilis ve Palmer 1990). Canavar otunun her bir çiçeği bir meyveyi oluşturur ve bu meyveye kapsül adı verilir. Meyvesi 0,5-2 cm'lik kapsül şeklindedir ve her kapsülde yaklaşık 600-5000 tohum bulunur (Şekil 2.1). Her bitki ise yaklaşık 40-100 kapsül oluşturur. Böylece tek orobanş bitkisi 500000'den fazla tohum üretmiş

olur (Habimana ve ark. 2014). Tohumlar ise toprakta 20 yıla kadar canlı olarak kalabilmektedir (Pathak ve Kannan 2014). *Orobanche* tohumlarının optimum çimlenme sıcaklığı 20-25°C'dir (Saghir 1986, Linke ve ark. 1989). Canavar otunun çimlenip, toprak yüzeyine çıkışına kadar olan süre 30-60 gündür (Linke ve ark. 1989). Toprak yüzeyine çıkan sürgünler çok kısa sürede çiçeklenir ve sürgün gelişimi hızlanır. Canavar otu bitkisinin kuru ağırlığının %88'i çiçeklenmeden önce oluşmuştur. Tarlalarda oluşan tohumlar bir sonraki sene tekrar *Orobanche* etkisi altında kalınmasına neden olur (Elzein ve Kroschel 2003).



Şekil 2.1. *Orobanche* türlerine ait tohumlar

(http://itp.lucidcentral.org/id/fnw/key/FNW_Seeds/Media/Html/fact_sheets/Orobanche.htm)

(<http://www.parasiticplants.siu.edu/Scrophulariaceae/Orobanche.Gallery.html>)

2.3 Canavar Otu Bitkisinin Yaşam Döngüsü

Orobanche ve *Phelipanche* türleri ile *Striga* türlerinin dünyada birçok ülkede sorunlara neden olduğu, konukçu bitkide büyük oranda verim ve kalitede düşüşüne neden olduğu ve özellikle *Orobanchaceae* familyasına ait olan parazit bitkilerin yabancı ot türleri içerisinde en çok zarar veren parazit bitki türleri olduğu bilinmektedir (Westwood ve ark. 2012). *Striga*, *Alectra*, *Orobanche* ve *Phelipanche* gibi kök paraziti olan angiosperm bitkiler, konukçu bitkilerinde yıkıcı etki göstermektedirler. Tüm bu kök paraziti bitkilerin tohumları çimlenebilmek için kimyasal uyarıcılara ihtiyaç duyarlar. Bu uyarıcı kimyasallar, konukçu veya konukçu olmayan bitkiler tarafından salgılanarak toprağa bırakılmaktadır (Reizelman-Lucascen 2003). Eğer parazit bitkiye ait tohumun bulunduğu ortamda konukçu bitkinin kökünden salınan uyarıcılar bulunmadığı zaman ise bu tohumlar 10 yıldan daha fazla sürede canlılığını yitirmeden toprakta kalabilmektedir (Linke ve ark. 1989). Zorunlu kök paraziti olan bu yabancı otlar yaşam döngüsünün büyük bölümünü toprak altında geçirmektedirler (Eizenberg ve ark. 2012). *Orobanche* ve *Phelipanche* (canavar otu) cinsi parazit bitkiler,

haustoryum (emeç) adı verilen çok hücreli özel organları vasıtasıyla dikotil konukçusundan kendisi için gerekli olan su ve besin maddelerini alırlar. Bu birliktelik sayesinde hormonlar, toksinler, mRNA ve genler gibi birçok madde iletim sisteminde rahatlıkla iki yönlü olarak hareket edebilmektedir (Perez-de-Luque ve ark. 2007, Westwood ve ark. 2012). Emeç hücrelerinin konukçu dokusunun (ksilem ve/veya floem) içine girmesi (penetrasyon), konukçu endodermis hücreleri üzerindeki mekanik baskı ve hidrolitik enzimler sayesinde gerçekleşmektedir (Elzein ve Kroschel 2003). Tam parazit olup yaprakları bulunmayan bu bitkiler, tamamıyla kendi konukçularına bağlı olarak yaşarlar. Fotosentetik olmayan tam parazit bitkilerde, fotosentezle ilgili olan genler ya inaktiftir ya da plastid genomlarından elimine olmuştur. Bu yüzden plastidler, kloroplastları oluşturamaz ve bitkiler ışığı asla fotosentez için kullanamazlar (Okazawa ve ark. 2005).

Orobanchaceae familyasına ait kök parazitlerinin yaşamlarında 2 ana safha bulunmaktadır: *bağımsız safha* ve *parazitik safha*. Bağımsız safha, toprak altında 15-20 yıl boyunca çimlenmeden kalan tohumların su alması, şişmesi ve çimlenmesiyle başlar ve konukçusunun köklerini bulup yapışmasına kadar devam eder. Bu yaşam safhası tohumlarda depo halinde bulunan yağlar sayesinde desteklenmektedir. Parazitik safhada ise, parazit tarafından konukçudan besinler alınır ve emeçler konukçu köklerini kısa bir sürede istila etmeye başlar (Nun ve ark. 2003, Zehhar ve ark. 2003, Joel ve ark. 2007) (Şekil 2.2). Bu yapışma işlemi, hem mekanik hem de enzimatik ve/veya konukçu hücre duvarı tarafından salınan enzimler (selülaz, hemiselülazlar, pektin metilesteraz, peroksidaz ve proteazlar) sayesinde gerçekleşmektedir (Şekil 2.3). Kurulan bu bağlantı sayesinde parazit bitki büyümeye başlamaktadır. Belirtilen enzimler sayesinde konukçu hücre duvarı ve özellikle orta lamel kırılabilir. Böylelikle parazitin konukçu kökündeki ilerleyişi de kolaylaşmış olur (Veronesi ve ark. 2007). Parazit bitkiler için belirtilen bu 2 ana safha yedi alt evre de özetlenebilir (Joel ve ark. 2007, Duca ve ark. 2013);

A: Tohumun çimlenmesi,

B: Emeç gelişimi ve canavar otunun konukçusuna yapışması,

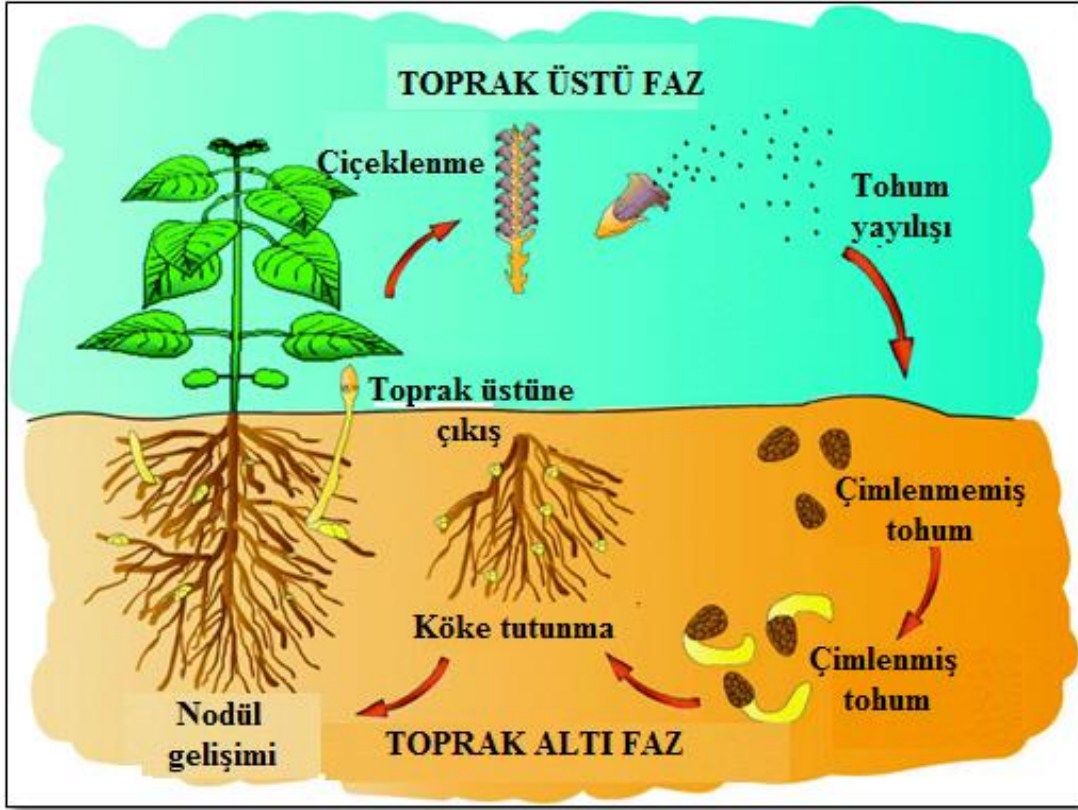
C: Nodül oluşumu,

D: Nodüllerin farklılaşması sonucu tüber oluşumu ve tüberlerin üzerinden birçok kök benzeri yapıların oluşması, toprak altında gövdenin gelişmesi,

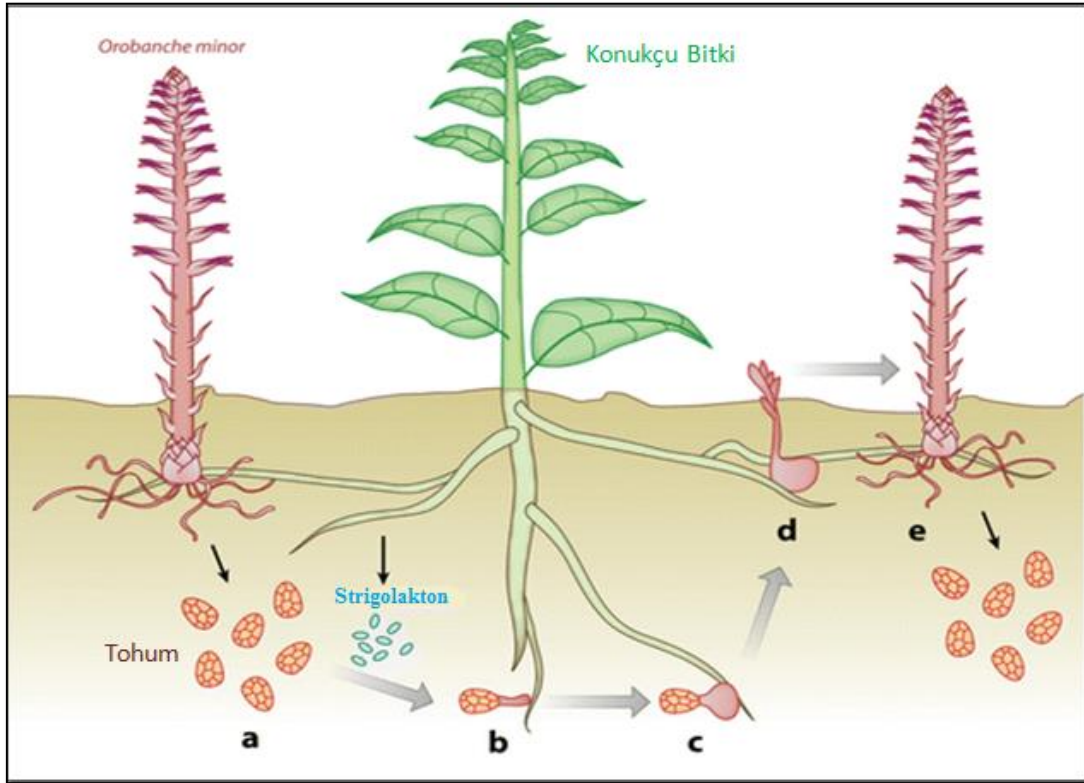
E: Konukçuya bağlı olarak değişen canavar otunun toprak üstüne çıkıp, çiçek açması,

F: Çiçeklerin kısa sürede tohum bağlaması ve tohumların olgunlaşması,

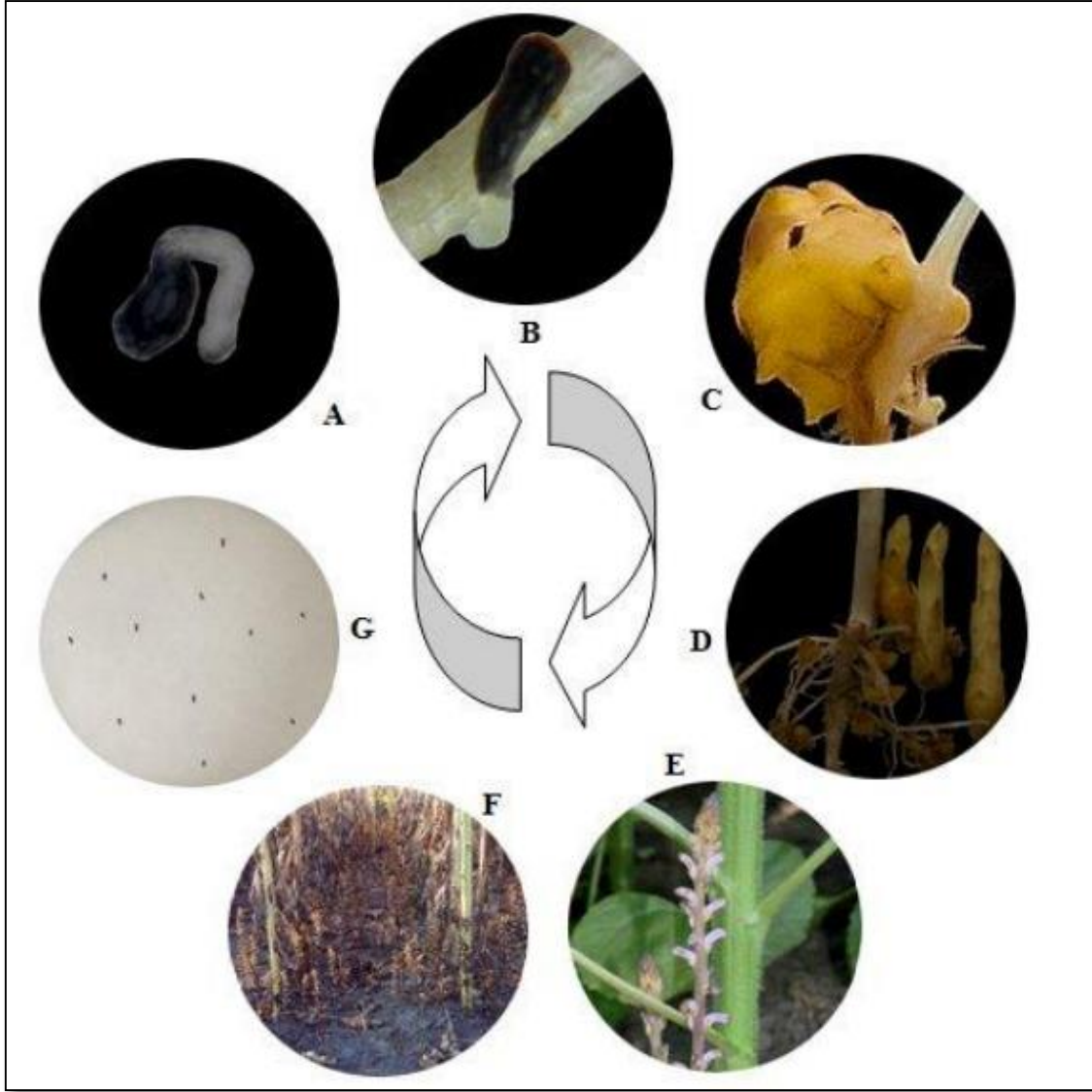
G: Tohumların yayılması (Şekil 2.4).



Şekil 2.2. Canavar otu tohumlarının çimlenerek, toprak altındaki konukçu bitkinin köklerine tutunması (Rispaıl ve ark. 2007'dan Türkçeye çevrilmiştir)



Şekil 2.3. Bitki köklerinden salgılanan strigolaktonlar ve orobanşın köke tutunması <https://heatherkellyblog.wordpress.com/2015/05/>



Şekil 2.4. *Orobanche cumana* bitkisinin yaşam döngüsü (Duca ve ark. 2013)

2.4 Canavar Otu Türlerinin Zarar Şekli ve Oluşturdukları Verim Kayıpları

Orobanchaceae familyasına ait canavar otları tamamen klorofilden yoksun zorunlu tam kök parazitleridir. Fotosentez yeteneğinden yoksun oldukları için geniş yapraklı konukçu bitkilerini su, mineral ve karbon kaynağı olarak kullanırlar ve konukçu bitkide hasara neden olurlar (Abbes ve ark. 2008, Takagi ve ark. 2009). Ekonomik değeri yüksek birçok bitkide canavar otu enfeksiyonu kaynaklı verim kayıpları rapor edilmiştir (Parker ve Riches 1993, Parker 2012) ve bu durum dünya çapında milyarlarca insanın geçimini etkilemektedir (Abang ve ark. 2007). Verim kaybı, enfekte olan bitki ve enfeksiyon seviyesine bağlı olarak %5-100 arasında değişmektedir (Abang ve ark. 2007, Bülbül ve ark. 2009).

O. cumana özellikle Orta ve Doğu Avrupa, İspanya, Türkiye, Rusya, Ukrayna, İsrail, İran, Kazakistan ve Çin başta olmak üzere ayçiçeği üreten ülkelerde üretimi sınırlayan en ciddi faktörlerden biridir (Kaya 2014a, Skoric ve ark. 2010). Birçok canavar otu türünün, Avrupa (Müller-Stöver ve ark. 2009), Fransa (Veronesi ve ark. 2007), Lübnan (Haidar ve Sidahmed 2006), Orta doğu, Rusya, Ukrayna, Çin, Afganistan, Küba, Nepal, Pakistan, Hindistan, Suudi Arabistan, Türkiye, Uganda'da (Winston 2003), Tunus (Abbes ve ark. 2008), Amerika (Parker 2009), İspanya ve Yugoslavya'da (Sauerborn ve ark. 2002) önemli verim kayıplarına neden olduğu rapor edilmiştir. Akdeniz ve Batı Asya' da 1991 yılında 16 milyon hektar alanın (Parker 2009), İspanya'nın orta ve güney bölgelerinde ise 100000-350000 hektar alanın canavar otu tehlikesi altında olduğu belirtilmiştir (Diaz-Sanchez ve ark. 2003). Canavar otu zararı nedeniyle ayçiçeğinde %58, tütünde %50, baklada %35 (Demirkan 2005), havuçta %50 (Bernhard ve ark. 1998), bezelyede %80 (Perez-de-Luque ve ark. 2005) ve domateste ise Türkiye'de ortalama %24 (Aksoy ve Uygur 2008) verim kaybı olduğu belirtilmiştir. Orta Doğuda canavar otlarından kaynaklanan yıllık ürün kaybının 1,3-2,6 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Aly 2007). Canavar otu türlerinden olan *O. cumana* bitkisinin Avrupa ve Asya'da ayçiçeğinde meydana getirdiği verim kaybının %80'lere ulaştığı bildirilmiştir (Louarn ve ark. 2016).

2.5 Canavar Otu Mücadelesi

Dünyada canavar otu türlerine karşı farklı kontrol yöntemleri denenmiş olup, özellikle metil bromid içeren kimyasallar, solarizasyon ve/veya glifosat etken maddeli herbisit uygulamalarının başarılı olduğu bildirilmiştir. Fakat bu tür uygulamalar sadece örtü altı üretimde uygulanabilmekte, maliyeti yüksek olmakta ve bazılarının da zararlı etkileri bulunmaktadır. Dolayısıyla bu yöntemler geniş tarım alanlarında uygulanabilir olarak görülmemektedir. Örtü altı yetiştiriciliğinde uzun yıllar bu parazitin mücadelesinde kullanılan metil bromitin kullanımına Avrupa birliği 1 Ocak 2005 yılına kadar izin vermiş (Mauromicale ve ark. 2005), Türkiye'de ise 2007 yılı sonu itibarı ile yasaklanmıştır (Meriç ve Öztekin 2008). Bu uygulamalar nedeniyle seralarda alternatif mücadele yolları aranmaya başlanmıştır. Orobanş tarafından enfekte edilmiş ayçiçeği tarlalarında orobanşa karşı mücadele etmenin en sürdürülebilir yolu parazite karşı dirençli çeşitler geliştirmektir. Alternatif olarak IMI direnç alleli belirlenen yabani ayçiçeği türlerinden elde edilen ayçiçeği hibritlerine (genetiği değiştirilmiş olmayan) IMI herbisiti uygulanması ile parazit kontrolü yapıldığında bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Kaya ve ark. 2004a, Kaya ve Evcı 2007, Kaya ve ark. 2012, Kaya 2015).

Solarizasyon uygulaması, özellikle örtü altı üretiminde aşırı derece de sorun olan canavar otu türlerine karşı oldukça etkili olan ve yaygın olarak kullanılan bir yöntem olmasına rağmen, tarlalarda sorun olan canavar otları için kullanımı ekonomik değildir ve büyük oranda sıcak bölgelerde uygulanabilir bir yöntemdir. Bu nedenle son yıllarda canavar otu türlerinin neden olduğu sorunu azaltmak için kültürel metotlar öncelikli olmak üzere entegre mücadele ile ilgili çalışmalara ağırlık verilmiştir (Aksoy ve ark. 2014). Solarizasyon yöntemi tek yıllık, bazı çok yıllık ve parazit yabancı otlara karşı etkili olmasıyla birlikte, kültür bitkisinin daha iyi gelişmesine ve verimin daha yüksek olmasına olanak sağlamaktadır (Patel ve ark. 2005). Solarizasyonun açık arazilerde de canavar otuna etkili olduğu bildirilmektedir (Jacobsohn ve ark. 1980, Haidar ve Sidahmad 2000). Solarizasyon veya diğer yöntemlerle kombinasyonunun seralarda da canavar otuna karşı oldukça etkili olduğu bulunmuştur (Katan 1987, Mauromicale ve ark. 2001, Boz ve ark. 2012).

Üretici koşulların da yaygın olarak kullanılan bir yöntem olan tuzak bitkiler (mısır, yulaf, keten vb), canavar otu tohumları için gerekli strigolakton türevi bileşikler salgılayarak çimlenmelerini sağlarlar. Çimlenen canavar otu tohumları tuzak bitkilerin köklerine tutunamadıkları için ölürlür. Bu yöntemle topraktaki canavar otu miktarı azalmış olur (Kitiş 2015). Canavar otuyla mücadelede, sentetik allelopatik maddelerin kullanımının doğal ve farklı bir yol olduğu bildirilmektedir (Sauerborn 1991). Bir bitkiye ait sürgün, kök, yaprak veya çiçeklerinden salınan doğal kimyasal bileşiklerin bir başka bitkiyi etkilemesi olayına allelopati denir ve bu yöntem yabancı otlarla mücadelede kullanılabilir (Rice 1995).

Sertifikalı tohumların tercih edilmesi, temiz tohum ve fidelerin kullanılması ya da canavar otu ile bulaşık tarlalarda yetiştirilen kültür bitkilerinin tohumlarının kullanılmaması canavar otu ile mücadelede önemli bir rol oynamaktadır (Kitiş 2015). Bulaşık tarlalardan toplanan canavar otları yakılmalı ya da derin çukurlara gömülmelidir. Canavar otu tohumları çok küçük olduğundan tarımda kullanılan alet ve makinalarla, bitki dokularıyla/kısımlarıyla, çiftlik hayvanlarıyla, sulamayla (yağmurlama ve aşırı sulama), rüzgarla veya erozyona uğramış bulaşık topraklarla çok kolay yayılabilir ve yeni alanlarda sorun olmaya başlayabilir. Bundan dolayı sulama sularının canavar otu tohumu ile bulaşık olmamasına dikkat edilmeli, canavar otu ile bulaşık tarlalarda kullanılan alet ve ekipmanlar yeni üretim alanların da kullanılmamalıdır. Canavar otu tohumu bulaşık alanlarda çalışan kişilerin ayakkabı, çizme gibi kıyafetlerine yapışan veya canavar otu tohumları ile bulaşık alanlarda otlayan hayvanların üstüne yapışan canavar otu tohumlarının temiz üretim alanlarını kirletmemelerine dikkat edilmelidir (Saghir 1986, Demirkan 2005).

Canavar otu yoğunluğunun az olduğu veya küçük tarlalarda, canavar otunun türüne ve konukçusuna göre değişebilmekle beraber toprak yüzeyine çıkan sürgünler tohum oluşturmadan önce elle çekme yöntemi ile uzaklaştırılabilir. Böylece canavar otu tohumunun olgunlaşması ve yayılması engellenebilir. Toplanan canavar otu sürgünleri tarlada bırakılmamalı, yakılmalı ya da derin çukurlara gömülmelidir (Kitiş 2015). Toprağın ilk 10 cm derinliğinde bulunan canlı canavar otu tohumlarının çok yoğun bulaşıklık görülen tarlalarda 45-50 cm derinlikten sürülerek daha derinlere gömülmesi ile yoğunluğunun azalması sağlanabilir. Fakat ikinci bir derin sürme işlemi yapılmamalıdır, aksi takdirde derinlere gömülmüş olan canavar otu tohumları tekrar toprak yüzeyine çıkarılabilir. Bu yöntemle toprağın derinlerine gönderilen canavar otu tohumları gerekli uyarıcılara ulaşamayacak ve çimlenemeyeceklerdir (Kitiş 2015). Canavar otu ile biyolojik mücadele de ülkemizde ya da dünya da uygulamaya konulmuş bir yöntem bulunmamaktadır. Fakat yapılan araştırmalar sonucunda *Phytomyza orobanchia* Kalt. sineğinin canavar otu ile mücadelede etkili bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Bu sineğin erginleri yumurtalarını canavar otunun üzerine bırakmakta ve larvadan tekrar ergin hale gelinceye kadar ki dönemde tamamen canavar otları üzerinde hayatını devam ettirmektedir. Araştırmalar canavar otu türlerinde bu böceğe ait larvalarının %37-69 oranında ölümlere sebep olduğunu, %90'lara varan oranda ise tohumun kapsül bağlamasını engellediği veya tohumların çimlenme özelliğini yitirdiğini ve ek olarak tohum bağlama oranlarının düştüğünü göstermiştir (Giray ve Nemli 1983, Aksoy ve ark. 2006).

2.6 Canavar Otunun Ayçiçeğinde Meydana Getirdiği Zararlar ve Türkiye'deki Durumu

Ülkemizde ayçiçeği üretiminin yoğun olarak yapıldığı Trakya bölgesinde yoğun zarar meydana getiren canavar otu (*Orobanche* spp.), ayçiçeğinde önemli verim ve kalite düşüşüne neden olmaktadır. Canavar otu diğer Avrupa ve Balkan ülkelerinde de önemli verim kayıplarına sebep olan köke tam bağımlı bir parazittir. Konukçusunun köklerini tutunarak, yaşamı için gerekli olan su ve besin maddelerini almaktadır. Bundan dolayı konukçusunun gelişimini olumsuz etkilemekte ve önemli ölçüde verim kayıplarına neden olmaktadır. Canavar otu (*Orobanche* spp.) değişik çevre ve iklim koşullarında yeni fizyolojik ırklar meydana getirmekte ve bunlara dayanıklı ayçiçeği geliştirilse bile tekrar ortaya çıkarak sorun oluşturmaktadır. Ayçiçeğinde zararlı olan canavar otu *Orobanche cumana* türüdür (Aksoy ve Pekcan 2014)

Canavar otu ayçiçeğinde tane verimini azalttığı gibi, bin dane ağırlığı, tanedeki yağ ve protein oranı, bitki boyu, tabla büyüklüğü, bitki başına verim ve kalite gibi daha birçok önemli karakteri de olumsuz etkilemektedir. Ülkemizde ayçiçeği tarımı, birinci dünya savaşı

sonrasında balkanlarda başlamış ve daha sonrasında ekim alanı ülke geneline yayılmıştır. Ülkemizdeki ayçiçeği üretiminde Orobanş sorunu ilk olarak 1956 yılında görülmüştür (Demirbaş 2006). 1951-1955 yıllarında 86-100 kg/da olan ortalama verim, 1956'da yaklaşık 60 kg seviyesine düşmüştür. 1960'ların başında Rusya'dan orobanşa dayanıklı Vniimik çeşidinin getirilmesiyle bu sorun çözülmüştür (Aksoy ve Pekcan 2014).

1985 yılında ayçiçeği üretim sahalarında canavar otunun yoğunluğunun, Edirne ve çevresinde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Canavar otu ile bulaşma Tekirdağ'a ve hatta Çorlu'ya kadar yayılış göstermiştir. 1981 yılında orobanşın yeni ırkları tekrar Trakya bölgesinde görülmüştür. Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü (TTAE) ve özel şirketlerce yapılan çalışmalar sonucunda ülkemizde yayılış gösteren ırklar tespit edilmiş, yayılış alanları belirlenmiş ve yeni geliştirilen özel dayanıklı çeşitlerle sorun ortadan kaldırılmıştır (Kaya 2003).

Türkiye'de ayçiçeği üretimi yapılan alanlar 1956- 1982 yılları arasında *Orobanche* spp. kaynaklı yaklaşık %50 oranında azalmıştır (Bülbul ve ark. 1991). Verim ve kalite kaybına çözüm olarak çiftçiler derin sürüm ve dayanıklı hibritlerin ekimiyle ürünlerini koruma altına almaktadır. Son yıllarda hem ülkemizde hemde Doğu Avrupa ülkelerinde, orobanşın yeni ırk veya ırklar ortaya çıkararak tekrar problem olmaya başladığı bildirilmektedir. Bu durum, yaklaşık her yirmi yılda bir orobanş parazitinin dayanıklı çeşitlere karşı kendini yenileyerek dayanıklılık mekanizmasını kırdığını ortaya koymaktadır (Kaya 2003, Labrouse ark. 2004).

1982-1987 yılları arasında TTAE tarafından ayçiçeği çeşitleri ve ıslah materyali denemeye alınarak dayanıklı hat ve çeşitler elde edilmiştir. Romanya'dan temin edilen ırk ayırıcı ile bölgedeki canavar otunun 5 yeni ırktan (A, B, C, D, E) oluştuğu ortaya çıkmıştır. Trakya'da ayçiçeği ekim alanlarının yaklaşık üçte ikisinden fazlasında canavar otunun yeni ırkları görülken, TTAE tarafından yürütülen bir projede 2004'den sonra yeni ırk canavar otlarının tüm Trakya bölgesinde yayılış gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda son yıllarda canavar otlarının yeni ırklar geliştirdiği gözlemlenmiştir (Çizelge 2.2).

Ülkemizde canavar otu sorununun belirlenmesi ve çözülmesi amacıyla Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'ın desteği ile 'Ülkesel canavar otu (*Orobance* spp.) Projesi' 2006 yılında başlamış ve 2010 yılında tamalanmıştır. Bu projede çeşitli araştırma enstitüsü, üniversite ve özel firmalardan toplam 35 araştırmacı çalışmıştır. Bu proje kapsamında öncelikle canavar otu sorununun boyutu ülkesel çapta ele alınarak bu yabancı otun konukçusu olan kültür bitkilerindeki canavar otu türleri, yayılış alanları ve yoğunlukları belirlenmiştir (Aksoy ve Pekcan 2014).

Çizelge 2.2. Dünyadaki farklı ülkelerde bulunan *Orobanche cumana* ırkları (Molinero-Ruiz ve ark. 2015'den Türkçe'ye çevirilmiştir)

Ülke	Belirlenen <i>O. cumana</i> Irkları		Kaynaklar
	Geçmiş	Günümüz	
Bulgaristan	A, B, C, D, E	E, F, G	Shindrova 2006, Batchvarova 2014
Çin	A	A, B, C, D, E, F, G	Ma ve Jan 2014, Shi ve ark. 2015
Fransa	Mevcut değil	Bilinmiyor	Jestin 2012, Jestin ve ark. 2014
Macaristan	A, B, C, D	E, F	Zoltan 2001, Hargitay 2014, Molinero-Ruiz ve ark. 2014
Kazakistan	Bilinmiyor	C, G	Antonova 2014
Moldova	B, C	E, F	Gisca ve ark. 2013, Duca 2014
Romanya	A, B, C, D, E	F, G	Vranceanu ve ark. 1980, Pacureanu-Joita ve ark. 2008, Pacureanu 2014
Rusya	A, B, C, D	D, E, F, G, H	Tolmachyov 1990, Antonova ve ark. 2009; 2013, Antonova 2014
Sırbistan	B, E	E	Mihaljcevic 1996, Miladinovic ve ark. 2014
İspanya	B, C, D, E	E, F	Gonzalez-Torres ve ark. 1982, Melero-Vara ve ark. 1989, Saavedra Del Rio ve ark. 1994, Alonso ve ark. 1996, Molinero-Ruiz ve ark. 2006, Fernandez-Escobar ve ark. 2008, Molinero-Ruiz ve ark. 2009, Molinero-Ruiz ve Dominguez 2014
Türkiye	Bilinmiyor	F, G, H	Kaya ve ark. 2004, Kaya ve ark 2012, Kaya 2016, Molinero-Ruiz ve ark. 2014
Ukrayna	A, B, C, D	E, F, G	Tolmachyov 1990, Pototskyi 2014

2.7 Mikrosatellitler (Basit Dizi Tekrarları) ve Kullanım Alanları

Mikrosatellitler (basit dizi tekrarları, SSRlar), özellikle ökaryotik kromozomların ökromatin bölgesinde olmak üzere nükleer ve organel genomunun protein kodlayan veya kodlamayan herhangi bir bölgesinde bulunabilen, genom boyunca dağılmış, 1-10 nükleotidin (yaygın olarak dinükleotid) tekrarlanması ile oluşan kısa DNA dizileri olarak da tanımlanabilirler (Toth ve ark. 2000, Semagn ve ark. 2006, Vieira ve ark. 2016). Mikrosatellit lokuslarında var olan polimorfizmin belirlenmesinde, çalışılan tekrar bölgesinin veya SSR lokusunun yan bölgelerine komplementer primerler kullanılarak, tekrar bölgeleri PCR ile çoğaltılır ve elde edilen DNA parçaları elektroforetik olarak analiz edilir (Anzidei ve ark. 1999, Scotti ve ark. 1999, Bandelj ve ark. 2004, Varshney ve ark. 2005).

Mikrosatellitler genellikle seleksiyon ve çevre baskısı tarafından direkt olarak etkilenmezler (Scotti ve ark. 1999) ve genomda nötr etkileri olabildiği gibi, belirli türlerde de önemli görevleri üstlenmektedirler (Hancock ve ark. 1998, Varshney ve ark. 2005, Oliveira ve ark. 2006). Ün ve ark. (2000) mikrosatellitlerin temelde benzer olmasına rağmen, belirli bir

türde polimorfik olduklarını ve bireyden bireye küçük farklılıklar içermeleri nedeniyle moleküler genetik alanında belirteç olarak kullanılmalarının uygun olduğunu ifade etmişlerdir. Bilim adamları tarafından populasyon genetiği gibi çalışmalarda kullanılmak üzere çeşitli moleküler genetik belirteçler (SSR, RFLP, PCR-RFLP, AFLP, RAPD, STR gibi) geliştirilmiştir. Bu belirteçlerden biri olan mikrosatellitler yeniden üretilebilirlik, birden fazla allellik, kodominant kalıtım ve bol miktarda genom kapsamı sebebiyle populasyon genetiği, genetik çeşitlilik, akrabalık ve topluluk araştırmaları gibi moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda kullanılan en hızlı ve yüksek etkili moleküler araçlardır. Mikrosatellit analizlerinin tekrarlanabilirlik düzeyinin çok yüksek olması, analizler için az miktarda (1,5-50 ng) DNA örneğinin yeterli olması ve mikrosatellitlerin genomda dağınık olarak bulunması gibi özellikler bize mikrosatellitlerin güvenilir belirteçler olduğunu göstermektedir. (Scotti ve ark. 1999, Oliveira ve ark. 2006, Semagn ve ark. 2006, Gökdoğan ve Kaya 2015). Mikrosatellitler kodominant özellik gösterdikleri için genetik çaprazlamalar gerektirmeksizin homozigot ve heterozigot genotipler kolaylıkla birbirlerinden ayırt edilebilmektedir (Gillet 1999, Robinson ve Harris 1999, Scotti ve ark. 1999, Bandelj ve ark. 2004). Bu özelliği ile mikrosatellit analizler sırasında farklı PCR ürünleri karıştırılarak aynı jele yüklenebilmekte ve birden fazla mikrosatellit belirteci kullanılarak multipleks PCR kurulabilmektedir. Tüm bu özelliklerinin yanı sıra, bir tür için bulunan ve/veya tasarlanan belirteçlerin yakın türler için de kullanılabilmesi mikrosatellitler ile çalışanlara büyük avantajlar sunmaktadır (Anzidei ve ark. 1999, Robinson ve Harris 1999, Scotti ve ark. 1999, Oliveira ve ark. 2006). Mikrosatellitler, bir çalışmacı için büyük oranda zaman, işgücü ve maddi açıdan kazanç sağlanmaktadır.

Mikrosatellit belirteçleri genellikle yabani bitki türlerinde (i) genetik mesafeye dayalı çeşitlilik çalışmalarında, (ii) gen akımı ve krossing-over seviyesinin belirlenmesinde, (iii) gen kaynaklarının korunması çalışmalarında, (iv) evrimsel çalışmalarda kullanılmaktadır (Mammadov ve ark. 2012, Hayward ve ark. 2015, Vieira ve ark. 2016). Kültüre alınmış bitki türlerinde ise (i) bağlantı haritalarının oluşturulmasında, (ii) kantitatif karakter lokuslarının (QTL) haritalanmasında, (iii) markıra dayalı seleksiyonda, (iv) genetik haritalama ve DNA parmak izi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Garcia ve ark. 2006, Jonah ve ark. 2011, Kalia ve ark. 2011, Souza ve ark. 2013; Pereira ve ark. 2013).

2.8 Canavar Otu Türleri ile İlgili Yapılmış Genetik Çalışmalar

Orobanche cumana Wallr., ülkemizde, Avrupa ve Balkan ülkelerinde, ayçiçeği veriminde %100'e varan düşüslere sebep olan bir canavar otu türüdür. Ayçiçeğinde görülen

orobanş ırkları latin alfabesi kullanılarak adlandırılır; A, B, C, D ve E ırkları eski ırklar olup, F, G ve H ise en yeni en virulent özellikte olan ırklardır (Timko ve Scholes 2013, Kaya 2014a, 2014b, Molinero-Ruiz ve ark. 2015). Bu tür çok küçük ve fazla sayıda tohumlar içerdiğinden, kolayca yayılmakta ve böylelikle ayçiçeği üretimi yapılan alanlarda hızlı epidemilere neden olmaktadır (Kaya 2003). *Orobanche* cinsine ait genetik çeşitlilik çalışmalarında belirteçler kullanılarak yapılan ilk çalışmada izoenzimler kullanılmıştır (Verkleij ve ark. 1986). Daha sonraları ise RAPD ve ISSR belirteçleri aynı amaç için kullanılmıştır (Katzir ve ark. 1996, Gagne ve ark. 2000, Benharrat ve ark. 2002, Roman ve ark. 2002). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise SSR belirteçleri kullanılmaya başlanmıştır (Pineda-Martos ve ark. 2013, Pineda-Martos ve ark. 2014a, 2014b, Martin-Sanz ve ark. 2016).

Pineda-Martos ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada İspanya'dan örneklenen 50 *O. cumana* popülasyonunun 15 SSR primeri kullanılarak genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Pineda-Martos ve ark. (2013) tarafından yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçların *O. cumana* parazitinin kontrol altına alınması amacı ile gelişmiş bitki ıslah programlarının (özellikle ayçiçeği) oluşturulmasında ve bu programların yönetiminin ve devamlılığının sağlanmasında önemli katkılar sağlayacağı vurgulanmıştır. Gagne ve ark. (2000) tarafından 2 (İspanya ve Bulgaristan) *O. cumana* popülasyonu kullanılarak yapılan çalışmada AFLP belirteçleri kullanılmış ve Gagne ve ark. (1998) tarafından RAPD belirteçleri kullanılarak yapılan diğer çalışma ile sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Pineda-Martos ve ark. (2014a) tarafından *O. cumana* parazitinde mikrosatellitlerin genetik karakterizasyonda kullanımını araştırmak üzere yapılan çalışmada, 298 SSR primeri geliştirilmiş ve bu primerlerden 79 tanesinin 18 farklı bölgeden toplanan *O. cumana* popülasyonunda polimorfik olduğu ve genetik çeşitlilik çalışmaları için güçlü bir araç olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu SSR primerlerinin *O. cernua* gibi yakın akraba türlerde de kullanılabileceği vurgulanmıştır. Pineda-Martos ve ark. (2014b) tarafından Bulgaristan'da hem ayçiçeği tarlalarından hem de yabancı Asteraceae türlerinin olduğu alanlarda belirlenen *O. cumana* popülasyonlarının genetik çeşitliliği ve bu popülasyonlar arasında etkin gen alışverişinin varlığı SSR lokusları (15 SSR primeri) kullanılarak çalışılmıştır. Pineda-Martos ve ark. (2014b) tarafından yapılan bu çalışma sonucunda yabancı popülasyonlar ve ayçiçeği tarlalarındaki popülasyonlar arasında iki yönlü gen akımının bulunmasının yeni fizyolojik orobanş ırklarının oluşmasında etkili olabileceği ve bunun sonucunda yabancı popülasyonun genetik çeşitliliğinin ayçiçeği direnç mekanizmasının üstesinden gelebileceği bildirilmiştir.

Molinero-Ruiz ve ark. (2014) tarafından Macaristan (1 popülasyon), Romanya (1 popülasyon), İspanya (4 popülasyon) ve Türkiye (5 popülasyon)'den toplam 11 *O. cumana*

populasyonunun genetik olarak dirençli ayçiçeği çeşitlerini enfekte etme yönünden karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca yine bu çalışmada Macaristan, İspanya ve Türkiye'den 39 *O. cumana* populasyonunun RAPD-PCR (18 RAPD primeri) kullanılarak moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada yapılan AMOVA sonuçlarına göre genetik çeşitliliğin %60'ının ülkeler arası çeşitlilikten, %40'ının ise aynı ülke içindeki populasyonlar arası farklılıktan kaynaklandığı bildirilmiştir. Martin-Sanz ve ark. (2016)'nın çalışmasında 4 *O. cumana* populasyonunun virülans etkileri ve genetik çeşitliliğin virülans özelliğini arttırmadaki etkisi 20 SSR belirteçleri kullanılarak araştırılmıştır.

Literatür araştırma sonucunda diğer orobanş türleri için yapılan çalışmalara da rastlanmıştır. Paran ve ark. (1997) tarafından İsrail'den örneklenen 5 orobanş türünde 22 RAPD primeri kullanılarak yapılan çalışmada türler arası ve tür içi farklılıklar belirlenmiştir. Paran ve ark. (1997) tarafından yapılan bu çalışma, doğal orobanş populasyonları üzerinde DNA belirteçleri kullanılarak yapılan ilk çalışmadır. Benharrat ve ark. (2002), Fransa'dan örneklenen *O. hederæ* ve *O. amethystea*, İspanya, Bulgaristan, İsrail ve Romanya'dan örneklenen *O. cumana* ve *O. cernua* populasyonlarında 5 ISSR belirteci kullanarak orobanş türleri ve populasyonları arasındaki farklılıkları belirlemişlerdir. Benharrat ve ark. (2002)'nin çalışmasında ISSR belirteçlerinin *O. hederæ* türünde populasyonlar arası çeşitliliği belirlemede, *O. cumana* için ise genetik karakterizasyon ve ırkların belirlenmesinde kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Roman ve ark. (2001) tarafından İspanya'dan 6 *O. crenata* populasyonu üzerinde 23 RAPD primeri kullanılarak yapılan çalışmada, genetik çeşitliliğin büyük oranda (%94.29) populasyon içi bireyler arası çeşitlilikten kaynaklandığı bildirilmiştir. Roman ve ark. (2003) tarafından 20 orobanş türünde 5 RAPD primeri kullanılarak yapılan çalışmada türe özgü RAPD belirteci belirlenmiştir. Roman ve ark. (2003) tarafından yapılan bu çalışmada, *Orobanche* cinsine ait türlerin sınıflandırılması ve genetik ilişkilerin belirlenmesi için daha fazla türün, daha fazla populasyonun ve nükleer veya plastit DNA belirteçlerinin gerekliliği vurgulanmıştır. Roman ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, orobanş türlerinin (3 tür) kloroplast DNA (cpDNA) belirteçleri kullanılarak PCR-RFLP tekniği ile belirlenebileceği bildirilmiştir. Roman ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, plastit DNA belirteçlerinin türleri belirlemede, özellikle morfolojik olarak ayırt edilmesi zor olan orobanş türlerinde, basit ve güvenilir bir tanımlayıcı araç olduğu vurgulanmıştır. Brault ve ark. (2007) tarafından Fransa'dan örneklenen 3 *O. ramosa* populasyonunda 2 RAPD primeri (24 RAPD primeri denenmiş en iyi sonuç veren 2 tanesi seçilmiştir) kullanılarak genetik çeşitlilik belirlenmiştir. Vaz Patto ve ark. (2008) Fas'ta 5 *O. foetida* populasyonunda AFLP belirteçleri kullanarak genetik çeşitliliği belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 *Orobanche cumana* Populasyonları

Bu tez çalışmasında; Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illerinin farklı bölgelerindeki ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) tarlalarından 2011-2012-2013 yıllarında toplanmış 6 (altı) farklı *O. cumana* populasyonuna ait tohumlar kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Her bir populasyona ait tohumlar ‘bulk’ olarak toplanmış ve plastik tüplerde +4°C’de karanlıkta saklanmıştır. Yapılan literatür taramasına göre *O. cumana* tohumlarının canlılığı laboratuvar koşullarında karanlıkta saklandığında 17 yıla kadar sürmektedir (Molinero-Ruiz ve ark., 2008).

Çizelge 3.1. Çalışılan *O. cumana* populasyonlarına ait lokasyon bilgileri

Populasyon Numarası	Populasyon Adı	Toplanma Yılı
P1	Avarız/Merkez/Edirne	2012
P2	Ballıhoca/Muratlı/Tekirdağ	2012
P3	Karamusul/Lüleburgaz/Kırklareli	2013
P4	Kuleli/Babaeski/Kırklareli	2013
P5	Ballıhoca/Muratlı/Tekirdağ	2013
P6	Avarız/Merkez/Edirne	2011

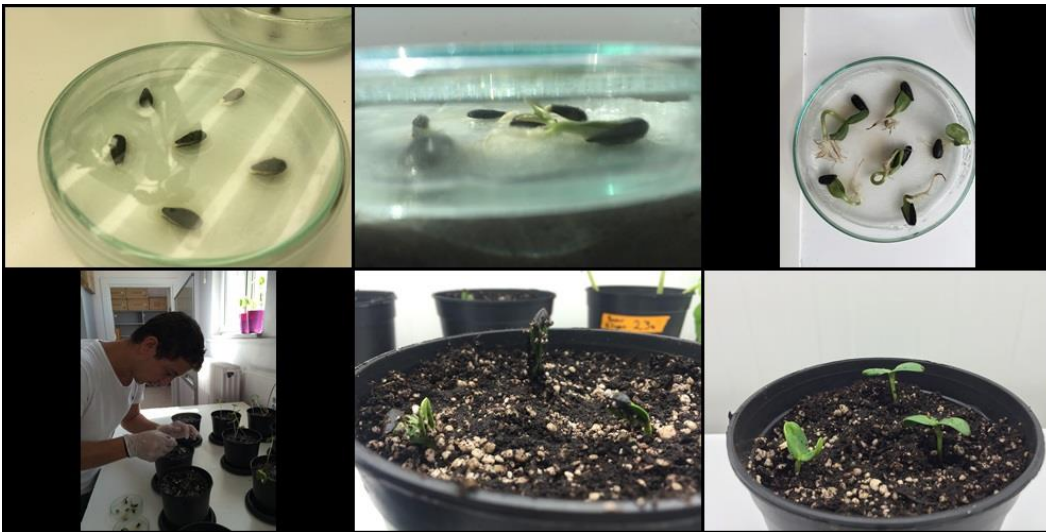
3.2 Ayçiçeği ve *O. cumana* Populasyonlarına ait Bitkilerin Yetiştirilmesi

O. cumana bitkilerinin yetiştirilmesi için; her bir populasyona ait 100 mg *O. cumana* tohumu 1:1 oranında perlit ve torf içeren saksılara (1,5 litre) eklendi ve tohumların perlit ve torf karışımı ile iyice karışması sağlanmıştır. Her bir saksının altındaki deliklere sulama işlemi uygulandığında toprağı kaçırmaması için taşlar yerleştirilmiştir (Şekil 3.1). Ayçiçeği tohumları ise nemli kurutma kâğıdı içeren Petri kaplarında çimlendirildi ve 2 günlük filizler önceden hazırlanan *O. cumana* tohumu içeren saksılara, her bir saksıda 3 adet ayçiçeği fidesi olmak üzere aktarılmıştır (Şekil 3.2). Trakya bölgesinde yayılış gösteren *O. cumana* bitkilerinin yetiştirilmesi için canavar otuna hassas Özdemirbey ayçiçeği çeşidi kullanılmıştır. Her bir *O. cumana* populasyonu için 3 adet saksı hazırlanmıştır. Bitkiler NKÜ, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü bitki yetiştirme odasında kontrollü koşullarda 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık içeren 16

saat fotoperiyotta, $25\pm 2^{\circ}\text{C}/15\pm 2^{\circ}\text{C}$ (gündüz/gece) sıcaklıkta, $\%60\pm 5$ nemli ortamda yaklaşık 2 ay süresince yetiştirilmiştir. Bitkiler belirli aralıklarla sulanmış, herhangi bir gübreleme işlemi yapılmamıştır (Şekil 3.3). Orobaş populasyonlarına ait bireylerden toprak yüzeyine çıkış ekimden sonra 31. günden itibaren başlamış ve örnekler 35. günden itibaren toplanmıştır. Örnek toplanmasına yeterli sayıda örnek elde edilene kadar devam edilmiştir.



Şekil 3.1. Ayçiçeği ve *O. cumana* populasyonlarına ait bitkilerin yetiştirilmesi için torf, perlit ve canavar otu tohumları karıştırılarak hazırlanmış saksılar



Şekil 3.2. Ayçiçeği tohumlarının çimlendirilmesi ve saksılara ekimi



Şekil 3.3. Ayçiçeği ve *O. cumana* populasyonlarına ait bitkilerinin kontrollü koşullarda yetiştirilmesi

Her bir *O. cumana* populasyonuna ait 20 bireyden bitki çiçeklenmeden önce taze doku örnekleri alınmıştır, populasyon adı ve birey numarası ile etiketlenmiş alüminyum folyaya sarılarak DNA izolasyonuna kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Her bir populasyona ait yetiştirilen orobanş bitkilerinin muhafazası

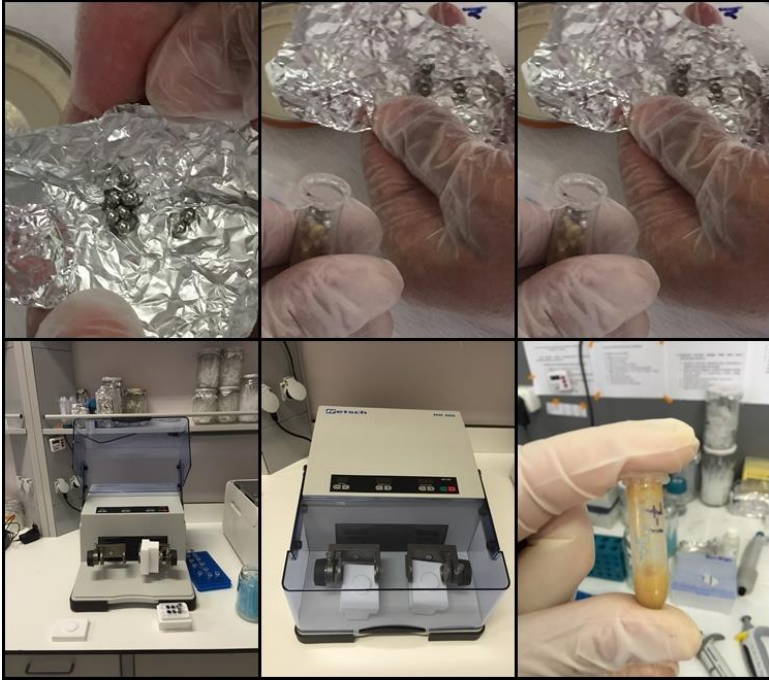
3.3 DNA İzolasyonu

Kalite ve miktar olarak en iyi DNA izolasyonunu yapabilmek için birçok manuel DNA izolasyon yöntemi ve bu yöntemlerin modifikasyonları denenmiştir (Dellaporta ve ark. 1983, Doyle ve Doyle 1990, Li ve ark. 2007, Azmat ve ark. 2012, Healey ve ark. 2014). DNA izolasyonu optimizasyonları sonucunda kalite ve miktar açısından en iyi olan ve PCR analizlerinde istenilen kalitede sonuç veren DNA örnekleri Dellaporta ve ark. (1983) ve Doyle ve Doyle (1990) tarafından bildirilen DNA izolasyon metotları ile elde edildiği için DNA izolasyonunda bu iki metot bazı modifikasyonlarla kullanılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında her bir *O. cumana* popülasyonuna ait 20 bireyden alınan ve -80°C 'de saklanan doku örneklerinden yeterli miktarda alınmış (yaklaşık 1-1.5 mm uzunluğunda) ve Retsch® MM400 model vibrasyonlu öğütücü kullanılarak 2 ml'lik santrifüj tüpleri içinde ezilmiştir. Homojenizasyon işleminin etkinliğini arttırmak için bitki örnekleri bir bistüri yardımı ile küçük parçalara bölünmüştür (Şekil 3.5). Homojenizasyon işlemi sırasında her bir tüp içine 3 mm'lik metal bilyelerden 3'er tane eklenmiştir. Homojenizasyon süresi 3 dk ve titreşim frekansı ise saniyede 30 olarak ayarlanmıştır (Şekil 3.6). Örneklerin iyi bir şekilde homojenize olup/olmadığı kontrol edildikten sonra homojenizasyon işlemine son verilmiştir. Öğütücüden alınan örneklerin içindeki çelik bilyeler bir mıknatıs yardımıyla çıkarılmış ve örnekler DNA izolasyonuna hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.5. DNA izolasyonu öncesinde orobanş örneklerinin küçük parçalara ayrılması

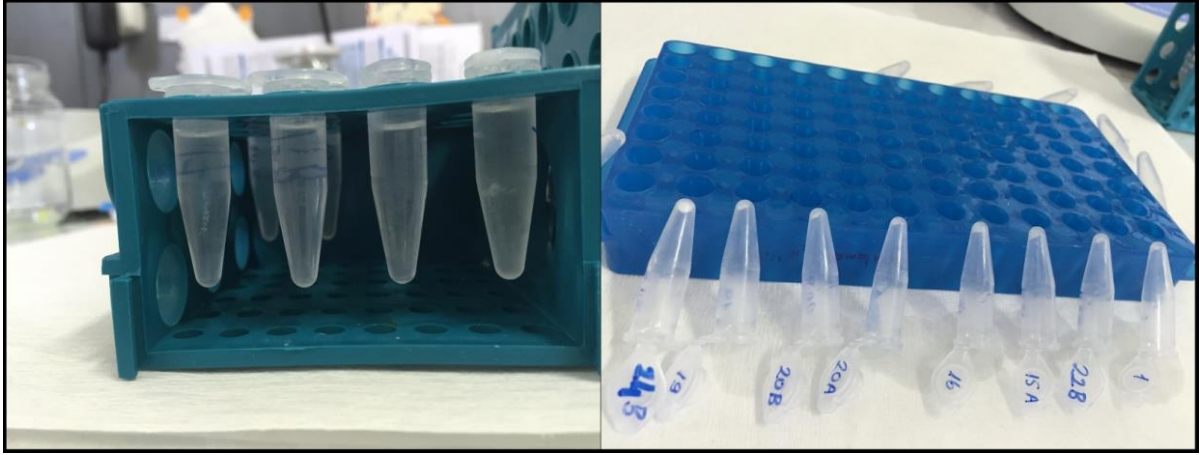


Şekil 3.6. Orobaş örneklerinin Retsch® MM400 model vibrasyonlu öğütücü ile homojenizasyonu

DNA izolasyonunda kullanılan yöntemin basamakları şu şekilde sıralanmaktadır:

- 1) İyice ezildiğine emin olunan örnekler ait her bir tüpe önceden hazırlanmış 65°C de bir süre ısıtılmış özütleme tamponundan (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, pH=8) 1000 µl eklenmiştir.
- 2) Özütleme tamponu eklenmiş olan örneklerin üstüne 100 µl %20'lik SDS eklenmiş ve iyice karışması için vorteks yapılmıştır.
- 3) Örnekler 65°C ısıtıcılı blokda 60 dk inkübasyona bırakılmış, her 10 dk da bir nazikçe karıştırılmıştır.
- 4) İnkübasyon işlemi bittikten sonra her tüpe 350 µl soğuk 5M potasyum asetat eklenmiş, nazikçe karıştırılmıştır ve buzlu kapta 20 dk buzdolabında (+4°C) bekletilmiştir.
- 5) 13000 rpm'de 20 dk santrifüj yapılmıştır.
- 6) Üstteki sıvı kısım (supernatant) steril 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- 7) Her bir tüpe eşit hacimde Chloroform:Isoamylalcohol (24:1) eklenmiş ve 5 dk nazikçe karıştırılmıştır.
- 8) 10000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılmış ve her bir tüpten üstteki sıvı kısım steril 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- 9) Her bir tüpe 800 µl isopropanol eklenmiş ve nazikçe karıştırılmıştır.

- 10) +4°C’de gece boyu bekletilmiştir.
- 11) 13000 rpm’de 15 dk santrifüj yapılmış ve üstteki sıvı kısım dökülmüştür.
- 12) Kalan isopropanolü iyice uzaklaştırmak için tüpler ters çevrilmiş ve bir süre bekleterek pellet kurutulmuştur (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. DNA'nın isopropanol ile çöktürülmesi ve DNA pelletinin kurutulması

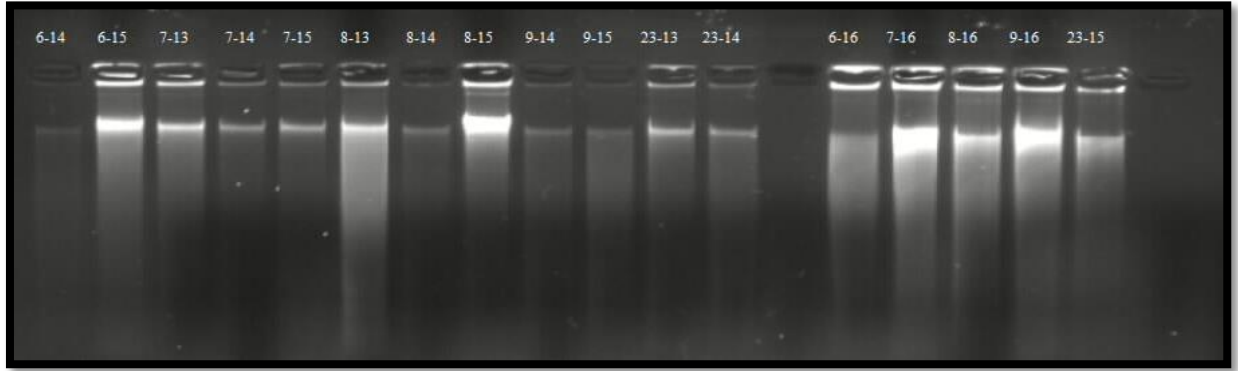
- 13) Pellet 100 µl TE tamponu (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH=8) ile çözülmüş ve 37°C’de 30 dk bekletilmiştir.
- 14) 20 µl 3M sodyum asetat eklenmiş ve vorteks yapılmıştır.
- 15) 100 µl isopropanol eklenmiş ve nazikçe karıştırılmıştır. -20°C’de 30 dk bekletilmiştir.
- 16) 13000 rpm’de 10 dk santrifüj yapılmış, üstteki sıvı kısım dökülmüştür.
- 17) Kalan isoprpanolü iyice uzaklaştırmak için tüpler ters çevrilmiş ve pellet kurutulmuştur.
- 18) Her bir tüpe 1000 µl soğuk %70’lik etanol eklenmiş, 13000 rpm’de 10 dk santrifüj yapılmıştır.
- 19) Üstteki sıvı kısım dökülmüş, kalan etanol iyice uzaklaştırılması için tüpler ters çevrilerek veya 37°C’de -15-20 dk bekleterek kurutulmuştur.
- 20) Her bir tüpe 4 µl RNase (10 mg/ml) ve 125 µl TE Tamponu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8) konularak çözülmüş ve 37°C’de 30 dk bekletilmiştir.
- 21) İzole edilen genomik DNA’lar PCR analizine kadar +4°C’de veya -20°C’de saklanmıştır.

3.4 İzole Edilen DNA Örneklerinde Miktar ve Kalite Tayini

Elde edilen DNA örneklerinde miktarı tayinin de Qubit® 2.0 Fluorometer cihazı kullanılmıştır. DNA miktarı ng/µl olarak cihaz ekranında okunmuş ve kaydedilmiştir. İzole

edilen genomik DNA örnekleri PCR reaksiyonu için konsantrasyonu 10 ng/μl olacak şekilde sulandırılmıştır.

Ayrıca izole edilen DNA'ların kalitesi ve DNA'da kırıkların olup olmadığını belirlemek için izole edilen her bir örneğe ait 5 μl DNA ve 1 μl yükleme boyası (loading dye) ile karıştırılarak RedSafe Nucleic Acid Staining Solution içeren %1'lik agaroz jellerinde 1X TBE tamponunda 80 Voltta 30 dk yürütülmüştür. Elektroforez işleminden sonra jeller UV ışığı altında Gel Imaging System Vilber Lourmat Quantum ST5 ile görüntülenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Orobaş populasyonlarına ait izole edilen bazı DNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri

3.5 Nükleer Mikrosatellit (nSSR) Primerlerinin Belirlenmesi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri ve Elektroforez

Çeşitli literatür araştırması sonucunda (Pineda-Martos ve ark. 2013; Pineda-Martos ve ark. 2014a; Pineda-Martos ve ark. 2014b) *O. cumana* populasyonlarının genetik çeşitliliğini belirlemek için kullanabileceğimiz SSR lokusları taranmış (217 SSR lokusu) ve bilimsel makalelerde en yaygın kullanılan 8 primer çifti çalışmada kullanılmak üzere belirlenmiştir. Tez çalışmasında kullanılmak üzere nSSR primerlerinin belirlenmesinde; primerin polimorfizm oranı, polimorfizmi sağlaması için allel sayısının yeterli derecede çok olması, aynı florasan boya ile işaretli olanların multipleks PCR analizi yapabilmek için PCR ürünlerinin uzunlukları birbirinden farklı olması, primerlerin bağlanma (annealing) sıcaklıklarının birbirine yakın olması ve PIC (polimorfik bilgi içeriği) değeri yükseldikçe polimorfizm de artacağı için, PIC değerinin yüksek olması gibi özellikler dikkate alınmıştır. Seçilen primer çiftlerine ait bilgiler Çizelge 3.2'de verilmiştir. Seçilen primer çiftlerinin ileri (forward) primerleri 5' uçlarından DNA parça (fragment) analizi için uygun florasan boya (Applied Biosystems tarafından tescilli PET, NED ve VIC ile 6-FAM) işaretli olarak sentezlettirilmiş ve bütün örneklerinin analizinde bu primerler kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılmak üzere belirlenen nSSR primerlerine ait bilgiler

SSR primeri	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: CAAGACTTGGAACAAGCAAATC	(AG) ₁₀	62
OCUM -70	F: 5'-NED-AAGCTGTAAACAATGCCTGAA-3' R: CCTCCTCCAGTACCACTAGGC	(TG) ₁₁	58
OCUM -81	F: 5'-6-FAM-TTACAAGGTGAAACCACCCA-3' R: CAGCTACTGTCCGCAAGAAA	(CA) ₁₃	58
OCUM -87	F: 5'-VIC-TTCTCGACAGCTTTGGGTAAA-3' R: ATGCCAACTTCGAGTGATCC	(TTC) ₁₃	62
OCUM -108	F: 5'-VIC-TCGTTAATAAGTGGTTCACGAAA-3' R: TGACTAAAATAAAATGTACGGGTG	(GTAT) ₆	58
OCUM -141	F: 5'-6-FAM -CAGCAACTGTTTCTTCCATAGAG-3' R: TCCAAGAAGAGGAAAAGAAGTGA	(CTT) ₆	62
OCUM -160	F: 5'-NED-TGAGGGTTTGTAAGTGGGC-3' R: CGTACCTTATCCCTCCGTC	(AG) ₇	62
OCUM -196	F: 5'-PET-GTATGTGCGCCCGTCTTG-3' R: GGGGATGACTGTGTTTCGAT	(GT) ₇	58

Çalışmada nSSR primerleri için PCR analizleri Pineda-Martos ve ark. (2014b)'nin çalışmasındaki reaksiyon koşullarında ve PCR döngülerinde denendi, ayrıca laboratuvar şartlarımıza uygun gerekli optimizasyonları yapılmıştır. PCR optimizasyonu için değişik DNA miktarı (10, 20, 30 ve 50 ng), primer (5 pmol ve 10 pmol), dNTP (0,2, 0,3 ve 0,5 mM), MgCl₂ (1,5 mM, 2 mM ve 2,5 mM) ve *Taq* DNA polimeraz (1U, 1,5U ve 2U) konsantrasyonları denenmiştir. Optimum reaksiyon koşulları Çizelge 3.3'de verilmiştir. Ayrıca çalışmada optimize edilen PCR döngüleri Çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

PCR işlemine başlarken, öncelikle her bir DNA örneğinden 5 µl (yaklaşık 50 ng) 0,2 ml PCR tüplerine konulmuş ve daha sonra ise PCR karışımı (mastermix) hazırlanmıştır. Karışımın içeriği Çizelge 3.3'de gösterilmiştir. Hazırlanan karışım Vortex karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra, her bir tüpe 10 µl dağıtılıp toplam hacim 15 µl olarak ayarlanmıştır. DNA amplifikasyonları Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'de verilen koşullarda Applied Biosystems® Veriti® Thermal Cycler ve Applied Biosystems® ProFlex™ PCR System Thermal Cycler kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.9).

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan nSSR primerleri için optimize edilmiş PCR koşulları

PCR Karışımı	Son Konsantrasyon
10X PCR Buffer	1X
MgCl ₂	2,5 mM
dNTPs	0,3 mM
İleri Primer*	10 pmol
Geri Primer	10 pmol
Taq DNA Polimeraz	1,5 U/μl
DNA	50 ng

* Kullanılan primer 5' ucundan florasan boya ile işaretlidir.

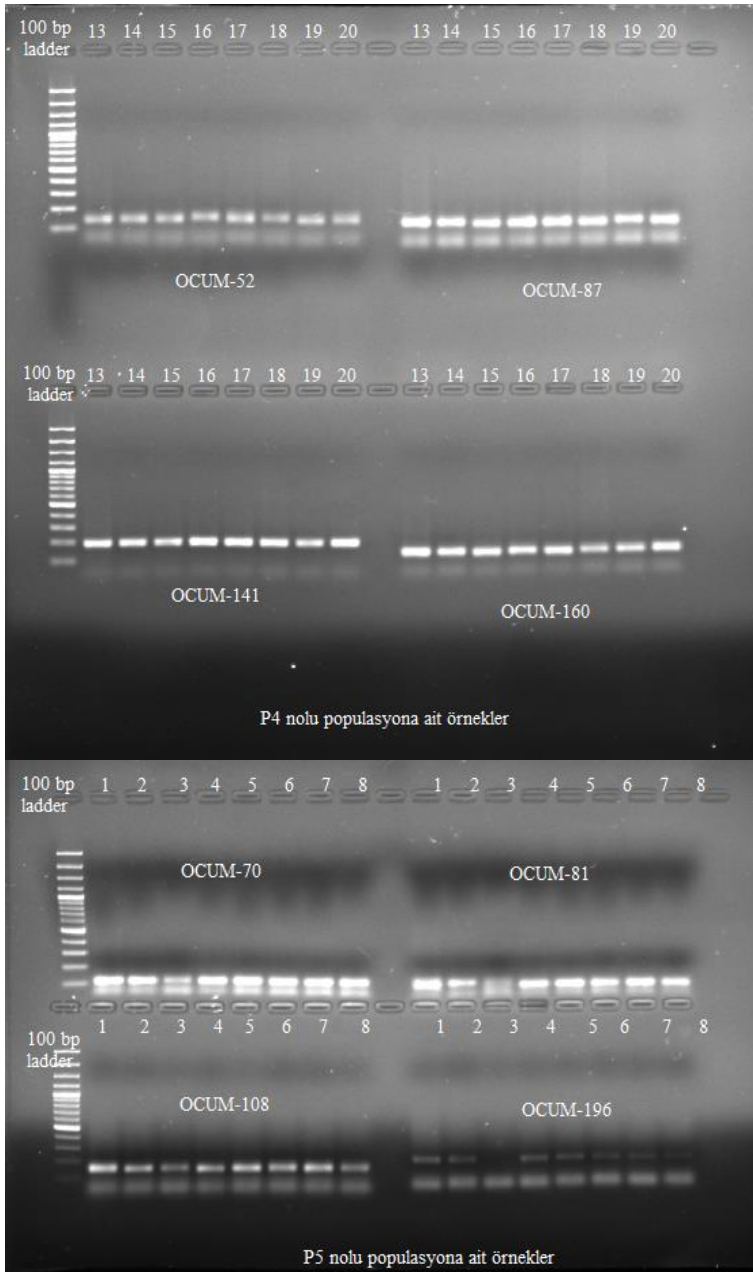
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilen PCR döngüleri (T_M = DNA'nın erime sıcaklığı)

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

PCR ürünleri elektroforez işlemine kadar, alüminyum folyoya sarılmış şekilde +4°C'de saklanmıştır. Bantların istenilen nitelikte olup olmadıklarını kontrol etmek için RedSafe Nucleic Acid Staining Solution içeren %2'lik agaroz jellerinde 1X TBE tamponunda 100 Voltta yaklaşık 1 saat yürütülmüştür (Şekil 3.10). Elektroforez işleminden sonra jeller UV ışığı altında Gel Imaging System Vilber Lourmat Quantum ST5 ile görüntülenmiştir. Böylece SSR analizleri sonucunda elde edilen bantların istenilen nitelikte kalitede olup olmadığı belirlenmiştir.

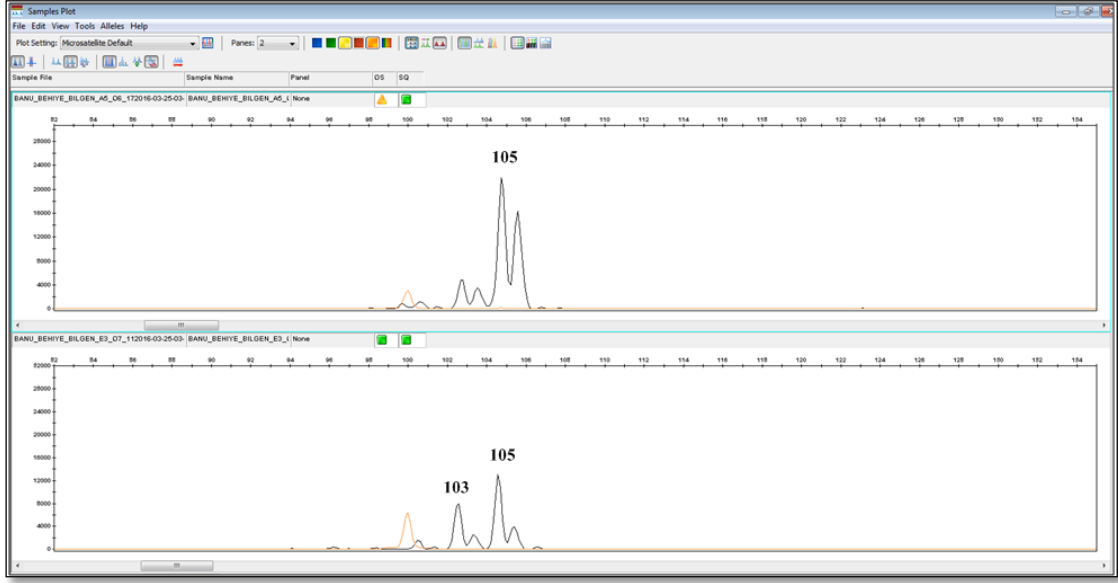


Şekil 3.9. Thermal Cycler cihazlarında DNA amplifikasyonları ve Elektroforez

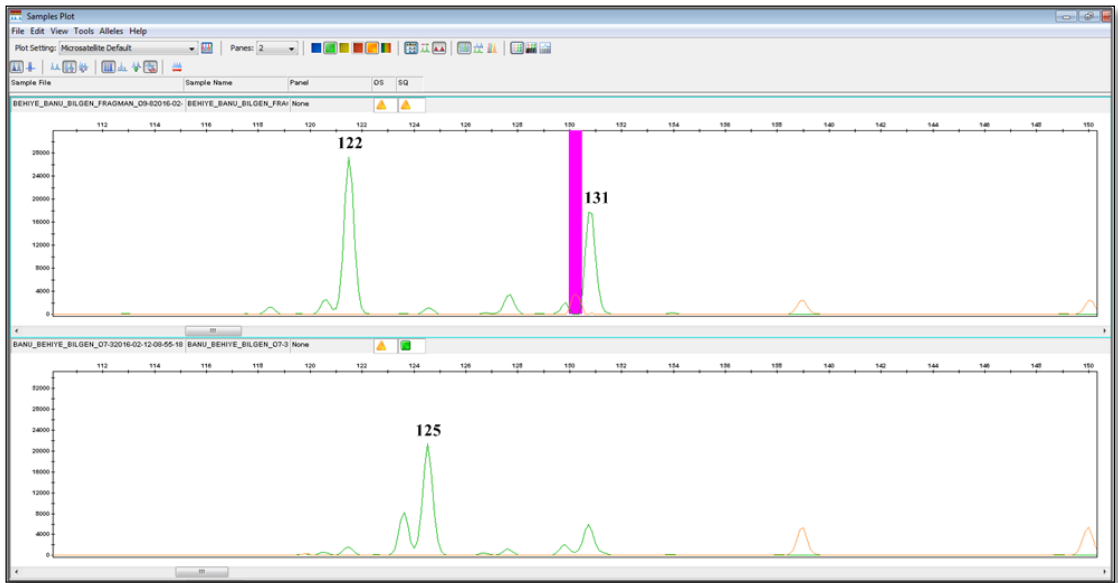


Şekil 3.10. *O. cumana* populasýonlarına ait bazı örneklerin PCR ürünlerinin UV ışık altındaki jel görüntüsü

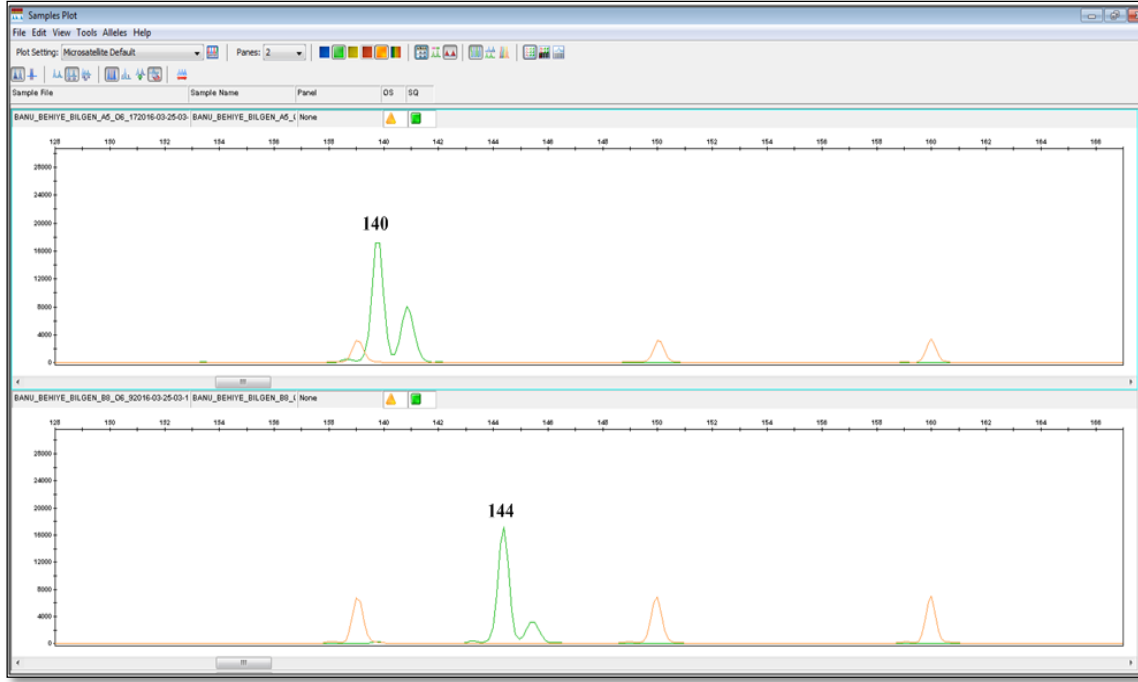
Elde edilen PCR ürünlerinin DNA parça (fragment) büyüklüklerinin belirlenmesi hizmet alımı ile yapılmıştır. Çalışılan populasyonlardaki örneklerden fragment analizlerinin sonucu laboratuvarımızda GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak değerlendirilmiş ve bir primerin oluşturduğu parçaların baz büyüklükleri belirlenmiştir. GeneMapper Software 5.0 programı kullanılarak DNA parça analizi sonuçlarının değerlendirilmesine ait farklı primerlerden elde edilen DNA parça büyüklükleri ile ilgili bazı örnekler aşağıdaki şekillerde verilmiştir (Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16).



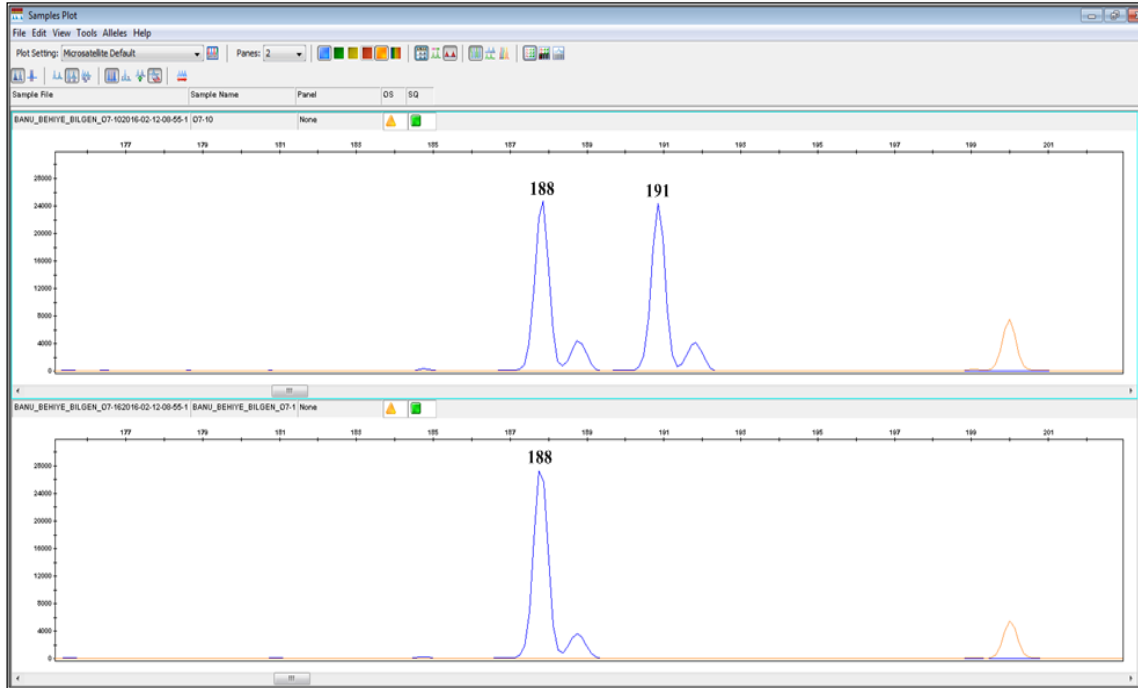
Şekil 3.11. OCUM-70 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



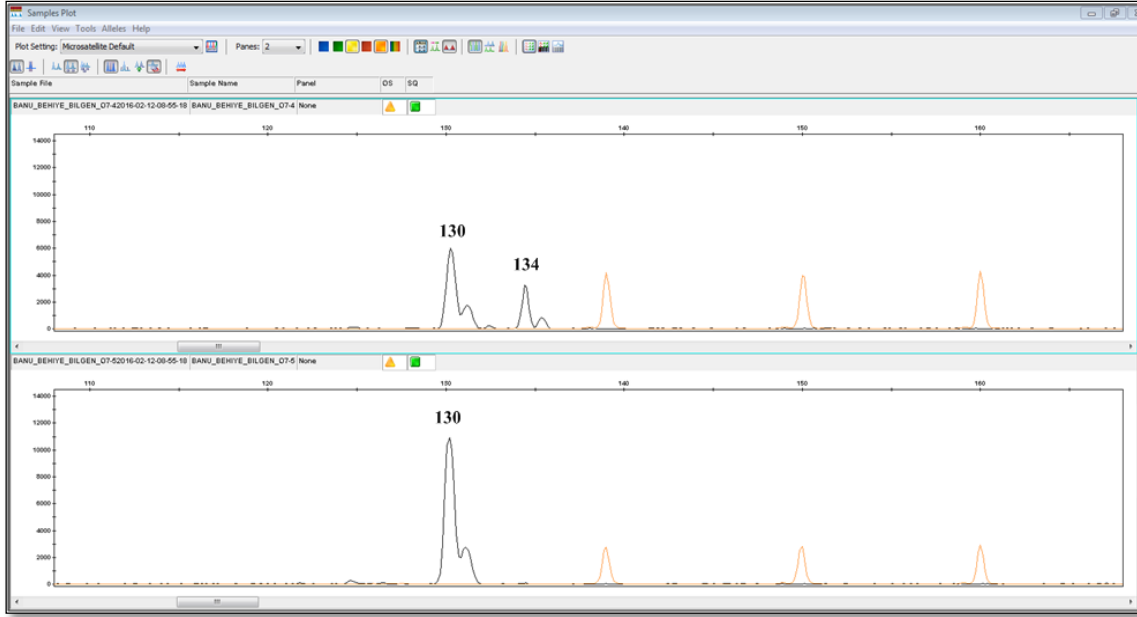
Şekil 3.12. OCUM-87 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



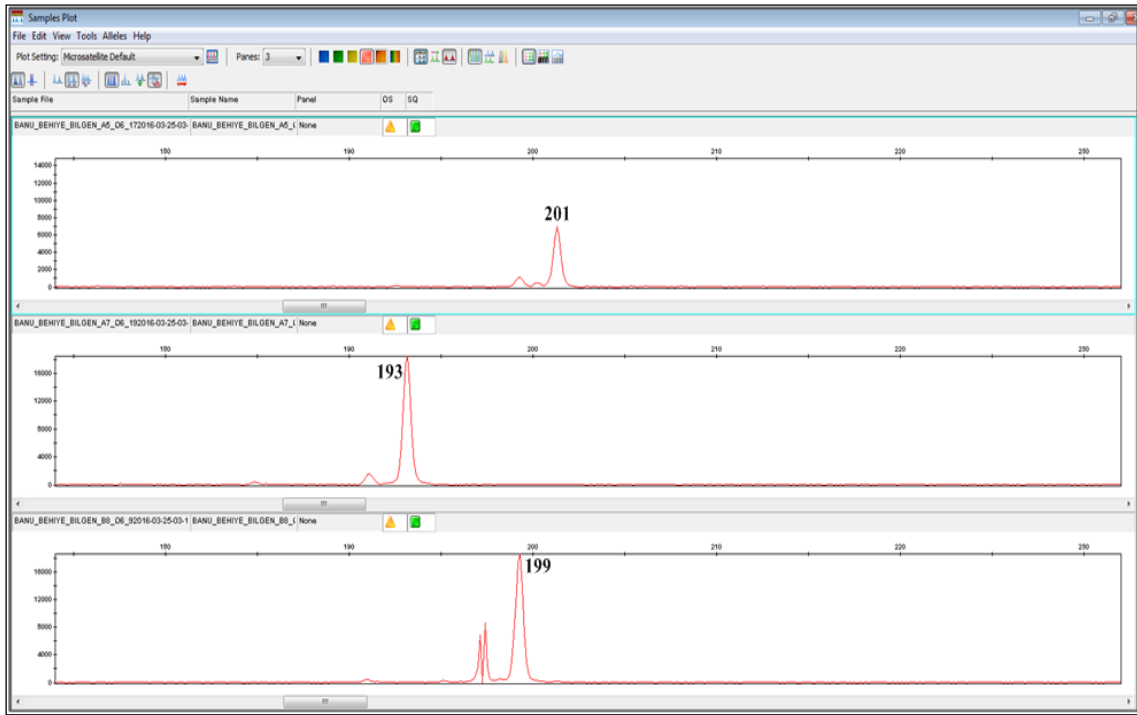
Şekil 3.13. OCUM-108 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



Şekil 3.14. OCUM-141 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



Şekil 3.15. OCUM-160 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



Şekil 3.16. OCUM-196 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü

3.6 Verilerin istatistiksel analizi

Bütün populasyonlar göz önüne alındığında iki ve/veya daha fazla allele sahip olan mikrosatellit bölgesi polimorfik lokus olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle polimorfizm ölçütü olarak, bir lokustaki allel sayısı dikkate alınmıştır. Populasyonların genetik yapısını ve çeşitliliğini belirleyebilmek için her bir populasyonda, polimorfik lokuslar ve yüzdeleri, polimorfik lokuslardaki gözlenen allel sayısı (N_a), etkili allel sayısı (N_e), beklenen heterozigotluk (H_e), gözlenen heterozigotluk (H_o), Shannon sabiti (I) ve standart hataları hesaplanmıştır. Polimorfik lokusların toplam lokus sayısına bölünmesi ile polimorfizm yüzdesi belirlenmiştir. Ortalama allel sayısı, çalışılan her bir populasyondaki her bir lokusun sahip olduğu allel sayısının aritmetik ortalaması alınarak bulunur. Her bir populasyonun genetik çeşitliliği, gözlenen ve Hardy-Weinberg dengesinde beklenen heterozigotluk düzeyleri hesaplanarak belirlenir (Hartl ve Clark 1989). Polimorfik bilgi içeriği (PIC), bir belirtecin populasyon içindeki polimorfizm değerini belirlemede kullanılan önemli bir parametredir. PIC değeri, bir lokusa ait allel sayısına ve allellerin populasyon içindeki dağılımına göre değişebilir. Çalışmada kullanılan bireylerdeki her bir nSSR lokusu için polimorfik bilgi içeriği (PIC) değeri Botstein ve ark. (1980)'nin formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel analizlerde elde edilen ham veriler POPGENE (Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic analysis, Version 1.32) (Yeh ve ark. 1999) ve GenAlEx [(Version 6.5) (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>)] (Peakall ve Smouse 2006) istatistik paket programları kullanılarak değerlendirilmiştir. Basamaklı mutasyon modeline göre moleküler varyans analizinde (AMOVA) ARLEQUIN [(Versiyon 3.11) (Excoffier ve ark. 2005) istatistik programından yararlanılmıştır (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>)]. Nei'nin (1987) populasyonlar arasındaki genetik farklılaşma düzeyini belirleyebilmek ve yakın bağlantı ağaçlarını (neighbor-joining trees) oluşturmak 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, Işık ve ark. 2005). Bu yöntemler genel olarak numerik taksonomide farklı taksonların (alt tür, tür veya daha üst düzey taksonomik birimlerin) birbirleri ile olan benzerlik veya farklılık derecelerini bulmak için kullanılır (Sneath ve Sokal 1973).

4. BULGULAR

4.1 Nükleer Mikrosatellit (nSSR) Primerlerine ait Allellerin Belirlenmesi

Nükleer mikrosatellit (nSSR) primerlerine ait allellerin belirlenmesi için; çalışılan her bir primer bir lokus ve her bir primerin çoğalttığı farklı nükleotid uzunluğundaki DNA parçaları tek bir allel olarak değerlendirildi. Bu ilkeye dayanarak, analiz edilen sekiz nSSR primeri için, altı orobanş populasyonundan çalışılan toplam 120 bireyin her birinin sahip olduğu alleller belirlendi ve allellerin frekansları ayrı ayrı hesaplandı (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1’de çalışılan altı farklı populasyon (P1, P2, P3, P4, P5, P6) ve sekiz nSSR lokusuna (OCUM-52, OCUM-70, OCUM-81, OCUM-87, OCUM-108, OCUM-141, OCUM-160, OCUM-196) ait primerler ve baz çifti (bç) olarak büyüklükleri verilmiştir. Bütün populasyonlar bir bütün olarak ele alındığında sekiz nSSR primerinin hepsi polimorfik olarak saptanmıştır. Populasyonlar ayrı ayrı değerlendirildiğinde P1, P3, P4 ve P6 populasyonlarında polimorfizm yüzdesi %87,5, P2 ve P5 populasyonlarında ise %100 olarak hesaplanmıştır. Çalışılan nSSR primerlerinden OCUM-70 primeri P1 populasyonunda, OCUM-141 primeri P4 populasyonunda, OCUM-196 primeri ise P3 ve P6 populasyonlarında monomorfik olarak değerlendirilmiştir. Analiz edilen orobanş populasyonlarına ait bireylerde 8 nSSR lokusu için toplam 23 allel belirlenmiştir. Tez çalışmasında kullanılan nSSR primerlerinden en çok allel (6) OCUM-81 primerinde görülmüştür. OCUM-70, OCUM-108, OCUM-141 ve OCUM-160 primerlerinde 2’şer allel, OCUM-52, OCUM-87 ve OCUM-196 primerlerinde ise 3’er allel saptanmıştır.

OCUM-52 primeri için hesaplanan allel frekanslarına bakıldığında 128 ve 136 bç’lik alleller bütün populasyonlarda gözlenirken, 124 bç’lik allel sadece P3 populasyonunda gözlenmiştir ($f=0,075$) ve P3 populasyonuna (Karamusul/Lüleburgaz/Kırklareli-2013) özgü allel (private allel) olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1). 128 bç büyüklüğündeki allel en yüksek frekansta P5 populasyonunda ($f=0,950$), 136 bç büyüklüğündeki allel ise en yüksek frekansta P3 populasyonun ($f=0,675$) belirlenmiştir.

OCUM-70 primeri için hesaplanan allel frekans değerleri incelendiğinde 103 ve 105 bç’lik alleller (P1 populasyonu hariç) bütün populasyonlarda gözlenmiştir. P1 populasyonunda sadece 105 bç’lik allel belirlendiği için bu lokus monomorfik olarak değerlendirilmiştir. 105 bç’lik allel bütün populasyonlarda yaygın olarak gözlenen alleldir.

OCUM-81 primeri için hesaplanan allel frekansları göz önüne alındığında en fazla allel sayısının bu primerde olduğu görülmektedir. 73 bç’lik allel P2 ve P3 populasyonları hariç diğer populasyonlarda saptanmıştır. 77 bç’lik allel sadece P4 (Kuleli/Babeski/Kırklareli-2013)

populasyonunda gözleendiği için bu populasyona ait özgü allel olarak değerlendirilmiştir (f=0,025) (Çizelge 4.1). 83 bç'lik allel P1 populasyonu hariç diğer populasyonlarda gözlenmiştir. 85 bç'lik allel P1 ve P5 populasyonlarında gözlenmezken diğer populasyonlarda gözlenmiştir. 97 bç'lik allel bütün populasyonlarda belirlenmiştir. 99 bç'lik allel ise P5 populasyonu hariç diğer populasyonlarda saptanmıştır.

Çizelge 4.1. Çalışmada analiz edilen sekiz (8) nSSR lokusuna ait allellerin altı (6) orobanş populasyonundaki frekansları

Primer	Allel	Allel frekansları(f)					
		P1	P2	P3	P4	P5	P6
OCUM-52	124	0,000	0,000	0,075*	0,000	0,000	0,000
	128	0,775	0,700	0,250	0,600	0,950	0,925
	136	0,225	0,300	0,675	0,400	0,050	0,075
OCUM-70	103	0,000	0,125	0,075	0,375	0,175	0,425
	105	1,000	0,875	0,925	0,625	0,825	0,575
OCUM-81	73	0,225	0,000	0,000	0,025	0,025	0,150
	77	0,000	0,000	0,000	0,025*	0,000	0,000
	83	0,000	0,150	0,100	0,025	0,850	0,050
	85	0,000	0,375	0,050	0,075	0,000	0,025
	97	0,300	0,250	0,400	0,375	0,125	0,450
	99	0,475	0,225	0,450	0,475	0,000	0,325
OCUM-87	122	0,000	0,000	0,100	0,000	0,075	0,000
	125	0,300	0,900	0,725	0,425	0,700	0,050
	131	0,700	0,100	0,175	0,575	0,225	0,950
OCUM-108	140	0,800	0,775	0,200	0,450	0,700	0,500
	144	0,200	0,225	0,800	0,550	0,300	0,500
OCUM-141	188	0,925	0,400	0,950	1,000	0,100	0,875
	191	0,075	0,600	0,050	0,000	0,900	0,125
OCUM-160	130	0,225	0,725	0,300	0,175	0,650	0,450
	134	0,775	0,275	0,700	0,825	0,350	0,550
OCUM-196	193	0,125*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	199	0,375	0,025	0,000	0,175	0,175	0,000
	201	0,500	0,975	1,000	0,825	0,825	1,000

* Populasyona özgü (private) alleller

OCUM-87 primeri için hesaplanan allel frekansı değerlerine bakıldığında 125 ve 131 bç'lik alleller bütün populasyonlarda gözlenmiştir. 122 bç büyüklüğündeki allel ise sadece P3 ve P5 populasyonlarında görülmüştür (sırasıyla $f=0,100$ ve $f=0,075$). 125 bç'lik allel en yüksek ($f=0,900$) P2 populasyonunda gözlenirken, 131 bç'lik allel en yüksek ($f=0,950$) P6 populasyonunda gözlenmiştir.

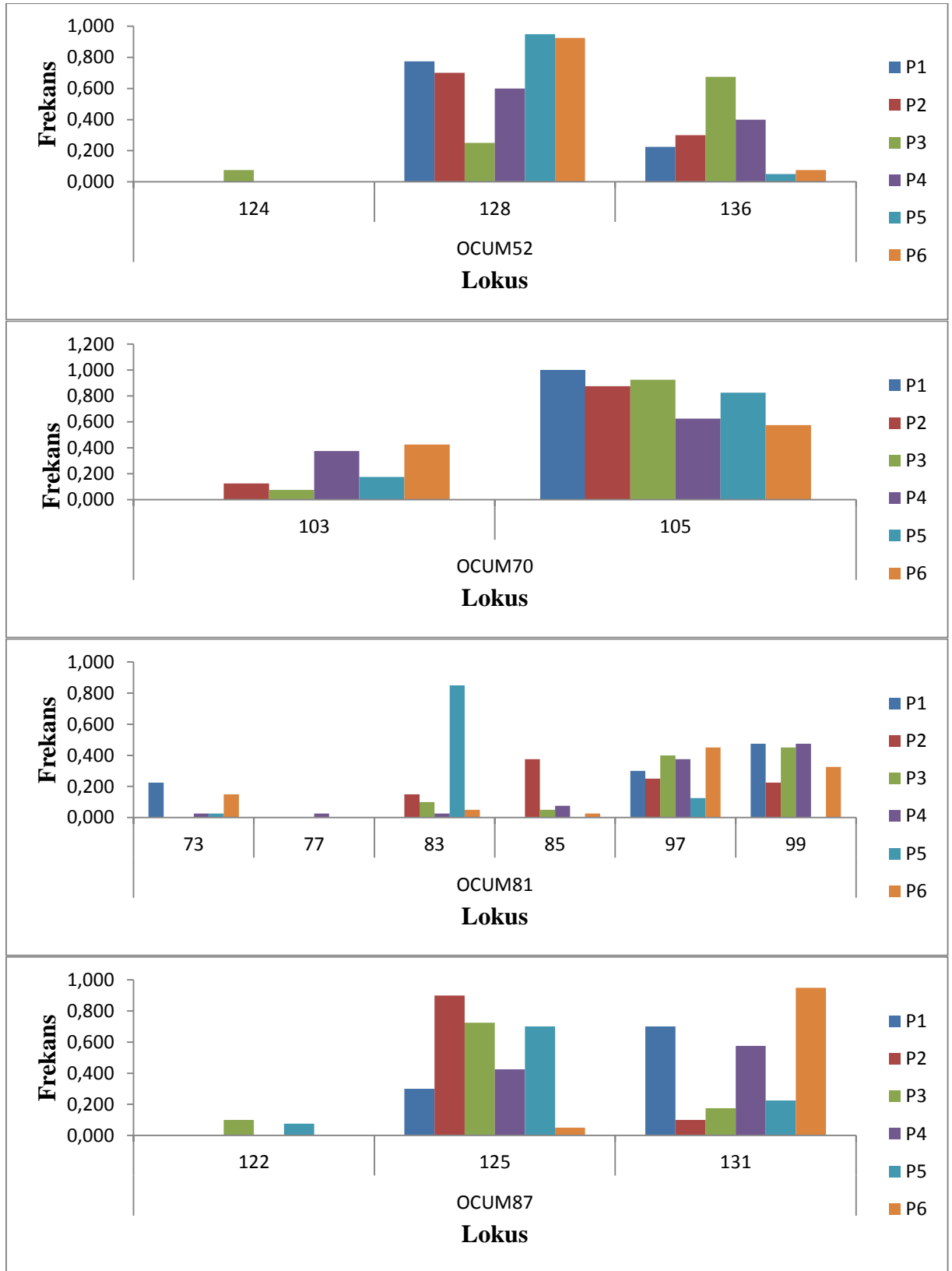
OCUM-108 primerine için hesaplanan allel frekansı değerleri incelendiğinde 140 ve 144 bç'lik alleller bütün populasyonlarda saptanmıştır. 140 bç'lik allel P1, P2 ve P5 populasyonlarında yüksek frekansa gözlenirken, 144 bç'lik allel P3 ve P4 populasyonlarında yüksek frekansa gözlenmiştir. P6 populasyonunda ise bu iki allel eşit frekansa gözlenmiştir.

OCUM-141 primeri için hesaplanan allel frekans değerleri göz önüne alındığında 188 ve 191 bç'lik alleller (P4 populasyonu hariç) bütün populasyonlarda gözlenmiştir. P4 populasyonunda sadece 188 bç'lik allel belirlendiği için bu lokus monomorfik olarak değerlendirilmiştir. 188 bç'lik allel P2 ve P5 populasyonu hariç diğer populasyonlarda yaygın olarak gözlenen alleldir. P2 ve P5 populasyonunda (Tekirdağ iline ait populasyonlar) ise 191 bç'lik allel yaygın olarak gözlenmiştir.

OCUM-160 primeri için 130 ve 134 bç'lik iki allel belirlenmiştir. Hesaplanan allel frekansları göz önüne alındığında bu iki allel bütün populasyonlarda gözlenmiştir. 130 bç'lik allel yaygın olarak P2 ve P5 populasyonlarında (Tekirdağ iline ait populasyonlar) gözlenmiştir. 134 bç'lik allel ise P1, P3, P4 ve P6 populasyonlarında (Edirne ve Kırklareli illerine ait populasyonlar) yaygın olarak saptanmıştır.

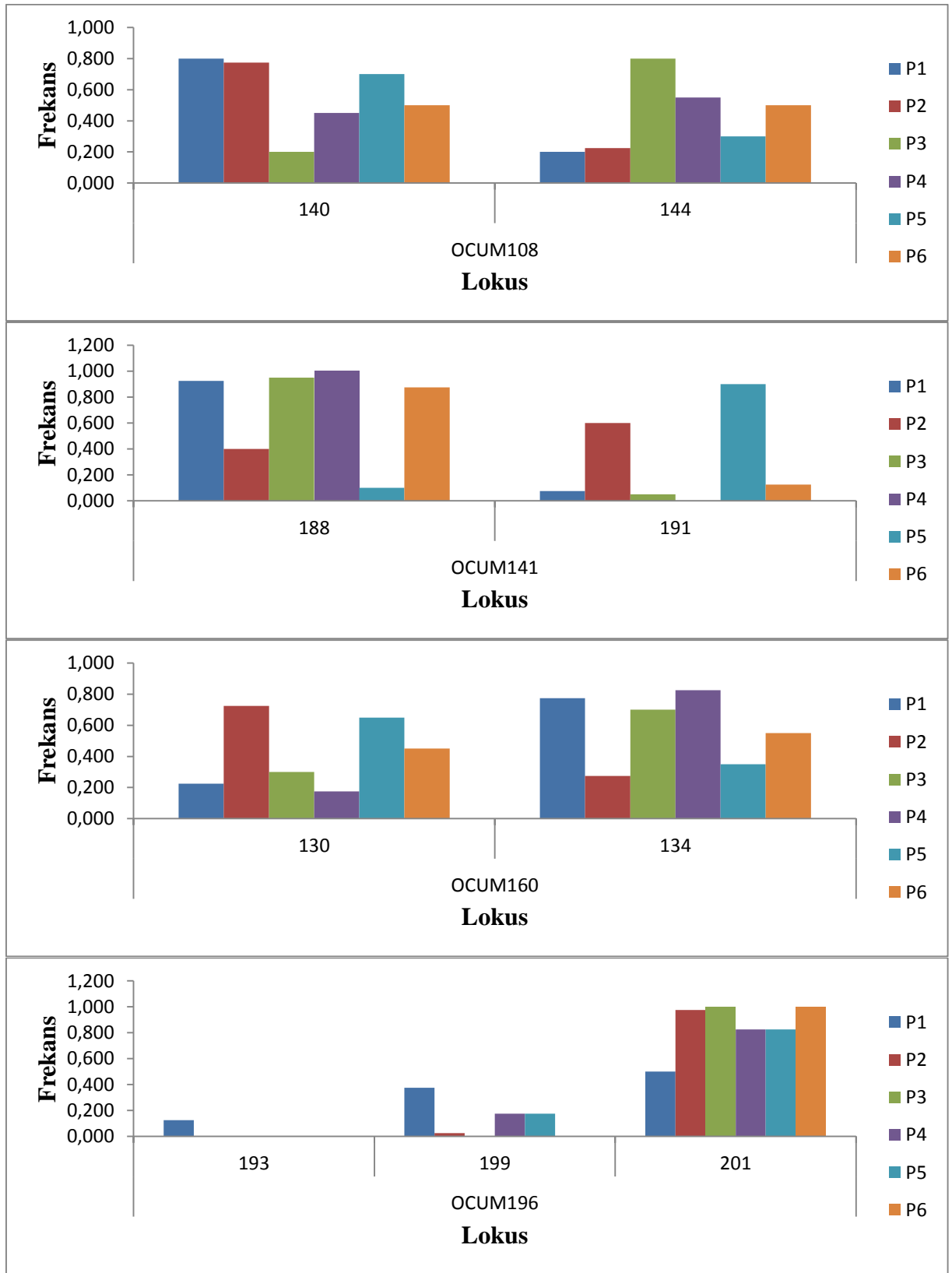
OCUM-196 primeri için 193, 199 ve 201 bç'lik üç allel saptanmıştır. Her bir allelin frekans değerlerine bakıldığında 193 bç'lik allel sadece P1 populasyonunda görüldüğü için populasyona özgü allel olarak değerlendirilmiştir ($f=0,125$) (Çizelge 4.1). P3 ve P6 populasyonlarında sadece 201 bç'lik allel belirlendiği için bu lokuslar monomorfik olarak değerlendirilmiştir. 201 bç'lik allele bütün populasyonlarda rastlanmıştır.

Her bir lokustaki allellerin ele alınan bütün populasyonlara göre dağılımına bakıldığında, bazı allellerin sadece belirli bir populasyona özgü allel olduğu (private allel) görülmüştür (Şekil 4.1). Populasyona özgü alleller P1 (Avarız/Merkez/Edirne-2012), P3 (Karamusul/Lüleburgaz/Kırklareli-2013) ve P4 (Kuleli/Babaeski/Kırklareli-2013) populasyonlarında (her birinde 1 allel) gözlenmiştir. Diğer populasyonlarda ise populasyona özgü allel gözlenmemiştir.



Şekil 4.1. Çalışmada analiz edilen polimorfik nSSR lokuslarının her birindeki allellerin, allel büyüklüklerine göre çalışılan populasyonlardaki frekans dağılımları

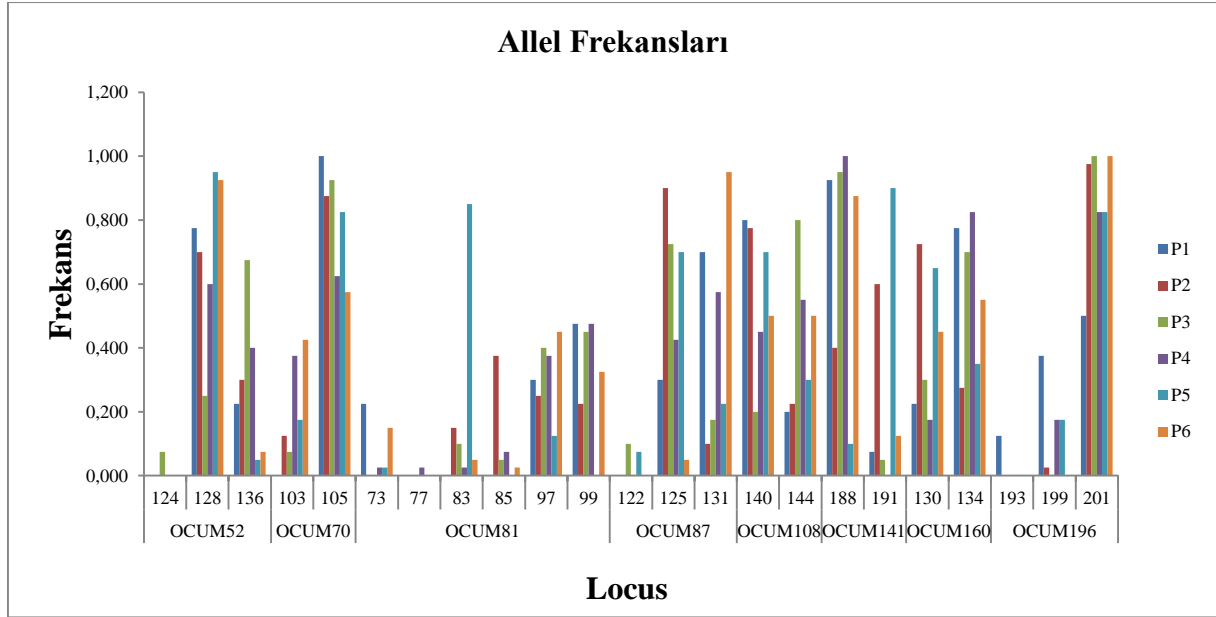
Şekil 4.1. devam



Şekil 4.1. Çalışmada analiz edilen polimorfik nSSR lokuslarının her birindeki allellerin, allel büyüklüklerine göre çalışılan populasyonlardaki frekans dağılımları

4.2 Gen Frekansları ve Genetik Çeşitlilik

Tez çalışması kapsamında Trakya Bölgesinden 6 farklı orobanş popülasyonundan belirlenen toplam 120 bireyde 8 farklı nSSR lokusuna ait toplam 23 allel belirlenmiştir. Her bir nSSR lokusunda ve her bir popülasyonda gözlenen alleller karşılaştırmalı olarak Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. nSSR lokuslarına ait allellerin altı orobanş popülasyonunda frekans dağılımları

Çalışmada örneklenen orobanş popülasyonları [Avarız/Merkez/Edirne-2012 (P1), Ballıhoca/Muratlı/Tekirdağ-2012 (P2), Karamusul/Lüleburgaz/Kırklareli-2013 (P3), Kuleli/Babaeski/Kırklareli-2013 (P4), Ballıhoca/Muratlı/Tekirdağ-2013 (P5) ve Avarız/Merkez/Edirne-2011 (P6)] için hesaplanan genetik çeşitlilik parametreleri ve polimorfik bilgi içeriği (PIC) değerleri (Botstein ve ark. 1980) Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Ortalama allel sayısı (N_a) 2,125 (P1 popülasyonu) ile 2,375 arasında (P3 ve P4 popülasyonları), etkili allel sayısı (N_e) ise 1,485 (P5 popülasyonu) ile 1,779 (P4 popülasyonu) arasında değişmektedir. En yüksek allel sayısı P3 ve P4 popülasyonlarında (19 allel), en düşük allel sayısı ise P1 popülasyonunda (17 allel) gözlenmiştir. Çalışılan popülasyonların hepsi ele alındığında ortalama N_e değeri $1,167 \pm 0,082$ olarak bulunmuştur. Popülasyon içindeki varyasyonun belirlenmesi için bir gösterge olan Shannon sabiti (I), $0,603 \pm 0,117$ değeri ile en yüksek P4 popülasyonunda, $0,497 \pm 0,065$ değeri ile en düşük P5 popülasyonunda hesaplanmıştır. Yüksek I değeri popülasyon içi varyasyonun önemli oranda olduğunun göstergesidir. Çalışılan altı popülasyon için ortalama Shannon sabiti (I) $0,547 \pm 0,046$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Çalışılan altı orobanş popülasyonuna ait genetik çeşitlilik parametreleri

Popülasyon	Lokus	N*	N _a *	N _e *	I*	H _o *	H _e *	PIC*
P1	OCUM52	20	2,000	1,536	0,533	0,250	0,349	0,288
	OCUM70	20	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	OCUM81	20	3,000	2,730	1,050	0,050	0,634	0,634
	OCUM87	20	2,000	1,724	0,611	0,200	0,420	0,319
	OCUM108	20	2,000	1,471	0,500	0,100	0,320	0,320
	OCUM141	20	2,000	1,161	0,266	0,150	0,139	0,139
	OCUM160	20	2,000	1,536	0,533	0,150	0,349	0,349
	OCUM196	20	3,000	2,462	0,974	0,050	0,594	0,594
	Ortalama	20	2,125 (±0,227)	1,702 (±0,213)	0,559 (±0,121)	0,119 (±0,030)	0,350 (±0,075)	0,316
P2	OCUM52	20	2,000	1,724	0,611	0,200	0,420	0,319
	OCUM70	20	2,000	1,280	0,377	0,250	0,219	0,195
	OCUM81	20	4,000	3,620	1,335	0,250	0,724	0,674
	OCUM87	20	2,000	1,220	0,325	0,200	0,180	0,164
	OCUM108	20	2,000	1,536	0,533	0,450	0,349	0,288
	OCUM141	20	2,000	1,923	0,673	0,100	0,480	0,365
	OCUM160	20	2,000	1,663	0,588	0,250	0,399	0,319
	OCUM196	20	2,000	1,051	0,117	0,050	0,049	0,048
	Ortalama	20	2,250 (±0,250)	1,752 (±0,286)	0,570 (±0,127)	0,219 (±0,042)	0,352 (±0,073)	0,296
P3	OCUM52	20	3,000	1,909	0,806	0,450	0,476	0,413
	OCUM70	20	2,000	1,161	0,266	0,150	0,139	0,129
	OCUM81	20	4,000	2,667	1,106	0,000	0,625	0,551
	OCUM87	20	3,000	1,766	0,768	0,250	0,434	0,390
	OCUM108	20	2,000	1,471	0,500	0,300	0,320	0,269
	OCUM141	20	2,000	1,105	0,199	0,100	0,095	0,091
	OCUM160	20	2,000	1,724	0,611	0,100	0,420	0,343
	OCUM196	20	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Ortalama	20	2,375 (±0,324)	1,600 (±0,193)	0,532 (±0,129)	0,169 (±0,055)	0,314 (±0,076)	0,273
P4	OCUM52	20	2,000	1,923	0,673	0,100	0,480	0,365
	OCUM70	20	2,000	1,882	0,662	0,750	0,469	0,359
	OCUM81	20	6,000	2,676	1,192	0,200	0,626	0,557
	OCUM87	20	2,000	1,956	0,682	0,050	0,489	0,369
	OCUM108	20	2,000	1,980	0,688	0,200	0,495	0,373
	OCUM141	20	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	OCUM160	20	2,000	1,406	0,464	0,150	0,289	0,247
	OCUM196	20	2,000	1,406	0,464	0,250	0,289	0,247
	Ortalama	20	2,375 (±0,532)	1,779 (±0,179)	0,603 (±0,117)	0,213 (±0,082)	0,392 (±0,069)	0,315

Çizelge 4.2. devam

Populasyon	Lokus	N*	N _a *	N _e *	I*	H _o *	H _e *	PIC*
P5	OCUM52	20	2,000	1,105	0,199	0,100	0,095	0,091
	OCUM70	20	2,000	1,406	0,464	0,350	0,289	0,247
	OCUM81	20	3,000	1,354	0,490	0,200	0,261	0,238
	OCUM87	20	3,000	1,831	0,780	0,400	0,454	0,247
	OCUM108	20	2,000	1,724	0,611	0,400	0,420	0,332
	OCUM141	20	2,000	1,220	0,325	0,100	0,180	0,164
	OCUM160	20	2,000	1,835	0,647	0,100	0,455	0,455
	OCUM196	20	2,000	1,406	0,464	0,050	0,289	0,223
	Ortalama	20	2,250 (±0,164)	1,485 (±0,099)	0,497 (±0,065)	0,213 (±0,052)	0,305 (±0,046)	0,250
P6	OCUM52	20	2,000	1,161	0,266	0,050	0,139	0,129
	OCUM70	20	2,000	1,956	0,682	0,850	0,489	0,369
	OCUM81	20	5,000	2,996	1,251	0,450	0,666	0,608
	OCUM87	20	2,000	1,105	0,199	0,000	0,095	0,091
	OCUM108	20	2,000	2,000	0,693	1,000	0,500	0,375
	OCUM141	20	2,000	1,280	0,377	0,050	0,219	0,195
	OCUM160	20	2,000	1,980	0,688	0,100	0,495	0,373
	OCUM196	20	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Ortalama	20	2,250 (±0,412)	1,685 (±0,240)	0,519 (±0,139)	0,313 (±0,144)	0,325 (±0,085)	0,268
Toplam	Ortalama	20	2,271 (±0,132)	1,667 (±0,082)	0,547 (±0,046)	0,207 (±0,031)	0,340 (±0,028)	0,286

*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.

Nei'nin (1987) beklenen (H_e) ve gözlenen (H_o) heterozigotluk değeri her bir populasyon için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Gözlenen (H_o) heterozigotluk değeri en yüksek 0,313 ± 0,144 olarak P6 populasyonunda, en düşük 0,119 ± 0,030 olarak P1 populasyonunda saptanmıştır. Beklenen (H_e) heterozigotluk değeri ise en yüksek 0,392 ± 0,069 olarak P4 populasyonunda, en düşük 0,305 ± 0,046 olarak P5 populasyonunda saptanmıştır. Ortalama beklenen (H_e) heterozigotluk değerinin ortalama gözlenen (H_o) heterozigotluk değerinden biraz yüksek değerde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

Bu tez çalışmasında kullanılan sekiz nSSR belirteci için ortalama polimorfik bilgi içeriği (PIC) değeri, P1 populasyonunda 0,316, P2 populasyonunda 0,296, P3 populasyonunda 0,273, P4 populasyonunda 0,315, P5 populasyonunda 0,250 ve P6 populasyonunda 0,268 olarak hesaplanmıştır. Analiz edilen bütün örnekler ele alındığında ortalama PIC değeri, 0,286

olarak belirlenmiştir. Ayrıca, en yüksek PIC değeri 6 allele sahip olan OCUM-81 lokusunda, en düşük PIC değeri ise OCUM-141 ve OCUM-196 lokuslarında hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).

Çalışılan altı orobanş popülasyonu çeşitliliğin kaynağını belirlemek için yapılan basamaklı mutasyon modeline göre moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçlarına göre, varyasyonun büyük oranda (%66) popülasyon içerisinde olduğu, popülasyonlar arası genetik çeşitliliğin ise nispeten düşük olduğu (%34) gözlenmiştir ($F_{ST} = 0,340$) (Çizelge 4.3). İstatistiksel analizler sonucunda, bütün örnekler ele alındığında F_{ST} değerleri OCUM-52 lokusu için 0,236, OCUM-70 lokusu için 0,151, OCUM-81 lokusu için 0,207, OCUM-87 lokusu için 0,344, OCUM-108 lokusu için 0,182, OCUM-141 lokusu için 0,551, OCUM-160 lokusu için 0,177 ve OCUM-196 lokusu için 0,201 olarak bulunmuştur. F_{IS} ve F_{IT} değerleri bütün lokuslar ele alındığında sırasıyla ortalama 0,368 ve 0,514 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Varyans (%)
Popülasyonlar-arası	5	224,967	2,051	% 34
Popülasyonlar-içi	114	453,500	3,978	% 66
Toplam	119	678,467	6,029	% 100

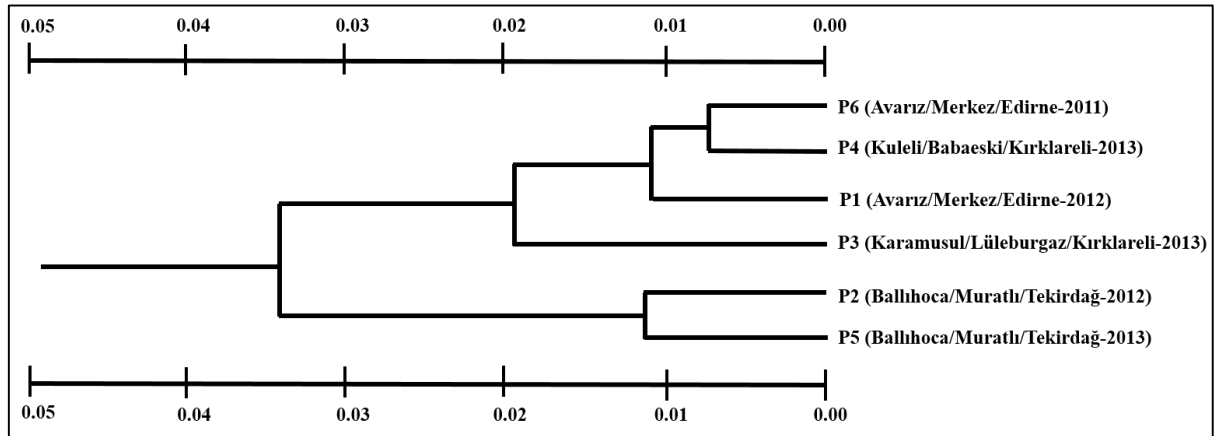
Popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın düzeyi Nei'nin tarafsız genetik benzerlik ve/veya farklılık katsayısı kullanılarak belirlenmiştir (Nei 1987). Çalışmada kullanılan 8 nSSR lokusuna ait bilgilere dayanarak elde edilen genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri Çizelge 4.4'te sunulmuştur. Genetik benzerlik değerleri 0,645 ile 0,937 arasında değişiklik göstermiştir. Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi genetik mesafe değeri en düşük (0,065) P4 (Kuleli/Babaeski/Kırklareli-2013) popülasyonu ile P6 (Avarız/Merkez7Edirne-2011) popülasyonu arasında, en yüksek (0,439) P3 (Karamusul/Lüleburgaz/Kırklareli-2013) – P5 (Ballıhoca/Muratlı/Tekirdağ-2013) popülasyonları arasında bulunmuştur. Mümkün olan bütün popülasyon çiftleri göz önüne alındığında ortalama genetik mesafe değeri 0,231 olarak hesaplanmıştır.

Bu tez çalışmasında ele alınan 6 farklı orobanş popülasyonundaki genetik farklılaşmanın görsel bir grafik üzerinde izlenebilmesi için, genetik farklılaşma değerleri UPGMA kümelendirme yöntemi kullanılarak sınıflandırıldı ve bir dendrogram yapıldı (Şekil 4.3). Bu dendrograma bakılarak popülasyonlar arasındaki genetik farklılıklar/benzerlikler

görsel olarak da anlaşılmaktadır. Dendrograma bakıldığında Trakya bölgesinden örneklenen orobanş populasyonlarının 2 gen havuzuna (veya 2 kümeye) ayrıldığı gözlenmektedir. I. kümede Kırklareli ve Edirne populasyonlarının yer aldığı ve genetik yapılarının birbirine benzer olduğu görülmektedir. Diğer kümede ise Tekirdağ populasyonları yer almıştır (Şekil 4.3).

Çizelge 4.4. *O. cumana* populasyonları arasında Nei (1987)'ye göre hesaplanan genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri (sol alt diyagonal: genetik benzerlik, sağ üst diyagonal: genetik mesafe değerleri)

Populasyonlar	P1	P2	P3	P4	P5	P6
P1	***	0,256	0,214	0,072	0,372	0,115
P2	0,774	***	0,219	0,252	0,099	0,279
P3	0,807	0,804	***	0,072	0,439	0,238
P4	0,930	0,777	0,930	***	0,422	0,065
P5	0,689	0,906	0,645	0,656	***	0,356
P6	0,891	0,756	0,788	0,937	0,701	***



Şekil 4.3. *O. cumana* populasyonlarının nSSR analizleri sonucunda genetik mesafe değerlerine göre oluşturdukları dendrogram (UPGMA'ya göre)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, Trakya Bölgesinin 3 ilindeki (Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ) ayçiçeği tarlalarından toplanan 6 farklı orobanş (*Orobancha cumana*) populasyonuna ait tohumlar kontrollü ortamda olan orobanşa dirençsiz Özdemirbey isimli ayçiçeği çeşidi kullanılarak yetiştirilmiştir. Henüz çiçeklenme aşamasına geçmeden toplanan taze doku örnekleri kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen DNA örnekleri kullanılarak sekiz nSSR lokusu (OCUM-52, OCUM-70, OCUM-81, OCUM-87, OCUM-108, OCUM-141, OCUM-160 ve OCUM-196) ile PCR analizleri yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin bç olarak büyüklükleri DNA parça (fragment) analizleri ile belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında; çalışılan 8 populasyon için 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 parametreler hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). AMOVA sonuçları ve Nei (1987)'ye göre hesaplanan genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri Çizelge 4.3'te ve 4.4'te verilmiştir. Yapılan analizler sonucu elde edilen verilerle *O. cumana* populasyonlarının genetik yapısı ve genetik çeşitliliği hakkında önemli bilgilere ulaşılmıştır.

Orobanş ile yapılmış daha önceki çalışmalara bakıldığında; orobanşın farklı kültür bitkilerin de yaptığı zararlara karşı mücadele yöntemleri, orobanş kök parazitinin bitki köklerine verdiği zarar nedeniyle bitki bünyesindeki etkileri, orobanşa karşı mücadelede farklı kimyasalların etkileri, canavar otunun tarlalardaki bulaşık ve yoğunluğunun belirlenmesi gibi konulara rastlanmaktadır. Orobanş populasyonlarının populasyon-içi ve populasyonlar-arası genetik yapısının ve çeşitliliğinin belirlenmesi üzerine özellikle güvenilirliği ve geçerliliği yüksek belirteç teknolojisi kullanılarak yapılan moleküler çalışmalar çok nadirdir. Verkleij ve ark. (1986) ve Castejon-Munoz ve ark. (1991) tarafından izoenzim belirteçleri kullanılarak *Orobancha* cinsine ait genetik çeşitliliğin belirlenmesi çalışmaları belirteç kullanılarak yapılan ilk çalışmalar arasındadır. Daha sonraları ise RAPD ve ISSR belirteçleri kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (Katzir ve ark. 1996, Gagne ve ark. 1998, Gagne ve ark. 2000, Benharrat ve ark. 2002, Roman ve ark. 2002). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise yüksek derecede polimorfik, kodominant ve çoklu allelik olma özelliklerinden dolayı SSR belirteçleri kullanılmaya başlanmıştır (Pineda-Martos ve ark. 2013, Guchetl ve ark. 2014a, 2014b, Pineda-Martos ve ark. 2014a, 2014b, Martin-Sanz ve ark. 2016). Yapılan kaynak taraması sonucunda ülkemizde bu konuda yapılmış moleküler çalışmanın tam olarak mevcut olmadığı, sadece yabancı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ülkemizin bazı bölgelerindeki *O. cumana* populasyonlarından örnekler alınarak çalışmalarına dahil edildiği görülmüştür.

Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan 8 nSSR lokusunun, çalışılan altı populasyon bir bütün olarak ele alındığında, hepsi polimorfik olarak saptanmıştır. Populasyonlar ayrı ayrı değerlendirildiğinde P1 populasyonunda OCUM-70, P3 ve P6 populasyonunda OCUM-196 ve P4 populasyonunda OCUM-141 lokusları monomorfik olarak saptanmıştır. P2 ve P5 populasyonlarında ise polimorfizm oranı %100 olarak hesaplanmıştır. Benzer genetik çalışmalarla karşılaştırıldığında; Pineda-Martos ve ark. (2013)'nin İspanya'dan toplanan 50 orobanş poplasyonunun genetik çeşitliliğini belirlemek için 15 SSR lokusu kullanılarak yaptıkları çalışmada bütün lokuslar polimorfik olarak bildirilmiştir. Guchetl ve ark. (2014a, 2014b) tarafından yapılan çalışmalarda Rusya, Kazakistan ve Romanya populasyonlarının genetik benzerliklerinin belirlenmesi için 9 SSR lokusu kullanılmış ve bu lokuslar Rusya ve Kazakistan populasyonlarında %100, Romanya populasyonunda ise %11,11 oranında polimorfik olarak belirlenmiştir. Molinero-Ruiz ve ark. (2014)'nin çalışmasında Macaristan, Romanya, İspanya ve Türkiye'den 11 *O. cumana* populasyonunun moleküler çeşitliliği 18 polimorfik RAPD primeri ile belirlenmiş, 25-2213 bp uzunluğunda 100 polimorfik bant gözlenmiştir. Gagne ve ark. (1998), İspanya ve doğu Avrupa'dan örneklenen 8 *O. cumana* poplasyonunda %43 oranında polimorfik RAPD bantları, bir diğer çalışmalarında ise 2 populasyona ait 48 bireyde %29 oranında AFLP polimorfizmi bildirmişlerdir (Gagne ve ark. 2000). Pineda-Martos ve ark. (2014a) tarafından yapılan çalışmada *O. cumana* bitkisinde elde edilen SSR belirteçlerinin polimorfizm oranının diğer belirteçlerden elde edilenden yüksek olduğu bildirilmiştir (%50,3). Yapılan çalışmalar göstermektedir ki bu farklılıklar hem çalışılan belirteç sisteminden hem de çalışılan populasyonların farklı coğrafik kökenleri olmasından kaynaklanmaktadır.

Çalışmada kullanılan 8 SSR belirteçine ait ortalama polimorfik bilgi içeriği (PIC) değeri en düşük (0.157) OCUM-141, en yüksek (0,532) OCUM-81 lokusunda gözlenmiştir. SSR belirteçleri PIC değerlerine göre; yüksek derecede ($PIC > 0,5$), orta derecede ($0,25 < PIC < 0,5$) ve çok az derecede ($PIC < 0,25$) bilgi verici (informative) olarak gruplandırılabilir. Tez çalışmasında kullanılan SSR belirteçleri, Pineda-Martos ve ark. (2014a) tarafından geliştirilen 79 SSR lokusundan PIC değerleri dikkate alınarak seçilmiştir. Tez çalışması için seçilen SSR lokuslarının Pineda-Martos ve ark. (2014a)'nın çalışmasındaki PIC değerleri 0,450'den büyüktür. Bu tez çalışması hem coğrafik hem de örnek sayısı açısından daha sınırlı populasyonlar üzerinde yapıldığı için bazı lokusların PIC değerinin nispeten düşük çıkması mümkündür. Pineda-Martos ve ark. (2014a) tarafından yapılan çalışmada geliştirilen 79 SSR lokusunun 20 tanesinin PIC değeri 0,5'in üstünde, 39 tanesinin PIC değeri 0,25 ile 0,5 arasında, 20 tanesinin ise 0,25'den küçük olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 4.2'deki veriler sekiz orobanş popülasyonuna ait bireylerin genetik çeşitliliğine ait bilgileri ortaya koymuştur. Çalışılan sekiz nSSR lokusu değerlendirildiğinde toplam 23 allel saptanmıştır. Her bir popülasyonda bütün SSR lokusları birlikte değerlendirildiğinde gözlenen allel sayısı 17 ile 19 arasında, popülasyon başına düşen ortalama allel sayısı ise 18,17 olarak belirlenmiştir. Her bir SSR lokusu ayrı olarak değerlendirildiğinde popülasyondaki her bir lokus için ortalama allel sayısı 2,271 ($\pm 0,132$) olarak hesaplanmıştır. Pineda-Martos ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada 15 nSSR lokusu kullanılarak (8 tanesi bu tez çalışmada kullanılan lokuslar ile ortak) yapılan çalışmada toplam 33 allel, lokus başına 2 ile 3 arasında allel olarak bildirilmiştir. Çalışmada, ana gen havuzundan uzak bulunan 4 İspanya popülasyonunun lokus başına düşen ortalama allel sayıları en düşük 1,40, en yüksek 2,13 ve etkili allel sayıları en düşük 1,33 ve en yüksek 2,07 olarak bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen etkili allel sayısı 1,485 ile 1,779 arasında (ortalama $1,667 \pm 0,082$) hesaplanmıştır, hesaplanan değer ile Pineda-Martos ve ark. (2013)'nin çalışmasında elde edilen değer arasında paralellik bulunmaktadır. Pineda-Martos ve ark. (2014a) tarafından yapılan çalışmada *O. cumana* için geliştirilen 79 SSR primeri için 2 ile 10 arasında allel gözlendiği bildirilmiştir. Pineda-Martos ve ark. (2014b), Bulgaristan ve İspanya'daki 14 *O. cumana* popülasyonunda 15 SSR lokusunda toplam 38 allel (lokus başına 2-4) bildirilmiştir. SSR belirteçleri kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada, Guchetl ve ark. (2014a), Rusya, Kazakistan ve Romanya'ya ait 24 popülasyonda 9 SSR lokusu için toplam 21 allel (lokus başına 2-4) belirlemişlerdir. Literatürdeki farklı *O. cumana* popülasyonlarında SSR kullanılarak yapılan çalışmalar ile bu tez çalışmasındaki SSR lokusları, lokuslarda gözlenen bant büyüklükleri ve lokuslarda gözlenen allel sayıları sonuçları birbiri ile uyumludur.

Çalışılan lokuslardaki genetik çeşitliliğin en temel ölçülerinden biri allelik zenginliğin ve popülasyona özgü allellerin belirlenmesidir. Bu bağlamda, çalışmada P1 (Avarız/Merkez/Edirne-2012), P3 (Karamusul/Lüleburgaz/Kırklareli-2013) ve P4 (Kuleli/Babaeski/Kırklareli-2013) popülasyonlarında, sırasıyla OCUM-196 (193 bç allel), OCUM-52 (124 bç allel) ve OCUM-81 (77 bç allel) lokuslarına ait 1'er tane olmak üzere toplam 3 adet popülasyona özgü (private) allel belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Tekirdağ ilinden örneklenen popülasyonlarda ise popülasyona özgü (private) allel gözlenmemiştir. Pineda-Martos ve ark. (2014b) tarafından yapılan çalışmada 14 popülasyondan 1 tanesinde (Bulgaristan popülasyonu) sadece 1 tane popülasyona özgü allel gözlendiği diğer popülasyonlarda gözlenmediği bildirilmiştir. Atanasova ve ark. (2005) tarafından Bulgaristan, Romanya, Türkiye, İspanya, Rusya, Ukrayna ve İsrail'de yayılış gösteren *Phelipanche ramosa* ve *O. cumana* türlerinde 6 RAPD belirteci kullanılarak yapılan çalışmada RAPD

primerlerinden bir tanesinin 660 bç, 780 bç ve 1250 bç uzunluğunda bantlar oluşturduğu ve bu bantların *O. cumana* bitkisine özgü olduğu bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada 750 bç uzunluğundaki bantın ise *P. ramosa* populasyonlarında gözleendiği belirtilmiştir. Bütün RAPD lokusları ele alındığında farklı coğrafik bölgelerden örneklenen populasyonlar arası yüksek çeşitlilik gözleendiği rapor edilmiştir.

Tez çalışmamız sonucunda genetik çeşitlilik parametrelerinden biri olan Shannon sabiti (I) en yüksek P4 (Kuleli/Babaeski/Kırklareli-2013) populasyonunda ($0,603 \pm 0,117$), en düşük P5 (Ballıhoca/Muratlı/Tekirdağ-2013) populasyonunda ($0,497 \pm 0,065$) hesaplanmıştır. Nispeten yüksek I değeri (ortalama 0,547) populasyon içindeki çeşitliliğin yüksek olduğunun bir göstergesidir. Pineda-Martos ve ark. (2014b), yabancı konukçu bitkilerden toplanan *O. cumana* populasyonlarında ortalama Shannon sabiti (I) $0,299 \pm 0,03$, ayçiçeği tarlalarından toplanan Bulgaristan ve İspanya populasyonlarında ise sırasıyla $0,099 \pm 0,05$ ve $0,010 \pm 0,01$ olarak bildirmiştir. Pineda-Martos ve ark. (2014b)'nın çalışmasında elde edilen son derece düşük I değerinin populasyonların oluşumunda etkili olan kurucu (founder) etkisi sayesinde olabileceği rapor edilmiştir. Çok düşük sayıda bireyden oluşan populasyonlarda kurucu etkisinden dolayı genetik çeşitlilikte azalma ve bazı allellerin frekansının düşük olması veya bazı allellerin kaybolması gözlenir. Guchetl ve ark. (2014a, 2014b) tarafından yapılan çalışmada ise I değeri Kazakistan ve Rusya populasyonları için en yüksek (0,63), Romanya populasyonları için en düşük (0,05) bulunmuştur. *O. cumana* türünün doğal yayılış alanı Orta Asya'dan güneydoğu Avrupa'ya kadar uzanmakta ve özellikle *Artemisia* türlerini enfekte etmektedir. Bununla birlikte 19.yy'ın sonlarına doğru Rusya'da ayçiçeği tarımının artmasıyla *O. cumana* bitkisinin ayçiçeğini enfekte etmeye başladığı bildirilmiştir (Pineda-Martos ve ark. 2013). *O. cumana* bitkisinin ayçiçeğini enfekte etmeye başlamasının orobanşın sahip olduğu doğal yeteneğinden mi yoksa mutasyon taşıyan orobanş genotiplerinden mi kaynaklandığı henüz bilinmemektedir (Pineda-Martos ve ark. 2014b). Yapılan çalışmalarda Rusya ve yakın ülkelerde genetik çeşitliliğin yüksek çıkmasına neden olarak orobanş tohumunun bu bölgelerden yoğun bir şekilde yayılması gibi nedenler sayılabilir.

Bu tez çalışmasında gözlenen ortalama heterozigotluk değeri (H_o) 0,207 ve beklenen ortalama heterozigotluk değeri (H_e) ise 0,349 olarak hesaplanmıştır. Pineda-Martos ve ark. (2013)'nın çalışmasında özellikle ana gen havuzundan ayrılan 4 İspanya populasyonunda çok düşük oranda H_o değerleri (0,00 ile 0,09 arasında) gözlenmiştir. Yine bu dört populasyonun H_e değerleri incelendiğinde H_o değerlerine göre yüksek değerler gözlenmiştir (0,12 ile 0,49 arasında). Pineda-Martos ve ark. (2014b) tarafından yapılan çalışmada da bir önceki çalışmaya benzer sonuçlar elde edilmiş, hem yabancı konukçulardan hem de ayçiçeği tarlalarından toplanan

O. cumana populasyonlarında H_0 değerlerinin H_e değerlerinden düşük çıktığı bildirilmiştir. Çalışmada analiz edilen SSR lokuslarının ciddi bir şekilde heterozigot eksikliği gösterdiği, bunun en büyük nedeninin bu populasyonlarda yüksek oranda kendi kendi tozlaşmanın (self polinasyon) görülmesi olarak bildirilmiştir (kendi kendine tozlaşma oranı = 0,971). Guchetl ve ark. (2014a, 2014b)'nın çalışmasında Kazakistan ve Rusya populasyonları için ortalama gözlenen ve beklenen heterozigotluk değeri sırasıyla 0,44 ve 0,41, Romanya populasyonlarında ise 0,04 ve 0,03 olarak bildirilmiştir. Rusya ve Kazakistan populasyonlarındaki heterozigotluk değerinin Romanya poplasyonlarına oranla yüksek olmasının nedeni olarak, Kazakistan ve Rusya populasyonları arasında coğrafik mesafenin fazla olduğu (200-2000 km), Romanya populasyonlarının yeterli oranda coğrafik mesafeye sahip olmadığı belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında hesaplanan F_{ST} , F_{IS} ve F_{IT} değerleri bütün lokuslar ele alındığında sırasıyla ortalama 0,340, 0,368 ve 0,514 olarak bulunmuştur. Guchetl ve ark. (2014a, 2014b)'nın çalışmasında F_{IS} değeri -0,019 ve F_{IT} değeri 0,205 olarak bildirilmiş, çalışmadaki her bir populasyonda heterozigot eksikliğin varlığı, özellikle Romanya populasyonlarındaki heterozigot eksikliğin F_{IS} değerini düşürdüğü belirtilmiştir. Gen akımı (N_m) genetik çeşitliliğin populasyon içi ve arasındaki dağılımını etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Bu tez çalışmasında F_{ST} değerleri kullanılarak tüm populasyonlar hep birlikte değerlendirildiğinde N_m değeri her bir kuşakta ortalama 1,741 olarak hesaplanmıştır. Populasyonlar arası gen akımının düşük olması, populasyonların genetik çeşitliliğinde meydana gelen azalmanın nedenlerinden sayılabilir.

Basamaklı mutasyon modeline göre elde edilen verilerin değerlendirilmesiyle yapmış olduğumuz moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçlarına göre, çalışılan altı orobanş populasyonu arasındaki varyasyon %66 oranında populasyon içerisindedir. Populasyonlar arası genetik çeşitlilik ise %34 olarak hesaplanmıştır. Molinero-Ruiz ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada İspanya, Macaristan ve Türkiye populasyonlarında gruplar arası çeşitliliğin %60, Güney İspanya, Orta İspanya, Türkiye ve Macaristan populasyonlarında gruplar arası çeşitliliğin %79 ve Türkiye populasyonlarında ise grup içi çeşitliliğin %87 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar coğrafik mesafe arttıkça populasyon arasındaki çeşitliliğin arttığını göstermektedir. Pineda-Martos ve ark. (2013)'nin çalışmasında populasyonlar 2 grupta değerlendirilmiş, 1. grupta ana gen havuzunu oluşturan populasyonlar, 2. grupta ise ana populasyona genetik olarak uzak olan populasyonlar bulunmaktadır. Pineda-Martos ve ark. (2013)'nin çalışmasına göre 1. gruptaki populasyonlarda %100 oranında populasyonlar arası çeşitlilik, 2. grupta ise populasyonlar farklı coğrafik alanlarda olmasına rağmen %31,8 oranında populasyonlar arası çeşitlilik bildirilmiştir. Pineda-Martos ve ark. (2014b)'nin AMOVA

sonuçlarına göre, yabancı konukçudan toplanan Bulgaristan popülasyonları arası çeşitliliğin %53,64, popülasyon içi çeşitliliğin ise %46,36 olduğunu belirlemişlerdir. Yine aynı çalışmada hem yabancı konukçudan hem de ayçiçeği tarlalarından toplanan popülasyonlar bir arada değerlendirildiğinde %59,54 oranında popülasyon arası çeşitlilik bildirilmiştir. Guchetl ve ark. (2014a, 2014b) tarafından 3 farklı ülke popülasyonları ile yapılan çalışmada ise genetik çeşitlilik kaynağının büyük oranda (%78) popülasyon içi olduğu, %22'sinin ise popülasyonlar arası çeşitlilikten kaynaklandığı rapor edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise İspanya, Bulgaristan, Romanya ve Türkiye'den örneklenen *O. cumana* popülasyonlarında, popülasyon içi genetik çeşitlilik düzeyinin düşük olduğu ve farklı coğrafik mesafeler arasındaki gen akımının az olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Gagne ve ark. 1998).

Tez çalışmamızda orobanş popülasyonları arasındaki genetik farklılaşma düzeyi, Nei'nin tarafsız genetik benzerlik veya farklılık katsayıları kullanılarak hesaplanmıştır (Nei 1987). Kullanmış olduğumuz nSSR lokuslarına dayanarak hesaplanan genetik benzerlik değerleri 0,645 ile 0,937 arasında değişmektedir. Genetik mesafe değeri ise 0,065'lik değerle en düşük P4 ve P6 popülasyonları arasında, 0,439'luk değerle P3 ve P5 popülasyonları arasında bulunmuştur. Bu sonuçlar, P3 (Karamusul/Lüleburgaz/Kırklareli-2013) ve P5 (Ballıhoca/Muratlı/Tekirdağ-2013) popülasyonlarının genetik olarak birbirinden en farklı iki popülasyon olduğunu, P4 (Kuleli/Babaeski/Kırklareli-2013) ve P6 (Avarız/Merkez/Edirne-2011) popülasyonlarının ise yüksek benzerlik gösterdiklerini işaret etmektedir. Çalışmamız sonucunda elde edilen genetik mesafe değerlerinden oluşturduğumuz UPGMA dendrogramına göre, çalışılan 6 popülasyon 2 ana gen havuzuna (küme) ayrılmıştır. 1. Grupta Edirne ve Kırklareli popülasyonlarını temsil eden P1, P3, P4 ve P6 popülasyonları yer alırken, 2. Grupta Tekirdağ iline ait coğrafik olarak birbirine yakın 2 popülasyon yer almıştır. Guchetl ve ark. (2014a, 2014b) tarafından yapılan çalışmada oluşturulan dendrograma göre Rusya ve Kazakistan popülasyonları bir grupta Romanya popülasyonları diğer bir grupta toplanmıştır. Rusya ve Kazakistan popülasyonlarının bir grupta toplanmasının nedeni olarak Sovyetler Birliğinde yer alan ülkelerde birbirine benzer genetik çeşitliliği olan ayçiçeği çeşitlerinin ekiminin yapıldığından kaynaklandığı belirtilmiştir. Molinero-Ruiz ve ark. (2014), çalışılan orobanş popülasyonlarının coğrafik kökenlerine göre gruplandığını, yakın coğrafik bölgelerdeki popülasyonların (Kuzey İspanya ve Güney İspanya gibi) genetik olarak birbirinden net bir şekilde ayrılabilmediğini yaptıkları çalışmada bildirmişlerdir. Pineda-Martos ve ark. (2014a)'nın çalışmasında SSR analizi sonucu elde edilen genetik mesafe değerleri kullanılarak oluşturulan dendrogramda *O. cumana* popülasyonları I, II, III ve IV nolu grupları, *O. cernua* popülasyonları ise V nolu grubu oluşturmuştur. Grupların yapısına bakıldığında

coğrafik köken ve enfekte ettiği türe göre populasyonların kümelenmesinin meydana geldiği ve *O. cumana* türünde SSR belirteçlerinin gruplamaları yapabilmek için yüksek ayırım gücü olduğu vurgulanmıştır. Bunun yanısıra çalışmada *O. cumana* için geliştirilen SSR belirteçlerinin *O. cernua* türünde de kullanılabildiği rapor edilmiştir.

Yüksek genetik çeşitliliğe sahip parazit bitki populasyonları konukçu bitkinin direnç mekanizmasının üstesinden gelerek bitkiyi enfekte etme yeteneğine sahiptir. Farklı ekolojik ve coğrafik bölgelerde yayılış gösteren parazit bitki populasyonlarına karşı konukçu bitkinin (ayçiçeği gibi) direnç mekanizmalarını geliştirmeyi amaçlayan sürdürülebilir ve uzun vadeli ıslah programları için, *Orobancha* spp. gibi parazitik bitki populasyonlarının, populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitlilik seviyesini belirlemek büyük önem taşımaktadır (Kaya 2003). Ayrıca, doğal veya tarım alanlarındaki parazitik biyotiplerin genetik çeşitliliğini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar, yabancı parazitik bitkilerin tarım bitkilerini enfekte eden bir yabancı ota nasıl dönüştüğünün evrimsel mekanizmasını anlamada önemlidir. Bu tez çalışmasından elde edilen bilgiler *O. cumana* ve yakın akraba türlerde yapılacak olan genetik yapı, genetik çeşitlilik ve yeni ırkların oluşumunun evrimi ile ilgili diğer çalışmalara önemli katkılar sağlayacaktır. *O. cumana* ve yakın akraba türlerde küresel anlamda genetik çeşitlilik, yayılış ve ırk oluşumunun evrimsel mekanizması gibi olayları anlamak ve açığa çıkarmak için, türün yayılış alanı içindeki bütün alanlardan örneklemeler yapılarak gelecekte yeni çalışmaların planlanması bilim dünyası için yararlı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abang M, Abu-Irmaileh B, Bayaa B, Yahyaoui A (2007). A Participatory Farming System Approach for Sustainable Broomrape (*Orobancha spp.*) Management in the Near East and North Africa. *Crop Protection* 26: 1723-1732.
- Abbes Z, Chaibi W, Kharrat M (2008). Seed Germination and Tubercle Development of *Orobancha foetida* and *Orobancha crenata* in Presence of Different Plant Species. *Tunisian Journal of Plant Protection* 3: 101-109.
- Aksoy E, Uygur FN (2008). Effect of Broomrapes on Tomato and Faba Bean Crops. *The Journal of Turkish Weed Science* 11(1): 1-7.
- Aksoy E, Pekcan V (2014). Canavar Otları (*Orobancha spp.*, *Phelipanche Spp.*) ve Mücadelesi. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı, 15, Ankara.
- Aksoy E, Öztemiz S, Uygur FN (2006). Canavar Otu Türlerinin (*Orobancha spp.*) Doğal Düşmanı Olan Böcek Türlerinin Saptanması ve *Phytomyza Orobanchia* Kalt. (Diptera: Agromyzidae)'nın Canavar Otunun Biyolojik Mücadelesinde Kullanılma Olanığının Araştırılması. *Türkiye Herboloji Dergisi* 9(2): 10-17.
- Aksoy E, Arslan ZF, Tetik Ö, Eymirli S (2014). Domates Tarlalarında Sorun Olan Mısırlı Canavar Otunun [*Phelipanche aegyptiaca* (Pers.) Pomel] Mücadelesinde Bazı Tuzak ve Yakalayıcı Bitkilerin Allelopatik Özelliklerinden Yararlanma Olanakları. *Tarım Bilimleri Dergisi-Journal of Agricultural Sciences* 20: 126-135.
- Aly R (2007). Conventional and Biotechnological Approaches for Control of Parasitic Weeds. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 43: 304-317.
- Anzidei M, Madaghiele A, Sperisen B, Ziegenhagen B and Vendramin GG (1999). Chloroplast Microsatellites for Analysis of The Geographic Distribution of Diversity in Conifer Species. In: E.M. Gillet (Ed.). Which DNA Marker for Which Purpose? Final compendium of the research project development, optimization and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity.
- Atanasova R, Batchvarova R, Todorovska E, Atanassov A (2005). Molecular Study of Broomrape (*Orobancha spp.*) by RAPD Analyses. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 19: 51-60.
- Azmat MA, Khan IA, Cheema HMN (2012). Extraction of DNA Suitable for PCR Applications from Mature Leaves of *Mangifera indica* L. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 13: 239.
- Bandelj D, Jakse J, Javornik B (2004). Amplification of Fluorescent-Labelled Microsatellite Markers in Olives by A Novel, Economic Method. *Acta Agriculturae Slovenica* 83(2): 323-329.
- Benharrat H, Thalouarn P, Theodet C, Veronesi C (2002). *Orobancha* Species and Population Discrimination Using Intersimple Sequence Repeat (ISSR). *Weed Research* 42: 470-475.

- Bernhard RH, Jensen JE, Andreasen C (1998). Prediction of Yield Loss Caused by *Orobanche* spp. in Carrot and Pea Crops Based on The Soil Seedbank. *Weed Research* 38: 191-197.
- Botstein D, White RL, Skolnick K, Davis RW (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Bouhadida M, Jannet RB, Abbes Z, Amri M, Kharrat M (2015). Analysis of Genetic Diversity of *Orobanche foetida* Population Parasitizing Crops Legume. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science* 8(3): 37-40.
- Boz Ö, MN Doğan, D Ögüt (2012). The Effect of Duration of Solarization on Controlling Branched Broomrape (*Phelipanche ramosa* L.) and Some Weed Species. 25th German Conference on Weed Biology and Weed Control, Braunschweig, Germany.
- Brault M, Betsou F, Jeune B, Tuquet C, Salle G (2007). Variability of *Orobanche ramosa* Populations in France as Revealed by Cross Infestations and Molecular Markers. *Environmental and Experimental Botany* 61: 272-280.
- Bülbül A, Salihoğlu M, Sarı C, Aydın A (1991). Determination of Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) Races of Sunflower in the Thrace Region of Turkey. *Helia* 14: 21-26
- Bülbül F, Aksoy E, Uygur S, Uygur N (2009). Broomrape (*Orobanche* spp.) Problem in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Helia* 32(51): 141-152.
- Castejon-Munoz M, Suso MJ, Romero-Munoz F, Garcia-Torres L (1991). Isoenzymatic Study of Broomrape (*Orobanche cernua*) Populations Infesting Sunflower (*Helianthus annuus*). In: Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds. Nairobi, Kenya, 313-319.
- Davis PH, Mill RR, Tan K (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Suppl. 1), Vol. 10, pp. 200–201, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 19-21.
- Demirbaş S (2006). Bazı Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Çeşitlerinde *Orobanche cumana* Wallr.'nin Süperoksit Dismütaz (Sod;E.C.1.15.1.1) ve Peroksidaz (Pod;E.C.1.11.1.7) Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
- Demirkan H (2005). Bazı Bitki Parçalarının *Orobanche ramosa* L.'nin Gelişimine Olan Allelopatik Etkilerinin Araştırılması. *Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Dergisi* 42(3): 45-54.
- Diaz-Sanchez J, Jurado-Exposito M, Lopez-Granados F, Castejon-Munoz M, Garcia-Torres L (2003). Pronamide Applied to Sunflower Seeds for *Orobanche cumana* Control. *Weed Technol* 17: 314-319.
- Doyle JJ, Doyle JI (1990). Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus* 12: 13-15.

- Eizenberg H, Tanaami Z, Jacobsohn R, Rubin B (2001). Effect of Temperature on the Relationship Between *Orobanche* spp. and Carrot (*Daucus carota* L.). *Crop Protection* 20: 415-420.
- Eizenberg H, Aly R, Cohen Y (2012). Technologies for Smart Chemical Control of Broomrape (*Orobanche* spp. and *Phelipanche* spp.). *Weed Science* 60: 316-323.
- Elzein A, Kroschel J (2003). Problem Weeds and Their Management in Crops and Non-Crop Situations. *Weed Management for Developing Countries*, Ed: Labrada L., Addendum 1, Rome.
- Emiroğlu ÜJ, Nemli Y, Küçüközden R (1987). The Resistance of Aegean Tobacco Lines and Cultivars to Roomrape (*O. ramosa*) and The Effect of That Parasite on Yield and Quality. In: Weber, H. Chr., W. Forstreuter (eds.) *Proc. 4th Int. Symposium on Parasitic Flowering Plants*, Marburg, FRG, pp. 175-182.
- Eşitmez B, Işık D (2016). Kayseri İli Elma Bahçelerinde Görülen Yabancı Ot Türlerinin Belirlenmesi *Meyve Bilimi* 3(1): 1-9.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin (version 3.0): An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. *Journal List Evol Bioinform Online* v.1; 2005 PMC 2658868.
- Fernandez-Aparicio M, Flores F, Rubiales D (2009). Recognition of Root Exudates by Seeds of Broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche*) Species. *Annals of Botany* 103: 423-431.
- Gagne G, Roeckel-Drevet P, Grezes-Besset B, Shindrova P, Ivanov P, Grand-Ravel C, Vear F, Tourvielle de Labrouhe D, Charmet G, 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, Nicolas P (2000). Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) as Suitable Markers to Study *Orobanche cumana* Genetic Diversity. *Journal of Phytopathology* 148: 457-459.
- Garcia FAA, Kido AE, Meza NA, Souza BHM, Pinto RL, Pastina MM, Leite SC, Silva GJ da, Ulian CE, Figueira A, Souza AP (2006). Development of an Integrated Genetic Map of a Sugarcane (*Saccharum* Spp.) Commercial Cross, Based on a Maximum-Likelihood Approach for Estimation of Linkage and Linkage Phases. *Theor Appl Genet* 112: 298-314.
- Gibot-Leclerc S, Dessaint F, Reibel C, Le Corre V (2008). *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel Populations Differ in Lifehistory and Infection Response to Hosts. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 208(4): 247-252.
- Gillet EM (1999). DNA Markers-Concepts and Characteristics. In: E.M. Gillet (Ed.). *Which DNA Marker for Which Purpose? Final compendium of the research project development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity.*

- Giray H, Nemli Y (1983). İzmir İlinde *Orobanche*'nin Doğal Düşmanı Olan *Phytomyza orobanchia* Kalt. (Diptera, Agromyzidae)'in Morfolojik Karakterleri, Kısaca Biyolojisi ve Etkinliği Üzerinde Araştırmalar. Türkiye Bitki Koruma Dergisi, 7: 183-192.
- Gökdoğan E, Kaya E (2015). Bitki Germplazmalarının Korunmasında Biyoteknolojik Yöntemlerin ve Biyoçeşitliliğin Belirlenmesinde Moleküler Markör Sistemlerinin Kullanımı. Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi 6 (Özel Sayı 2): 98-107.
- Guchetl SZ, Antonova TS, Tchelustnikova TA (2014a). Interpopulation Genetic Differentiation *Orobanche cumana* Wallr. from Russia, Kazakhstan and Romania Using Molecular Genetic Markers. Helia 37(61): 181-191.
- Guchetl SZ, Antonova TS, Tchelustnikova TA (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.
- Güncan A (2009). Yabancı Otlar ve Mücadele Prensipleri. Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi yayınları, Konya.
- Habimana S, Nduwumuremyi A, Chinama JDR (2014). Management of *Orobanche* in Field Crops-A review. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 14(1): 43-62.
- Haidar MA, Sidahmed MM (2000). Soil Solarization and Chicken Manure for the Control of *Orobanche crenata* and Other Weeds in Lebanon. Crop Protection 19: 169-173.
- Haidar MA, Sidahmed MM (2006). Elemental Sulphur and Chicken Manure for The Control of Branched Broomrape (*Orobanche ramosa*). Crop Protection 25: 47-51.
- Hancock JM (1998). Microsatellites and Other Simple Sequences: Genomic Context and Mutational Mechanisms. In: D.B. Goldstein and C. Schlotterer (Eds.). Microsatellites: Evolution and Applications. pp. 1-9. Oxford University Press.
- Hartl DL, Clark AG (1989). Principles of Population Genetics. 2nd edition. Sinauer Ass. Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hayward AC, Tollenaere R, Dalton-Morgan J, Batley J (2015). Molecular Marker Applications in Plants. In: Batley J (ed) Plant Genotyping. Springer, New York, NY, pp 13-27.
- Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry R (2014). Protocol: a Simple Method for Extracting Next-Generation Sequencing Quality Genomic DNA From Recalcitrant Plant Species. Plant Methods 10: 21.
- Işık K, Semiz G, Kurt Y (2005). Farklı Doğal Alanların, İçerdikleri Türler Açısından UPGMA Kümelendirme Yöntemine Göre Karşılaştırılması. Korunan Doğal Alanlar Sempozyumu, SDÜ, Isparta.
- Jacobsohn R, Greenberger A, Katan J, Levi M, Alon H (1980). Control of Egyptian Broomrape (*Orobanche aegyptiaca*) and Other Weeds by Solar Heating and The Soil by Polyethylen Mulching. Weed Science 28: 312-315.

- Joel DM (2009). The New Nomenclature of *Orobanche* and *Phelipanche*. *Weed Research*, 49(1): 6-7.
- Joel DM, Hershenhorn Y, Eizenberg H (2007). Biology and Management of Weedy Root Parasites. *Hort. Rev. (Am. Soc. Hortic. Sci.)* 38: 267-349.
- Jonah P, Bello L, Lucky O, Midau A, Moruppa S (2011). Review: The Importance of Molecular Markers in Plant Breeding Programmes. *Glob J Sci Front Res* 11:eV-vers1.
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK (2011). Microsatellite Markers: an Overview of the Recent Progress in Plants. *Euphytica* 177: 309-334.
- Katan J (1987). Soil Solarization. *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. New York: J. Wiley. Cept. I., p.77-105.
- Katzir N, Portnoy V, Tzuri G, Castejon-Munoz M, Joel DM (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). Current Situation of Sunflower Broomrape around the World. In *Current Situation of Sunflower Broomrape around the World, Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (Orobanche spp.) in Sunflower, Cordoba, Spain, International Sunflower Association (ISA): Paris, France*, pp 9-18.
- Kaya Y (2014b). The Situation of Broomrape Infestation, Control Methods in Sunflower Production Areas in Turkey. In *Current Situation of Sunflower Broomrape around the World, Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (Orobanche spp.) in Sunflower, Cordoba, Spain, International Sunflower Association (ISA): Paris, France*, p 55.
- Kaya Y (2015). Herbicide Resistance Breeding in Sunflower, Current Situation and Future Directions. *Journal of ASM. Life Sciences*. No. 2(326): 101-106.
- Kaya Y, Evcı G (2007). Herbicide Resistance in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). In *Proceedings of the International Research Conference, Plant Genetic Stocks-The Basis of Agriculture of Today (II), 125 Years of Agricultural Science in Sadovo, Plovdiv, Bulgaria*, pp 45-47.
- Kaya Y, Demirci M, Evcı G (2004a). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Breeding in Turkey for Broomrape (*Orobanche cernua* Loeffl.) and Herbicide Resistance. *Helia* 27: 199-210.
- Kaya Y, Evcı G, Pekcan V, Gucer T (2004b). Determining New Broomrape-Infested Areas, Resistant Lines and Hybrids in Trakya Region in Turkey. *Helia* 27: 211-218.
- Kaya Y, Evcı G, Pekcan V, Gucer T, Yılmaz MI (2009). Evaluation of Broomrape Resistance in Sunflower Hybrids. *Helia* 32: 161-170.

- Kaya Y, Jocić S, Miladinović D (2012). Sunflower. In Technological Innovations in Major World Oil Crops, I Breeding; Gupta, S. K., Ed.; Springer: New York, United States, pp 85-130.
- Kitiş YE (2015). Patateste Canavar Otu Problemi. *Agrotime* 13: 24-25.
- Labrousse P, Arnaud MC, Griveau Y, Fer A, Thalouarn P (2004). Analysis of Resistance Criteria of Sunflower Recombined Inbred Lines Against *Orobanche cumana* Wallr. *Crop protection* 23: 407-413.
- Li JT, Yang J, Chen DC, Zhang XL, Tang ZS (2007). An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. School of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong, Sichuan, P.R. China. Institute of Rare Animals and Plants, China West Normal University, Nanchong, Sichuan, P.R. China. *Genet. Mol. Res.* 6 (4): 1064-1071.
- Linke KH, Sauerborn J, Saxena MC (1989). *Orobanche* field guide. University of Hohenheim, Germany. p. 41
- Louarn J, Boniface MC, Pouilly N, Velasco L, Pérez-Vich B, Vincourt P, Muñoz S (2016). Sunflower Resistance to Broomrape (*Orobanche cumana*) is Controlled by Specific QTLs for Different Parasitism Stages. *Front. Plant Sci.* 7: 590.
- Mammadov J, Aggarwal R, Buyyarapu R, Kumpatla S (2012). SNP Markers and Their Impact on Plant Breeding. *Int J Plant Genomics* 2012: 1-11.
- Martin-Sanz A, Malek J, Fernandez-Martinez JM, Perez-Vich B, Velasco L (2016). Increased Virulence in Sunflower Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) Populations from Southern Spain Is Associated with Greater Genetic Diversity. *Front. Plant Sci.* 7: 589.
- Mauromicale G, Lo Monaco A, Longo AMG, Restuccia A (2005). Soil Solarization, a Non-Chemical Method to Control Branched Broomrape (*Orobanche ramosa*) and Improve The Yield of Tomato. *Weed Sci* 53: 877-883.
- Mauromicale G, Restuccia G, Marchese M (2001). Soil Solarization, a Non-Chemical Technique for Controlling *Orobanche crenata* and Improving Yield of Faba Bean. *Agronomie* 21: 757-765.
- Meriç KM, Öztekin GB (2008). Topraksız Tarımda Kapilar Sistemler Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg. 45(2): 145-152.
- Molinero-Ruiz L, Garcia-Carneros AB, Collado-Romero M, Raranciuc S, Dominguez J, Melero-Vara JM (2014). Pathogenic and Molecular Diversity in Highly Virulent Populations of The Parasitic Weed *Orobanche cumana* (Sunflower Broomrape) From Europe. *Weed Research* 54: 87-96.
- Molinero-Ruiz L, Delavault P, Perez-Vich B, Pacureanu-Joita M, Bulos M, Altieri E, Dominguez J (2015). History of The Race Structure of *Orobanche cumana* and The Breeding of Sunflower for Resistance to This Parasitic Weed: A Review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, Vol 13, No 4.

- Musselman LJ (1994). Taxonomy and Spread of *Orobanche*. Germination Ecology of *Striga* and *Orobanche* an Overview. Biology and Management of *Orobanche*, Proceedings of the Third International Workshop on *Orobanche* and Related *Striga* Research. Editors, Arnold H. Pieterse Jus A.C., Verkleij Sing, J.ter Burg Royal Tropical Institute, The Netherlands, pp. 27-35.
- Müller-Stöver D, Kohlschmid E, Sauerborn J (2009). A Novel Strain of *Fusarium oxysporum* from Germany and its Potential for Biocontrol of *Orobanche ramosa*. *Weed Research* 49: 175-182.
- Nei M (1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York. 512 p.
- Nun NB, Plakhine D, Joel DM, Mayer AM (2003). Changes in Activity of The Alternative Oxidase in *Orobanche* Seeds During Conditioning and Their Possible Physiological Function. *Phytochemistry* 64: 235-241.
- Okazawa A, Trakulnaleamsai C, Hiramatsu H, Fukusaki EI, Yoneyama K, Takeuchi Y, Kobayashi A (2005). Cloning of a Cryptochrome Homologue from the Holoparasitic Plant *Orobanche minor* Sm. *Plant Physiology and Biochemistry* 43(5): 499-502.
- Oliveira EJ, Padua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Carneiro-Vieria ML (2006). Origin, Evolution and Genome Distribution of Microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2): 294-307.
- Özer Z, Kadioğlu İ, Önen H, Tursun N (2001). Herboloji (Yabancı Ot Bilimi) Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:20 Kitap seri No:10 Tokat.
- Pamphilis CW, Palmer JD (1990). Loss of Photosynthetic and Chlororespiratory Genes From The Plastid Genome of a Parasitic Flowering Plant. *Nature* 348: 337-339.
- Paran I, Gidoni D, Jacobsohn R (1997). Variation Between and Within Broomrape (*Orobanche*) Species Revealed by RAPD Markers. *Heredity* 78: 68-74.
- Parker C, Riches CR (1993). Parasitic Weeds of the World: Biology and Control. CAB International, Wallingfort, UK, 332 pp.
- Parker C (2009) Observations on the Current Status of *Orobanche* and *Striga* Problems Worldwide. *Pest Management Science*. 65: 453-459.
- Parker C (2012). Parasitic Weeds: A World Challenge. *Weed Science* 60: 269-276.
- Patel RH, Jagruti S, Soumyadeep D, Meisheri TG (2005). Weed Dynamics as Influenced By Soil Solarization - A Review. *Agricultural Reviews* 26(4): 295-300.
- Pathak A, Kannan C (2014). A New Cost-Effective Method for Quantification of Seed Bank of *Orobanche* in Soil. *Indian Journal of Weed Science* 46(2): 151-154.
- Peakall R, Smouse PE (2006). GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.

- Pereira GS, Nunes ES, Laperuta LDC, Braga MF, Penha HA, Diniz AL, Munhoz CF, Gazaffi R, Garcia AAF, Vieira MLC (2013). Molecular Polymorphism and Linkage Analysis in Sweet Passion Fruit, an Outcrossing Species: Molecular Map in Sweet Passion Fruit. *Ann Appl Biol* 162: 347-361.
- Perez-de-Luque A, Jorriin J, Cubero JI, Rubiales D (2005). *Orobanche crenata* Resistance and Avoidance in Pea (*Pisum* spp.) Operate at Different Developmental Stages of The Parasite. *Weed Research* 45(5): 379-387.
- Perez-de-Luque A, Lozano MD, Moreno MT, Testillano PS, Rubiales D (2007). Resistance to Broomrape (*Orobanche crenata*) in Faba Bean (*Vicia faba*): Cell Wall Changes Associated With Prehaustorial Defensive Mechanisms. *Annals of Applied Biology* 151: 89-98.
- Pineda-Martos R, Velasco L, Fernandez-Escobar J, Fernandez-Martinez JM, 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, Perez-Vich B (2014a). Identification, Characterisation and Discriminatory Power of Microsatellite Markers in The Parasitic Weed *Orobanche cumana*. *Weed Research* 54: 120-132.
- Pineda-Martos R, Pujadas-Salva AJ, Fernandez-Martinez JM, Stoyanov K, Velasco L, 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*, Volume 2014, Article ID 150432, 15 pages.
- Press MC, Graves JD (1995). *Parasitic Plants*. Chapman and Hall, London.
- Press MC, Phoenix GK (2005). Impacts of Parasitic Plants on Natural Communities. *New Phytol.* 166: 737-751.
- 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. 142 pages.
- Rice E (1995). *Biological Control of Weeds and Plant Diseases*. *Advances in Applied Allelopathy*. Norman, OK: University of Oklahoma Press.
- Rispail N, Dita MA, Gonzalez-Verdejo C, Perez-de-Luque A, Castillejo MA, Prats E, Roman B, Jorriin J, Rubiales D (2007). Plant Resistance to Parasitic Plants: Molecular Approaches to An Old Foe. *New Phytologist* 173: 703-712.
- Robinson JP, Harris SA (1999). Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A Phylogenetic Perspective. In: E.M. Gillet (Ed.). *Which DNA Marker for Which Purpose? Final compendium of the research project development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity*.

- Roman B, Rubiales D, Torres AM, Cubero JI, Satovic Z (2001). Genetic Diversity in *Orobancha crenata* Populations from Southern Spain. *Theor. Appl. Genet.* 103: 1108-1114.
- Roman B, Satovic Z, Rubiales D, Torres AM, Cubero JI, Katzir N, Joel MJ (2002). Variation Among and Within Populations of The Parasitic Weed *Orobancha Crenata* From Spain and Israel Revealed by Inter Simple Sequence Repeat Markers. *Phytopathology* 92: 1262-1266.
- Roman B, Alfaro C, Torres AM, Moreno MT, Satovic Z, Pujadas A, Rubiales D (2003). Genetic Relationships Among *Orobancha* Species as Revealed by RAPD Analysis. *Ann. Bot.* 91: 637-642.
- Roman B, Gonzalez Verdejo CI, Satovic Z, Madrid MD, Cubero JI, Nadal S (2007). Detecting *Orobancha* Species by Using cpDNA Diagnostic Markers. *Phytoparasitica* 35(2): 129-135.
- Saghir AR (1986). Dormancy and Germination of *Orobancha* seeds in Relation to Control Methods. In *Biology and Control of Orobancha*. Proceedings of a Workshop in Wageningen, The Netherlands, 13-17 January 1986. Pages 25-34.
- Sauerborn J (1991). *Parasitic Flowering Plants, Ecology and Management*. Verlag Josef Margraf Scientific Books, Germany.
- Sauerborn J, Buschmann H, Ghiasi GK, Kogel KH (2002). Benzothiadiazole Activates Resistance in Sunflower (*Helianthus annuus*) to the Root-Parasitic Weed *Orobancha cumana*. *Phytopathology* 92(1): 59-64.
- Skoric D, Pacureanu-Joita M, Sava E (2010). Sunflower Breeding for Resistance to Broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.). *Analele INCDA Fundulea* 78: 63-79.
- Scotti I, Paglia G, Magni F, Morgante M (1999). Microsatellite Markers as a Tool for The Detection of Intra- and Interpopulational Genetic Structure. In: E.M. Gillet (Ed.). *Which DNA Marker for Which Purpose? Final compendium of the research project development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity*.
- Semagn K, Bjornstad A, Ndjiondjop MN (2006). An Overview of Molecular Marker Methods For Plants. *African Journal Of Biotechnology*, 5(25): 2540-2568.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973). *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 573 pp.
- Souza LM, Gazaffi R, Mantello CC, Silva CC, Garcia D, Le Guen V, Cardoso SEA, Garcia AAF, Souza AP (2013). QTL Mapping of Growth-Related Traits in a Full-Sib Family of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) Evaluated in A Sub-Tropical Climate. *PLoS One* 8:e61238.
- Takagi K, Okazawa A, Wada Y, Mongkolchaiyaphruek A, Fukusaki E, Yoneyama K, Takeuchi Y, Kobayashi A (2009). Unique Phytochrome Responses of The Holoparasitic Plant *Orobancha minor*. *New Phytologist* 182: 965-974.

- Thorogood CJ, Rumsey FJ, Hiscock SJ (2009). Host-Specific Races in The Holoparasitic Angiosperm *Orobanche minor*: Implications for Speciation in Parasitic Plants *Annals of Botany* 103: 1005-1014.
- Timko MP, Scholes JD (2013). Host Reaction to Attack by Root Parasitic Plants. In: Gressel DMJJ, Musselman LJ (eds) *Parasitic Orobanchaceae*. Springer, New York, pp 115-141.
- Toth G, Gaspari Z, Jurka J (2000). Microsatellites in Different Eucaryotic Genoms: Survey and Analysis. *Genome Research* 10: 967-981.
- Ün C, Wimmers K, Ponsuksili S, Schmoll F, Schellander K (2000). Mikrosatellitler ve Kullanım Alanları. Institute of Animal Science, University of Bonn, Germany *Hayvansal Üretim* 41: 9-14.
- Varshney RK, Graner A, Sorrels ME (2005). Genic Microsatellite Markers in Plants: Features and Applications. *Trends in Biotechnology*, 23: 48-55.
- Vaz Patto MC, Diaz-Ruiz R, Satovic Z, Roman B, Pujadas-Salva AJ, Rubiales D (2008). Genetic Diversity of Moroccan Populations of *Orobanche foetida*: Evolving from Parasitising Wild Hosts to Crop Plants. *Weed Research* 48: 179-186.
- Verkleij JAC, Janssen J, Pieterse AH (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.
- Veronesi C, Bonnin E, Calvez S, Thalouarn P, Simier P (2007). Activity of Secreted Cell Wall-Modifying Enzymes and Expression of Peroxidase-Encoding Gene Following Germination of *Orobanche ramosa*. *Biologia plantarum* 51(2): 391-394.
- Vieira MLC, Santini L, Diniz AL, Munhoz CF (2016). Microsatellite Markers: What They Mean and Why They are So Useful. *Genetics and Molecular Biology* 39(3): 312-328.
- Westwood JH, DePamphilis CW, Das M, Fernandez-Aparicio M, Honaas LA, Timko MP, Wafula EK, Wickett NJ, Yoder JI (2012). The Parasitic Plant Genome Project: New Tools For Understanding The Biology of *Orobanche* and *Striga*. *Weed Science* 60(2): 295-306.
- Winston E (2003). The Utilization of the *HMG2* Inducible Promoter to Genetically Engineer Parasite Resistance in Tobacco. Dissertation submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999). POPGENE Version 1.32. Windows-based Software for Population Genetics Analysis.
- Zare G, Dönmez AA (2013). The New Records of The Genus *Orobanche* (Orobanchaceae) From Turkey. *Turkish Journal of Botany* 37: 1-7.
- Zehhar N, Labrousse P, Arnaud MC, Boulet C, Bouya D, Fer A (2003). Study of Resistance to *Orobanche ramosa* in Host (Oilseed Rape and Carrot) and Non-Host (Maize) Plants. *European Journal of Plant Pathology* 109: 75-82.

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet Kubilay Barut 1991 yılında Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya’nın Korkuteli ilçesinde tamamladı. 2009 yılında Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü’ne girdi. Bu bölümden 2014 yılında mezun oldu. Eylül 2014’te Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda, Bitki Moleküler Genetiği üzerine yüksek lisans eğitimine başladı.