

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**GEN DÜZENLEME TEKNOLOJİSİ (CRISPR) İLE ELDE EDİLEN DOMATES
GENOTİPLERİNİN CANAVAR OTUNA (*Phelipanche* spp.) KARŞI
DAYANIKLILIK VE GEN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

Esra ÇİĞNİTAŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

KASIM 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**GEN DÜZENLEME TEKNOLOJİSİ (CRISPR) İLE ELDE EDİLEN DOMATES
GENOTİPLERİNİN CANAVAR OTUNA (*Phelipanche* spp.) KARŞI
DAYANIKLILIK VE GEN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

Esra ÇİĞNİTAŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

KASIM 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEN DÜZENLEME TEKNOLOJİSİ (CRISPR) İLE ELDE EDİLEN DOMATES
GENOTİPLERİNİN CANAVAR OTUNA (*Phelipanche* spp.) KARŞI
DAYANIKLILIK VE GEN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Esra ÇİĞNİTAŞ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından FBA-2022-5970 nolu proje ile desteklenmiştir.

KASIM 2024

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEN DÜZENLEME TEKNOLOJİSİ (CRISPR) İLE ELDE EDİLEN DOMATES
GENOTİPLERİNİN CANAVAR OTUNA (*Phelipanche spp.*) KARŞI
DAYANIKLILIK VE GEN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Esra ÇİĞNİTAŞ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 05/11//2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğretim Üyesi Yasin Emre KİTİŞ

Prof. Dr. Işık TEPE

Prof. Dr. Doğan IŞIK

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ÖZET

GEN DÜZENLEME TEKNOLOJİSİ (CRISPR) İLE ELDE EDİLEN DOMATES GENOTİPLERİNİN CANAVAR OTUNA (*Phelipanche* spp.) KARŞI DAYANIKLILIK VE GEN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Esra ÇİĞNİTAŞ

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Yasin Emre KİTİŞ

Kasım 2024; 92 sayfa

Kök paraziti yabancı ot türlerinden canavar otları (*Phelipanche* spp./*Orobanch* spp.), konukçu köküne tutunarak, doğrudan konukçunun besin elementlerine ve suyuna ortak olmaktadır. *Phelipanche aegyptiaca* ve *P. ramosa*, domates (*Solanum lycopersicum* L.)’te önemli ekonomik kayıplara neden olan türlerdir. Bu türlerin çimlenmeleri konukçu bitki kökünden salgılanan fitohormonlar olan strigolaktonlara bağlıdır. Bu çalışmada, domateste strigolakton sentezinden sorumlu Carotenoid Cleavage Dioxygenase 7 (*SICCD7*) geninin ilk ekzonunda CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak 18 nükleotid silinmiş olan 18nt ve 186 nükleotid silinmiş olan 186nt isimli genotipler kullanılmıştır.

Bu genotiplerin *P. aegyptiaca*’ya karşı dayanıklılık durumlarının Petri kabı, hidroponik ve saksı denemeleri, ayrıca RT-qPCR ile *CCD7*, *CCD8* ve *Betakaroten* genlerinin ifadeleri ve LC-MS/MS cihazı ile orobanchol hormonu miktarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Denemelerde homozigot özellikte mutant genotiplerle kıyaslama yapmak amacıyla yabani tip (WT) ve pozitif kontrol olarak bazı ticari domates genotipleri kullanılmıştır. Petri kabı denemeleri için genotiplerin kök dokusundan toplam strigolakton ekstraksiyonu yapılmış, elde edilen ekstraktlar *P. aegyptiaca* tohumlarına uygulanmıştır.

Çalışmada 20°C’de yapılan Petri kabı deneme sonuçlarında 18nt genotipi ticari domates çeşidi Torry F1’ e göre *P. aegyptiaca* tohum çimlenmesini %30 azaltırken, 186nt genotipi %74 oranında azaltmıştır. Hidroponik denemelerde ise köke tutunan *P. aegyptiaca* tüberkül sayısının 18nt ve 186nt genotiplerinde TorryF1’e göre önemli ölçüde düştüğü ve tüberküllerinin gelişemediği belirlenmiştir. Saksı denemelerinde ise 18nt genotipinde toplam *P. aegyptiaca* sürgün sayısında fark yaratmadığı fakat 186nt genotipinin WT kıyasla toplam sürgün sayısını %71 azalttığı belirlenmiştir. RT-qPCR analiz sonuçlarına göre ise 18nt ve 186nt genotiplerinde *SICCD7* geninin ifadesi değişmezken, 186nt genotipinde karotenoid yolağında bulunan diğer genler olan *SICCD8*

ve *Betakaroten* genlerinin ifadelerinin sırasıyla yaklaşık %22 ve %39 arttığı belirlenmiştir. Orobanchol hormon miktarının 18nt genotipinde yabani tip (WT)'e kıyasla %5 azalmışken, 186nt genotipinde yaklaşık %40 oranında azaldığı belirlenmiştir.

CRISPR/Cas9 tekniği ile *CCD7* geninin modifikasyonunun, *P. aegyptiaca*'ya karşı domateste dayanıklılık gösterebileceği bu çalışma ile belirlenmiştir. *SICCD7* geninin ilk ekzonunda meydana gelen 186 bazlık mutasyonun *P. aegyptiaca*'ya karşı WT kıyasla bir dayanıklılık sağladığı fakat 18 bazlık mutasyonun bu dayanıklılığı sağlamadığı belirlenmiştir. CRISPR/Cas9 tekniği ile yapılan dayanıklılık çalışmaları, parazit bitkilerle mücadelede etkili bir strateji olabileceği düşünülmektedir. 186nt genotipinin *P. aegyptiaca*' da hem çimlenmeyi hem de tüberkül gelişimini engelleyen/geciktiren bir dayanıklılık ortaya koyduğu belirlenmiştir. Fakat bu genotipin performansının, doğal olarak canavar otu ile bulaşık alanlarda da değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca domates üretiminde sorun olan diğer canavar otu türlerinden *Phelipanche ramosa* ve/veya *Orobanche cernua* gibi türlerle de genotipin performansının test edilmesi faydalı olacaktır.

ANAHTAR KELİMELER: Canavar otu, CRISPR/Cas9, Dayanıklılık, Domates, Strigolakton

JÜRİ: Dr. Öğretim Üyesi Yasin Emre KİTİŞ

Prof. Dr. Işık TEPE

Prof. Dr. Doğan IŞIK

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE RESISTANCE AND GENE EXPRESSION LEVELS OF TOMATO GENOTYPES OBTAINED BY CRISPR/CAS9 TECHNOLOGY AGAINST BROOMRAPE (*Phelipanche* spp.)

Esra ÇİĞNİTAŞ

PhD Thesis in Plant Protection

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Yasin Emre KİTİŞ

Kasım 2024; 92 pages

Root parasitic weeds, broomrapes (*Phelipanche* spp. / *Orobanchae* spp.), attach to the host root, thereby directly accessing the nutrients and water of the host plant. *Phelipanche aegyptiaca* and *Phelipanche ramosa* are species that cause significant economic losses in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). The germination of these species depends on strigolactones, which are phytohormones secreted by the roots of the host plant.

In this study, we utilized the genotypes 18nt and 186nt, which have undergone an 18-nucleotide deletion and a 186-nucleotide deletion, respectively, by modifying the Carotenoid Cleavage Dioxygenase 7 (*SICCD7*) gene in the first exon using the CRISPR/Cas9 technique. The deletions are in-frame (not knock-out) with 6 and 62 amino acid at the N terminal of the protein. The study aimed to evaluate the resistance of these genotypes against *P. aegyptiaca* through Petri dish, hydroponic, and pot experiments, as well as to assess the expression of the *CCD7*, *CCD8*, and *Betacarotene* genes via RT-qPCR, and to determine the orobanchol hormone level using LC-MS/MS. In the experiments, wild-type (WT) and several commercial tomato genotypes were used as a control to compare against the homozygous mutant genotypes. For the Petri dish experiments, total strigolactone extraction was performed from the root tissue of the genotypes, and applied to *P. aegyptiaca* seeds. In the Petri dish trials conducted at 20°C, the 18nt genotype reduced the germination of *P. aegyptiaca* seeds by 30% compared to the commercial tomato variety Torry F1, while the 186nt genotype reduced germination by 74%. In hydroponic trials, it was determined that the number of *P. aegyptiaca* tubercles attaching to the roots significantly decreased in the 18nt and 186nt genotypes compared to Torry F1, and the tubercles were unable to develop. In pot trials, it was found that the 18nt genotype did not show a significant difference in the total number of *P. aegyptiaca* shoots, while the 186nt genotype reduced the total shoot number by 71% compared to WT. According to RT-qPCR analysis results, the expression of the *SICCD7* gene did not

change in the 18nt and 186nt genotypes; however, the expression of other genes in the carotenoid pathway, *SICCD8* and Betakarotene, increased by approximately 22% and 39%, respectively, in the 186nt genotype. The level of orobanchol hormone in the 18nt genotype was reduced by 5% compared to WT, whereas the 186nt genotype exhibited an approximate decrease of 40%.

This study determined that the modification of the *CCD7* gene via the CRISPR/Cas9 technique can confer resistance to *P. aegyptiaca* in tomatoes. It was established that the 186-base mutation in the first exon of the *SICCD7* gene provides resistance against *P. aegyptiaca* compared to WT, while the 18-base mutation does not confer such resistance. The resistance studies conducted using the CRISPR/Cas9 technique are thought to be an effective strategy to control parasitic weeds. It has been shown that the 186nt genotype exhibits resistance that hinders both germination and tubercle development in *P. aegyptiaca*. However, the performance of this genotype should also be evaluated in areas naturally infested with broomrape. Additionally, testing the performance of the genotype against other broomrape species that pose problems in tomato production, such as *Phelipanche ramosa* and/or *Orobanche cernua*, would be beneficial.

KEYWORDS: Broomrape, CRISPR/Cas9, Resistance, Tomato, Strigolacton

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Yasin Emre KİTİŞ

Prof. Dr. Işık TEPE

Prof. Dr. Doğan IŞIK

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Assoc. Prof. Dr. Cengiz İKTEN

ÖNSÖZ

Domates, Orta ve Güney Amerika orijinli bir bitki türü olmasına rağmen, zamanla adaptasyon kabiliyeti nedeniyle birçok ülkede yetiştiriciliği yapılan bir sebze türü haline gelmiştir. Kök paraziti olan canavar otları (*Phelipanche* spp. /*Orobanchae* spp.) domateste önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Birçok herbisit, canavar otlarını kontrol etmek için kullanılmış olsa da konukçu bitkiye seçicilik ana engel olarak kalmıştır. Bu nedenle dayanıklı çeşitlerin kullanılması kimyasalların neden olduğu sorunları azaltmakta ve mücadele için etkili bir yöntem olmaktadır. Bu nedenle kültür bitkilerinde yeni biyoteknolojik yaklaşımların kullanılarak, kültür bitkilerine dayanıklılık kazandırılması gerekliliği doğmuştur. Bu çalışmada CRISPR-Cas9 tekniği kullanılarak domateste strigolakton biyosentezinde görev alan *CCD7* geninin ilk ekzonunda yapılan 18 ve 186 nükleotit çerçeve mutasyonunun (in-frame delesyonu) ile elde edilen 18nt ve 186nt genotiplerinin yabani tip ve yaygın olarak kullanılan ticari domates çeşitlerine göre sağladıkları dayanıklılığın araştırılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması boyunca tavsiyeleriyle araştırmaya yön veren, danışman hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Yasin Emre KİTİŞ'e,

Tez çalışmalarımın büyük bir kısmında laboratuvarını kullandığım, katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Nedim Mutlu (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü)'ya, Tez izleme komitesi süresince değerli katkıları için Sayın Doç. Dr. Cengiz İKTEN (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü)'e, Sayın Prof. Dr. Işık TEPE (Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü)'ye ve Sayın Prof. Dr. Doğan IŞIK (Erciyes Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü)'a,

Kromatografi çalışmaları kapsamında bilgi ve deneyimleri ile destek olan Sayın Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü)'e,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Herboloji Laboratuvarı öğrencileri Ziraat Mühendisi İpek ECE'ye, Zir. Yüksek Müh. Aleyna SARUHAN'a,

Mutant domates genotiplerini sağlayan ve deneyimleriyle yardımcı olan Dr. Cansu ŞİMŞEK'e, Prof. Dr. Nedim MUTLU laboratuvar ekibinden Dr. Selcen DOĞAN'a, Dr. Vese PAKASHTICA'ya Zir. Yüksek Müh. Alparslan KARABENİZ'e, Biyolog Adem KABA'ya, Zir. Yüksek Müh. Enes GÜLMEZ'e, Zir. Yüksek Müh. Ahmet Barkan BOSTAN'a, ve Mamoudou ZONON'a,

Çalışmalarımın bir kısmını yürüttüğüm Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitü Müdürlüğü (BATEM)'ne, Enstitü Müdürü Sayın Dr. Abdullah ÜNLÜ'ye ve Gıda ve Tıbbi Aromatik Bitkiler Bölüm Başkanı Kimya Yüksek Mühendisi Orçun ÇINAR'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiiiiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	8
2.1 Kök Paraziti Bitkilere Karşı Yapılan Dayanıklılık Çalışmaları.....	8
2.1.1 <i>Striga</i> (<i>Striga</i> spp. Lour.)'ya karşı dayanıklılık çalışmaları.....	9
2.1.2 Canavar otları (<i>Orobancha/Phelipanche</i> spp.)'na karşı dayanıklılık çalışmaları.....	13
2.1.2.1 Ayçiçeğinde dayanıklılık çalışmaları.....	14
2.1.2.2 Baklagillerde dayanıklılık çalışmaları.....	17
2.1.2.3 Domateste dayanıklılık çalışmaları.....	20
2.2 CRISPR Yöntemiyle Kök Paraziti Bitkilere Karşı Yapılan Dayanıklılık Çalışmaları.....	23
3. MATERYAL VE METOT.....	25
3.1 Materyal.....	25
3.1.1 Domates genotipleri.....	25
3.1.2 Canavar otu tohumları.....	25
3.1.3 Çalışmada kullanılan kimyasallar, hazır setler.....	26
3.1.4 Çalışmada kullanılan cihazlar.....	28
3.2 Metot.....	29
3.2.1 Denemede kullanılan canavar otu türlerinin moleküler teşhisleri.....	29
3.2.1.1 DNA izolasyonu.....	29
3.2.1.2 PCR çalışması.....	30
3.2.2 Denemede kullanılan canavar otu tohumlarının canlılık testleri.....	31

3.2.3	Canavar otu tohum çimlenme denemeleri.....	32
3.2.3.1	Tohum yüzey dezenfeksiyonu.....	32
3.2.3.2	Domates kök ekstraktlarının elde edilmesi	32
3.2.3.3	Domates kök ekstraktlarının Petri kabı denemesinde canavar otuna etkisinin belirlenmesi	33
3.2.4	Hidroponik sistem denemeleri ile genotiplerin canavar otuna karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi	34
3.2.5	Saksı denemeleri ile genotiplerin canavar otuna karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi	36
3.2.6	Genotiplerin gen ekspresyon analizleri	37
3.2.6.1	RNA izolasyonu	37
3.2.6.2	RNA miktar ve kalitesinin belirlenmesi.....	38
3.2.6.3	DNase uygulaması	39
3.2.6.4	RT-qPCR işlemleri.....	40
3.2.7	Genotiplerin orobanchol içeriklerinin belirlenmesi.....	41
3.2.7.1	Domates kök eksudatlarının elde edilmesi.....	41
3.2.7.2	LC-MS/MS analizleri.....	41
3.2.8	İstatistik Analiz.....	42
4.	BULGULAR	43
4.1	Denemede Kullanılan Canavar Otu Türlerinin Moleküler Teşhisleri.....	43
4.2	Domates Kök Ekstraktlarının Petri Kabı Denemesinde Canavar Otuna Etkisinin Belirlenmesi.....	44
4.3	Hidroponik Sistem Denemeleri ile Genotiplerin Canavar Otuna Karşı Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi	46
4.4	Saksı Denemeleri ile Genotiplerin Canavar Otuna Karşı Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi	52
4.5	Genotiplerin Gen Ekspresyon Analizleri	59
4.5.1	RNA miktar ve kalitesinin belirlenmesi	59
4.5.2	DNase uygulaması.....	60
4.5.3	RT-qPCR işlemleri	61
4.6	Genotiplerin Orobanchol İçeriklerinin Belirlenmesi	63
5.	TARTIŞMA.....	66

6. SONUÇLAR	73
7. KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Gen dzenleme teknolojisi (CRISPR) ile elde edilen domates genotiplerinin canavar otuna (*Phelipanche spp.*) karşı dayanıklılık ve gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi**” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

.../.../2024

Esra ÇİĞNİTAŞ



SİMGELELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Santigrad derece
µl	: Mikro litre
g	: Gram
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
V	: Volt

Kisaltmalar

AFLP	:Amplified Fragment Length Polymorphism
ALS	:Aceto Lactase Synthase
AM	:Arbusküler Mikorhiza
Bp	:Base Pair
Cas9	:Crispr Associated Protein 9
CCD7	:Carotenoid Cleavage Dioxygenase 7
CCD8	:Carotenoid Cleavage Dioxygenase 8
cDNA	:Complementary Deoxyribonucleic Acid
CLM	:Confocal Laser Mikroskopi
CTAB	:Cetyl Trimethylammonium Bromide
CV	:Coefficient of Variation
DArT	:Diversity Arrays Technique

DLC	:Dehydrocostus Lactone
DMBQ	:Dimethoxy_Benzoquinone
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
DsRNA	:Double Strand Ribonucleik Asit
<i>df</i>	:Degrees of freedom
EMS	:Ethyl Methane Sulfonate
EtBr	:Ethidium Bromide
FAO	:Food And Agriculture Organization
FNM	:Fast Neutron Mutagenesis
GLDP	:Global Lentil Diversity Panel
<i>HaOr</i>	: <i>Helianthus annuus</i> Orobanç Dayanıklılık Geni
HIF	:Houstorial Initiation Factor
ICARDA	:International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
IMI	:Imidazolinone
INDEL	:Insertion And Deletion
IR	:Incompatible Response
LC-MS/MS	:Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry
<i>LGS</i>	:Low Germination Stimülant
LRR	:Leucine-Rich Repeat
LSD	:List Significant Differences
M6PR	:Mannoz 6-Fosfat Redüktaz
MALDI-TOF	:Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry
MAS	:Marker Asisted Selection
<i>MAX1</i>	:More Axillary Growth1
MgCl ₂	:Magnezyum Klorür

NT	:Nükleotid
<i>Or</i>	:Orobanj Dayanıklılık Geni
PCR	:Polimerase Chain Reaction
PEB	:Polyetilen Bag Assay
PMF	:Peptide Mass Finger
PR	:Pathogen Related
qPCR	:Quantitative Polymerase Chain Reaction
QTL	:Quantitative Trait Locus
RAPD	:Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic Acid
RIL	:Recombinant Inbred Lines
RNA	:Ribo Nükleik Asit
RNAi	:Rna interference
ROS	:Reactive Oxygen Species
RSG	:Resistant Striga Gesneroides Geni
RT-PCR	:Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SCAR	:Sequence Characterized Amplified Region
SL	:Strigolacton
SPTPA	:Sand Packed Titer Plate Assay
SSR	:Simple Sequence Repeat
TILLING	:Targeting Induced Local Lesions İn Genome
TRV	:Tobacco Rattle Virus
TTC	:Trifenil Tetrazolyum Klorür
TÜİK	:Türkiye İstatistik Kurumu
VIGS	:Virus-Induced Gene Silencing
WT	:Wild Type

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 3.1.** Canavar otu tohumlarının toplanması; **a)** enfekteli domates seralarından canavar otlarının toplanması; **b)** tohumların elenmesi; **c)** elenen tohumların kullanılıncaya kadar koyu renkli cam şişelerde saklanması 26
- Şekil 3.2.** Canavar otu tohumlarından DNA izolasyonu; **a)** 10 mg'lık tohum örnekleri; **b)** canavar otundan izole edilen DNA örnekleri..... 29
- Şekil 3.3.** Canavar otu tür teşhisleri için PCR işlemleri; **a)** DNA örneklerinin PCR için hazırlanması; **b)** PCR işlemi için primer ve diğer kimyasalların eklenmesi; **c)** PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi 30
- Şekil 3.4.** Canavar otu tohum canlılık testleri; **a)** tohumların %1 tetrazolyum tuzu ile inkübe edilmesi; **b)** inkübe edilen tohumların %5 NaOCl ile yıkanması; **c)** yıkanan tohumların embriyolarındaki renk değişiklikleri esas alınarak mikroskop altında incelenmesi..... 31
- Şekil 3.5.** Canavar otu tohumlarında yüzey dezenfeksiyonu işlemleri; **a)** küçük keselere konulması; **b)** tohumların %1 (h/h) sodyumhipoklorit (NaOCl) içerisinde bekletilmesi; **c)** tohumların %70 etanolde bekletilmesi 32
- Şekil 3.6.** Domates kök ekstraktlarının elde edilmesi; **a)** kaya yünü içeren kök kabında domates fidelerinin yetiştirilmesi; **b)** kök dokusuna sıvı azot ilave edilmesi; **c)** kök dokusunun ezilerek toz haline getirilmesi..... 33
- Şekil 3.7.** Domates kök ekstraktlarının canavar otuna etkisi; **a)** tohumların Petri kabına yerleştirilmesi; **b)** tohumların ön kondisyona alınması; **c)** kök ekstraktlarının Petri kaplarına eklenmesi; **d)** çimlenmiş tohumların binoküler mikroskop altında değerlendirilmesi..... 34
- Şekil 3.8.** Hidroponik sistem denemeleri ile genotiplerin canavar otuna karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi; **a)** hidroponik deneme için kök kaplarının hazırlanması; **b)** ön kondisyona alınmış canavar otu tohumlarının kök kabında fitre kağıdı üzerine eklenmesi **c)** domates fidesinin kök kabına yerleştirilmesi; **d)** kök kaplarında bulunan domates bitkilerinin kontrollü iklim odasında büyütülmesi; **e)** kök kabında gelişen tüberküllerin binoküler mikroskopta sayılması **f)** tüberküllerin büyüklüklerinin değerlendirilmesi; **g)** tüberküllerin kuru ağırlıklarının alınması 35
- Şekil 3.9.** Saksı denemeleri; **a)** canavar otu tohumlarının saksılara bulaştırılması; **b)** domates fidelerinin dikilmesi; **c)** canavar otu dal sayıları ile ilgili gözlemlerin alınması; **d)** canavar otu sürgünleri ve tüberküllerinin yaş ve kuru ağırlıklarının alınması 37
- Şekil 3.10.** RNA izolasyonu; **a)** genç domates bitkilerinin yapraklarının alınması; **b)** yaprakları ezmek için RB buffer kullanılması; **c)** pestel ve buffer yardımıyla ezilmiş domates yaprakları; **d)** total RNA lerin PCR işlemi için -80°C'de saklanması..... 38

Şekil 3.11. RNA miktar ve kalitesinin belirlenmesi; a) örneklerin -80 °C'den çıkarılarak buz küvetine alınması; b) dalga boylarına göre örneklerin RNA miktar ve kalitelerinin BioDrop cihazı ile ölçülmesi	38
Şekil 3.12. RNA örneklerine DNase uygulaması; a) Örneklerle DNase I enzimi eklenmesi; b) karışımın PCR'da 37°C'de inkübe edilmesi; c) Aktin primerleri kullanılarak yapılan PCR işlemi; d) PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi	39
Şekil 3.13. RT-qPCR işlemleri; a) Luna Universal One Step RT qPCR kiti kullanılarak örneklerin RT-qPCR için hazırlanması; b) reaksiyon koşulların light cycler cihazında ayarlanması; c) örneklerin cihaza yerleştirilmesi.....	40
Şekil 4.1. ITS350 ve rps2 primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri; a) rps2 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri; b) M: Moleküler markör (100 bp DNA ladder, GeneAll).....	43
Şekil 4.2. TTC tohum canlılık testi sonucu; a) soldan sağa ilk tohum cansız diğer iki tohum canlı; b) Endospermi kırmızıya boyanmış tohum.....	43
Şekil 4.3. Domates kök ekstraktlarının Petri kabı denemesinde 20°C'de canavar otunun tohum çimlenmesine etkisi; a) pozitif kontrol (GR24), b) negatif kontrol (su); c) 186nt genotipi; d) 18nt genotipi; e) TorryF1 ticari domates çeşidi	45
Şekil 4.4. Domates kök ekstraktlarının 18°C, 20°C ve 21°C'de canavar otu tohum çimlenme oranlarına etkisi	45
Şekil 4.5. <i>Solanum pennelli</i> LA 0716 aksasyonu yabancı domates genotipinin canavar otu enfeksiyonundan 30 gün sonra köklerinde oluşan tüberküller; a) kök kabında bitkinin görünümü; b) oluşan tüberküller; c) 1-2 mm çapında oluşan tüberküller	46
Şekil 4.6. <i>P. aegyptiaca</i> enfeksiyonundan 30 gün sonra köklerde oluşan 1-2 mm ve >2 mm çapındaki tüberküller; a) 186nt; b) 18nt; c) Torry F1 ticari domates çeşidi	49
Şekil 4.7. Domates genotiplerinin enfeksiyondan 10 gün sonra, 15 gün sonra ve 30 gün sonra köklerinde oluşan 1-2 mm ve >2 mm çapındaki tüberkül sayıları	49
Şekil 4.8. <i>P. aegyptiaca</i> enfeksiyonundan 30 gün sonra köklerde oluşan farklı büyüklükteki tüberküller; a) 186nt; b) 18nt; c) TorryF1 ticari domates çeşidi; d) BizimköyF1 ticari domates çeşidi	50
Şekil 4.9. Domates genotiplerinde enfeksiyondan 20 gün sonra köklerde oluşan 1-5 mm, 5-10 mm, >10 mm çapındaki tüberkül sayıları (ORT±SS).....	51
Şekil 4.10. <i>Solanum pennelli</i> LA 0716 aksasyonu domates genotipinin saksı denemesi; a) saksıda toprak yüzeyine çıkan canavar otu sürgünleri; b) sürgünler; c) tüberküller	52

Şekil 4.11. Domates genotiplerinde toprak yüzeyine çıkan sürgün ve toprak altında kalan canavar otu tüberküleri; a) ve e) 186nt mutant b) ve f) 18nt mutant c) ve g) TorryF1; d) ve h) BizimköyF1 domates çeşidi.....	53
Şekil 4.12. Domates genotiplerinde dikimden 130 gün sonra <i>P. aegyptiaca</i> 'nın çiçeklenme öncesi, çiçeklenme dönemi ve tohum oluşumu dönemindeki sürgün sayısına, toplam <i>P. aegyptiaca</i> sürgün sayısına ve toplam <i>P. aegyptiaca</i> tüberkül ve sürgün kuru biyokütlesine etkileri.....	55
Şekil 4.13. Domates genotiplerinin dikimden 90 gün sonra <i>P. aegyptiaca</i> çiçeklenme öncesi çiçeklenme, tohum dönemindeki sürgün sayısına, toplam <i>P. aegyptiaca</i> sürgün sayısına ve toplam <i>P. aegyptiaca</i> tüberkül ve sürgün kuru biyokütlesine etkileri	58
Şekil 4.14. Actin primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri; [M: Moleküler markör (100 bp DNA ladder, GeneAll); 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19: DNase uygulaması yapılan RNA örnekleri, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18: DNase uygulaması yapılmayan RNA örnekleri	61
Şekil 4.15. Aktin geninin 18nt, 186nt ve 267F1 (WT) bitkilerindeki çoğaltım eğrileri	61
Şekil 4.16. Domates genotiplerinin CCD7, CCD8 ve BetaKaroten genlerinin ekspresyon değerleri (ΔCt)	63
Şekil 4.17. Orobanchol kalibrasyon grafiği	64
Şekil 4.18. Orobanchol hormonunun alıkonma zamanı (retention time) eğrisi.....	64
Şekil 4.19. Domates genotiplerinin kök ekstraktlarındaki orobanchol miktarları (ppb)	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Canavar otu tohumu toplanan lokasyonlara ait bilgiler.....	25
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallara ait bilgiler	27
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan hazır kitlere ait bilgiler.....	28
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan cihazlara ait bilgiler	28
Çizelge 3.5. <i>Phelipanche</i> popülasyonlarının moleküler tanımlanmasında kullanılan primerlerin dizisi ve beklenen bant uzunluğu	31
Çizelge 3.6. PCR reaksiyon bileşenleri	39
Çizelge 3.7. RT-PCR reaksiyon bileşenleri	40
Çizelge 3.8. LC-MS/MS cihazı analitik koşulları.....	42
Çizelge 4.1. Domates kök ekstraktlarının 18°C, 20°C ve 21°C’de canavar otu tohumunun çimlenmesine etkisi.....	44
Çizelge 4.2. Domates genotiplerinde enfeksiyondan 10 gün sonra köklerde oluşan tüberkül sayıları.....	47
Çizelge 4.3. Domates genotiplerinde enfeksiyondan 15 gün sonra köklerde oluşan tüberkül sayıları.....	48
Çizelge 4.4. Domates genotiplerinde enfeksiyondan 30 gün sonra köklerde oluşan tüberkül sayıları.....	48
Çizelge 4.5. Domates genotiplerinde enfeksiyondan 20 gün sonra köklerde oluşan farklı büyüklükteki tüberkül sayıları ve biyokütleleri.....	51
Çizelge 4.6. Domates genotiplerinde dikimden 130 gün sonra canavar otunun çiçeklenme öncesi, çiçeklenme dönemi ve tohum oluşumu dönemindeki toplam sürgün sayısına etkisi	54
Çizelge 4.7. Domates genotiplerinin dikiminden 130 gün sonra canavar otunun toplam sürgün sayısına ve toplam sürgün ve tüberküllerin kuru ağırlığına etkisi	55
Çizelge 4.8. Domates genotiplerinin dikimden 90 gün sonra <i>P. aegyptiaca</i> ’nın çiçeklenme öncesi sürgün sayısı, çiçeklenme dönemindeki sürgün sayısı ve tohum dönemindeki sürgün sayısına etkisi	56
Çizelge 4.9. Domates genotiplerinin dikiminden 90 gün sonra <i>P. aegyptiaca</i> ’nın sürgün sayısına ve toplam sürgün ve tüberküllerin kuru biyokütlesine etkisi	57

Çizelge 4.10. Domates genotiplerinin 1. ve 2. saksı denemesi ortalamasına göre <i>P. aegyptiaca</i> 'nın sürgün sayısı ile toplam sürgün ve tüberküllerin kuru biyokütlesi üzerine etkisi	59
Çizelge 4.11. Domates genotiplerinin Biodrop ölçüm sonucu total RNA Miktarları ...	60
Çizelge 4.12. Domates Genotiplerinin <i>CCD7</i> , <i>CCD8</i> ve <i>BetaKaroten</i> genlerinin ekspresyon değerlerini (Δ Ct)	62
Çizelge 4.13. Domates genotiplerinin kök ekstraktlarındaki orobanchol miktarları (ppb)	65



1. GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), $2n = 24$ kromozoma sahip diploit bir bitkidir. Bu tür patates, patlıcan, tütün, biber ve petunya gibi ekonomik öneme sahip birçok bitki türünün yanı sıra 3000'den fazla tür içeren Solanaceae familyasına aittir (Bergougnoux, 2014). *Solanum*, Solanaceae familyasının 1250-1700 arasında tür bulunduran en zengin cinsidir (Frodin, 2004). *Solanum* cinsine ait türler, ılıman ve tropikal bölgelerde bulunup morfolojik ve ekolojik çeşitlilikleri ile dikkat çekerler. *Solanum* cinsinin muhtemelen ekonomik öneme sahip en önemli cins olduğu ve en fazla yetiştiriciliği yapılan türleri içerdiği bildirilmektedir (Weese ve Bohs, 2007).

Anavatamı And Dağları olan domates, 16. yüzyılda Avrupa'ya getirilmiştir (Gerszberg vd. 2015). Günümüzde, bu bitki dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilmekte olup, ekonomik açıdan önemli bir tarım ürünü haline gelmiştir. Aynı zamanda domates, agronomik açıdan önemli genlerin çift çenekli (dikotiledon) bitkilere aktarılması için model tür olarak kullanılmaktadır (Paduchuri vd. 2010). Domatesin yabani akrabalarının çeşitlilik merkezi Peru olarak kabul edilmektedir. Orta Amerika'da yaygın olarak bulunan *S. lycopersicum cerasiforme*, kültür domatesinin atası olarak değerlendirilmektedir (Bai ve Lindhout, 2007). Bununla birlikte, son kapsamlı genetik çalışmalar, domatesin en yakın akrabasının *Solanum pimpinellifolium* olduğunu ortaya koymuştur (Tomato Genome Consortium, 2012).

Domates, sahip olduğu besleyici değer nedeniyle koruyucu bir gıda olarak kabul edilir. Çünkü likopen, beta-karoten, flavonoidler, C vitamini ve hidroksisünamik asit türevleri gibi önemli besin maddeleri sağlamaktadır. Ayrıca, likopenin antioksidan özellikleri ve kanser karşıtı işlevlerinin keşfedilmesiyle birlikte bu bitkiye olan ilgi, özellikle son yıllarda artmıştır (Wu vd. 2011; Raiola vd. 2014). Bu nedenle, domates üretimi ve tüketimi artış eğilimindedir. Domates taze tüketimin yanında, gıda sanayinde dondurulmuş, salça, sos, ketçap, turşu, domates suyu, domates püresi, soyulmuş domates, dilimlenmiş domates, küp şeklinde doğranmış domates, kurutulmuş domates, domates konservesi gibi çeşitli kullanım alanlarına da sahiptir (Ertürk ve Çirka, 2015). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) üretim verilerine göre 168 ülkede yaklaşık 4.9 milyon hektar alanda 186 milyon ton domates üretimi yapılmaktadır. Türkiye, 158 bin hektar üretim alanı, 13 milyon ton üretim miktarı ile dünya domates üretiminin yaklaşık %7'ini gerçekleştirerek, Çin ile Hindistan'dan sonra dünyanın üçüncü büyük üreticisi konumundadır (FAOSTAT, 2022). Domates üretimi, Türkiye'de hem açıkta tarla sebzeçiliği hem de örtü altı üretimi şeklinde yapılmaktadır. Türkiye'nin sahip olduğu iklim ve coğrafik koşullar nedeniyle tüm bölgelerde domates üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Sanayi tipi domates ve sofralık tip domates olarak üretilen domatesin tarımı, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde yoğun olarak yapılmaktadır. Özellikle Ege ve Marmara bölgelerinin batı ve doğu kesimleri sanayi tipi üretime odaklanırken, Akdeniz, Ege ve Karadeniz bölgeleri sofralık domates üretiminde yoğunlaşmıştır (Çiftçi ve Tapkı, 2023). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nin verilerine göre Türkiye'de üretilen domatesin yaklaşık 9 milyon tonu açıkta 4 milyon tonu ise örtü altında gerçekleştirilmektedir. Antalya ilinde toplam örtü altı üretim alanı yaklaşık 249 bin dekar olup, bu üretim alanlarının yaklaşık %62'si olan 155 bin dekar alanda yaklaşık 2.5

milyon ton domates üretimi yapılmaktadır (TÜİK, 2023). Türkiye, 2023 yılında yaklaşık 558 bin ton domates ihracatı gerçekleştirmiş ve bu ihracattan yaklaşık 452 bin dolar gelir elde etmiştir. İhracat pazarında en büyük payı %15 ile Suriye alırken, onu %14.3 ile Ukrayna ve %11.7 ile Romanya takip etmiştir (Demircan, 2023).

Dünya'nın birçok farklı yerinde yetiştiriciliği yapılan, önemli tarımsal ürünlerde verim ve kalite kayıplarına neden olan birçok hastalık, zararlı ve yabancı ot türü bulunmaktadır (Bauske vd. 1998; Stall ve Gilreath, 2002). Yabancı otlar içerisinde ise özellikle tam parazit bitkiler direkt olarak besin elementlerini ve suyu kültür bitkisinden alarak verimi önemli oranda düşürürler (Twyford, 2018). Kök paraziti bitkiler Orobanchaceae familyasına ait zorunlu parazit bitkiler olup özellikle *Striga*, *Orobanche*, *Phelipanche* türleri tarımsal alanlarda ciddi kayıplara neden olmaktadır (Parker, 2013). *Striga* cinsine ait *Striga hermonthica* ve *Striga asiatica* Afrika ve Asya'da geniş bir dağılıma sahip olup, mısır (*Zea mays* L.), sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) ve darı, çim (*Pennisetum*, *Panicum*, *Eleusine*, *Digitaria* vb.), çeltik (*Oryza sativa* L.) ve şeker kamışında (*Saccharum officinarum* L.) önemli zararlar oluşturmaktadır (Parker, 2012). Bu iki türün aksine diğer bir *Striga* türü olan *Striga gesnerioides*, yalnızca geniş yapraklı konukçularda zarar oluşturur. Özellikle börülcede (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. Da) *S. gesnerioides*'in farklı virülenslik gösteren ırkları zarar oluşturmaktadır (Ouédraogo vd. 2002). Domateste önemli verim kayıplarına yol açan tam parazit bitkilerin en önemlileri canavar otları (*Orobanche* spp. / *Phelipanche* spp.)'dir (Mauromicale vd. 2008; Eizenberg ve Goldwasser, 2018).

Tarımsal alanlarda yabancı ot olarak sorun olan canavar otları *Orobanche* cinsine ait olup, Sec. *Trionychon* ve Sec. *Orobanche* olmak üzere iki alt cinse ayrılmaktadır (Mannagetta, 1930). Bununla birlikte, iki alt cins arasındaki morfolojik ve karyolojik farklılıklar nedeniyle, cinsin ikiye ayrılması gerektiği düşünülmüştür. Teryokhin, (1997), "Yabancı Ot Olarak Canavar Otları" isimli kitabında bu konuyu tartışmış ve kendi gözlemlerini ekleyerek cinsin ikiye ayrılmasının bir zorunluluk olduğu kanaatine varmıştır. Bu nedenle, Sec. *Trionychon* türlerini ayrı bir cins olan *Phelipanche* Pomel altında gruplandırmıştır. Ancak, bu iki alt cins arasındaki filogenetik ilişkilere dair hiçbir kanıt bulunmadığından birçok araştırmacı, bu zamana kadar geleneksel terminolojiyi korumuştur. Ancak, son zamanlarda Schneeweiss vd. (2004), Schneeweiss vd. (2005) ve Manen vd. (2004) tarafından yapılan filogenetik çalışmalar, nükleer ribozomal DNA ve plastid genomundan alınan DNA dizilerine dayanarak, *Orobanche*'nin monofiletik olmadığını, ancak iki filogenetik olarak farklı klad içerdiğini ortaya koymuştur. Bu moleküler sonuçlar, önceden rapor edilen morfolojik bulguları tamamlamış ve sonuç olarak, iki alt cinsin *Orobanche* ve *Phelipanche* olarak iki ayrı cins haline getirilmesi kararı alınmıştır. Nitekim, Türkiye'de 2009 yılında onuncusu düzenlenen Dünya Parazit Bitkiler Kongresi'nde (10thWCPP), *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel (syn. *O. ramosa* L.) ve *P. aegyptiaca* (Pers.) Pomel (syn. *O. aegyptiaca* Pers.) adlarını kullanmamız gerektiği rapor edilmiştir (Joel, 2009). Bu bitkiler, Güney ve Doğu Avrupa, Orta Doğu ve Kuzey Afrika'ya yayılmış olan, geniş bir konukçu dizisine sahip obligat parazitlerdir (Twyford, 2018). Dünya'nın farklı yerlerinde bulunan canavar otlarının günümüzde 200 türü tanımlanmış (Parker ve Riches, 1993), ülkemizde ise 40 türünün bulunduğu bildirilmiştir (Zare ve Dönmez, 2014). Bu türler içinde tarım alanlarında sorun olmaları nedeniyle en önemlileri boğumlu canavar otu (*Orobanche cernua* Loeff.) (Domínguez vd. 1996), ayçiçeği canavar otu (*Orobanche cumana* Wallr.) (Gagne vd. 1998), beyaz çiçekli

canavar otu (*Orobancha crenata* Forsk.) (Diego Rubiales vd. 2009), küçük canavar otu (*Orobancha minor* Sm.) (Yokota vd. 1998), mavi çiçekli canavar otu (*Phelipanche ramosa* L.) (Longo vd. 2010) ve mısırlı canavar otu (*Phelipanche aegyptiaca* Pers. (Pomel)'dır (Hershenthorn vd. 2009). Solanaceae familyası, ayçiçeği canavar otu dışındaki diğer canavar otu türlerinin konukçusudur. Fakat domateste özellikle mavi çiçekli canavar otu (*P. ramosa* L.) ve mısırlı canavar otu *P. aegyptiaca* Pers. (Pomel) sorun olmaktadır (Al-Wakeel vd. 2013; Eizenberg ve Goldwasser, 2018).

Canavar otlarının yaşam döngüsü preparazitik ve parazitik olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Preparazitik aşama konukçu bitki kökleri tarafından salgılanan strigolaktonların (SLs) parazit bitki tarafından algılanarak tohumlarının çimlenmesi ile başlamaktadır (Fernández-Aparicio vd. 2016). Strigolaktonlar bitki gelişimi ile konukçu bitki, arbusküler mikorizal (AM) funguslar ve parazit yabancı otlar arasındaki etkileşimleri kontrol eden bitki hormonları olarak bilinmektedir (Gomez-Roldan vd. 2008; Al-Babili ve Bouwmeester, 2015; Wang vd. 2020). Parazit bitki tarafından strigolaktonların algılanması, parazit bitki tohumlarında bulunan karrikin tepkilerini düzenleyen bir reseptörden evrimleşen ve yeni işlev kazanmış olan KAI2d reseptörleri tarafından gerçekleşmektedir (Nelson, 2021). Parazitik aşamada ise, parazit bitki emeç (haustorium) adı verilen özelleşmiş yapısı ile konukçu bitkinin iletim demetleri ile bağlantı kurar ve konukçu bitki ile makro ve mikro molekül akışı başlar (Yoshida vd. 2016). Parazit bitki konukçuya tutunduktan sonra, tüberkül adı verilen yapıyı oluşturur. Tüberküllerden gelişen sürgünler toprak yüzeyine çıkar ve çiçek açarak tohum oluştururlar (Rispaill vd. 2007). Canavar otları konukçu bitkinin fizyolojisinin bozulmasına (Alcántara vd. 2006) ve meyve kalitesinin düşmesine (Longo vd. 2010) neden olmaktadır.

Canavar otu türleri Dünya'nın farklı yerlerinde geniş tarım alanlarını etkileyerek tarımsal üretimde önemli kayıplara neden olur. Boğumlu canavar otu (*O. cernua*)'nun Güney Avrupa ve Afrika'daki geniş domates üretim alanlarında ve Hindistan'daki tütün üretiminde ciddi bir sorun haline geldiği ve tütüne verdiği zararın parazitinin ağırlığıyla orantılı olduğu belirlenmiştir (Hibberd vd. 1999). Tütün yetiştiriciliğinde Hindistan ve Pakistan'a ek olarak Ürdün, Etiyopya, Nepal ve Suudi Arabistan'da da *O. cernua* sorun olmaktadır. Hindistan'ın, Andhra Pradesh eyaletinde 40 bin hektarlık tütün üretim alanlarının yaklaşık yarısının *O. cernua* tarafından istila edildiği ve verimde %25-50 oranında kayıplar ve kalitede de düşüşler olduğu bildirilmiştir (Parker, 2013). Ayçiçeği canavar otu (*O. cumana*)'nun, İspanya, Macaristan, Romanya, Bulgaristan, Rusya, Ukrayna, Moldova, Türkiye, Suriye, İsrail ve Mısır'da ayçiçeği ekim alanlarında sorun olduğu, yapılan tahminlere göre Yunanistan'da 40 bin hektarlık alanda %60, Çin'de ise 20 bin hektarlık alanda %20-50 oranında kayıplara neden olmuştur (Parker, 2013). Beyaz çiçekli canavar otu (*O. crenata*), Akdeniz çevresinde büyük öneme sahiptir ve başta bakla olmak üzere mercimek, nohut, burçak ve tarla bezelyesi gibi önemli baklagil bitkilerine zarar vermektedir (Parker, 2013). İspanya, Portekiz, Suriye ve Fas'ta bakla ekim alanlarının %50'den fazlasının *O. crenata* tarafından istila edildiğini ve toplamda yaklaşık 180 bin hektarlık bir alanı kapsadığını tahmin edilmiştir (Sauerborn, 1991). Türkiye'nin bazı bölgelerinde bakla ve mercimek tarlalarının yarısından fazlasının istila edildiği bildirilmiştir (Bülbül vd. 2009). Küçük canavar otu (*O. minor*)'nun yonca ve korunga bitkilerinde tohum üretiminde önemli ekonomik zarar meydana getirdiği bildirilmektedir (Parker, 2013). *O. minor* nedeniyle toplam konukçu ağırlığında %15-50

oranında azalma olduğu, bu azalmanın büyük kısmının konukçunun çiçek yapısında olduğunu rapor edilmiştir (Lins vd. 2007). Mavi çiçekli canavar otu (*P. ramosa*)'nun, konukçu üzerindeki zararlı etkileri, parazitin kuru ağırlığından beklenenden daha fazla olabildiği bildirilmiştir (Parker, 2013). Domates sürgünlerinin kuru ağırlığında %60-70 oranında bir azalma gözlenmiş olup, bu azalmanın *P. ramosa*'nın ağırlığındaki artıştan orantısız şekilde daha fazla olduğu ve bitkinin klorofil içeriği ile fotosentezdeki %50 oranındaki düşüşten kaynaklandığı anlaşılmıştır (Mauromicale vd. 2008). *P. ramosa* nedeniyle domates ve tütündeki verim kayıplarının genellikle %30–50 oranında olduğu bildirilmiştir (Parker, 2013). Slovakya'da, bitki başına 10 ila 20 *P. ramosa* sürgününün %40–50 oranında verim düşüklüğüne neden olduğu rapor edilmiştir (Cagán ve Tóth, 2003). Şili'de domates üretim alanlarında %80 oranında kayıp olduğu tahmin edilmiştir (Díaz vd. 2006). İtalya'da, domates ve karnabaharda hektar başına 6–20 tonluk kayıplar bildirmiştir (Fracchiolla ve Boari, 2003). Sudan'da, bu parazit bitki nedeniyle domates suyu fabrikası kapanmıştır (Babiker vd. 1994). Bülbül vd. (2009) Türkiye'de Doğu Akdeniz bölgesinde domatesin yoğun bir şekilde istilaya uğradığını rapor etmişlerdir. Mısırlı canavar otu (*P. aegyptiaca*)'nun konukçu üzerindeki zararlı etkilerinin *P. ramosa*'dan farklı olmadığı bildirilmektedir (Parker, 2013). İsrail'de yapılan toprakta kg başına 100 tohum ile yapılan yapay *P. aegyptiaca* enfeksiyonunda havuçta %30'dan fazla verim kaybı (Bernhard vd. 1998), İran'da patatesten %71 verim kaybı, Rusya'da ise, karpuzda %50, kavunda %15–30 ve domateste %15 oranında kayıplar rapor edilmiştir (Parker ve Riches, 1993). Türkiye'de ise domateste *P. ramosa*'dan kaynaklı verim azalışının %24 oranında olduğu bildirilmiştir (Aksoy ve Uygur, 2008).

Canavar otlarının yaşam döngülerinin büyük kısmını toprak altında geçirmeleri, çok fazla sayıda ve küçük tohum oluşturmaları, tohumlarının uzun süre toprakta canlı olarak kalması, ve tohumların rüzgar, su, tarımsal aletler, hayvanlar ile kolaylıkla temiz alanlara yayılması nedeniyle mücadeleleri oldukça zordur (Goldwasser ve Rodenburg, 2013). Bu parazit bitkilerle kültürel, fiziksel, kimyasal, biyolojik mücadele yöntemleri ve dayanıklı çeşit geliştirme stratejileri bulunmaktadır (Fernández-Aparicio vd. 2016; Eizenberg ve Goldwasser, 2018) .

Mücadele yöntemlerinden elle yolma, canavar otları toprak yüzeyine çıktıktan sonra gerçekleştirilebilmektedir. Her ne kadar, konukçu bitki parazitten zaten zarar görmüş olsa bile, toprağa düşecek olan tohum miktarının azaltılması için bu yöntem etkili olmaktadır (Parker ve Riches, 1993). Fiziksel mücadele yöntemlerinden solarizasyon, aynı zamanda topraktaki canavar otu tohum bankasını azaltmak amacıyla kullanılan etkili bir yöntemdir (Abu-Irmaileh, 1991; Sauerborn vd. 1989). Birçok toprak kaynaklı hastalık ve zararlıların mücadelesinde kullanılan kimyasal toprak fumigantları aynı zamanda canavar otları ile mücadelede kullanılmaktadır. Fakat bu kimyasalların ekonomik olmaması, hedef dışı organizmalara toksik etkileri, hava ve su kirliliğine yol açmaları, özel ve maliyetli uygulama ekipmanları gerektirmeleri gibi nedenlerden dolayı kullanımları kısıtlıdır (Goldwasser ve Rodenburg, 2013). Canavar otlarının mücadelesinde tuzak ya da yakalayıcı bitkiler kullanılabilir. Tuzak bitkiler, parazit bitkinin çimlenmesini teşvik edebilen fakat konukçu olmayan bitkilerdir. Tuzak bitkinin kök salgıları nedeniyle çimlenen bitki konukçuya tutunamamakta ve kısa süre sonra ölmektedir (Parker ve Riches, 1993). Sorgum (*Sorghum bicolor*), arpa (*Hordeum vulgare*), mısır (*Zea mays*), baklagiller (*Vicia villosa* ve *V. atropurpurea*), üçgül (*Trifolium* spp.), keten (*Linum usitatissimum*), kişniş (*Coriandrum sativum*), kenevir

(*Cannabis sativa*), yeşil mercimek (*Phaseolus aureus*), fasulye (*Phaseolus vulgare*), yonca (*Medicago sativa*), soya fasulyesi (*Glycine max*) ve nohut (*Cicer arietinum*) canavar otlarının topraktaki tohum bankasını azaltmada etkili olduğu bildirilen önemli tuzak bitkilerdir (Kleifeld vd. 1994; Kebreab ve Murdoch, 2001; D Rubiales vd. 2009; Acharya, 2012; Qasem, 2019; Ye vd. 2020). Yakalayıcı bitkiler ise parazit bitkilerin konukçusu olup, parazit konukçu bitkinin köküne tutunduktan sonra bitkilerin yok edilmesi ile topraktaki tohum bankası azaltılmaktadır. Canavar otlarının mücadelesinde kullanılan yakalayıcı bitkiler bakla (*Vicia faba*), kolza (*Brassica campestris*), beyaz hardal (*Sinapis alba*), mercimek (*Lens culinaris*) ve çemen otu (*Trigonella foenum-graecum*) olduğu bildirilmektedir (Parker ve Riches, 1993). Canavar otları ile biyolojik mücadele kapsamında ise çeşitli funguslar, bakteriler ve böcek türleri üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Klein ve Kroschel, 2002; Boari ve Vurro, 2004; Zermane vd. 2007).

Parazit bitkilere karşı kimyasal mücadelede ALS grubu herbisitler kullanılmaktadır. Fakat parazit bitki tohumlarının toprakta farklı derinlikte bulunmaları herbisitlerin kullanımında zorluklara neden olmaktadır. Her bir herbisit toprak uygulamasının optimize edilmesi, yalnızca bitki kök yapısıyla değil, aynı zamanda kültür bitkisine tutunacak parazit bitki tohumunun bulunduğu yer ile uyumlu olması gerekmektedir (Eizenberg vd. 2007). Ayçiçeği canavar otunun mücadelesinde IMI tolerant "Clearfield" ayçiçeği çeşitleri geliştirilmekte ve IMI grubu herbisitler kullanılmaktadır (Tan vd. 2005). Canavar otları ile kimyasal mücadelenin mümkün olduğu durumlarda, çevre dostu herbisit uygulamaları için hassas tarım teknikleri dikkate alınmalı, optimum zamanlama ve kesin konumda uygulanması gerekmektedir (Eizenberg vd. 2013). Şu ana kadar konukçu bitkilere seçici canavar otlarının mücadelesinde etkili bulunan herbisit gruplarından biri olan ALS-inhibitörü herbisitler, parazit yabancı otların kimyasal kontrolü için mevcut en iyi seçenektir. Ancak, ALS-inhibitör herbisitlerin uygulanması, canavar otlarında herbisit direncine yol açtığı bildirilmiştir (Kaundun vd. 2024).

Kök paraziti yabancı otlarla mücadelede kullanılan yöntemlerin en önemlisi dayanıklı çeşit geliştirmektir (Cubero, 1986). Dayanıklı çeşit kullanımının çevre ve insan sağlığına zararının olmaması, herhangi bir uygulama ekipmanına gereksinim duyulmaması ve sürdürülebilir olması gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Rubiales vd. 2003). Canavar otlarına karşı konukçu bitkilerde, parazit bitkinin konukçuya tutunmadan önce ve konukçuya tutunduktan sonra olmak üzere iki tip dayanıklılık mekanizması bulunmaktadır (Fishman ve Shirasu, 2021; Jhu ve Sinha, 2022). Parazit bitkinin konukçuya bağlanmadan önceki dayanıklılık mekanizması, parazit bitki tohumlarının çimlenmesinin engellenmesidir. Kök paraziti bitkilerde çimlenmeyi, strigolakton (SL) olarak bilinen bitki hormonları teşvik etmektedir (Yoneyama vd. 2010). Konukçu bitkide SL sentezinin engellenmesi veya azaltılması, parazit bitkinin de tohumlarının çimlenmesini engellemekte veya azaltmaktadır. Konukçu bitkilerde SL sentezinden sorumlu birçok gen ve parazit bitkilerde çimlenmeyi teşvik eden birçok SL tespit edilmiştir (Gobena vd. 2017). Ayrıca konukçu bitkiden salgılanan bazı toksik bileşikler de parazit bitkinin gelişimini engelleyerek bir dayanıklılık oluşturabilmektedir. Örneğin bazı dayanıklı ayçiçeği çeşitleri, canavar otunun gelişimini engelleyen toksik kumarinler salgırlar (Serghini vd. 2001). Parazit bitki konukçuya tutunduktan sonraki dayanıklılık mekanizmaları ise hipersensitif (HR;aşırı duyarlılık) reaksiyonları, hormon odaklı sinyal

yolakları, hücre duvarlarının kalınlaşması ve savunma amaçlı ikincil metabolitlerin birikimi şeklindedir (Fishman ve Shirasu, 2021; Jhu ve Sinha, 2022).

Kültür bitkilerinden nohut (Brahmi vd. 2016), bakla (Gutiérrez vd. 2013), bezelye (Rubiales vd. 2005), ayçiçeği (Kaya, 2014; Martín-Sanz vd. 2020) bitkilerinde canavar otuna yönelik dayanıklılık çalışmaları yapılmaktadır. Fakat, domateste dayanıklılık kaynağının bulunmaması dayanıklılık ıslahı çalışmalarını sınırlandırmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında da dayanıklı domates çeşit ve hatlarını bulmaya yönelik çalışmaların sonuçsuz kaldığı anlaşılmıştır (Dalela ve Mathur, 1971; Abu-Gharbieh vd. 1978; Foy vd. 1988; Avdeyev vd. 2002). Doğu Avrupa'da canavar otuna karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiş olan PZU-11 domates hattının, farklı lokasyonlarda yapılan tarla denemelerinde aynı dayanıklılığı göstermediği tespit edilmiştir (Foy vd. 1987; Hershenhorn vd. 2009). Sınırlı genetik çeşitlilik, geleneksel ıslah metotları ile dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesini engellemektedir (Tester ve Langridge, 2010). Bu sınırlı genetik çeşitlilik, canavar otlarına karşı konukçu dayanıklılığı sağlamak için yeni biyoteknolojik yaklaşımların önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Parazit bitkilere karşı dayanıklılık geliştirmek için regülatör RNA molekülleri, CRISPR/Cas9 tekniği ve T-DNA eklemeleri kullanıldığı çalışmaların yapıldığı görülmektedir. Örneğin, Fast-neutron (FN) mutagenesis yöntemiyle, SL senteziyle ilişkili *SLCCD7* geninin düşük ekspresyonu ile karakterize edilen *SL-ORT1* genotipi domates elde edilmiştir. Bu genotip, SL eksikliği nedeniyle *O. cernua*, *O. crenata*, *P. aegyptiaca* ve *P. ramosa*'ya karşı dayanıklılık sağlamıştır (Dor vd. 2010; Koltai vd. 2010; Dor vd. 2011). Ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenesis tekniği ile M2 generasyonunda, *P. ramosa*'ya karşı dayanıklı altı genotip elde edilmiştir (Kostov vd. 2007). "Targeting Induced Local Lesions in Genome" (TILLING) yöntemiyle, SL sentezindeki değişiklikler ile *P. ramosa*'ya karşı dayanıklı domates genotipleri elde edilmiştir (Minoia vd. 2010; Disciglio vd. 2016). Ayrıca, iki Micro-Tom domates genotipinde *CCD8* geninde tek nokta mutasyonu sonucu, *P. aegyptiaca* ve *O. minor*'a karşı dayanıklılık elde edilmiştir (Hasegawa vd. 2018). Transgenesis tekniği kullanılarak, *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklı domates bitkileri elde edilmiştir (Aly vd. 2006). RNAi teknolojisi kullanılarak, mannitol birikiminde önemli parazit genlerinden M6PR'nın konukçu aracılığı ile susturulması sonucu *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklılık geliştirilmiştir (Aly vd. 2009). Domateste *P. ramosa*'ya karşı dayanıklılık *CCD7* geni (Vogel vd. 2010) ve *CCD8* geninin (Kohlen vd. 2012) susturulması ile elde edilmiştir. Ayrıca *P. aegyptiaca*'nın konukçusunu parazitlenmesinde önemli olan *PaACS*, *PaM6PR*, *PaPrx1* genlerinin RNAi ile susturulması sonucunda dayanıklı bitkiler elde edilmiştir (Dubey vd. 2017).

Kümelenmiş düzenli aralıklarla kısa palindromik tekrarlar/CRISPR yöntemi, çeşitli organizmalarda başarılı olan güçlü bir genom mühendisliği teknolojisi olarak ortaya çıkmıştır (Doudna ve Charpentier, 2014). Cas9 aracılığı genom düzenleme teknolojisinin tarımda kullanımı diğer klasik yöntemlere göre çok büyük avantajlar sağlar. Belirli bir hedef dizide istenen modifikasyonları üreterek, geleneksel geri çaprazlamalar veya bitki ıslahı olmaksızın kültür bitkilerinde dayanıklılık sağlayan mutasyonların doğrudan uygulanmasına izin verir (Ricroch vd. 2024). Parazit bitkilere karşı CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak yeni dayanıklılık kaynakları geliştirilebilmektedir. Örneğin, CRISPR-Cas9 yöntemi kullanılarak, SL biyosentezinde rol oynayan *CCD8* geni (Bari vd. 2019), *MAX1* geni (Bari vd. 2021), *P450* ve *CYP722C* geni (Wakabayashi vd. 2019) ve *ATP-Binding (ABCG)* genleri (Bari vd. 2021) manipüle

edilerek canavar otlarına karşı farklı seviyelerde dayanıklılık gösteren genotipler elde edilmiştir. Fakat, CRISPR-Cas9 yöntemi kullanılarak SL biyosentezinde yer alan *CCD7* geninde yapılan çerçeve mutasyonunun (in-frame delesyonu) canavar otuna karşı dayanıklılık sağladığını gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, domates bitkisinde canavar otuna karşı dayanıklılık geliştirme potansiyelini araştırmak amacıyla, CRISPR-Cas9 tekniği kullanılarak SL biyosentezinde rol oynayan *CCD7* geninin ilk ekzonunda 18 ve 186 nükleotitlik in-frame delesyonlarla oluşturulan 18nt ve 186nt mutant domates genotiplerinin, yabani tip (WT) ve yaygın ticari domates çeşitlerine kıyasla dayanıklılık durumları belirlenmiştir. Bu kapsamda; a) Mutant genotiplerin canavar otuna karşı tepkileri in vitro ve in vivo testlerle değerlendirilmiş; b) *CCD7* geninin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiş; c) Mutant genotiplerde SL hormonlarından orobanchol miktarındaki değişimler araştırılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1 Kök Paraziti Bitkilere Karşı Yapılan Dayanıklılık Çalışmaları

Kök paraziti yabancı otlar, konukçu bitkinin su ve besin kaynaklarından faydalanmalarının yanı sıra konukçunun fotosentezini olumsuz yönde etkileyerek verimi düşürmektedirler (Watling ve Press, 2001). Bu parazit bitkilere karşı konukçu bitki dayanıklılığı, parazit bitki ile konukçu bitki arasındaki ilişkiyi erken aşamada engelleyerek verim düşüklüğünü engelleyen/azaltan etkili yöntemdir (Frost vd. 1997). Bu yöntem parazit yabancı otlarla mücadelede özel uygulama teknolojisi veya ekipman gerektirmemesi nedeniyle avantajlıdır ve farklı tarım uygulamalarına kolayca entegre edilebilir (Hearne, 2009). Kök paraziti yabancı otların yaygın olduğu bölgelerde dayanıklılıkla tarımsal verimi artırmaya yönelik ilk çalışmalar, değerli gen kaynaklarını ortaya çıkarmıştır (Cubero, 1986). Özellikle kültür bitkilerinin yabancı akrabalarında, dayanıklılık ıslahı çalışmalarında kullanılmak üzere dayanıklılık kaynakları tespit edilerek ıslah programlarında kullanılmıştır (Fernández-Martínez vd. 2000; Eizenberg vd. 2003; Fernández-Aparicio vd. 2009; Mbuvi vd. 2017; Rubiales, 2018; Bai vd. 2020; Hatami Maleki vd. 2024; Kaur vd. 2024).

Parazit yabancı otlara karşı toleranslık ve dayanıklılık özelliklerinin genetik kontrolü, konukçunun kök salgıları, yabancı ot tohum bankası yoğunluğu, sıcaklık, toprak tipi, yağış ve tarım uygulamaları gibi karmaşık etkileşimler nedeniyle çoğu kültür bitkisi için yavaş ilerlemiştir (Perez-Vich vd. 2013). Parazit bitkilere karşı dayanıklılık genellikle bir veya iki dominant gen tarafından kontrol edilen, baskın alellerle sağlanan dikey dayanıklılık ve genellikle birden fazla lokusta yer alan aleller aracılığıyla kalıtılan kısmi yatay dayanıklılık olarak sınıflandırılmaktadır (Molinero-Ruiz vd. 2009). Parazit bitkilerde dayanıklılık test yöntemlerinin geliştirilmesi sayesinde, her iki dayanıklılık türünde de, bu özelliklerin aktarıldığı kültür bitkileri çeşitlerinin tepkilerinin belirlenmesi mümkün hale gelmiştir (Hausmann vd. 2000; Kavuluko vd. 2021).

Bitki fizyolojisi temelli ıslah bitkilerin çevresel koşullara ve biyotik stres faktörlerine verdiği tepkileri anlamaya yönelik çalışmalarla geliştirilmektedir (Reynolds ve Langridge, 2016). Konukçu ve parazit bitki ilişkilerinin fizyolojisine dair artan bilgi birikimiyle yönlendirilen ıslah çalışmaları da, parazit bitki dayanımında önemli ilerlemeler sağlayabilmektedir (Pérez-Vich vd. 2013). Parazit bitkilerde fizyoloji temelli ıslah çalışmalarında parazitik ilişkinin her bir aşaması in vitro deneylerle ayrı ayrı incelenmekte, öncelikle başarılı bir parazitik ilişkinin kurulmasında rol oynayan spesifik süreçler (dokular ve sinyaller) tanımlanmakta daha sonra parazit bitkinin gelişimini engelleyen konukçu bitki çeşitleri seçilmektedir (Pérez-Vich vd. 2013). Bu fizyoloji temelli yaklaşım, ilk olarak *Striga* türleri tarafından parazitlenen sorgum *Sorghum bicolor* (L.) Moench bitkisi üzerinde tanımlanmış (Ejeta ve Butler, 1993) daha sonra *Orobanche* ve *Phelipanche* türleri tarafından parazitlenen bitkilere de uyarlanmıştır (Joel, 2000). Parazitik ilişki süresince, konukçu bitkide birçok gen ifade edilir ve bu genler parazitteki karşılık gelen genleri tetiklemektedir (Pérez-Vich vd. 2013). Bu genler özellikle parazit bitkiye karşı aşırı duyarlılık reaksiyonları (Mohamed vd. 2003) veya fitotoksin üretimi (Pérez-de-Luque vd. 2008) şeklinde oluşan dayanıklılık mekanizmalarına sebep olurlar. Bunlar dışında kalan ve parazit bitki dayanımı ile ilişkilendirilen genler ise kültür bitkisinin büyüme ve gelişmesi için gerekli olan genlerdir. Hem parazit bitkilerin hem de

arbusküler mikorizal fungusların çimlenme uyarıcısı olarak kullandıkları strigolakton üretimi ile ilişkili genler bu genlere örnek olarak verilebilir (Torres-Vera vd. 2016; Zhou vd. 2022). Fakat dikey dayanıklılık sağlayan savunma genlerinin genellikle dominant karakterde, basit kalıtıma sahip olmaları ve çeşide kolay aktarılabilmesi nedeniyle, parazit bitki dayanıklılık ıslahında daha fazla tercih edilmişlerdir (Pérez-Vich vd. 2013). Dayanıklılık ıslahının uzun süreli başarısı parazit bitki popülasyonlarında dayanıklılık genlerinin seleksiyon baskısı sonucu oluşacak virülensliğin oluşması ile sınırlanabilmektedir (Timko vd. 2012; Fernández-Melero vd. 2023).

Kök paraziti olan Orobanchaceae familyası üyelerine karşı dayanıklılığın, moleküler olarak belirlenebilmesi hem test süresini kısaltmakta hem de bu parazit bitkilerle mücadelenin daha etkin bir şekilde yapılmasına imkân sunmaktadır. Parazit bitkilerin dayanıklılığında, basit kalıtımla aktarılan dayanıklılığın altında yatan birkaç ana gen haritalanmış ve bu genlerle ilişkili moleküler markörler tanımlanmıştır. Parazitik Orobanchaceae familyasında dirençle ilişkili olan ve kantitatif özellikleri kontrol eden kromozomal bölgeler veya genler (QTL) tespit edilmiştir. Çeşitli konukçu parazit sistemleri için moleküler markörlerin geliştirilmekte ve markör destekli seleksiyon (MAS) ile dayanıklılık ıslahı çalışmaları yapılmaktadır (Pérez-Vich vd. 2013).

2.1.1 *Striga* (*Striga* spp. Lour.)'ya karşı dayanıklılık çalışmaları

Striga türleri, Afrika ve bazı Asya bölgelerinde başta sorgum ve mısır olmak üzere bu bölgelerin tarımında önemli rol oynayan birçok dar yapraklı kültür bitkisinde sorun olan kök paraziti bitkilerdir (Berner vd. 1995). Orobanchaceae familyasına ait, *Striga* türlerinin de dahil olduğu kök paraziti yabancı otların konukçu bitki ile erken dönemdeki karmaşık etkileşimlerinin in vitro yöntemler sayesinde gözlemlenebilmesi birçok kültür bitkisinde dayanıklılık karakterlerinin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Bu metotlar sorgum bitkisinde *Striga* spp'ya karşı çeşitli dayanıklılık mekanizmalarını karakterize etmek için kullanılmıştır (Pérez-Vich vd. 2013).

Güney Afrika'da, *Striga*'ya karşı ilk dayanıklılık çalışmalarına bakıldığında yıllar boyunca kök paraziti *Striga lutea*'ya dayanıklı sorgum (*Sorghum vulgare*) çeşitlerinin geliştirildiği görülmektedir (Saunders, 1942). Sorgum'da *Striga*'ya karşı bilinen en iyi dayanıklılık mekanizması, düşük çimlenme uyarıcı aktivitesidir ve tek bir resesif gen olan Low Germination Stimulant (*LGS*) geni tarafından kontrol edilmektedir (Satish vd. 2012). *LGS* genini bulduran sorgum genotipleri, şartlandırılmış *Striga* tohumlarının çimlenmesi için gerekli olan salgıları yetersiz miktarda üretirler (Ejeta, 2007). Düşük çimlenme uyarıcı üretimine ek olarak belirlenen diğer *Striga* dayanıklılık mekanizmaları, düşük haustoryal başlatma faktörü üretimi (HIF), aşırı duyarlılık (HR) ve konukçu genotiplerinin parazit bitkiye karşı uyumsuz yanıtı (IR)'dır (Ejeta, 2005). HIF'ye dayalı dayanıklılıkta ise, sorgum bitkilerinin kökleri yakınında çimlenen *Striga*, genellikle haustorium oluşturmaz ve bu nedenle konukçuya bağlanamadıkları için ölürlere (Ejeta, 2007). Birçok fenolik bileşikle beraber basit bir kinon olan DMBQ'nın *Striga*'da haustorium başlatıcı olarak işlev gördüğü kanıtlanmıştır (Lynn ve Chang, 1990). HR'ye dayalı dayanıklılıkta, parazit bitki ile konukçunun bağlandığı bölgeyi çevreleyen konukçu dokularında lokalize nekroz ile ilişkilidir ve bu genellikle *Striga*'yı öldüren fitotoksinlerin salınımı ile gerçekleşmektedir (Mohamed vd. 2003). Konukçu bitki hücre ölümü parazit bitkinin başarılı bir şekilde bitkiye yerleşmesini engelleyerek nihayetinde ölümüne neden

olur. IR dayanıklılık mekanizmasında ise parazit bağlanma bölgesini çevreleyen konukçu dokularında belirgin bir nekroz görülmemekte fakat muhtemelen yetersiz vasküler bağlantıların kurulmasından kaynaklanan veya toksik maddelerin üretilmesi nedeniyle parazit bitkinin büyüme ve gelişiminin bozulmasıdır (Grenier vd. 2001).

Williams (1959), ilk kez Güney Afrika'da 'Framida' isimli sorgum (*Sorghum vulgare*) çeşidi *Striga lutea* tohumlarının çimlenmesini sağlayan ve genellikle konukçunun köklerinden salgılanan uyarıcı maddeyi üretme yeteneğine sahip olmaması ile karakterize edilmiş, dayanıklı 'Framida' çeşidi ile Nijerya kökenli duyarlı 'Light Mori' çeşidi arasındaki karşılaştırma, bu farkı açıkça ortaya koymuştur.

Maiti vd. (1984), on adet sorgum hattında, *Striga* parazitizm mekanizmaları ve direnç faktörleri incelemiştir. Dayanıklı hatlarda, *S. asiatica* haustoriumlarının endodermisin ötesine geçemediği gözlemlenirken, duyarlı hatlarda haustoriumlar endodermise penetrasyon sağlayarak yerleşmiştir. Dayanıklı hatların, endodermis hücrelerinde belirgin bir kalınlaşma ve silika birikimi gösterirken, bu özellikler duyarlı hatlarda gözlemlenmemiştir.

Vaidya vd. (1991), *S. asiatica* ve *S. forbesii*'ye karşı düşük stimülant madde üreten dayanıklı ıslah materyali olarak kullanılabilir 48 sorgum ıslah hattı elde etmişlerdir.

Siame vd. (1993), mısır, sorgum ve darının kök salgılarının kromatografik analizleri sonucunda *Striga asiatica*'nın tohum çimlenmesini teşvik eden bileşenin strigol olduğunu belirlemişlerdir.

Vogler vd. (1996), sorgum bitkisinde *Striga*'ya karşı bilinen en etkili direnç mekanizmalarından biri olan, konukçu bitkinin köklerinden *Striga* tohumlarının çimlenmesi için gerekli uyarıcı bileşikler düşük seviyede üreterek dayanıklılık sağlayan 'SRN-39' sorgum hattını ıslah çalışmalarında kullanmışlardır.

Lane vd. (1997), *S. hermonthica*'ya karşı mısırın yabancı akrabası *Zea diploperennis*'i test etmişlerdir. Bitkiler *S. hermonthica*'ya karşı heterojen direnç yanıtları göstermiş, *S. hermonthica* konukçu köküne daha az tutunmuş veya normal gelişim göstermemiştir. *S. hermonthica* tüberkül oluştursa da bazı dayanıklı *Z. diploperennis* bitkilerinde parazit bitkinin sürgün gelişimi ciddi şekilde kısıtlanmıştır. Diğer dayanıklı bitkilerde ise *S. hermonthica* tüberkül oluşumundan önce ölmüştür. Seçilen dayanıklı bitkilerden elde edilen tohumlar tekrar testlenmiş ve yeni nesillerde *S. hermonthica*'ya karşı direnç oranı sadece az bir artış göstermiştir, bu da direncin genetik temelinin karmaşık olduğunu düşündürmüştür.

Kim vd. (1999), Nijerya'nın Niger Eyaleti'nde 13 mısır hattını Nijerya'nın farklı bölgelerinden toplanan 12 farklı *Striga hermonthica* popülasyonuna karşı test etmişlerdir. Test sonuçlarına göre hatlar toleranslık düzeylerine göre üç gruba ayrılmıştır: toleranslı (6 hat), orta (4 hat) ve duyarlı (3 hat). En yüksek toleranslık düzeyine sahip hatlar mısırın yabancı akrabası olan *Zea diploperennis*'ten melezleme yoluyla elde edilen Per hatlarında ve Corn Belt hattı B73de elde edilmiş ayrıca bu hatlarda kök büyümesi fazla olmuştur.

Hausmann vd. (2001), Mali, Nijerya ve Kenya'dan gelen *S. hermonthica* popülasyonlarını kullanarak tohum çimlenmesini uyarıcı kalıtımına sahip üç F₂ ve iki

F_{3:5} rekombinant sorgum inbred popülasyonu incelemiştir. Düşük uyarıcı hatlar (Framida, IS 9830) ile yüksek uyarıcı hat (E 36-1) arasında yapılan melezlerden elde edilen hatlar Mali ve Nijerya'dan gelen *Striga* ile test edilmiş fakat dayanıklı ile hassas hatlar birbirinden net olarak ayrılmamıştır.

Ouédraogo vd. (2002), *S. gesnerioides* ırk 1'e karşı dayanıklılığı sağlayan börülce (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) genlerine bağlı moleküler markörleri tanımlamak amacıyla dayanıklı "Gorom" ve hassas "Tvx 3236" hatlarını melezleyerek elde ettikleri F₂ popülasyonunda, *Rsg3* genine bağlı yedi AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markörü belirlemiştir. Bu markörler ile *Rsg3* arasındaki mesafelerin 9.9 ile 2.5 cM arasında değiştiğini bildirmiştir. IT81D-994 ve Tvx 3236 hatlarının melezlenmesi ile elde edilen ikinci bir F₂ popülasyonunda ise, *994-Rsg* genine bağlı beş AFLP markörü bulunmuş ve en yakın markörlerin sırasıyla 2.1 ve 2.0 cM uzaklıkta bulunan E-AAG/M-AAC₄₅₀ ve E-AAG/M-AAC₁₅₀ olmuştur. Ayrıca, *994-Rsg* ile bağlantılı iki markör olan E-AGA/M-CAG₃₀₀ ve E-AGA/M-CAG₄₅₀, *Rsg3* ile de bağlantılı bulunmuştur. İki dayanıklılık kaynağı arasında ortak moleküler markörlerin tespit edilmesi, *Striga* dayanıklılık genlerinin bu bitkilerde kümelenmiş olduğunu veya bu lokusların allelik olduğunu düşündürmüştür.

Gurney vd. (2003), mısırın yabani akrabası olan *Tripsacum dactyloides* ve mısır×*T. dactyloides* melezinin *S. hermonthica* enfeksiyonuna karşı duyarlılığını incelemiştir. *S. hermonthica* gelişimi, *T. dactyloides*'e bağlandıktan sonra durmuştur. Sonuçlar, *T. dactyloides*'in haustoryum gelişimini engelleyen bir sinyal ürettiğini ve bu sinyalin parazitin haustorial sistemi içinde taşınabilir olduğunu düşündürmüştür.

Pierce vd. (2003), on adet mısır çeşidini, *S. asiatica*'ya karşı test etmişlerdir. Kök kaplarında gözlemlenen testlerde, *S. asiatica* tüm çeşitlerin köklerine tutunmuş ve gelişmiş, bu da hiçbir çeşidin gerçek bir direnç mekanizması sergilemediğini göstermiştir. Ancak, IWD STR Co ve *Zea diploperennis* BC4C2 çeşitlerinin kök salgıları, *S. asiatica*'nın tohumlarının daha az çimlenmesine neden olmuş bu da düşük xenognosin üretimini olduğunu düşündürmüştür. Fakat 98 Syn WEC çeşidi yüksek xenognosin üretimine rağmen, parazit tutunması ve gelişimi açısından direnç göstermemiştir. Çalışma sonucunda düşük xenognosin üreten mısır çeşitleri ile *Striga* toleranslı hatların melezlenmesi ile *Striga* ile bulaşık alanlarda kullanılacak üstün performans gösteren çeşitler geliştirilebileceği bildirilmiştir.

Omanya vd. (2004), IS 9830 (düşük *Striga* çimlenme uyarıcı), E 36-1 (yüksek çimlenme uyarıcı) ve N 13 (mekanik direnç) sorgum hatları kullanılarak iki farklı çaprazlama (IS 9830 × E 36-1 ve N 13 × E 36-1) sonucu 226 adet F_{3:5} sorgum hattı geliştirmişlerdir. Bu hatlar, Kenya, Mali ve Nijerya'dan toplanan *S. hermonthica* popülasyonlarına karşı in vitro agar-jel testleri, saksı ve tarla denemeleri ile değerlendirilmiştir. Agar-jel testleri, düşük çimlenme uyarıcı özelliğine sahip dayanıklı hatların taranmasında hassas ve hızlı bir yöntem olarak öne çıksa da saksı taramalarının düşük kalıtım tahminleri ve tarla koşullarındaki direnç ile zayıf korelasyonları, bu yöntemin ıslah programlarındaki kullanımını sınırlandırdığı ve sabit *Striga* direnci elde etmek için genotip × çevre etkileşimlerinin önemi, çok lokasyonlu tarla denemelerinin gerekliliğini vurgulanmıştır.

Hausmann vd. (2004), sorgumda *S. hermonthica* dayanıklılığı için IS9830 × E36-1 (1) ve N13 × E36-1 (2) çaprazlamalarından elde edilen iki rekombinant inbred popülasyonu (RIP-1, -2) haritalamışlardır. Bu popülasyonlar, set 1 (116 hat) ve set 2 (110 hat) olarak değerlendirilmiştir. RIP-1’de, set 1 ve set 2’de sırasıyla 11 ve 9 adet QTL (kantitatif özellik lokusu) belirlenmiş ve bu QTL’ler genetik varyasyonun %77 ve %80’ini açıklamıştır. En önemli RIP-1 QTL’i, düşük *Striga* tohum çimlenme uyarımı ile ilişkili major-gen *LGS* geni ile örtüşmüştür. RIP-2’de ise, set 1 ve set 2’de sırasıyla 11 ve 9 adet QTL, genetik varyasyonun %79 ve %82’sini açıklamıştır. Her iki RIP popülasyonunda ortak olan beş QTL, direnç allellerinin IS9830 veya N13’ten geldiğini göstermiş, bu QTL’lerin *Striga* dayanıklılık ıslahında markör destekli seleksiyon (MAS) için etkili adaylar olabileceği bildirilmiştir.

Gurney vd. (2006), *S. hermonthica*’da konukçuya bağlandıktan sonra parazitin kök korteksine girmesine rağmen parazit-konukçu ksilem bağlantıları oluşturamaması nedeniyle dayanıklılık sergileyen Nipponbare ve hassas Kasalath arasında oluşturulan geri melez inbred hatlar kullanılarak yapılan kompozit aralıklı haritalamada, *S. hermonthica*’ya karşı dayanıklılığı sağlayan ve fenotipik varyansın %31’ini açıklayan yedi QTL tespit edilmiştir. İkinci bir bağımsız tarama bu QTL’lerden dördünü doğrulamış ve bu major genlerin, çeltik ıslahında *Striga* direncini artırmak için potansiyel olarak değerlendirilebileceği bildirilmiştir.

Grenier vd. (2007), sorgumda *S. hermonthica* ve *S. asiatica*’ya karşı dayanıklı ve hassas ebeveynlerin melezlenmesiyle çeşitli haritalama popülasyonları oluşturulmuştur. Bu popülasyonların *Striga* dayanıklılığının karmaşık mekanizmasını basit kalıtmı bileşenlere ayırabilmesi ve bu özelliklerin genetik analizi ve moleküler haritalaması, *Striga* dayanıklılığı için doğrulanmış ve sağlam moleküler markörlerin Afrika yerel çeşitlerine entegre edilmesinde önemli olduğu bildirilmiştir.

Swarbrick vd. (2008), *S. hermonthica*’ya karşı dayanıklı Nipponbare çeltik çeşidi ve hassas IAC 165 çeşidi kullanılarak yapılan mikroarray analizlerinde, dayanıklılık ile ilişkili kantitatif özellik lokuslarında (QTL) gen ekspresyonu profillenmiştir. Direnç gösteren Nipponbare’de savunma genleri, fenilpropanoid metabolizması ve WRKY transkripsiyon faktörleri gibi patojen savunma yanıtları ile ilişkili genler yukarı regüle olmuştur. Özellikle 12. kromozomda yer alan ve bilinmeyen fonksiyona sahip üç genin yüksek düzeyde ifade edildiği bulunmuş ve bu genlerin, dayanıklılık genleri olduğu öne sürülmüştür.

Amusan vd. (2008), iki mısır hattında *S. hermonthica*’nın konukçuya tutunduktan sonraki gelişimlerini histolojik olarak incelenmiş, dayanıklı ve hassas hatlar arasında morfolojik farklılıkları gözlemlenmişlerdir. Dayanıklı mısır hattında, daha az parazit tutunması, parazitin yavaş gelişimi ve köke tutunan parazit bitkide daha yüksek ölüm oranı görülürken, hassas hatta, *Striga* ksileme nüfuz etmiş ve önemli ölçüde iç haustorial gelişim göstermiştir. Dayanıklı hatta haustorial giriş genellikle endodermiste durdurulmuş ve daha az haustorial gelişim göstermiştir. Dayanıklı mısır hattı *Striga* parazitizmine karşı gelişimsel bir bariyer ve uyumsuz yanıt dayanıklılığı (IR) göstermiştir.

Li ve Timko (2009), bürülcede *S. gesnerioides* ırk-spesifik direnç, *RSG3-301* geninin kodladığı bir koil-koil nükleotid bağlanma yeri ve lösün-zengin tekrar (LRR)

içeren direnç proteini ile sağlanmakta olduğu, virüs kaynaklı gen susturma (VIGS) yöntemiyle *RSG3-301* geninin ifadesi baskılanmış, birçok ırka (multirace) karşı dayanıklı börülce çeşidi B301'de *RSG3-301* geninin susturulduğu bitkilerin *S. gesnerioides* ırk SG3'e karşı hipersensitif bir yanıt veremediğini ve parazitin nekrozunu teşvik ettiğini ortaya koymuştur. Ancak, SG2 ve SG5 ırklarına karşı direnç yanıtında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar, bitki-bitki etkileşimlerinde gene karşı gen dayanıklılık mekanizmasının aktif olduğunu göstermiştir.

Amusan vd. (2011), *Striga hermonthica*'nın (Del.) Benth. erken dönem konukçu bitkiye bağlandıktan sonraki dayanıklılık mekanizmasını incelemek amacıyla 'kumla doldurulmuş titer plaka testi' (SPTPA) adlı bir kök gözlem sistemini kullanmışlardır. Bu sistem, tarlada *Striga*'ya karşı dayanıklı ve hassas olduğu bilinen iki mısır ve iki sorgum saf hattında uygulanmıştır. Dayanıklı mısır ve sorgum hatlarında daha az *Striga* tutunması gözlenmiş, bu hatlarda parazitin gelişimi gecikmiş ve ölüm oranı hassas çeşitlere göre daha yüksek olmuştur. Genotiplerdeki dayanıklılık mekanizması parazit bitkiye karşı uyumsuz yanıt (IR) olarak tanımlanmıştır.

Satish vd. (2012), *Striga*'da düşük ve yüksek çimlenme uyarıcı aktivitesi gösteren SRN39 (düşük uyarıcı) × Shanqui Red (yüksek uyarıcı) sorgum çaprazlamasından elde edilen 354 rekombinant inbred hat, 367 DARt (Diversity Arrays Technique) ve SSR (Simple Sequence Repeat) markörü ile haritalanmış ve *LGS* geni, SBI-05 bölgesinde iki mikrosatellit markör (SB3344 ve SB3352) arasında 0.5-1.5 cM aralıkta konumlandırılmıştır. Genotipleme ve fenotipleme çalışmaları, 23 sorgum hattının 21'inde bu markörlerin *Striga* çimlenme aktivitesi ile segregasyon gösterdiğini doğrulamıştır. *LGS* lokusu, hem *S. asiatica* hem de *S. hermonthica*'ya karşı benzer direnç mekanizmaları sergilemiştir. Strigolakton biyosentezi ile ilişkili aday genler, *LGS* lokusunun bulunduğu bölgede tespit edilmiş ve bu bulgular, düşük çimlenme uyarıcı aktiviteye dayalı direnç mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılmasına katkı sağlamıştır.

Mbuvu vd. (2017), *Aethiopicum*, *drummondii* ve *arundinaceum* isimli yedi yabancı sorgum ırkının *Striga* enfeksiyonuna karşı dayanıklılık durumlarını belirlemeyi amaçlamışlardır. *Striga*'ya karşı sorgum testleri laboratuvar ve tarla denemeleri şeklinde gerçekleştirilmiştir. Üç yabancı sorgum genotipinde (WSA-1, WSE-1 ve WSA-2), N13 adlı genotipine göre *Striga* biyokütlesinin önemli oranda düşük olduğu tespit edilmiştir. Mikroskopik ve histolojik analizler, yabancı sorgum örneklerinin *Striga* haustorium'unun konukçu endodermisine girmesini engellediğini göstermiştir. Sonuç olarak, yabancı sorgum genotiplerinin, *Striga*'ya dayanıklı sorgum çeşitlerinin geliştirilmesi için önemli olduğu belirlenmiştir.

2.1.2 Canavar otları (*Orobancha/Phelipanche* spp.)'na karşı dayanıklılık çalışmaları

Canavar otları (*Orobancha* spp. ve *Phelipanche* spp.)'na karşı dayanıklılık geliştirme çalışmaları, *Striga*'ya karşı dayanıklı sorgum geliştirme çalışmalarında olduğu gibi direnç mekanizmalarının fizyolojik temellerinin karakterizasyonu ile yakın bir ilişki içinde yürütülememiştir (Pérez-Vich vd. 2013). Canavar otlarına karşı dayanıklı genotiplerin seçimi genellikle, parazit bitki tohumları ile toprağın inokülasyonu sera veya tarla denemeleri ile gerçekleştirilmiştir (Fernández-Martínez vd. 2000; Rubiales vd.

2006). Direnç mekanizmalarının karakterizasyonu genellikle dayanıklı genotiplerin belirlenmesini takiben yapılmıştır (Rubiales ve Fernández-Aparicio, 2012).

Canavar otlarına karşı direnç geliştirme stratejilerinin konukçu dayanıklılığının derecesi ve genetik kontrolüne bağlı olduğu ve çoğu konukçu türünde sadece orta veya düşük seviyelerde dayanıklılığın tanımlandığı ve ayçiçeğinde *O. cumana*'ya karşı dayanıklılık dışında diğer canavar otu türlerine karşı dayanıklılığın tek bir gen tarafından kontrol edilmediği ve ırk-spesifik olmadığı bildirilmiştir (Pérez-Vich vd. 2013).

Konukçu bitki direnç mekanizmalarının karakterizasyonu ve testlerin geliştirilmesi, yani birden fazla direnç/tolerans özelliğini tek bir çeşitte birleştirme stratejileri için çok önemlidir. *Striga*'da olduğu gibi, canavar otlarına karşı direnç hem konukçu köküne tutunmadan önce hem de tutunduktan sonraki aşamalarda ortaya çıkabilmektedir (Louarn vd. 2016; Sisou vd. 2021). Canavar otlarının çimlenmesini teşvik eden hormonların düşük üretimi, çimlenme engelleyici ve fitotoksinlerin salgılanması, canavar otlarının radikül oluşturması ve konukçu köküne tutunmasını engelleyen önemli mekanizmalardır (Labrousse vd. 2001; Bari vd. 2019). Konukçu bitki köküne tutunduktan sonra ise haustorial penetrasyonu durduracak çapraz protein bağlanması, suberizasyon ve kalloz depozisyonu gibi dayanıklılık mekanizmaları ortaya çıkmaktadır (Echevarría-Zomeño vd. 2006; Pérez-de-Luque vd. 2006; Letousey vd. 2007). Endodermal hücrelerin lignifikasyonu da *Orobanche* türlerine karşı bir savunma mekanizması olarak tanımlanmıştır (Pérez-de-Luque vd. 2005). Haustorium vasıtasıyla konukçu bitki ile vasküler bağlantılar kurulduktan sonra da konukçu ksilem bağlantılarının kapatılması ve üretilen toksik bileşiklerin parazite vasküler sistem aracılığıyla iletilmesi gibi ek savunma mekanizmaları devreye girebilmektedir (Pérez-de-Luque vd. 2008). Canavar otlarına karşı tek bir direnç mekanizmasının etkinliğine dair net bir bilgi bulunmamaktadır. Tam direnç sağlayan genotiplerde, özellikle ayçiçeğinde, farklı aşamalarda birden fazla direnç mekanizmasının varlığı ortaya çıkmıştır (Martín-Sanz vd. 2020; Sisou vd. 2021).

2.1.2.1 Ayçiçeğinde dayanıklılık çalışmaları

Orobanche cumana Wallr.'nın ayçiçeğinde meydana getirdiği ilk enfeksiyonlar, 19. yüzyılın sonunda Rusya'da ayçiçeği tarımının hızla yayılmasıyla başlamış ve bu durum, 20. yüzyılın başlarında dayanıklı bitki genetik kaynaklarını belirlemek amacıyla ıslah çalışmalarının başlatılmasına yol açmıştır (Pérez-de-Luque vd. 2009). *O. cumana*'nın ilk ırklarına karşı dayanıklılık kaynakları, yerli çeşitler ve çoğunlukla *Helianthus tuberosus* L. olmak üzere yabancı türler arasında tespit edilmiştir (Pustovoit, 1966).

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) *Orobanche cumana*'ya karşı direnç mekanizmaları, genel olarak kalitatif, yani tam, ırk spesifik ve bir veya iki lokus tarafından kontrol edilen bir yapıya sahiptir (Fernández-Martínez vd. 2008). Bu tür kalitatif veya dikey direnç mekanizmaları elit çeşitlere kolaylıkla entegre edilebilmekte fakat parazitin yeni ırkları dikey direnç mekanizmalarını aşabilme yeteneğine sahip olabilmektedir (Pérez-Vich vd. 2013). Akdeniz havzası ve Karadeniz bölgesinde ayçiçeği yetiştirilen alanlarda, bu yeni canavar otu ırkları, dayanıklılığı aşarak sürdürülebilir direnci tehdit etmektedir (Fernández-Melero vd. 2023).

Ish-Shalom-Gordon vd. (1993), 1983-1988 yılları arasında İsrail'deki dört farklı lokasyonda gerçekleştirilen denemelerde, *O. cumana* dayanıklılığının kalıtımı, dayanıklı SW-501 ve RW-637 ayçiçeği hatları ile Sunbred-254 hibritinin (SW-501 × RW-637), hassas Aya ve DI-1 ile yapılan melezlemeleri kullanılarak araştırılmıştır. SW-501 ve RW-637'deki dayanıklılığın, tek bir baskın gen tarafından sağlandığı, SW-501 tamamen dayanıklıyken, RW-637 heterozigot olup bir direnç ve bir hassas alleli taşıdığı, Sunbred-254'ün hassas Aya ile yapılan test melezlemesinde, 3 dayanıklı: 1 hassas oranı gözlemlenmiş olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar Sunbred-254'ün, SW-501 ve RW-637 arasındaki genetik farklılıkları yansıtan iki farklı genotipik alt popülasyondan oluştuğunu göstermiştir.

Sukno vd. (1999), ayçiçeğinde *O. cernua*'ya karşı farklı dayanıklılık kaynaklarının kalıtımını belirlemek ve direnç genleri arasındaki allelik ilişkileri belirlemek amacıyla altı dayanıklı ayçiçeği hattı (bir hat *Or5* genine sahip), iki hassas hat, dayanıklı ve hassas hatların F1 melezleri, dayanıklı F2 ve dayanıklı hatlar arasındaki BC1 jenerasyonları, *O. cernua*'nın yaygın olarak bulunan ve yüksek virüent SE 194 popülasyonuna karşı dayanım durumu değerlendirilmiştir. Hatlardaki genetik analizler, *O. cernua*'ya karşı direncin tek bir baskın gen tarafından sağlandığını göstermiştir. Ancak, dayanıklı hatların farklı bölgelerden ve yıllardan gelen *O. cernua* popülasyonlarına karşı tepkileri, yeni yüksek virüent popülasyonlara karşı farklılıklar göstermiştir. Sadece iki hat tüm popülasyonlara karşı direnç göstermiştir, bu da bu hatlardaki direncin *Or* lokusunda ek baskın alleller veya çok sıkı bağlı olmayan genler kümesi tarafından sağlandığını göstermiştir. *Or* dayanıklılık genini kıran yeni virüent *O.cernua* popülasyonlara karşı iki hatta bulunan dayanıklılığın, yeni dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı bildirilmiştir.

Lu vd. (2000), İki hassas × dayanıklı ayçiçeği hattı melezinden elde edilen F2 popülasyonlarına ait segregasyon verilerine dayanarak, *O. cumana*'nın E ırkına karşı direnç sağlayan *Or5* genini içeren, 61.9 cM uzunluğunda bir moleküler bağlanma haritası oluşturmuşlardır. Bu haritada üçü dominant, ikisi kodominant olmak üzere beş SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) markörü ve bir RAPD (Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic Acid) markörü tanımlanmıştır. Bu markörlerin, ayçiçeği ıslah hatları arasında dayanıklılık geninin etkin transferini kolaylaştıracağı bildirilmiştir.

Labrousse vd. (2001), dayanıklı yabancı ve melez (yabancı *Helianthus* × ayçiçeği) ayçiçeği çeşitlerinin direnç mekanizmalarını karakterize etmek amacıyla yürüttükleri çalışmada, *Helianthus* türlerinin *O. cumana*'ya karşı direncinde ana aşamalar (çimlenme, tutunma, tüberkül oluşumu ve gelişme) belirlendikten sonra çeşitli genetik kaynaklar test edilmiştir. Hidroponik kültür sistemi ile yeni *Helianthus* genetik kaynaklarının hızlı taranması ve direnç olgusunun daha hassas incelenmesi sağlanmış, dayanıklı ayçiçeği genotipi LR1'de yapılan histolojik gözlemler, konukçu-parazit etkileşiminde hücre duvarı kalınlaşması, iletim demetleri tıkanıklığı ve canavar otu hücrelerinin organizasyon bozukluğu gibi birkaç direnç mekanizması ortaya koyulmuştur. Buna karşılık, hassas genotip olan 2603'te herhangi bir reaksiyon gözlemlenmemiştir. LR1'in yabancı akrabası olan *H. debilis*, parazitin kortekse girmesini engelleyen bir yapı oluşturmuştur. Hassas hatta (2603) ayçiçeği kök ve tepe biyokütlesinde ciddi bir azalma gözlemlenmiş olup, bu durum canavar otu ile ayçiçeği arasındaki güçlü bir rekabet olduğunu kanıtlamıştır.

Pérez-Vich vd. (2004), *O. cumana* ırk E'ye karşı dominant, ırk F'ye karşı ise resesif dayanıklılık gösteren P-96 ayçiçeği hattında, bu ırlara karşı direnç sağlayan kantitatif özellik lokuslarını (QTL) haritalayarak karakterize etmişlerdir. Mikrosatellit ve RFLP markörleriyle yapılan tarama sonucu gerçekleştirilen haritalama analizlerinde toplamda ırk E'ye karşı beş QTL (or1.1, or3.1, or7.1, or13.1 ve or13.2) ve ırk F'ye karşı altı QTL (or1.1, or4.1, or5.1, or13.1, or13.2 ve or16.1) tespit edilmiştir. ırk E direnci esas olarak or3.1 QTL'si ile açıklanırken ($R^2 = \%59$), ırk F direnci küçük ve orta etkili QTL'ler ile açıklanmıştır ($R^2 \%15.0$ ile $\%38.7$ arasında). Or3.1, ırk E'ye özgü iken, or1.1, or13.1 ve or13.2 her iki ırka karşı direnç göstermiştir. Sonuçlar, ayçiçeğinde canavar otuna karşı direncin hem ırk-spesifik, hem de ırk-spesifik olmayan kantitatif direnç kombinasyonu ile kontrol edildiğini göstermiştir.

Echevarría-Zomeño vd. (2006), *Helianthus annuus* ve *O. cumana* arasındaki etkileşimi incelemiş ve direncin mekanizmalarını araştırmışlardır. *O. cumana* ırk F'ye karşı HE-39998 (hassas) ve HE-39999 (dayanıklı), saksı ve Petri kabı testlerinde kullanılmış ve sadece HE-39998 bitkilerinin ciddi şekilde etkilendiğini, bu hatta çok sayıda *O. cumana* bitkisini geliştirdiği, buna karşın HE-39999 köklerinde hiç tüberkül görülmediğini ve direncin parazit ve konukçu dokularındaki kahverengileşme belirtileriyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Parazit ile temas eden dayanıklı ayçiçeği hücrelerinde hücre duvarında süberizasyon ve protein çapraz bağlanması gözlemlenmiş ve bu süreç, parazitin penetrasyonunu ve konukçu vasküler sistemine bağlanmasını engellemiştir. Ayrıca, floresan ve konfokal lazer mikroskopi (CLM) gözlemleri, uyumsuz reaksiyon sırasında fenolik bileşiklerin biriktiğini ve bu metabolitlerin *H. annuus* ve *O. cumana* etkileşiminde savunma rolü oynadığını göstermiştir.

de Zélicourt vd. (2007), canavar otuna karşı dayanıklı bir ayçiçeğinde bitki savunma mekanizmasında önemli rol oynayan bitki savunma peptitlerinden (defensin), üç adet tanımlanmış (*SF18*, *SD2* ve *HaDef1*) ve sadece *HaDef1* *Orobancha cumana* enfeksiyon esnasında köklerde ifadesinin yükseldiği belirlenmiştir. Ayrıca testlerde, *Ha-DEF1*'in, *Orobancha* radikül uçlarında hızla kararırma belirtilerine neden olduğu fakat *Striga hermonthica* ya da *Arabidopsis thaliana* üzerinde bu etkilerin gözlenmediğini ortaya koymuştur. Bu durum, dayanıklı ayçiçeği köklerine bağlı *Orobancha* tüberküllerinde görülen nekrozla ilişkilendirilmiştir. FDA canlılık boyaması ile hücre ölümleri nedeniyle radikül uçlarının karardığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, bitki savunma peptitlerinin bitki hücreleri üzerinde ilk kez ölümcül bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayçiçeği *Ha-DEF1*, *Orobancha* hücre ölümündeki güçlü etki mekanizması ve bu toksinin konukçu direncinde doğrudan bir rol oynadığının kanıtlanması için daha fazla araştırmayı yapılması gerektiği bildirilmiştir.

Joel vd. (2011), ayçiçeği kök ekstrelerinde doğal bir çimlenme uyarıcısını bioassay-tabanlı saflaştırma yöntemiyle tanımlayarak kimyasal yapısı, guaianolide sesquiterpene lactone dehydrocostus lactone (DCL) olarak belirlemişlerdir. Düşük DCL konsantrasyonları, *O. cumana* tohumlarının çimlenmesini etkili bir şekilde uyarırken, *Phelipanche aegyptiaca* tohumları üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Daha önce DCL ve diğer sesquiterpen laktonlarının çeşitli bitki organlarında bulunduğu bilinmesine rağmen, bu çalışma ile ilk defa rizosfere salgılandıkları ve diğer organizmalarla etkileşime girdikleri belirlenmiştir.

Fernández-Aparicio vd. (2022), *OrDeb2* geninin *O. cumana*'ya karşı tutunma sonrası direnç yanıtını belirlediğini ve bu direncin, özellikle kortekste *O. cumana* gelişimini engellediğini bildirmişlerdir. *OrDeb2*'nin, ayçiçeği 4. kromozomunda bulunan 1.38 Mbp uzunluğundaki bir aralık içinde yer aldığı tespit edilmiştir. Bu bölge, hastalık direncinde rol oynayan dokuz reseptör-benzeri proteini ve sitoplazmik bir kinaz bölgesinden yoksun reseptör-benzeri kinazları içeren bir kümeye sahip olduğu ve diğer bitkilerde hastalık direnci ile ilişkili olan bu proteinlerin, ayrıca *O. cumana*'ya karşı ayçiçeğinde direnci sağladıkları için *OrDeb2* için değerli adaylar olduğu bildirilmiştir.

2.1.2.2 Baklagillerde dayanıklılık çalışmaları

Ayçiçeğinde *O. cumana*'ya karşı az sayıda majör gen tarafından sağlanan kalitatif veya dikey dayanıklılığın aksine, baklagillerde canavar otlarına karşı dayanıklılığın genellikle çok genle kontrol edilen ve ırk-spesifik olmayan bir yapıya sahip olduğu bildirilmiştir (Rubiales ve Fernández-Aparicio, 2012). Bakla (*Vicia faba* L.) ve adi fiğ (*Vicia sativa* L.)'de *O. crenata*'ya karşı dayanıklılık ile ilgili yapılan çeşitli genetik çalışmalar, dayanıklılığı kontrol eden genetik sistemin kuvvetli bir eklemeli bileşene sahip kantitatif bir yapıda olduğunu ortaya koymuştur (Cubero ve Hernández, 1991; Gil, 1999). Baklagillerde canavar otuna karşı dayanıklılıkta dominantlık varsa bu genellikle kısmi ve hassaslık yönünde olmasına rağmen, bazı bakla genotiplerinde (Cubero ve Hernández, 1991) ve adi fiğde (Gil, 1999) tam dominant dayanıklılık bildirilmiştir. Yapılan dayanıklılık çalışmalarında *O. crenata*'da ırkların varlığını destekleyen net bir kanıt bulunamamıştır (Radwan vd. 1988).

Román vd. (2002), baklada hassas (Vf6) ve dayanıklı (Vf136) ebeveynler çaprazlayarak elde ettikleri F2 popülasyonundan geliştirilen bir RAPD-tohum proteini gen-izoenzim haritasında dayanıklılık ile ilgili üç QTL (Oc1, Oc2 ve Oc3) tanımlamıştır. Bu üç QTL, *O. crenata*'ya karşı dirençte fenotipik varyasyonun %74'ünü açıklamış, ana QTL olan Oc1, fenotipik varyasyonun %35'inden fazlasını açıkladığını bildirmişlerdir.

Valderrama vd. (2004), bezelyede *O. crenata*'ya karşı dayanıklı bir yabancı bezelye (*Pisum sativum* subsp. *syriacum*) çeşidi ile hassas bir bezelye çeşidi arasındaki melezlemeden elde edilen 115 F2 popülasyonu, RAPD-STS genetik bağlantı haritasında kullanarak tanımlamışlardır ve dayanıklılık ile ilgili iki QTL (Ocp1 ve Ocp2) tespit etmişlerdir. Fakat bu QTL'ler gözlemlenen varyasyonun yalnızca orta derecede bir kısmını (sırasıyla %9.6 ve %11.4) açıkladığını bildirilmişlerdir.

Castillejo vd. (2004), *O. crenata*'ya mevcut en dayanıklı bezelye (*Pisum sativum* L.) genotipi Ps 624 ve duyarlı bir çeşit olan Messire ile, parazit bitkiye karşı genetik dayanıklılık testleri yapmışlardır. Denemeler, saksı ve Petri kabı yöntemleri kullanılarak yapılmış, her iki genotipin *O. crenata* tohumu çimlenmesi üzerine etki yüzdeleri arasında çok az fark bulunmuş, ancak Ps 624'te Messire'e kıyasla *O. crenata* tüberkül sayısında ve gelişim aşamalarında önemli bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Sağlıklı ve *O. crenata* ile enfekte olmuş bezelye kök dokularının protein profilleri iki boyutlu elektroforez ile analiz edilmiştir. Kontrol (enfekte olmayan), Messire ve Ps 624 genotipleri arasında en az 22 farklı protein noktası farklılaşmıştır. Bu proteinlerin bazıları MALDI-TOF kütle spektrometrisi ve veri tabanı aramalarıyla sistein proteinaz, β -1,3-glukanaz, endokitiniz, profukosidaz ve ABA-tepkili protein olarak tanımlanmıştır.

Parazitime tepki olarak, karbonhidrat metabolizmasına ait enzimler (fruktokinaz, fruktoz-bisfosfat aldolaz), azot metabolizması (ferredoksin-NADP redüktaz) ve mitokondriyal elektron zincir taşınımına ait proteinler (alternatif oksidaz 2) duyarlı Messire çeşidinde azalmıştır. Buna karşılık, Ps 624'te azot asimilasyon yolağına ait enzimler (glutamin sentetaz) veya patojen savunma proteinleri (PR proteinleri), β -1,3-glukanaz ve peroksidazlar artmıştır. Bezelyede *O.crenata* parazitizminde yanıt olarak karbonhidrat ve azot metabolizmasındaki değişiklikler ve savunma proteinlerinin devreye girdiğı belirlenmiştir.

Rubiales vd. (2006), *S. gesnerioides*'e karşı b r lcede dayanıklılık ile ilgili tek bir dominant genin (RSG) tanımlanarak ıslahta geniş çaplı olarak kullanıldığı, *Orobanche* türlerine karşı ise diğer baklagil bitkilerinde sadece orta ila d şuk seviyelerde dayanıklılık ve karmaşık kalıtım özellikleri tanımlandığını bildirmişlerdir. Bu durumun, bitki seleksiyonunu zorlaştırarak ıslah sürecini yavaşlattığını belirtmişlerdir.  n vitro tarama yöntemlerinin ve markör yardımıyla seleksiyon (MAS) tekniklerinin kullanımı, dayanıklılık kaynaklarının tanımlanması, farklı direnç mekanizmalarının tek bir çeşitte birleştirilmesi, sahada sürdürülebilir bir dayanıklılık sağlamaya katkı sunacağını bildirmişlerdir.

D az-Ruiz vd. (2009), baklada *O. foetida*'ya hassas (Vf6) ve dayanıklı (Vf136) ebeveynin melezlenmesinden elde edilen 144 Rekombinant Inbred Hattı (RIL), izoenzimler, RAPD, tohum protein genleri, mikrosatellitler ve SCAR markörleri kullanılarak dayanıklılığı kontrol eden kantitatif özelliik lokuslarını (QTL'ler) haritalamışlardır. Kromozom 1'de yer alan Of1 ve kromozom 3'te yer alan Of2 olmak üzere iki QTL tanımlamışlardır.

Castillejo vd. (2009), model baklagil bitkisi olarak kullanılan *Medicago truncatula*'nın *O.crenata*'ya verdiği yanıtı ve direncin moleküler temellerini incelemek amacıyla proteomik bir yaklaşım kullanmışlardır. *O.crenata*'ya dayanıklılık gösteren SA 27774 ve SA 4087 *M. truncatula* genotipinin kök proteomları, kontrol ve inoküle edilmiş bitkilerde enfeksiyon sonrası iki farklı zamanda (21 ve 25 gün) karşılaştırılmıştır.  nok le edilmemiş genotipler arasında 69 farklı protein noktası bulunurken, SA 4087 ve SA 27774 genotiplerinde sırasıyla 42 ve 25 protein noktası tespit edilmiştir. Toplamda, MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi sonrasında peptid kütle parmak izi (PMF) analiziyle 49 farklı protein noktası tanımlanmıştır. Genotipler arasında ve parazitik enfeksiyon sonrası anlamlı farklar gösteren proteinlerin birçoğunun savunma ve stresle ilgili fonksiyonel kategorilere ait olduğu belirlenmiştir.

D az-Ruiz vd. (2010), baklada *O. crenata*'ya hassas (Vf6) ve dayanıklı (Vf136) ebeveynler kullanılarak oluşturulan rekombinant inbred (RIL) hatlarında dayanıklılık ile ilişkili genetik bölgeleri tanımlamak ve bu bölgelerin Vf6 ve Vf136 hatlarının melezlenmesinden elde edilen orijinal F2 popülasyonundaki konumlarını doğrulamak amacıyla çalışma yapmışlardır. Oluşturulan popülasyonda *O. crenata* direncini kontrol eden dört QTL (Oc2-Oc5) tanımlanmıştır. F2 popülasyonunda daha önce bildirilen Oc1, ileri hatlarda anlamlı bulunmamıştır.

Fondevilla vd. (2010), *O. crenata*'ya karşı bezelyede dayanıklılıkla ilgili genleri haritalamak amacıyla, dayanıklı yabani bezelye eşidi (*Pisum sativum* ssp. *syriacum*) ile hassas bir bezelye çeşidi arasındaki çaprazlamadan elde edilen RIL popülasyonu, iki sezon boyunca arazi koşullarında denemişlerdir. *O. crenata* testlerinde enfeksiyon d ngs n n

farklı aşamalarındaki direnç tepkimeleri için Petri kabı yöntemi kullanılmış ve bu yaklaşım, tarlada dirençle ilişkilendirilen dört QTL tanımlamayı sağlamıştır.

Rubiales vd. (2020), *O. crenata*'ya dayanıklı yabani ve yerel bezelye çeşitlerinden *P. fulvum*, *P. sativum* ssp. *elatius*, *P. sativum* ssp. *syriacum* ile yapılan geniş çaplı melezlemelerden elde edilen bir dizi ileri düzey bezelye ıslah hattının geliştirilmiş ve ıslah hatlarının direnci beş saha denemesi ile doğrulanmış ve canavar otu çıkışında belirgin azalmalar görüldüğünü bildirmişlerdir. Kök kabı deneylerinde ise, bazı hatlarda daha az tüberkül oluşumu gözlemlenmiş, bazılarında ise tüberkül gelişiminin yavaşladığı veya nekrotik hale gelerek öldüğü görülmüştür. ıslah hatları agronomik olarak iyi performans göstermiş ve canavar otu enfeksiyonunun yüksek olduğu ortamlarda, anaç bezelye çeşidi Messire ile karşılaştırıldığında benzer veya daha yüksek verim değerlerinin elde edildiği bildirilmiştir.

González-Verdejo vd. (2020), burçak (*Vicia ervilia* L.)'ta *O. crenata*'ya karşı dayanım için 102 burçak genotipi testlenmiş ve sadece düşük seviyelerde *O. crenata* enfeksiyonu gösteren 16 genotip seçilmiştir. Seçilen burçak genotiplerinin performansını ve direnç mekanizmalarını incelemek için tarla ve kök kabı denemeleri kullanılmıştır. Ve.055 ve Ve.155 genotiplerinde düşük *O. crenata* çimlenmesi gösteren bir tutunma öncesi dayanım mekanizması, Ve.125 genotipinde ise parazitin penetrasyonuna karşı bir tutunma sonrası dayanıklılık tespit edilmiştir. Ayrıca, arazide dayanım gösteren Ve.123 genotipi, kök kabı denemelerinde hassas bir yanıt göstermiş, bu da vasküler bağlantıdan sonra çalışan ve büyük olasılıkla erken olgunlaşmaya bağlı olarak gelişen dayanıklılık mekanizmasının *O. crenata* gelişimini engellediğini göstermiştir.

Abdallah vd. (2021), 13 mürdümük (*Lathyrus* spp.) türüne ait 285 genotip, *O. crenata* Forsk. ve *O. foetida* Poir.'ya karşı testlemiştir. *O. foetida*'ya karşı direnç, *O. crenata*'ya göre daha yüksek bulunmuş, *L. articulatus* L.'nin *O. crenata* ve *O. foetida*'ya karşı tam direnç, *L. aphaca* L. ve *L. ochrus* (L.) DC.'ya karşı ise orta düzeyde direnç gösterdiği belirlenmiştir. *L. sativus* genotiplerinde *O. crenata*'ya karşı direnç, kontrollü koşullarda yapılan saksı denemeleriyle doğrulanmıştır. İki genotip (IG64782 ve IG65197) *O. crenata*'ya karşı tam direnç göstermiştir. Tarla denemelerinde düşük enfeksiyon gösteren orta derecede dayanıklı bir genotip olan IG116989, saksı denemesinde yüksek hassasiyet göstermiştir. Sonuçlar, *O. crenata* ve *O. foetida*'ya karşı direncin, parazit çimlenmesinin düşük olması ve tüberküllerin yavaş gelişimi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

En-Nahli vd. (2023), Global Mercimek Çeşitlilik Paneli (GLDP), yerel popülasyonlar, yerel ırklar, aksesyonlar, geliştirilmiş hatlar ve tescilli çeşitler dahil olmak üzere 1315 mercimek (*Lens culinaris* Medik.) genotipini, ICARDA'nın Fas'taki Marchouch araştırma istasyonunda *O. crenata* ile doğal bulaşık alanda dayanıklılık açısından değerlendirmişlerdir. Denemede en iyi performans gösteren genotipler, *O. crenata* enfeksiyon parametreleri ile tarımsal performans arasındaki korelasyonlara dayanarak seçilmiştir. Sonuçlar, incelenen genotipler arasında ve denenilen genotipler ile kontrol çeşitleri arasında verim, çiçeklenme ve olgunlaşma süresi, bitki boyu ve *O. crenata* etki düzeyi açısından anlamlı farklılıklar olduğunu göstermiştir. Çalışmanın *O. crenata*'ya karşı dayanıklı mercimek çeşitlerinin ıslahı açısından önemli bilgiler sunduğu bildirilmiştir.

2.1.2.3 Domateste dayanıklılık çalışmaları

Abu-Gharbieh vd. (1978), 100'ün üzerinde domates çeşidinde *Orobanche ramosa*'ya karşı yapılan testlerde yalnızca sekiz çeşidin (Campbell 28 dahil) *O. ramosa*'ya karşı hafif tolerans gösterdiği bildirilmiştir.

Foy vd. (1988), *Orobanche aegyptiaca*'ya karşı direnç testi yapılan 1361 domates arasında dayanım açısından yalnızca küçük farklar gözlemlenmiştir. Tüm hatlar çeşitli derecelerde hassasiyet göstermiş bu nedenle, domateste *Orobanche* türlerine karşı tam direnç bulma şansının düşük olduğu düşünülmüştür.

Qasem ve Kasrawi (1995), yirmi beş domates çeşidi ve bir yabancı domates aksesyonu, *Orobanche ramosa* karşı dayanıklılık açısından değerlendirmişlerdir. Domates çeşitlerinin, farklı büyüme parametrelerine dayalı olarak *Orobanche*'ye karşı dirençleri farklı bulunmuş, toplam *Orobanche* bitki sayısı, haustoryum gelişimi ve *Orobanche* sürgünlerinin sayısı, domates çeşitleri arasında farklılık göstermiştir. *Orobanche* bulaşmasına yanıt olarak domates çeşitleri arasında büyüme ve meyve veriminde de farklılıklar bulunmuştur. Domates çeşitlerini *Orobanche* direncine göre sıralamak, bu çeşitlerde farklı direnç mekanizmalarının varlığını gösterdiğini bildirmişlerdir. Tiny Tim, Acora, Castler, Pomodora, Orient, Red Alert ve *L. pimpinellifolium*'un LA 1478 aksesyonunda nispeten yüksek ila orta seviyelerde direnç elde edilmiştir. Tiny Tim çeşidi, tüm ölçülen parametrelerde ve tüm deneylerde en yüksek direnç seviyesini gösteren çeşit olmuştur.

Avdeyev vd. (2002), domateste yapay enfekte alanlarda yapılan tarama sonucunda, *Orobanche aegyptiaca* Pers. ve *Orobanche cumana* Wallr.'a karşı direnç genleri bulunan türler tespit edilmiştir. *O. aegyptiaca*'ya karşı yüksek derecede direnç gösteren domates genetik olarak araştırılmış ve bu direncin dominant tek bir gen tarafından kontrol edildiği, bu genin *Ora* olarak adlandırıldığı bulunmuştur. *Ora* geni, kromozom 11'in kısa kolunda, j genine yakın bir bölgede lokalize edilmiştir. *Ora*-genine sahip domateslerin direnç mekanizması, domates kök hücrelerinin canavar otu radiküllerinin köke penetrasyonuna karşı savunma tepkimesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Aly vd. (2006), sarcotoxin IA'nın, et sineği (*Sarcophaga peregrine*) tarafından kodlanan sarcotoxin I gen kümesinde, 63 amino asitlik bir peptit olduğu ve bu toksinin antimikrobiyal etkisinin daha önce, sarcotoxin IA geni klonlanmış transgenik tütün bitkilerinde, bakteriyel ve fungal patojenlere dayanıklılık sağladığının kanıtlandığı bildirildiğinden, sarcotoxin IA genini domatese klonlayarak *Orobanche aegyptiaca*'ya karşı dayanım elde etmeyi amaçlamışlardır. Bu nedenle sarcotoxin IA geni domatese klonlanmış, elde edilen transgenik domates bitkilerinin *O. aegyptiaca*'ya karşı dayanım durumları polietilen torba sistemi (PEB) ve saksı denemeleri ile test edilmiştir. Sonuçlar, transgenik bitkilerin parazit büyümesini güçlü bir şekilde engellediğini ve transgenik olmayanlara kıyasla verimi önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Hem PEB hem de saksı denemelerinde, parazit tüberküleri nekrotik hale gelmiş ve anormal bir şekilde gelişmiştir. Genin entegrasyonu ve ifadesi, Southern blot, RT-PCR ve Western blot analizleri ile doğrulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, domates hücrelerinde ifade olan böcek geninin *O. aegyptiaca*'ya seçici olarak toksik olduğunu ve domatese toksik olmadığını göstermiştir.

Kostov vd. (2007), *Orobanche ramosa* L.'ya karşı dayanıklılık sağlamak amacıyla domates tohumlarını etil metan sülfonat (EMS) ile kimyasal mutasyona tabi tutmuşlardır. Elde edilen mutant domates bitkilerinin canavar otuna karşı dayanıklılık durumları sera koşullarında ve polietilen torba sistemi (PEB) ile değerlendirmişlerdir. Mutant domates bitkilerinin M2 jenerasyonlarının dayanıklılık testleri, öncelikle serada yapılmış ve canavar otu ile enfekte olmayan 16 domates bitkisi seçilmiştir. Bu bitkilerden elde edilen yeni bitkiler (M3), yapay polietilen torba sistemi kullanılarak test edilmiştir. Testlerin sonucunda, *Orobanche ramosa* L.'ye karşı dayanıklılık düzeyi önemli ölçüde artırılmış altı domates hattı seçilmiştir.

Aly vd. (2009), *O. aegyptiaca*'nın gelişimi sırasında fazla miktarda mannitol biriktiği, Mannoz 6-fosfat redüktaz (M6PR)'ın, mannitol biyosentezinde kilit bir enzim olduğu bu nedenle, *Orobanche* M6PR geninin, *O. aegyptiaca* dayanımı sağlamak amacıyla susturulduğunu bildirmişlerdir. *O. aegyptiaca* M6PR-mRNA'sının 277 baz çiftinden oluşan özel bir parçayı ters tekrar konfigürasyonunda içeren bir gen yapısı taşıyan transgenik domates bitkileri elde etmişlerdir. M6PR-siRNA, R1 jenerasyonunda üç bağımsız transgenik domates hattında tespit edilmiş, ancak *O. aegyptiaca*'da tespit edilmemiştir. Kantitatif RT-PCR analizleri, transgenik domateste *O. aegyptiaca*'nın tüberkül ve toprakaltı sürgünlerinde M6PR mRNA miktarının %60–80 oranında azaldığını tespit edilmiştir. PEB testlerinde, *O. aegyptiaca* tüberküllerinin ölüm oranında önemli bir artış, M6PR mRNA baskılanmasına paralel olarak, mannitol seviyesinde önemli bir azalma gözlemlenmiştir.

Vogel vd. (2010), domateste *SICCD7* geninin strigolakton biyosentezinde görev aldığı, *Orobanche ramosa* tohumlarının çimlenme oranı, *SICCD7* mutant hatlarının kök özütü uygulandığında, WT kıyasla %90'a kadar azaldığı bildirilmiştir. Bu çalışma, *CCD7*'nin strigolakton üretimi, sürgün dallanması ve arbusküler mikoriza kaynaklı apokarotenoidlerin üretimindeki çeşitli rollerini ortaya koymuştur.

Dor vd. (2010), hızlı nötron mutagenesis (FNM) ile elde edilmiş M-82 domates mutanı SI-ORT1'in izole edilmesi ve karakterizasyonunu rapor etmişlerdir. SI-ORT1 mutanı, M-82 çeşidi ile karşılaştırıldığında *P. aegyptiaca*'ya karşı direnç göstermiş; ayrışma analizi tek bir resesif *ort1* alleli öngörmüştür. SI-ORT1'in kök parazitlerine karşı direnci, bitki başına daha düşük kök paraziti, daha düşük *P. aegyptiaca* biyokütlesi ve daha yüksek konukçu büyümesi ve verimi ile karakterize edilmiştir. SI-ORT1'in *P. aegyptiaca*, *P. ramosa*, *O. cernua* ve *O. crenata*'ya karşı dayanıklı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, SI-ORT1'in saha koşullarında kök parazitlerine karşı dayanıklı olduğu gösterilmiştir. Verim parametreleri mutasyondan biraz etkilenmiş olduğundan, bu direnç geninin farklı genetik arka planlara sahip domates çeşitlerine kazandırılması gerektiği ve bu yeni tanımlanan *Orobanche* dayanıklı mutant, *Orobanche* direnci için ıslah programlarında kullanılabileceği bildirilmiştir.

Koltai vd. (2010), domateste daha önce kök paraziti *Orobanche*'ye karşı dayanıklı olarak tanımlanan SI-ORT1, kök özütlerinin biyokimyasal analizi sonucu, domateste iki strigolakton olan solanacol ve didehidro-orobancholün bu mutant hatta çok düşük oranda olduğunu ilk defa bu çalışma ile belirlemişlerdir. Ayrıca, domateste strigolakton sentezinde rol oynadığı varsayılan bir ana enzimin (*CCD7*) transkripsiyon seviyesi, SI-ORT1'de, yabani tip (WT) ile karşılaştırıldığında azaldığı tespit edilmiştir. SI-ORT1 sürgünleri artmış yan sürgün dallanması göstermiş buna karşın, mutanta sentetik

strigolakton GR24 uygulaması, yan dalların sayısını azaltarak WT fenotipini geri kazandırmıştır. İlk domates strigolakton eksikliği mutantının karakterizasyonu, strigolaktonların, çeşitli bitki türlerinde yan sürgün dallanmasını baskılayan moleküller olduğu bildirilmiştir.

Dor vd. (2011), SL-ORT1 mutant domates bitkileri, hassas domates çeşidi M-82 ile saksılarda yetiştirildiğinde *P. aegyptiaca* tarafından parazitlendiğini belirlemişlerdir. SL-ORT1 kök özütlerinde *Phelipanche* tohumlarının çimlenmesini engelleyen veya toksik bir aktivite tespit edilememiştir. SL-ORT1 saksılarda *Phelipanche* tohumlarının çimlenmesini teşvik etmemiş ancak, sentetik stimülant GR24'ün rizosfere uygulanmasından sonra M-82 ile aynı seviyede parazitlenmiştir. M-82'nin kök özütleri sıvı kromatografi ve tandem kütle spektrometrisi analizi sonucu, strigolaktonların orobanchol, solanacol ve didehidro-orobanchol izomerinin olduğu belirlenmiş ve bu bileşikler SL-ORT1'in özütlerinde bulunmamıştır. SL-ORT1'in dayanıklılığının, doğal çimlenme uyarıcılarının salgılanmamasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Kohlen vd. (2012), domateste *SICCD8* geni klonlanmış ve rizosfer sinyalleri ile bitki fizyolojisindeki rolünü, mutant domates genotipleri elde ederek değerlendirmişlerdir. RNAi aracılı gen susturma yöntemi ile transgenik *SICCD8* bitkiler elde etmişlerdir. Strigolakton üretimindeki farklı seviyelerde azalmaya sahip hatlar UPLC-MS/MS ile doğrulanmış ve bu hatların fenotipleri araştırılmıştır. *SICCD8* seviyeleri azalan genotiplerin aynı zamanda sürgün dallanması artmış, bitki boyu kısalmış ve aşırı adventif kök gelişimi olmuştur. Strigolakton biyosentezi ve salgılanmasında nispeten azalmaya sahip genotiplerde Petri kabında yapılan çimlenme ve saksı denemeleri ile *P. ramosa* enfeksiyonu %90 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda strigolakton biyosentezinin azaltılmasının parazit yabancı otların yönetiminde uygun bir araç olabileceğini gösterilmiştir.

Dubey vd. (2017), RNA susturma ile üç *P. aegyptiaca* genini (*PaACS*, *PaM6PR* ve *PaPrx1*) susturarak domateste dayanıklılık sağlamayı amaçlamışlardır. Seçilen gen dizilerini içeren dsRNA'yı ifade etmek için, VIGS vektörü olarak *Tobacco rattle virus* (TRV) kullanılarak geçici ifade ve transgenik domates bitkilerinde saç tokası yapısına sahip (hairpin) bir konstrüksiyon (pBINPLUS35) ile kalıcı ifade elde etmişlerdir. Transgenik domates veya TRV ile enfekte olmuş tütün (*Nicotiana benthamiana*) bitkilerinde *P. aegyptiaca* tüberküllerinden elde edilen *PaACS* ve *PaM6PR* transkriptlerinin miktarının önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Ancak, parazit tüberküllerinde *PaPrx1* transkriptlerinin miktarında yalnızca kısmi azalmalar gözlemlenmiştir. Hedef genlerin baskılanması ile hem geçici hem de kalıcı deneysel sistemlerde, yapılan saksı denemelerinde konukçu bitkiler üzerinde büyüyen parazit tüberküllerinin sayısında ve ağırlığında önemli azalmalar meydana geldiği belirlenmiştir. Her iki strateji kullanılarak yapılan çalışmanın sonuçları, mobil ekzojen siRNA'nın konukçudan parazite hareket ettiğini ve parazitin önemli hedef genlerinin ifadelerinin bozulmasına yol açtığını göstermişlerdir.

Hasegawa vd. (2018), TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) yöntemiyle *Micro-Tom* çeşidi domateste *slccd8* geni mutantları elde etmişlerdir. Elde edilen mutant domates genotiplerinin aşırı dallanma gösterdiği ve bu durumun, dışarıdan uygulanan strigolakton ile baskılandığını tespit etmişlerdir. Orobanchol ve solanacol hormon seviyeleri WT bitkilerinde tespit edilebilir miktardaiken, *slccd8* mutantlarında

analiz tespit limitinin altında bulunmuştur. Paralel şekilde, *slccd8* mutantlarının kök salgıları neredeyse parazit bitki tohumlarını hiç uyarmamıştır. Ayrıca, kök kabı denemelerinde *P. aegyptiaca* enfeksiyonunun, düşük çimlenme nedeniyle *slccd8* mutantlarında WT *Micro-Tom*'dan daha az olduğunu bu nedenle *slccd8* mutantlarının *P. aegyptiaca*'ya dayanıklı yeni domates hatları olarak faydalı olabileceği bildirilmiştir.

Wakabayashi vd. (2019), en yaygın strigolakton (SL) olan orobanchol üretiminde BC halkasının kapanma reaksiyonunu katalize eden anahtar bir enzim olarak sitokrom P450 CYP722C tanımlamışlardır. Rekombinant enzim, 4-deoksiorobanchol aşamasına geçmeden doğrudan karlaktonik asidi orobanchole dönüştürdüğü, domates bitkilerinde bu genin devre dışı bırakılmasıyla, kök salgılarında orobancholün tespit edilemediği bildirilmiştir. Bu çalışma ile bu bileşiklerin kök paraziti yabancı otlara karşı dayanıklı bitkiler elde etme amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir.

2.2 CRISPR Yöntemiyle Kök Paraziti Bitkilere Karşı Yapılan Dayanıklılık Çalışmaları

Konvansiyonel ıslah yöntemleriyle konukçu bitkilerde dayanıklılık sağlamak, bağlantı sürüklenmesi ve elit gen havuzundaki sınırlı genetik çeşitlilik nedeniyle engellenmektedir (Tester ve Langridge, 2010). Mutasyon ıslahı ise tüm genomda istenmeyen mutasyonlar oluşturması nedeniyle risklidir (Toker vd. 2007). Fakat genom düzenleme, özellikle CRISPR-Cas yöntemi, istenmeyen hedef dışı zararlı etkiler olmadan hassas gen modifikasyonları yapılmasını sağlamaktadır (Menz vd. 2020). CRISPR/Cas sistemleri, virüs hastalıklarıyla mücadelede, ayrıca çeşitli bitki fungal ve bakteriyel hastalıklara karşı olağanüstü bir verimlilik göstermiştir (Boubakri, 2023). Fakat parazit bitkilere karşı bitkilerin savunmasını geliştirmek için CRISPR teknolojilerinin uygulanması hâlâ erken aşamalarındadır (Jhu vd. 2023).

Bari vd. (2019), CRISPR/Cas9 aracılı mutasyon yoluyla *CCD8* geninin ikinci ekzonu hedeflenmiş ve *P. aegyptiaca*'ya karşı domateste dayanıklılık geliştirmeyi amaçlamışlardır. Farklı ekleme veya silme mutasyonlarına sahip herhangi bir hedef dışı (off-target) etkisi olmayan dört *CCD8Cas9* mutant domates hattı (hat 1, hat 2, hat 5, hat 11) elde edilmiştir. T1 bitkilerinin genotip analizi, *CCD8* mutasyonlarının kalıtıldığını göstermiştir. Kontrol domates bitkileriyle karşılaştırıldığında, *CCD8Cas9* mutantları bodurluk, aşırı sürgün dallanması ve adventif kök oluşumu gibi morfolojik değişiklikler göstermiştir. Ayrıca, SL eksikliği olan *CCD8Cas9* mutantları, yapılan saksı denemelerinde yabani tip (WT) bitkilerine göre toplam *P. aegyptiaca* sürgün sayısı önemli bir azalma göstermiştir. *CCD8Cas9* mutant hatlarında, orobanchol içeriği önemli ölçüde azalırken, toplam karotenoid seviyeleri ve karotenoid biyosenteziyle ilgili genlerin ekspresyonu, kontrol bitkilerine kıyasla artmıştır. *CCD8* geninin *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklılık geliştirmek ve domateste anaç bitkilere aktarmak için hedef olabileceği gösterilmiştir.

Bellis vd. (2020), *Striga hermonthica* (Delile) Benth. ile ilişkili olarak *Sorghum bicolor* (L.) Moench'da CRISPR/Cas9 tekniği ile yaptıkları mutasyonlarla sorgumda LGS1 geninin bitki yapısını ve mikorizal köklerle sinyalleşmeyi kontrol eden hormonlar olan strigolaktonların stereo-kimyasını değiştirerek direnç neden olduğunu tespit etmişlerdir. CRISPR/Cas9 ile düzenlenmiş sorgum bitkileriyle yapılan deneyler, *LGS1*

aracılığıyla sağlanan direncin parazit genotipi ve abiyotik çevreye büyük ölçüde bağlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Bari vd. (2021), CRISPR/Cas9 aracılığıyla iki homolog ATP bağlayıcı kaset alt grubu G (ABCG) geni, ABCG44 (Solyc08g067610) ve ABCG45 (Solyc08g067620) genlerinde mutasyon gerçekleştirerek domateste *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklılık geliştirmeyi amaçlamışlardır. Hedeflenen mutasyon işleminin, domatesin kök salgısındaki SL miktarını önemli ölçüde azalttığını ve yapılan saksı denemeleri ile *P. aegyptiaca*'nın tüberkül ve sürgün sayısında WT bitkilerine göre azalma olduğu bildirilmiştir. Cas9-mutasyonlu bitkilerin kök salgılarında orobanchol miktarının azalmasına rağmen, kök özütündeki orobanchol miktarı WT bitkileri ile karşılaştırıldığında değişiklik göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca hem tekli hem de ikili ABCG mutantlarında SL biyosentez genleri olan *CCD8* ve *MAX1* genlerinin ekspresyonunda azalma olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile, ABCG genlerinin CRISPR ile hedeflenen mutasyonunun, kök paraziti yabancı otların çimlenmesini engellemede etkili bir mücadele yöntemi olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Bari vd. (2021), domates bitkilerinde CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak *MAX1* geninin üçüncü ekzonu hedeflenmiş ve *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklılık sağlamayı amaçlamışlardır. *MAX1Cas9* heterozigot ve homozigot T1 bitkileri, aksiler tomurcukların aşırı büyümesi, bitki boyunun kısalması ve WT göre adventif kök oluşumu gibi benzer morfolojik değişiklikler göstermiştir. *MAX1Cas9* mutant hatların yapılan saksı denemelerinde *P. aegyptiaca* tüberkül ve sürgün sayısının WT bitkilerine göre önemli ölçüde düştüğünü, orobanchol seviyesinde ise azalma olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, *Max1* geni ile karotenoid biyosentez yolağındaki genlerden olan *CCD8* geninin ekspresyonunun WT bitkilerine göre değişmediği belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Domates genotipleri

Daha önce Bülbül (2021)'ün tez çalışması ile elde etmiş olduğu *CCD7*Cas9 18nt ve 186nt domates mutant genotiplerinin T1, T2 ve T3 jenerasyonlarına ait bitkiler kullanılmıştır. Bülbül (2021), tasarladıkları rehber RNA'ları ve Cas9, *Agrobacterium*-aracılı bitki transformasyonu yöntemi kullanarak domatese aktarmışlardır. Elde edilen birçok *SLCCD7* mutantının arasından, özellikle *SICCD7* geninin ekson 1 bölgesinde Thr42-Val105 arasında meydana gelen büyük bir homozigot bialellik "in-frame" mutasyonu taşıyan T2 mutantları seçilmiştir. Bu mutant genotiplerden strigolakton yolağının negatif yönde etkilediği ve canavar otuna karşı bir dayanım sağladığı düşünülen iki genotip bu çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılmıştır. 18nt isimli genotip, çalışmanın ilerleyen bölümlerinde Wild Type (WT) olarak isimlendirilecek 267 F1 domates genotipinin *CCD7* geninin birinci ekzonunda CRISPR/Cas9 tekniği ile yapılan mutasyon sonucu meydana gelen 18 bazlık (6 amino asit) in-frame silinme ile elde edilen genotiptir. 186nt isimli genotip ise WT domates genotipinin *CCD7* geninin birinci ekzonunda CRISPR/Cas9 tekniği ile yapılan mutasyon sonucu meydana gelen 186 bazlık (62 amino asit) in-frame silinme ile elde edilen genotiptir. Tüm deneylerde, her iki allel bakımından homozigot mutant bitkiler kullanılmıştır. Çalışmalarda aynı zamanda canavar otlarına karşı hassas olan ticari domates çeşitleri (Bizimköy F1, Torry F1, Naim F1) kontrol olarak kullanılmıştır. Mutant bitkiler ve *Solanum penelli* LA0716 aksesyonuna ait fideler Areo Tohum A.Ş. (Antalya) tarafından, Bizimköy F1 çeşidine ait fideler Akça Tohum A.Ş.'den, Torry F1 çeşitlerine ait fideler Syngenta A.Ş.'den, Naim F1 çeşidi Yüksel Tohum A.Ş. (Antalya, Türkiye)'den ve WT 267 F1 çeşidi ise Proto Seed (Antalya, Türkiye)'den temin edilmiştir.

3.1.2 Canavar otu tohumları

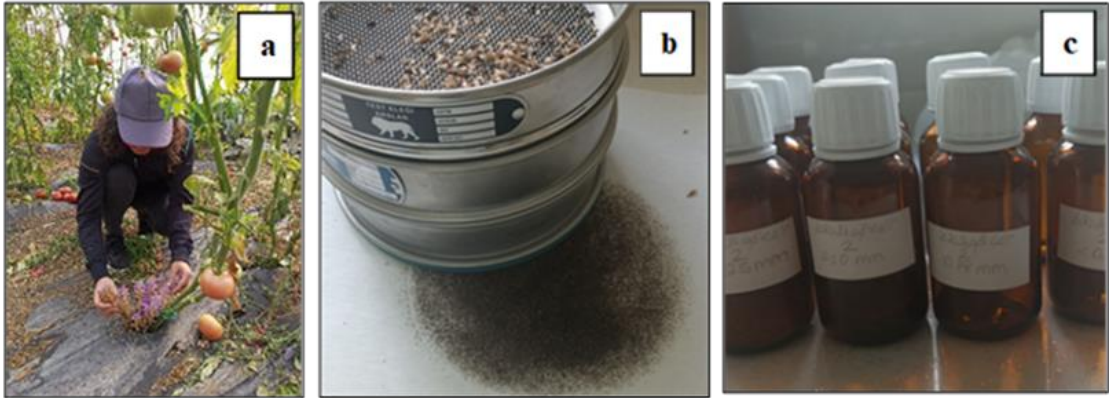
Canavar otları 2021 yılı içinde Isparta, Burdur ve Antalya'nın Korkuteli ve Elmalı ilçelerinde enfekteli domates seralarından toplanmıştır. Laboratuvara getirilen bitkiler 0.18-0.20 mm'lik eleklerden (Retsch GmbH ve Co KG, Germany) geçirilip kurutulduktan sonra koyu renkli şişelere alınarak kullanılıncaya kadar 4°C'de saklanmıştır (Şekil 3.1). Tohum toplanan lokasyonlara ait bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Canavar otu tohumu toplanan lokasyonlara ait bilgiler

Kod	İl	İlçe	Koordinat (GPS)	Rakım	Konukçu
S1-2021	Burdur	Söğüt	37°1'21''N 29°48'55''E	1420	Domates
S2-2021	Burdur	Söğüt	37°2'19''N 29°49'52'' E	1410	Domates
Ç1-2021	Burdur	Çavdır	37°9'3''N 29°39'60'' E	1000	Domates

Çizelge 3.1'in devamı

Ç2-2021	Burdur	Çavdır	37°9'10''N 29°39'36'' E	1000	Domates
G1-2021	Burdur	Göhlisar	37°8'35''N 29°35'57'' E	960	Domates
G2-2021	Burdur	Göhlisar	37°15'32''N 29°48'50'' E	950	Domates
T1-2021	Burdur	Tefenni	37°8'43''N 29°35'53'' E	1130	Domates
T2-2021	Burdur	Tefenni	37°15'18''N 29°48'36'' E	1130	Domates
D1-2021	Isparta	Merkez	37°46'35''N 30°30'22'' E	1120	Domates
I1-2021	Isparta	Merkez	37°54'46''N 30°40'41'' E	940	Domates
I2-2021	Isparta	Merkez	37°52'25''N 30°40'13'' E	940	Domates
K1-2021	Isparta	Merkez	37°52'33''N 30°40'55'' E	930	Domates
K2-2021	Isparta	Merkez	37°52'34''N 30°40'56'' E	930	Domates
AK-2021	Antalya	Korkuteli	36°58'3''N 29°55'6'' E	1482	Domates
AE-2021	Antalya	Elmalı	36°37'54''N 29°56'24'' E	1031	Domates



Şekil 3.1. Canavar otu tohumlarının toplanması; **a)** enfekteli domates seralarından canavar otlarının toplanması; **b)** tohumların elenmesi; **c)** elenen tohumların kullanılıncaya kadar koyu renkli cam şişelerde saklanması

3.1.3 Çalışmada kullanılan kimyasallar, hazır setler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, isim, marka ve kullanım bilgileri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallara ait bilgiler

Kimyasalın Adı	Marka	Kullanım Amacı
DNA Ladder GeneRuler 1kb	ThermoScientific	Jel görüntüleme, moleküler çalışmalar
Taq DNA Polimeraz	ThermoScientific	Jel görüntüleme, moleküler çalışmalar
Agaroz	BioMax	Jel elektroforezi, moleküler çalışmalar
Tris (hidroksimetil) aminometan	Merck	Jel elektroforezi, moleküler çalışmalar
Etidyum Bromür	Sigma	Jel elektroforezi, moleküler çalışmalar
Setil Trimetil Amonyum Bromür, CTAB Bromide	Amresco	DNA izolasyonu, moleküler çalışmalar
Kloroform	Merck	DNA izolasyonu, moleküler çalışmalar
Etanol, %96	Tekkim	Tüm çalışmalar
İzoamil alkol, %99	Merck	DNA izolasyonu, moleküler çalışmalar
Sodyum Hipoklorit	Tekkim	Tohum sterilizasyon
Tween 20	Sigma	Tohum sterilizasyon
rac-GR24, %99	Strigolab	Tohum çimlenme çalışmaları
2,3,5-Trifenil Tetrazolyum Klorür (TTC), %1	AppliChem	Canavar otu tohum canlılık testleri
Sıvı Nitrojen	Anonim	Kök ekstraksiyonu çalışmaları
Aseton, %99.8	Merck	Kök ekstraksiyonu, Orobanchol çalışmaları
Asetonitril, %99.8	Merck	Kök ekstraksiyonu, Orobanchol çalışmaları
Orobanchol, %99	Olchemim	LC-MS/MS analizleri

Tez çalışmasında RNA ekstraksiyonu ve RT-qPCR işlemi için hazır kitler kullanılmış olup, bu kitlelere ait bilgiler Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan hazır kitlere ait bilgiler

Hazır Kitin Adı	Marka	Kullanım Amacı
Bio-Tek E.Z.N.A plant RNA kiti	Omega	Total RNA izolasyonu
Luna Universal One-Step RT-Qpcr kit	New England Biolab	RT-qPCR işlemleri

3.1.4 Çalışmada kullanılan cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlara ait bilgiler Çizelge 3.4’te sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan cihazlara ait bilgiler

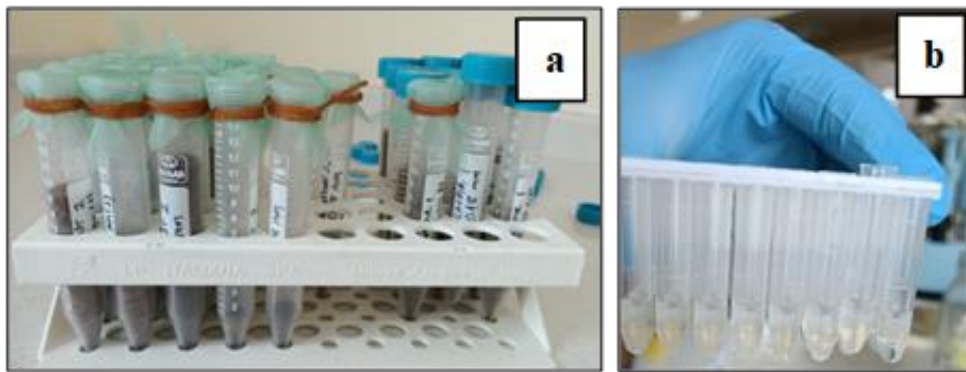
Marka	Tip	Kullanım Amacı
ThermoScientific Forma 88000 Series	Ultra Derin Dondurucu	RNA örneklerinin muhafazasında
Vestel Buzdolabı	Buzdolabı	Tüm örneklerin kısa süreli muhafazasında
Steril Kabin	Tezsan	Steril ortam gerektiren çalışmalarda
Hettich Rotina 420R	Santrifüj cihazı	Farklı hacimdeki sıvıların santrifüj işlemlerinde
Hettich Mikro 120		
Radweg AS 220/C/2	Tartı	Farklı ağırlıklardaki ürünlerin tartımında
MJ Research PTC-225	PCR Cihazı	PCR için gerekli termal döngünün sağlanmasında
Bio-Rad T100		
Dragonlab MX-S	Vorteks Cihazı	Farklı hacimlerdeki ürünlerin etkin bir şekilde karıştırılmasında
Mes MP-MiniPure	Saf Su Arıtma Cihazı	Çalışmalar için gerekli saf ve ultra saf su üretiminde
DNR- MiniLumi	UV Görüntüleme Cihazı	Jel elektroforezi sonrası elde edilen jellerin görüntülenmesinde
Memmert	İnkübatör	Tohumların inkübe edilmesinde
BioDrop	Konsantrasyon Ölçme Cihazı	Toplam RNA konsantrasyonunun ölçülmesinde
MikroTest	Su Banyosu	DNA izolasyonunda
Tomy SX-500E	Otoklav	Uygun laboratuvar ekipmanlarının sterilizasyonunda
Arçelik Mikro Dalga Fırın	Mikro Dalga Fırın	Jel elektroforezi için jel hazırlamada
Anonim	Bitki Büyütme Kabini	Bitki materyalinin farklı gelişim aşamalarında ihtiyaç duydukları ortamın sağlanmasında
Leica EZ4	Binoküler Mikroskop	Canavar otu tohum ve tüberküllerin görüntülenmesinde

Cizelge 3.4'ün devamı

Qiagen	Doku Ezici	Domates kök dokusunun ezilmesinde
Bandelin Sonorex	Ultrasonik sıcak su banyosu	Domates kök ekstraksiyonunun elde edilmesi işlemlerinde
Christ	Vakumlu konsantratör	Domates kök ekstraksiyonunda çözücünün uzaklaştırılması
Agilent, 1290 Infinity (LC)-6430 Tripquadrupol (MS)	LC-MS/MS	Orobanchol analizlerinde

3.2 Metot**3.2.1 Denemede kullanılan canavar otu türlerinin moleküler teşhisleri****3.2.1.1 DNA izolasyonu**

Tür teşhisleri için Doyle (1991)'nin kullandığı yöntemden değiştirilerek canavar otu tohumlarından CTAB DNA ekstraksiyon yöntemi ile total nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Buna göre; canavar otu tohumlarından 50 mg alınıp sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiştir. Elde edilen toz, toplam genomik DNA (gDNA) ekstraksiyonu için 1.5 ml tüpe alınarak tüpe 700 µl %2 CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) içeren ekstaksiyon tamponu [20 mM EDTA, 0.1 M Tris-HCl Ph 8.0, 1.4 M NaCl, %2 CTAB ve %0.4 β-Mercaptoethanol (kullanılmadan hemen önce)] eklenmiştir. Karışım 65 °C'de 45 dakika boyunca su banyosunda bekletilmiştir. Karışıma 500 µl kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenerek tüp 1 dakika karıştırılmıştır. Örnek 12000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj (Hettich 320R) edilerek, oluşan üst fazdan yaklaşık 600 µl'lik kısım mikropipet ile alınarak yeni tüpe aktarılmış ve üzerine tekrar 500 µl kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenerek 12000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Üst fazdan 500 µl'lik kısım yeni tüpe alınarak üzerine 700 µl soğuk (-20°C) izopropanol eklenerek hafifçe karıştırıldıktan sonra 12000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.



Şekil 3.2. Canavar otu tohumlarından DNA izolasyonu; **a)** 10 mg'lık tohum örnekleri; **b)** canavar otundan izole edilen DNA örnekleri

DNA'ya yapışan tuz kalıntısının giderilmesi için oluşan DNA peleti 700 µl %70 etanol ile iki defa yıkanmıştır. DNA peletinin çözünmesi için tüpe 100 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl Ph 8.0, 1 mM EDTA Ph 8.0) eklenerek ve 37°C'de bir saat bekletilmiştir. Lamda DNA kontrolü kullanılarak ve ethidium bromide ile boyanıp %1'lik agaroz jelde konsantrasyonları belirlenmiştir. BioDropta DNA miktarına ve kalitesine bakılarak ve izole edilen DNA'ların tamamı PCR uygulamasına kadar -20°C'de saklanmıştır (Şekil 3.2).

3.2.1.2 PCR çalışması

P. aegyptiaca ve *P. ramosa* türlerini ayırıcı üç farklı tür spesifik primer kullanılmıştır. *P. ramosa* türü için tür spesifik rps2F/rps2R (Park vd. 2007), *P. aegyptiaca* için ise AB101F/AB102R (Schneeweiss vd. 2004) ve ITS350F/ITS350R (Aly vd. 2012) primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.5). PCR reaksiyonu, 1 µL primer, 1.5 µL MgCl₂, 2 µL DNA, 1 µL dNTP, 1.5 µL 10X PCR buffer ve 1 Unit Taq DNA polymerase (Fermentas, Vilnius, Lithuania) ve 1.8 µL saf sudan oluşan toplam 10 µL hacimde yapılmıştır. PCR, Bio-Rad T100 cihazında yürütülmüştür. PCR döngüsü ITS350F/ITS350R primeri için 94°C'de 4 dk, daha sonra 95°C'de 1 dk, 65°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk toplam 30 döngü ve 72°C'de 10 dk 1 döngü olarak; AB101F/AB102R primeri için 94°C'de 4 dk, daha sonra 95°C'de 1 dk, 60°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk toplam 35 döngü ve 72°C'de 10 dk 1 döngü olarak ve rps2F/rps2R primerleri için 94°C'de 2.5 dk, daha sonra 94°C'de 1 dk, 57°C'de 30 sn ve 72°C'de 1 dk toplam 35 döngü ve 72°C'de 7 dk 1 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde TBE buffer yardımıyla 110 voltta 1.5 saat yürütülmüş ve EtBr (0.5 µg/ml) ile boyandıktan sonra UV ışığı altında görüntüleme cihazı (DNR-MiniLumi) yardımıyla fotoğraflanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Canavar otu tür teşhisleri için PCR işlemleri; **a)** DNA örneklerinin PCR için hazırlanması; **b)** PCR işlemi için primer ve diğer kimyasalların eklenmesi; **c)** PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi

Çizelge 3.5. *Phelipanche* popülasyonlarının moleküler tanımlanmasında kullanılan primerlerin dizisi ve beklenen bant uzunluğu

Primer adı	Primer dizisi (5-3)	Bant Uzunluğu (bp)	Referans
rps2F	AAATGGAATCCTAAAATGGC	550	(Park vd. 2007)
rps2R	AAACAAATTGTTGGAATTCC		
AB101F	ACGAATTCATGGTCCCGTGAAGG	850	(Schneeweiss vd. 2004)
AB102R	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCC		
ITS350F	CATGGTGGGTGGGGCAACCC	350	(Aly vd. 2012)
ITS350R	ACGTGATGCGTGACGCCAG		

3.2.2 Denemede kullanılan canavar otu tohumlarının canlılık testleri

Tohum canlılık testi, Gibot-Leclerc vd. (2004) tarafından tanımlanan protokol modifiye edilerek yapılmıştır. Buna göre, her Petri kabına yaklaşık 100 ± 10 *P. aegyptiaca* tohumu yerleştirilmiş ve 3 mL %1 2.3.5 Triphenyltetrazolium Chloride (TTC, AppliChem) eklenmiştir. Ardından Petri kapları alüminyum folyo ile sarılarak 33°C'de 13 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tohumlar %5 NaOCl ile tohumlar 5 dk yıkanarak stereo mikroskop (Leica EZ4) kullanılarak 20× büyütme ile embriyosu pembe veya kırmızı renkte olanlar canlı, renksiz veya siyah renkli olanlar ise cansız olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak 120°C'de 30 dakika otoklavda steril edilmiş tohumlar kullanılmıştır (Şekil 3.4).

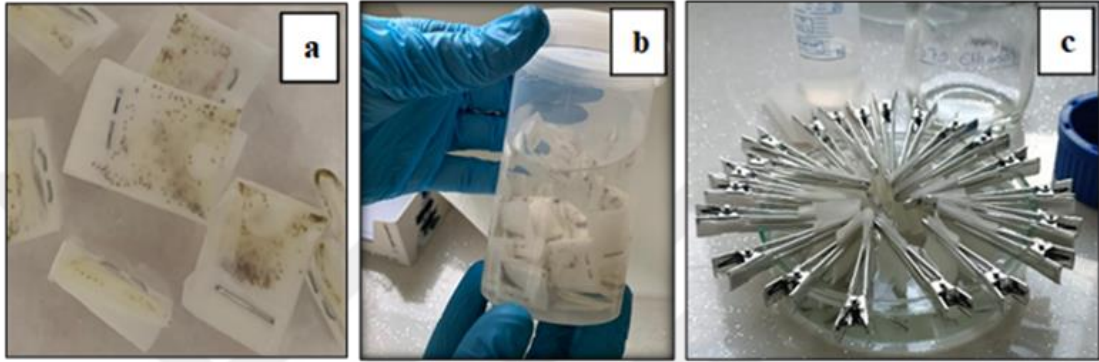


Şekil 3.4. Canavar otu tohum canlılık testleri; **a)** tohumların %1 tetrazolyum tuzu ile inkübe edilmesi; **b)** inkübe edilen tohumların %5 NaOCl ile yıkanması; **c)** yıkanan tohumların embriyolarındaki renk değişiklikleri esas alınarak mikroskop altında incelenmesi

3.2.3 Canavar otu tohum çimlenme denemeleri

3.2.3.1 Tohum yüzey dezenfeksiyonu

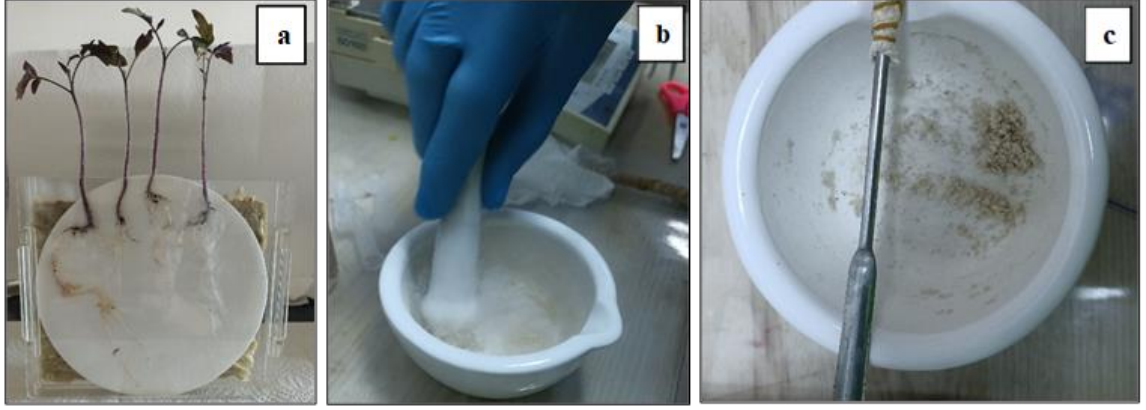
Canavar otu tohumları, filtre kağıdından hazırlanan küçük tohum keselerine konulmuş daha sonra %1 (h/h) sodyum hipoklorit (NaOCl) ve %0.01 Tween 20'de 3 dakika, %70 etanolde ise 3 dakika bekletildikten sonra yüzey sterilizasyonları yapılmış ve altı kez steril su ile iyice durulanmıştır (Bai vd. 2020). Tohum yüzey dezenfeksiyonuna ait resimler Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5. Canavar otu tohumlarında yüzey dezenfeksiyonu işlemleri; **a)** küçük keselere konulması; **b)** tohumların %1 (h/h) sodyumhipoklorit (NaOCl) içerisinde bekletilmesi; **c)** tohumların %70 etanolde bekletilmesi

3.2.3.2 Domates kök ekstraktlarının elde edilmesi

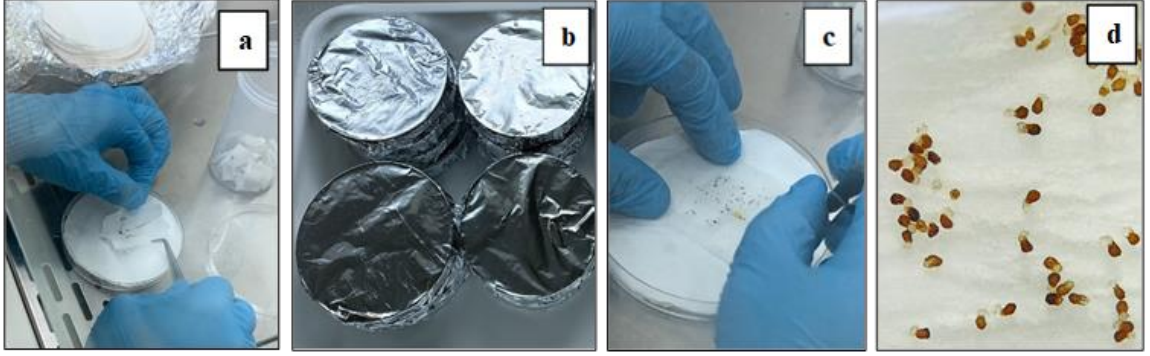
Domates kök ekstraktlarının elde edilmesi Floková vd. (2020) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Kök ekstraksiyonu için domates bitkileri tohumları kaya yünü bulunan kök kaplarına yetiştirilmiştir. Yaklaşık 30 gün sonra 2-3 gerçek yapraklı döneme gelen domates fidelerinden 150 mg kök dokusu alınarak sıvı nitrojen ile ezilerek homojenize edilmiş, homojenize edilen kök dokusuna 1.5 ml -20°C'de bekletilen %60'lık soğuk aseton eklenmiştir. Kök dokusu 2 mm çelik boncuk kullanılarak Tissue lyser 27 Hz'de 3 dakika homojenize edilmiş, buzlu suda 3 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Rotatörde 4 °C'de 20 rpm'de 30 dakika döndürülerek, 4°C'de 10 dakika 16000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak ve organik solvent vakum altında uzaklaştırılmıştır. Geri kalan organik faz (yaklaşık 0.9 ml), 1.5 ml %25 ACN/su karışımı ile tamamlanmıştır. Saflaştırma için Oasis HLB kolonu kullanılmıştır. Sorbent, 3 ml %100 asetonitril ile aktive edilmiş ve %10 ACN/su karışımı ile dengelenmiştir. Kök dokusu özü, aktive edilmiş kolondan geçirilmiş ve 3 ml %10 ACN/su karışımı ile yıkanmıştır. 3 ml %80 aseton su karışımı ile elüsyon yapılarak, çözücü vakum altında uzaklaştırılmış ve kullanılıncaya kadar -20°C'de tutulmuştur (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Domates kök ekstraktlarının elde edilmesi; **a)** kaya yünü içeren kök kabında domates fidelerinin yetiştirilmesi; **b)** kök dokusuna sıvı azot ilave edilmesi; **c)** kök dokusunun ezilerek toz haline getirilmesi

3.2.3.3 Domates kök ekstraktlarının Petri kabı denemesinde canavar otuna etkisinin belirlenmesi

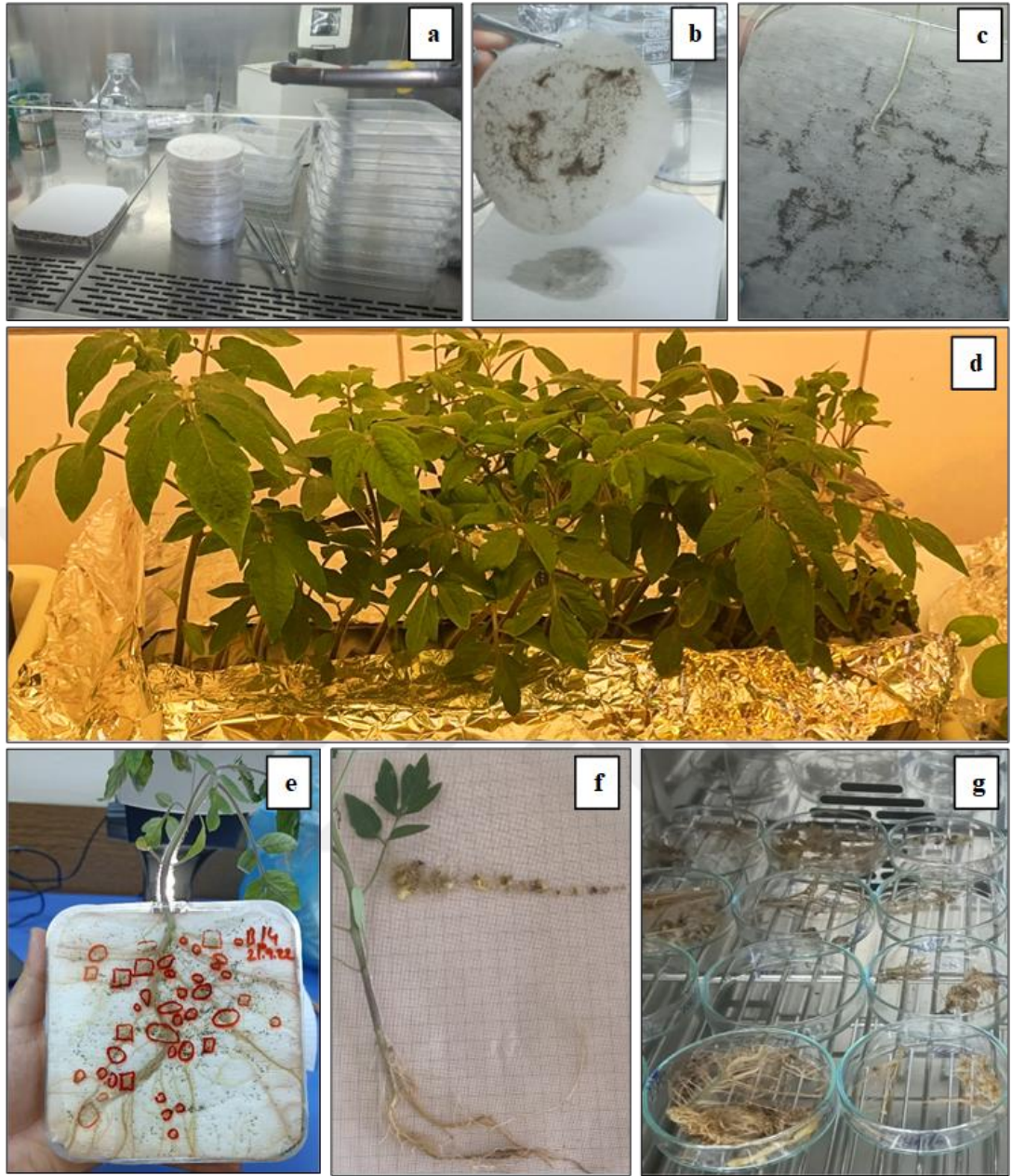
Yaklaşık 150 adet steril edilmiş *P. aegyptiaca* tohumu, 90 mm çapındaki Petri kaplarında 9 mm'lik filtre kâğıdı (Whatman GF/A) üzerine yerleştirilmiştir. Kullanılan *P. aegyptiaca* popülasyonuna ait tohumlar için optimum ön kondisyon ve inkübasyon sıcaklığının belirlenebilmesi amacıyla ön kondisyon ve inkübasyon sıcaklıkları 18°C, 20°C ve 22°C olacak şekilde denemeler kurulmuştur. Petri kapları 3 ml steril su ile nemlendirilerek ve karanlıkta yedi gün boyunca 18°C, 20°C ve 22°C'de ön kondisyona alınmıştır. İnkübasyondan yedi gün sonra, *P. aegyptiaca* tohumlarının bulunduğu disklere 20 µL domates kök ekstraktı ve 40 µL steril su ilave edilmiştir. Sentetik bir SL olan GR24 (www.strigolab.eu), 3.35×10^{-5} mol L⁻¹ konsantrasyonunda her Petri kabına 20 µL ilave edilmiştir. Negatif kontrol olarak steril saf su kullanılmıştır (Bai vd. 2020). Ön kondisyon işleminden sonra 18°C, 20°C ve 22°C sıcaklıklarda tohumlar yedi gün inkübe edilmiştir. Çimlenme oranları binoküler mikroskop altında sayılarak fotoğraflanmıştır (Leica EZ). *P. aegyptiaca* tohumlarında radikül görüldüğünde tohumlar çimlenmiş olarak kabul edilmiştir. Petri kabı denemeleri beş tekerrürlü ve iki tekrarlı olarak yapılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Domates kök ekstraktlarının canavar otuna etkisi; **a)** tohumların Petri kabına yerleştirilmesi; **b)** tohumların ön kondisyona alınması; **c)** kök ekstraktlarının Petri kaplarına eklenmesi; **d)** çimlenmiş tohumların binoküler mikroskop altında değerlendirilmesi

3.2.4 Hidroponik sistem denemeleri ile genotiplerin canavar otuna karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi

CRISPR/Cas9 mutant genotipleri 18nt ve 186nt, ticari domates çeşitleri Bizimköy F1 ve Torry F1'in canavar otuna tepkilerinin belirlenmesi amacıyla yapay olarak canavar otu bulaştırılmış ortamda yetiştirilen domates köklerinde oluşan tüberküller değerlendirilmiştir. Bu amaçla *P. aegyptiaca* tohumlarının yüzey sterilizasyonu %1'lik sodyum hipoklorit (NaOCI) ve %0.01 Tween 20 içinde 5 dakika bekletilip ve altı kez steril su ile iyice durulanarak yapılmıştır. *P. aegyptiaca* tohumları, karanlıkta 20°C'de yedi gün ön kondisyona alınmıştır. Otoklavlanmış yaklaşık 150 ml vermikulit içeren 120x120 mm ebatlarında kare plastik kök kaplarına birer adet domates fidesi filtre kâğıdı üzerine yerleştirilmiştir. Daha önce ön kondisyona alınan *P. aegyptiaca* tohumlarından 10 mg alınarak filtre kâğıdı üzerindeki domates fidesinin köklerine bulaştırılmıştır. Kök kapları 24°C'de 14 saatlik bir foto periyotta kontrollü iklim odasına alınmıştır. Kök kapları haftada 3 kez %1'lik Hoagland solüsyonu ile sulanmıştır. İnokülasyondan sonraki 20 ve 30. günlerde kök kabında gelişen tüberküller binoküler mikroskopta (Leica EZ4) sayılmış ve denemenin sonunda tüberkül büyüklükleri milimetrik kâğıt üzerinde ölçülerek fotoğraflanmış ve 65°C'de 24 saat etüvde kurularak ağırlıkları alınmıştır. Hidroponik denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre dört tekerrürlü ve iki tekrarlı olarak yapılmıştır (Şekil 3.8).

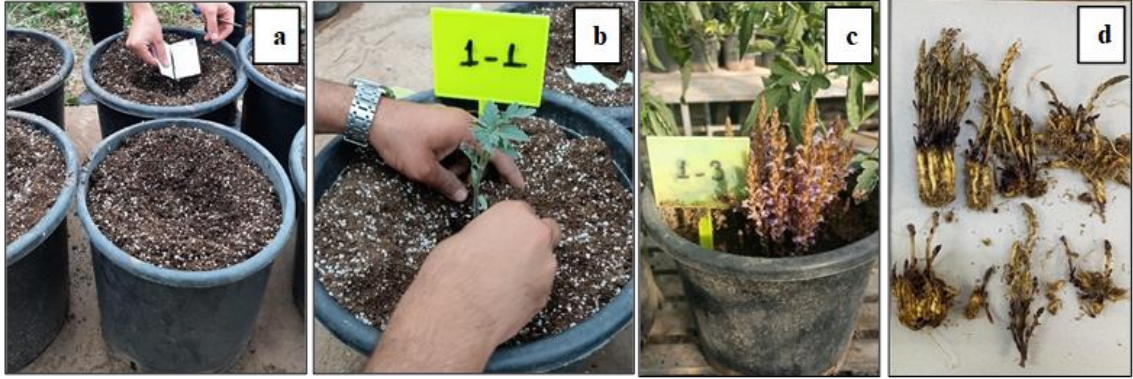


Şekil 3.8. Hidroponik sistem denemeleri ile genotiplerin canavar otuna karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi; **a)** hidroponik deneme için kök kaplarının hazırlanması; **b)** ön kondisyona alınmış canavar otu tohumlarının kök kabında fitre kağıdı üzerine eklenmesi **c)** domates fidesinin kök kabına yerleştirilmesi; **d)** kök kaplarında bulunan domates bitkilerinin kontrollü iklim odasında büyütülmesi; **e)** kök kabında gelişen tüberküllerin binoküler mikroskopta sayılması **f)** tüberküllerin büyüklüklerinin değerlendirilmesi; **g)** tüberküllerin kuru ağırlıklarının alınması

3.2.5 Saksı denemeleri ile genotiplerin canavar otuna karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi

Saksı denemelerinde CRISPR/Cas9 tekniği ile elde edilmiş olan iki allel bakımından homozigot özellik gösteren mutant 18nt ve 186nt domates genotipleri, heterozigot 186nt genotipi, ticari domates çeşitlerinden Naim F1, Torry F1 ve Bizimköy F1 genotipleri ve WT (267 F1) genotipleri kullanılmıştır. Saksı denemeleri için fide harcı olarak 1:1:1 oranında hazırlanmış olan toprak + kum + torf karışımı otoklav edildikten sonra kullanılmıştır. Fide dikimlerinden önce saksılar 100 mg *P. aegyptiaca* tohumları ile enfekte edilmiştir. Saksı denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre beş tekerrürlü ve iki tekrarlı olarak kurulmuştur. İlk denemede mutant genotipler 18nt, 186nt genotipleri ile Heterozigot 186nt, WT ve Naim F1 çeşitleri, ikinci denemede ise mutant genotiplerin yansıra Torry F1 ve Bizimköy F1 genotipleri kullanılmıştır. Birinci ve ikinci denemede canavar otuna duyarlılık konusunda sonucu değiştirmeyeceği düşünüldüğü için farklı ticari domates çeşitleri kullanılmıştır.

Fidelikte geliştirilen bir aylık domates fideleri her saksıya bir adet olmak üzere dikilmiştir. Bitkiler serada ve doğal ışık altında serada ortalama $20 \pm 6^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta büyütülmüştür. Bitkiler ihtiyaç duyduğu kadarıyla sulanarak gübrelemeleri yapılmıştır. Gerekli görüldüğü taktirde hastalık ve zararlı mücadelesi her saksı için eşit olarak yapılmıştır. Her saksıda canavar otunun toprak yüzeyine ilk çıkış tarihleri ve yedi günde bir dal sayıları kaydedilmiştir. Canavar otunun çıkış durumu göz önünde bulundurularak birinci saksı denemesi 130 gün sonunda değerlendirilmişken, ikinci deneme 90 günün sonunda değerlendirilmiştir. Değerlendirmede çiçeklenme öncesi toplam *P. aegyptiaca* sürgün sayısı (adet/saksı), çiçeklenme dönemi toplam *P. aegyptiaca* sürgün sayısı (adet/saksı), tohum dönemi toplam *P. aegyptiaca* sürgün sayısı (adet/saksı), toprak yüzeyine çıkan toplam *P. aegyptiaca* sürgün sayısı (adet/saksı) değerleri kaydedilmiştir. Ayrıca hem toprak üstü canavar otu sürgünleri hem de toprak altında kalan tüberküller ayrılarak hassas bir şekilde yıkanmış, yaş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Hem canavar otu için hem de domates kökleri için kurutma işlemi etüvde 65°C 'de 72 saat gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9).



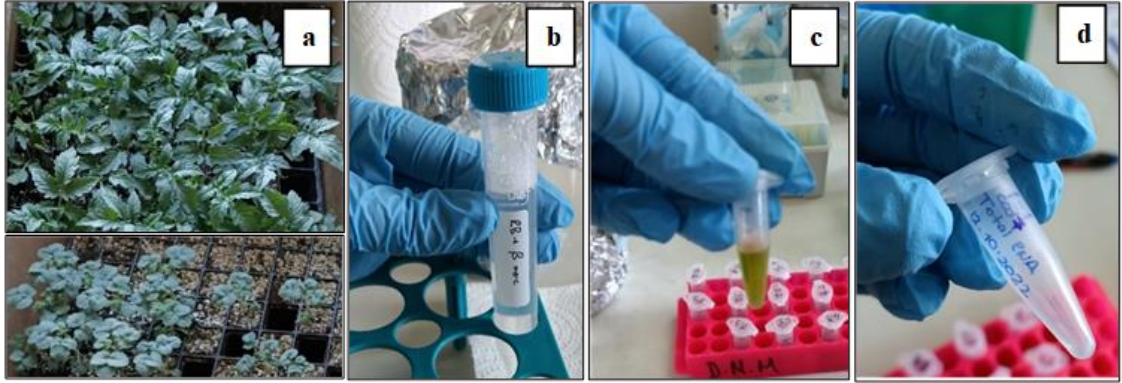
Şekil 3.9. Saksı denemeleri; **a)** canavar otu tohumlarının saksılara bulaştırılması; **b)** domates fidelerinin dikilmesi; **c)** canavar otu dal sayıları ile ilgili gözlemlerin alınması; **d)** canavar otu sürgünleri ve tüberküllerinin yaş ve kuru ağırlıklarının alınması

3.2.6 Genotiplerin gen ekspresyon analizleri

3.2.6.1 RNA izolasyonu

CRISPR/Cas9 mutant genotipleri 18nt, 186nt ve bu genotiplerin WT bitkisi olan 267F1 genotipinde RNA izolasyonları yapılmıştır. RNA izolasyonu Omega Bio-Tek E.Z.N.A Plant RNA Kit 50 prep R6827-01 kodlu RNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır. RNA izolasyonu için 15 günlük fidelerin genç domates yaprakları kullanılmıştır. Her genotip için üç teknik üç biyolojik tekrar yapılmıştır. RNA izolasyonunun aşamaları aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır:

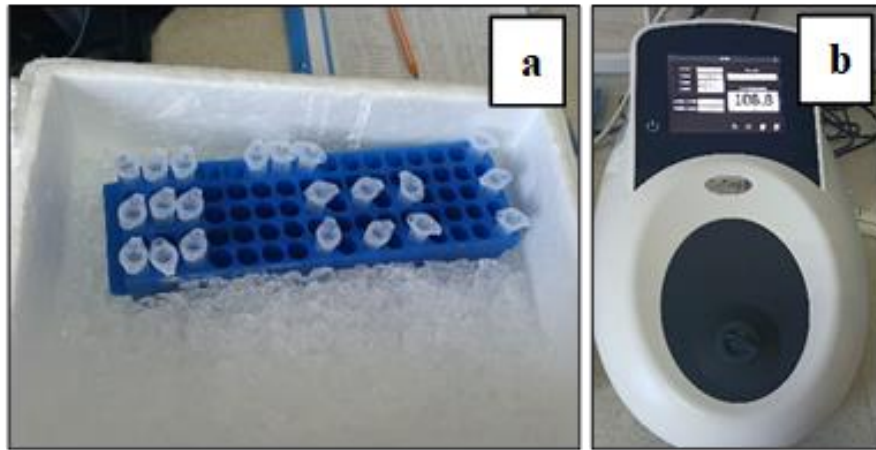
1. Bitkilerden üç yaprak seçilerek RB Buffer (500 µl) +B-ME ile pestelle ezilmiştir.
2. 'Homogenizer Mini Column' 2 ml'lik collection tube konulmuştur.
3. Vortex sonrasında oluşan lizat kolona aktarılmıştır. 14.000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. 1:1 hacminde %70 etanol eklenmiş, 20 saniye vortex yapılmıştır.
4. 'HiBind RNA Mini Column' 2 ml'lik collection tüpe konulmuştur. 700 µl örnek kolona yüklenmiştir. 12.000 g de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kalan örnekte kolona yüklenmiştir ve santrifüj edilmiştir. 500 µl 'RNA Wash Buffer I' eklenmiştir ve 10.000 g de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolon yeni tüpe aktarılmıştır. 700 µl 'RNA Wash Buffer II' eklenmiştir. 10.000 g de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolon yeni tüpe aktarılmıştır. 500 µl 'RNA Wah Buffer II' eklenmiştir. 10.000 g de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolon boş olarak 2 dakika maksimum hızda santrifüjlenmiştir. Kolon yeni tüpe alınmış ve 100 µl 'Nuclease Free Water' eklenmiştir. Maksimum hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. RNA izolasyonu; **a)** genç domates bitkilerinin yapraklarının alınması; **b)** yaprakları ezmek için RB buffer kullanılması; **c)** pestel ve buffer yardımıyla ezilmiş domates yaprakları; **d)** total RNA lerin PCR işlemi için -80°C 'de saklanması

3.2.6.2 RNA miktar ve kalitesinin belirlenmesi

Total RNA örnekleri -80°C dereceden çıkarılarak ve tekrar buz küvetine alınmış, 1-2 sn spin ettirilmiştir. Biodrop cihazı (BioDrop uLite Spectrophotometer) kullanılarak dalga boylarına göre RNA miktarı ve kalitesi ölçülmüştür. Cihaz kullanmak takip edilen basamak şu şekildedir; 1) Life Science; 2) Nükleik acids; 3) RNA; 4) ng/ μl ileri; 5) Blanc olarak su seçilmeli; 6) Cihaza her örnek için 2 μl koyularak her kuyucuğa örneği koyup okuduktan sonra kâğıt peçete yardımıyla kuyucuk silinmiştir. 1 ng/ μl değeri kullanılarak oran orantıdan 1000 ng için alınması gereken RNA miktarı belirlenmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. RNA miktar ve kalitesinin belirlenmesi; **a)** örneklerin -80°C 'den çıkarılarak buz küvetine alınması; **b)** dalga boylarına göre örneklerin RNA miktar ve kalitelerinin BioDrop cihazı ile ölçülmesi

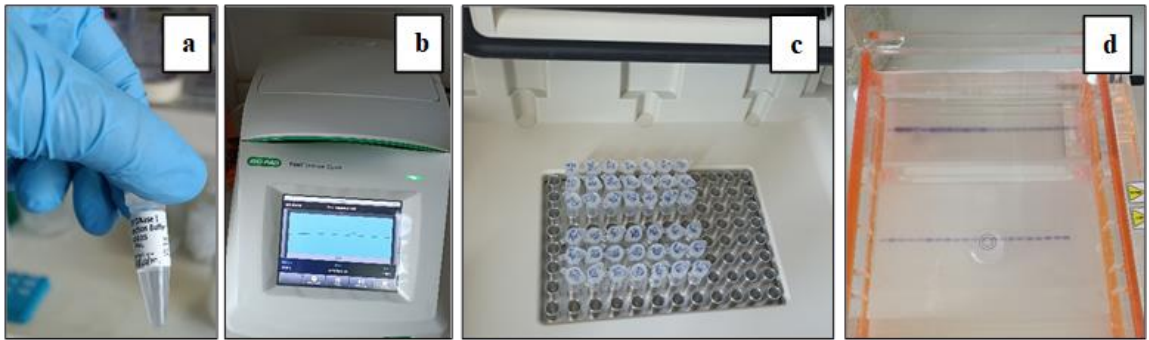
3.2.6.3 DNase uygulaması

RNA örneklerinin genomik DNA ile kontamine olmasını önlemek amacıyla DNase uygulaması yapılmıştır. Her örnekten 1000 ng RNA alındıktan sonra, 2 µL DNase I Reaksiyon Tamponu ve 1 µL DNase I enzimi eklenmiş, ardından toplam hacim ddH₂O ile 15 µL'ye tamamlanmıştır. Her izolasyon için DNase reaksiyon tamponu tüplere eklenmiş ve karışım PCR'da 37°C'de 1 saat 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örneğe 50 mM konsantrasyonunda 1 µL EDTA eklenmiş ve 65°C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Kontrol olarak, örneklerin genomik DNA ile kontamine olup olmadığını doğrulamak için Actin primerleri kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. PCR, Çizelge 3.6'da belirtilen parametrelere göre yapılmıştır. PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde TBE buffer yardımıyla 110 voltta 1.5 saat yürütülmüş ve EtBr (0.5 µg/ml) ile boyandıktan sonra UV ışığı altında görüntüleme cihazı (DNR- MiniLumi) yardımıyla fotoğraflanmıştır (Şekil 3.12).

Çizelge 3.6. PCR reaksiyon bileşenleri

İçerik	Miktar
RNA	1 µl
ddH ₂ O	13.75 µl
10X Taq Buffer ((NH ₄) ₂ SO ₄ -MgCl ₂)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.6 µl
Taq DNA Polymeraz (5 U/µl)	0.25 µl
dNTP (10 mM)	0.4 µl
Primer-Forward (10 µM)	0.5 µl
Primer-Reverse (10 µM)	0.5 µl
Toplam	20 µl

PCR döngüsü 95°C'de 5 dk, daha sonra 95°C'de 30 sn, 62°C'de 30 sn ve 72°C'de 1 dk toplam 34 döngü ve 72°C'de 5 dk 1 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler real-time PCR işleminde kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır.



Şekil 3.12. RNA örneklerine DNase uygulaması; **a)** Örnekler DNase I enzimi eklenmesi; **b)** karışımın PCR'da 37°C'de inkübe edilmesi; **c)** Aktin primerleri kullanılarak yapılan PCR işlemi; **d)** PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi

3.2.6.4 RT-qPCR işlemleri

Hedeflenen *CCD7*, *CCD8* ve *BetaKaroten* genlerinin domateste ifade seviyesini ölçmek için kantitatif PCR (qPCR) kullanılmıştır. Gen-spesifik primerler kullanılarak, her bir örneğin qRT-PCR'ı iki teknik ve üç biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. PCR analiz işlemleri için Luna Universal One Step RT qPCR kiti kullanılmıştır. Bu çalışmada referans (housekeeping) gen olarak Actin geni kullanılmıştır. Genotiplerin *CCD7*, *CCD8* ve *BetaKaroten* genlerinin ekspresyon seviyeleri kit protokolünde yer alan reaksiyon koşullarına göre hazırlanan reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. RT-PCR reaksiyon bileşenleri

İçerik	Miktar
RNA	0.5 µl
ddH ₂ O	6.9 µl
RT enzim (20x)	1 µl
Primer-Forward (10 µM)	0.8 µl
Primer-Reverse (10 µM)	0.8 µl
Reaksiyon karışımı (2x)	10 µl
Toplam	20 µl

PCR döngüsü, 95°C'de 6 dakika ön denatürasyon ile başlayıp, 95°C'de 60 saniye ilk denatürasyon, ardından 95°C'de 10 saniye ve 59°C'de 30 saniye olmak üzere 2 aşamalı amplifikasyon ile devam etmiştir. Son aşamada 95°C'de 10 saniye, 65°C'de 60 saniye ve 97°C'de 1 saniye olmak üzere erime adımı uygulanmıştır (Şekil 3.13). Hedef genlerin ifadelerini kantitatif olarak ölçmek için 2- $\Delta\Delta C_t$ yöntemi kullanılmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).



Şekil 3.13. RT-qPCR işlemleri; **a)** Luna Universal One Step RT qPCR kiti kullanılarak örneklerin RT-qPCR için hazırlanması; **b)** reaksiyon koşulların light cycler cihazında ayarlanması; **c)** örneklerin cihaza yerleştirilmesi

3.2.7 Genotiplerin orobanchol içeriklerinin belirlenmesi

3.2.7.1 Domates kök eksudatlarının elde edilmesi

Domates kök eksudatından strigolakton ekstraksiyonu için Floková vd. (2020) metodu kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi aynı koşullarda yetiştirilmiş 1 aylık domates fideleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde 18nt, 186nt ve Bizimköy F1 genotipleri kullanılmış olup, her bir genotip için üç bitki örneği alınmıştır. Ekstraksiyonlar her tekerrür için farklı bitkilerden olmak üzere 3 teknik, 3 biyolojik tekrarlı olmak üzere 9 tekerrürden oluşmuştur. Her bir bitkinin kök bölgesine 200 ml %5 asetonitril/su (v/v) çözeltisi dökülmüş ve süzülen sıvı Falcon tüplerde toplanmıştır. Elde edilen 200 ml'lik sıvı eksudattan 20 ml alınarak 50 ml Falcon tüplerine aktarılmıştır. Elde edilen sıvı 4°C, 4.000 rpm de 5 dakika süresinde içindeki katı partikülleri uzaklaştırmak amacıyla santrifüj edilmiştir. Santrifüjlenen kök eksudatları, polimerik ters faz bazlı Oasis® HLB kolonundan (Strata® C18-U) geçirilmiştir. Burada amaç çok polar, istenmeyen maddelerin kolonda tutulması ve strigolaktonların kolondan geçerek elde edilebilmesidir. Kök eksudatları kolondan geçirilmeden önce kolon aktive edilmiştir. Bunun için öncelikle 3 ml %100 Asetonitril kolondan geçirilmiş ardından 3 ml deiyonize su ile yıkanmıştır. Kök eksudatı kolondan geçirildikten sonra 3 ml %10 asetonitril ile yıkanarak 3 ml %80 aseton/su v/v ile elüsyon yapılmıştır. Vakumlu konsantratörde aseton uzaklaştırılmıştır. LC-MS/MS analizlerine kadar örnekler -20°C'de saklanmıştır.

3.2.7.2 LC-MS/MS analizleri

Strigolakton hormonları içerisinde canavar otunun çimlenmesini en fazla stimüle eden hormon olduğu için LC-MS/MS cihazında analitik kimya analizleri için standart olarak orobanchol hormonu (www.olchemim.cz) kullanılmıştır. İlgili hormon farklı asetonitril kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış ve ardından LC-MS/MS cihazına enjekte edilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Numunedeki orobanchol düzeyinin belirlenmesi için hazırlanan ekstrakt LC-MS/MS cihazında oluşturulan kalibrasyon aralığına düşecek şekilde bir volumetrik flask içinde asetonitril kullanılarak seyreltilmiştir. Dilüsyon sonrası hazırlanan preparatlar 0,45 µm PTFE şırınga ucu filtreden geçirilerek LC-MS/MS vialine alınmış ve çizelge 3.7'de belirtilen şartlar altında analiz edilmiştir. Elde edilen örnekler 0.45 µm micro-spin naylon filtreden geçirilmiştir. Filtreden geçirilen her örnekten 1 ml alınarak amber viyalere aktarılmıştır. Bu örneklerden 5 µL alınarak C18 kolonuna (Zorbax SB-C18, HT 2.1x50 mm, 1.8 µm), enjekte edilmiştir. Kolonda sıcaklık 45°C ve akış hızı 0.45ml/min⁻¹ olarak ayarlanmıştır (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. LC-MS/MS cihazı analitik koşulları

Cihaz	Agilent, 1290 Infinity (LC)-6430 Tripquadrapol (MS)
Dedektör	Diode Array Detector (DAD)
Kolon	C18 (Zorbax SB-C18, HT 2.1x50 mm, 1.8 µm)
Akış oranı	0.45 mL/dak
Kolon sıcaklığı	45°C
Enjeksiyon hacmi	5 µL
Hareketli faz	%80 asetonyril ve %20 su, v/v

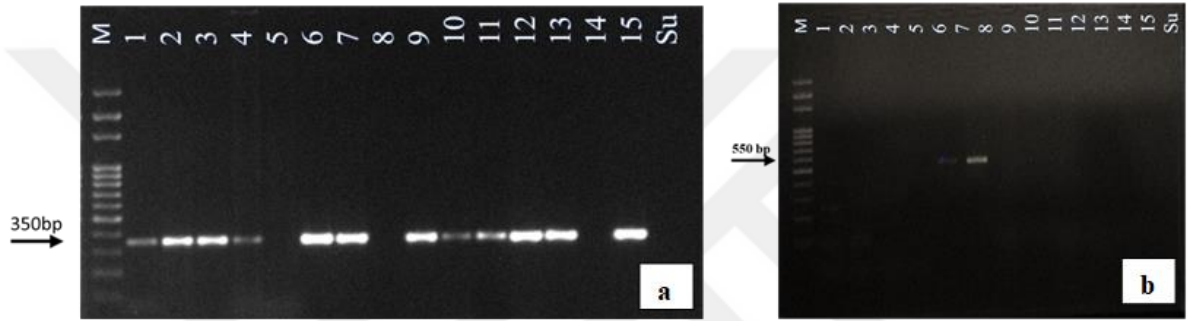
3.2.8 İstatistik Analiz

Tüm istatistiksel analizler SAS 9.0 (2002, SAS Institute, Cary, NC, ABD) istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Petri kabı denemelerinde elde edilen % çimlenme oranı değerlerine açı transformasyonu yapılmıştır. Hidroponik ve saksı denemesi verilerinde sıfır değerleri olduğu için $\log = \log (X + 1)$ transformasyonu yapılmıştır. Varyans analizinde (ANOVA) PROC GLM prosedürü kullanılmış, ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD karşılaştırma testi ile %95 önem düzeyinde karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

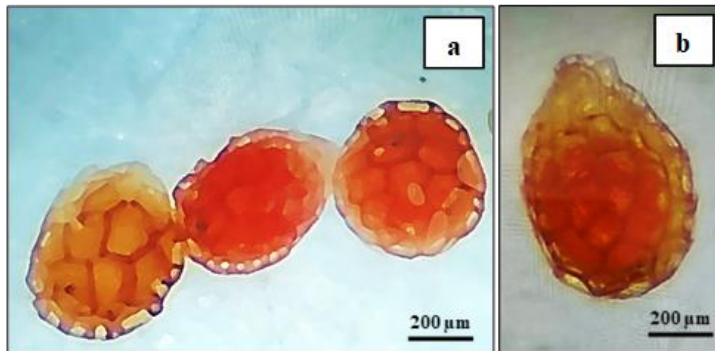
4.1 Denemede Kullanılan Canavar Otu Türlerinin Moleküler Teşhisleri

Tohum örneklerinden yapılan total nükleik asit izolasyonu sonucu genomik DNA elde edilmiştir. Elde edilen genomik DNA kullanılarak, daha önce araştırmacılar tarafından geliştirilmiş olan *P. aegyptiaca* ve *P. ramosa* türlerini ayırıcı primerlerden AB101, rps2 ve ITS350 primerleri kullanılarak PCR yapılmış ve ilgili bölgeler ITS350 ve rps primerleri ile başarılı bir şekilde çoğaltılarak %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.1.a-b). Tez çalışmalarında kullanılmak üzere domates üretim alanlarında Antalya, Isparta ve Burdur illeri canavar otunun sorun olduğu seralardan alınan örneklerden yapılan tür tespiti için 3 ilden alınan toplam 15 popülasyondan 12 si *P. aegyptiaca* tür spesifik primeri ile yapılan PCR sonucunda bant vermiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. ITS350 ve rps2 primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri; **a)** rps2 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri; **b)** M: Moleküler markör (100 bp DNA ladder, GeneAll)

Çalışmaların bundan sonraki kısımlarında canavar otu etki denemelerinde tür tespiti yapılmış *P. aegyptiaca* tohumları kullanılmıştır. Ayrıca kullanılacak popülasyonda yapılan tohum canlılık testlerinde tohumların yaklaşık %80 oranında canlı olduğu belirlenmiştir. Canlı tohumların embriyosu kırmızı renk ile boyanırken cansız tohumların embriyosu renksiz kalmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. TTC tohum canlılık testi sonucu; **a)** soldan sağa ilk tohum cansız diğer iki tohum canlı; **b)** Endospermi kırmızıya boyanmış tohum

4.2 Domates Kök Ekstraktlarının Petri Kabı Denemesinde Canavar Otuna Etkisinin Belirlenmesi

Genotiplere ait kök ekstraktlarının üç farklı sıcaklıkta canavar otunun tohum çimlenmesine yüzde etkileri Petri kabı denemesi ile belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak canavar otu çimlenme stimülantı GR-24, negatif kontrol olarak ise saf su kullanılmıştır. Çimlenme denemelerinde mutant genotipler ile ticari (hassas) çeşitler karşılaştırılmıştır. Tüm denemelerde genotipler arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Buna göre; 18°C’de pozitif kontrolde çimlenme oranı %84, Torry F1 genotipinde çimlenme oranı %33.7, 18nt genotipinde çimlenme oranı %18.6, 186nt genotipinin çimlenme oranı %16.3 ve negatif kontrolde %3.80 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

20°C’de pozitif kontrolde çimlenme oranı %83.9, Torry F1 genotipinde çimlenme oranı %63.3, 18nt genotipinde çimlenme oranı %44.5, 186nt genotipinin çimlenme oranı %16.4 ve negatif kontrolde %1.70 olarak belirlenmiştir.

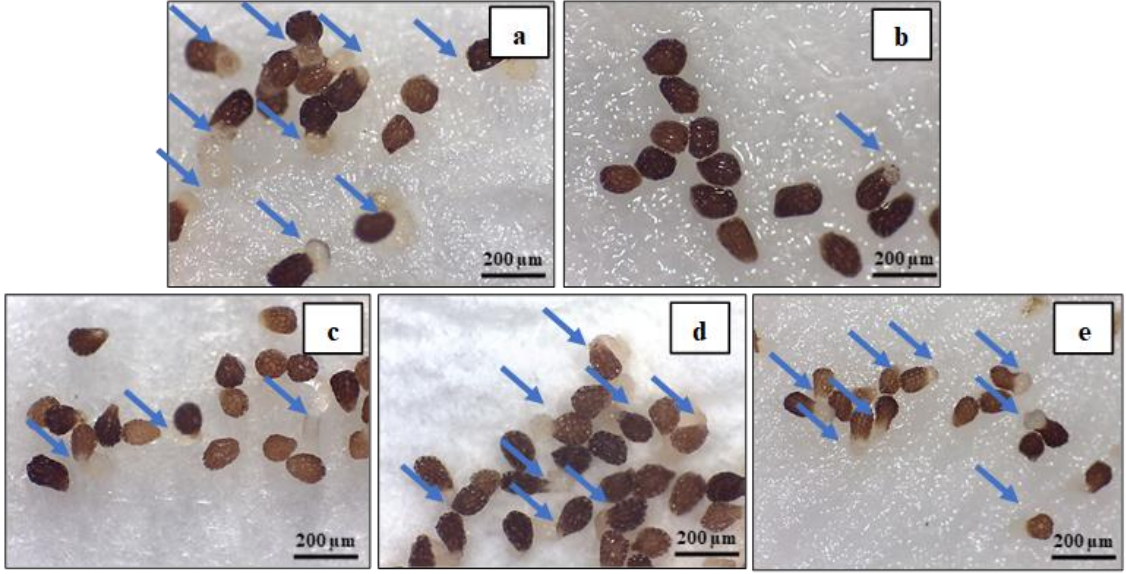
22°C’de pozitif kontrolde çimlenme oranı %87.5, Torry F1 genotipinde çimlenme oranı %51.5, 18nt genotipinde çimlenme oranı %43.2, 186nt genotipinin çimlenme oranı %31.3 ve negatif kontrolde %5.1 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Domates kök ekstraktlarının 18°C, 20°C ve 21°C’de canavar otu tohumunun çimlenmesine etkisi

Genotipler	Canavar Otu Tohum Çimlenme Oranı (%)		
	ORT ± SS*		
	18°C	20°C	22°C
18nt	18.6 ± 2.42 c	44.5 ± 4.97 c	43.2 ± 3.75 c
186nt	16.3 ± 5,87 c	16.4 ± 4.01 d	31.3 ± 3.86 d
Torry F1	33.7 ± 3.53 b	63.3 ± 5.65 b	51.5 ± 4.82 b
Pozitif Kontrol (GR24)	84.6 ± 2.49 a	83.9 ± 2.25 a	87.5 ± 3.27 a
Negatif Kontrol (su)	3.80 ± 3.03 d	1.70 ± 1.50 e	5.10 ± 2.08 e
CV (%)	11.4	10.4	9.02
LSD (%5)	3.33	3.60	3.30
P Değeri	0.0001	0.0001	0.0001
Serbestlik Derecesi	45	45	45

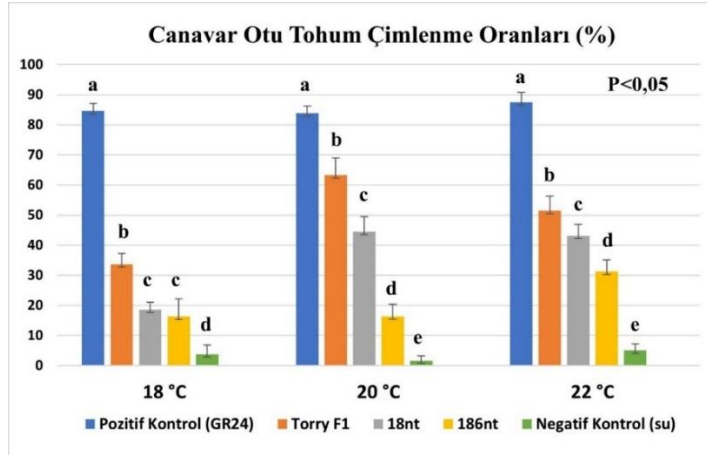
*ORT: Ortalama, SS: Standart Sapma

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır



Şekil 4.3. Domates kök ekstraktlarının Petri kabı denemesinde 20°C’de canavar otunun tohum çimlenmesine etkisi; **a)** pozitif kontrol (GR24), **b)** negatif kontrol (su); **c)** 186nt genotipi; **d)** 18nt genotipi; **e)** TorryF1 ticari domates çeşidi

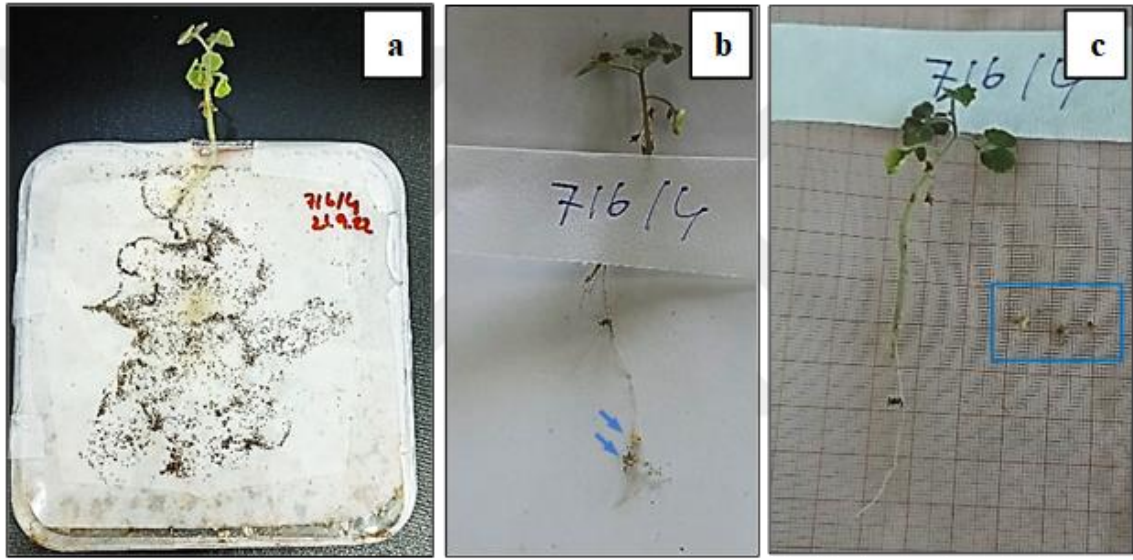
Sıcaklığa bağlı olarak canavar otu tohum çimlenme oranlarında tüm uygulamalarda artış gözlenmiştir. Fakat her üç sıcaklıkta da en düşük çimlenme oranı 186nt genotipinde elde edilmiştir. 186nt genotipi kök ekstraktının canavar otunun tohum çimlenmesini ticari çeşit olan TorryF1’e oranla yaklaşık %50 oranında daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Domates kök ekstraktlarının 18°C, 20°C ve 21°C’de canavar otu tohum çimlenme oranlarına etkisi

4.3 Hidroponik Sistem Denemeleri ile Genotiplerin Canavar Otuna Karşı Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi

İki mutant genotip olan 18nt ve 186nt, ticari domates çeşitleri olan Torry F1 ve Bizimköy F1 genotipleri kullanılarak hidroponik denemeler kurulmuştur. Ayrıca literatürde canavar otuna karşı dayanıklılık kaynağı olabileceği bildirildiğinden yabancı domates genotipi olan *Solanum pennellii* LA0716 aksasyonu da denemelere dahil edilmiştir. Fakat hidroponik denemelerde *S. pennellii* LA0716 aksasyonu diğer genotiplere göre çok yavaş geliştiğinden ve yeterince kök biyokütlesi oluşturamadığından (Şekil 4.5) tüberkül oluşumunun az olması, kök gelişiminin yeterince olamamasından mı yoksa bir çeşit dayanıklılık gösterdiğinden mi kaynaklandığı hususu net olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle *S. pennellii* LA0716 aksasyonu analizlere diğer genotiplerle birlikte dahil edilmemiştir.



Şekil 4.5. *Solanum pennellii* LA 0716 aksasyonu yabancı domates genotipinin canavar otu enfeksiyonundan 30 gün sonra köklerinde oluşan tüberküller; **a)** kök kabında bitkinin görünümü; **b)** oluşan tüberküller; **c)** 1-2 mm çapında oluşan tüberküller

Hidroponik deneme sonucunda oluşan tüberkül büyüklerinin farklı oluşları nedeniyle bu faktör dikkate alınarak değerlendirmeler yapılmıştır. Buna göre yapılan ilk denemede canavar otu enfeksiyonundan 10 gün sonra, 15 gün sonra ve 30 gün sonra köklerde oluşan 1-2 mm ve >2 mm çapındaki tüberkül sayıları belirlenmiştir (Şekil 4.6).

İkinci denemede ise 1-5 mm, 5-10 mm ve >10 mm çapındaki tüberkül sayıları değerlendirilmiştir. Ayrıca kök kaplarında aynı büyüklükte tüberküller bulunsada dahi tüberküllerin nekrozlu ya da sağlıklı oluşlarının bir varyasyon kaynağı olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle deneme sonunda tüberküller dikkatlice köklerden ayrılarak etüvde kurutulmuş ve kuru ağırlıkları alınmıştır.

Canavar otu enfeksiyonundan 10 gün sonra 1-2 mm çapındaki tüberkül sayıları incelendiğinde, Torry F1 genotipinde ortalama 0.56 tüberkül bulunurken, 18nt ve 186nt genotiplerinde bu sayı sırasıyla 0 ve 0.06 olarak kaydedilmiştir. İstatistiksel analizler, farklı genotipler arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. Ticari çeşitte canavar otu enfeksiyonundan sonraki 10. günde tüberkül oluşurken 18nt ve 186nt genotiplerinde neredeyse tüberkül oluşmadığı görülmüştür. Ayrıca, >2 mm çapındaki tüberküller hiçbir genotipte gözlenmemiştir, bu da enfeksiyonun bu aşamada ilerlemediğini göstermektedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Domates genotiplerinde enfeksiyondan 10 gün sonra köklerde oluşan tüberkül sayıları

Genotipler	Enfeksiyondan 10 Gün Sonra	
	1-2 mm Çapındaki Tüberkül Sayısı ORT ± SS*	>2 mm Çapındaki Tüberkül Sayısı (ORT)
18nt	0.00 ± 0.00 b	0.00
186nt	0.06 ± 0.11 b	0.00
TorryF1	0.56 ± 0.19 a	0.00
CV (%)	79.5	
LSD (%5)	0.2	
P Değeri	0.002	
Serbestlik Derecesi	9	

*ORT: Ortalama, SS: Standart Sapma

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır

Torry F1, 18nt ve 186nt genotiplerinde canavar otu enfeksiyonundan 15 gün sonra farklı çaplarda tüberkül oluşumunu olduğu belirlenmiştir. 1-2 mm çapındaki tüberkül sayıları incelendiğinde, Torry F1 genotipinde ortalama 0.79 adet tüberkül bulunurken, 18nt ve 186nt genotiplerinde bu sayı sırasıyla 0.08 ve 0.14 olarak kaydedilmiştir. İstatistiksel analizler, farklı genotipler arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. Ticari çeşitte canavar otu enfeksiyonundan sonraki 15. günde 2 mm çapındaki tüberküller bulunurken, özellikle 186nt genotipinde bu büyüklükte tüberkülün olmadığı görülmektedir. Bu da canavar otunun genotipte gelişiminin yavaş olduğunu göstermektedir. Enfeksiyondan sonraki 15. günde elde edilen verilerin sonuçlarına göre Torry F1 çeşidinin tüberkül gelişimine daha duyarlı olduğu, ancak 18nt ve 186nt genotiplerinin daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Fakat yüksek varyasyon katsayıları (%48.9 ve %114.3), genotipler arasındaki farklılıkların yüksek olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Domates genotiplerinde enfeksiyondan 15 gün sonra köklerde oluşan tüberkül sayıları

Genotipler	Enfeksiyondan 15 Gün Sonra	
	1-2 mm Çapındaki Tüberkül Sayısı ORT ± SS*	>2 mm Çapındaki Tüberkül Sayısı ORT ± SS*
18nt	0.08 ± 0.14 b	0.08 ± 0.14 b
186nt	0.14 ± 0.14 b	0.00 ± 0.00 b
TorryF1	0.79 ± 0.07 a	0.37 ± 0.20 a
CV (%)	48.9	114.3
LSD (%5)	0.2	0.22
P Değeri	0.0006	0.03
Serbestlik Derecesi	9	9

*ORT: Ortalama, SS: Standart Sapma

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır

Çizelge 4.4. Domates genotiplerinde enfeksiyondan 30 gün sonra köklerde oluşan tüberkül sayıları

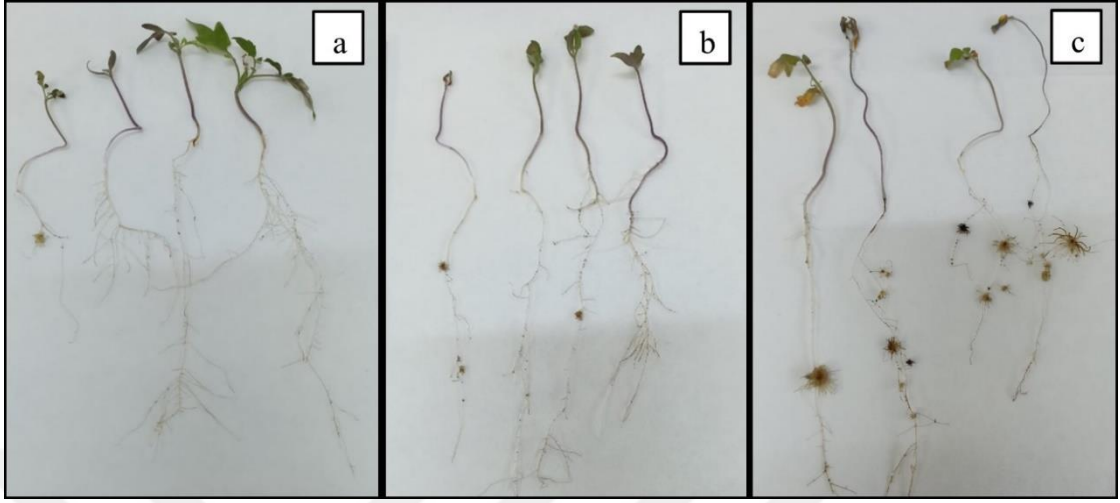
Genotipler	Enfeksiyondan 30 Gün Sonra	
	1-2 mm Çapındaki Tüberkül Sayısı (ORT)	>2 mm Çapındaki Tüberkül Sayısı ORT ± SS*
18nt	0.00	0.83 ± 0.39 b
186nt	0.00	0.16 ± 0.16 b
TorryF1	0.00	3.08 ± 0.54 a
CV (%)		59.3
LSD (%5)		0.63
P Değeri		0.007
Serbestlik Derecesi		9

*ORT: Ortalama, SS: Standart Sapma

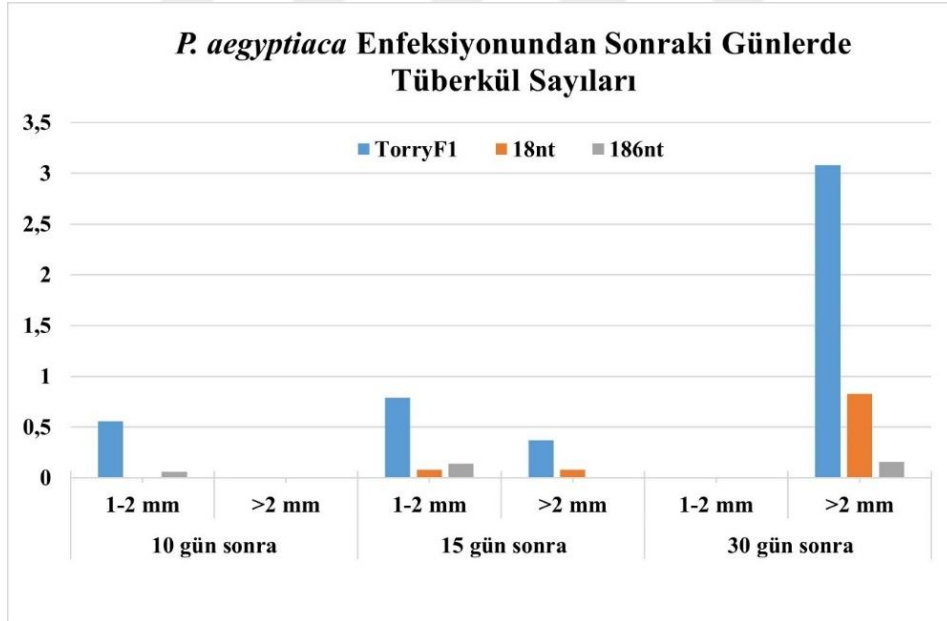
Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır

Enfeksiyondan 30 gün sonra 1-2 mm çapındaki tüberkül bulunmadığı yani tüm oluşan tüberküllerin büyüklüklerinin >2 mm olduğu gözlenmemiştir. 2 mm çapındaki tüberküller açısından ise Torry F1 genotipinde oldukça yüksek tüberkül sayısı (3.08 ± 0.54) gözlemlenmiştir. Bu sonuç, diğer genotipler olan 18nt (0.83 ± 0.39) ve 186nt (0.16 ± 0.16) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur

($p < 0.05$) (Çizelge 4.4). 18nt ve 186nt genotiplerinde oluşan tüberküllerin 30. günde sağlıklı bir şekilde büyümedikleri belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *P. aegyptiaca* enfeksiyonundan 30 gün sonra köklerde oluşan 1-2 mm ve >2 mm çapındaki tüberküller; a) 186nt; b) 18nt; c) Torry F1 ticari domates çeşidi



Şekil 4.7. Domates genotiplerinin enfeksiyondan 10 gün sonra, 15 gün sonra ve 30 gün sonra köklerinde oluşan 1-2 mm ve >2 mm çapındaki tüberkül sayıları

Farklı bir denemede mutant genotipler olan 186nt ve 18nt ye ek olarak ticari domates çeşitlerinden TorryF1 ve BizimköyF1 kullanılarak canavar otu enfeksiyonundan 20 gün sonra farklı çaplarda tüberkül oluşumu ve tüberkül biyokütleleri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5).



Şekil 4.8. *P. aegyptiaca* enfeksiyonundan 30 gün sonra köklerde oluşan farklı büyüklükteki tüberküller; **a)**186nt; **b)**18nt; **c)** TorryF1 ticari domates çeşidi; **d)** BizimköyF1 ticari domates çeşidi

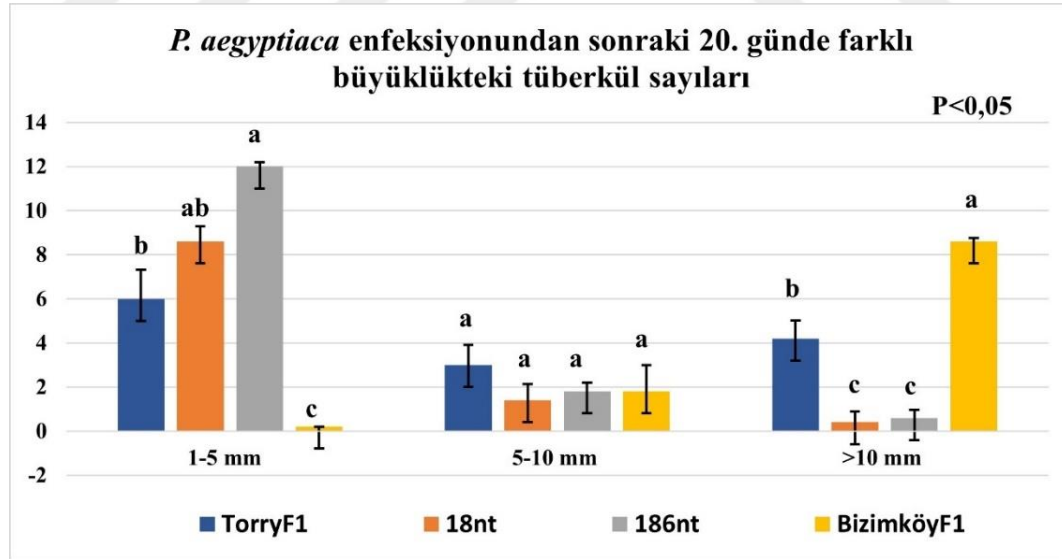
Genotiplerin canavar otuna vermiş oldukları tepkiler Çizelge 4.5'te gösterilmektedir. Genotipler arasında tüberkül oluşumu ve biyokütle açısından farklılıkların istatistiki olarak önemli olduğu belirlenmiştir. 1-5 mm çapındaki tüberküller açısından en yüksek ortalama tüberkül sayısı 186nt genotipinde gözlemlenmiş (12.0 ± 0.20), bunu 18nt (8.60 ± 0.69) ve TorryF1 (6.00 ± 1.31) izlemektedir. En düşük tüberkül sayısı ise BizimköyF1 genotipinde sıfır olarak belirlenmiştir. 5-10 mm çapındaki tüberküller incelendiğinde, tüberkül sayısı bakımından önemli farklılık olmadığı belirlenmiştir. >10 mm çapındaki tüberküller açısından, en yüksek ortalama tüberkül sayısı BizimköyF1 genotipinde (8.60 ± 0.15) tespit edilmiştir, bu da diğer genotiplerden anlamlı derecede daha büyük tüberkül oluştuğunu göstermektedir. Bu sonuçlar canavar otu enfeksiyonundan 20 gün sonra dahi mutant genotipler, 18nt ve 186nt de canavar otunun ticari çeşitlere göre az da olsa tüberkül oluşturduğu halde oluşan tüberküllerin gelişemediğini göstermiştir (Şekil 4.8).

Çizelge 4.5. Domates genotiplerinde enfeksiyondan 20 gün sonra köklerde oluşan farklı büyüklükteki tüberkül sayıları ve biyokütleleri

Genotipler	Enfeksiyondan 20 Gün Sonra			
	1-5 mm Çapındaki Tüberkül Sayısı ORT ± SS*	5-10 mm Çapındaki Tüberkül Sayısı ORT ± SS*	>10 mm Çapındaki Tüberkül Sayısı ORT ± SS*	Tüberkül Biyokütle (mg/rhizotron) ORT ± SS*
18nt	8.60 ± 0.69 ab	1.4 ± 0.73 a	0.4 ± 0.49 c	25,5 ± 10.4 b
186nt	12.0 ± 0.20 a	1.8 ± 0.40 a	0.6 ± 0.37 c	48.0 ± 5.88 b
TorryF1	6.00 ± 1.31 b	3.0 ± 0.90 a	4.2 ± 0.82 b	234.7 ± 199.7 a
BizimköyF1	0.00 ± 0.00 c	1.8 ± 0.18 a	8.6 ± 0.15 a	346.5 ± 68.2 a
CV (%)	49.8	68.4	48.1	64.6
LSD (%5)	1.00	0.83	0.70	162.9
P Değeri	0.0004	0.72	0.0001	0.002
Serbestlik Derecesi	16	16	16	12

*ORT: Ortalama, SS: Standart Sapma

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır



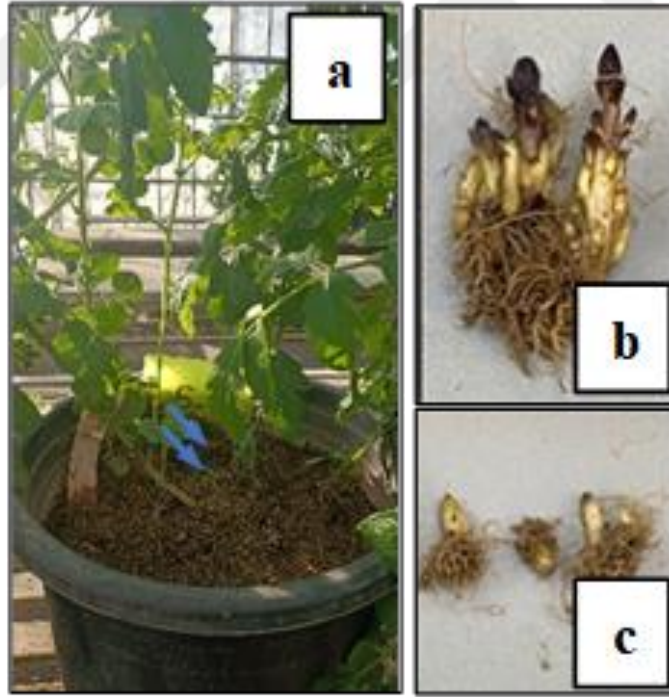
Şekil 4.9. Domates genotiplerinde enfeksiyondan 20 gün sonra köklerde oluşan 1-5 mm, 5-10 mm, >10 mm çapındaki tüberkül sayıları (ORT±SS)

Tüberkül biyokütlelerine bakıldığında oluşan tüberkül sayıları ve sağlıklı olmaları ile paralel olarak TorryF1 çeşidinin biyokütle değerinin diğerlerine göre yüksek olduğu görülmüştür (234.7 ± 199.7), ancak bu sonuç, yüksek varyasyon katsayısı (%64.6)

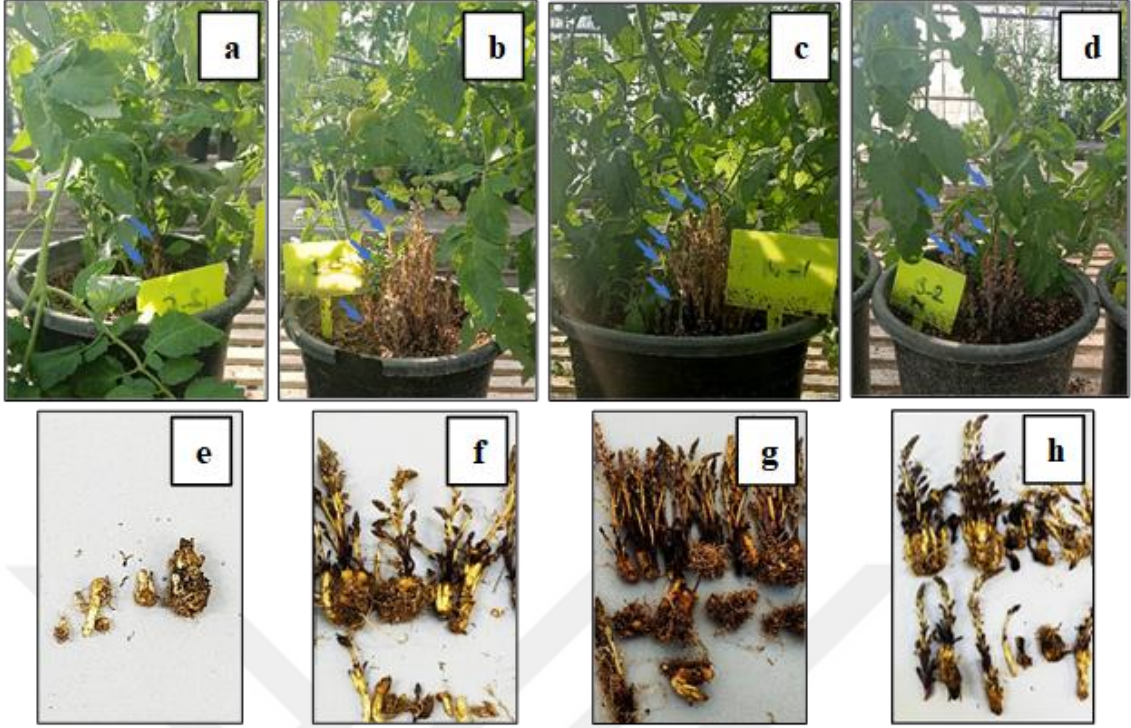
nedeniyle büyük bir değişkenlik göstermektedir. Benzer şekilde diğer ticari domates çeşidi, BizimköyF1 genotipinde de tüberkül biyokütlenin yüksek olduğu belirlenmiştir (346.5 ± 68.2), bu da diğer genotiplerle kıyaslandığında anlamlı olarak farklıdır ($P = 0.002$). Bu sonuçlar, genotipler arasındaki farkların hem tüberkül gelişimi hem de biyokütle açısından önemli olduğunu ve mutant genotiplerinin canavar otunun tüberkül gelişimini engellediğini göstermektedir (Çizelge 4.5).

4.4 Saksı Denemeleri ile Genotiplerin Canavar Otuna Karşı Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi

Hidroponik denemelerde olduğu gibi literatürde canavar otuna karşı dayanıklılık kaynağı olabileceği bildirildiğinden yabani domates genotipi olan *Solanum pennellii* LA0716 aksasyonu saksı denemelerine dahil edilmiştir. Fakat diğer genotiplere göre çok yavaş geliştiğinden *S. pennellii* LA0716 aksasyonu analizlere diğer genotiplerle birlikte dahil edilmemiş, yine de genotipte oluşan canavar otu sürgünleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. *Solanum pennellii* LA 0716 aksasyonu domates genotipinin saksı denemesi; a) saksıda toprak yüzeyine çıkan canavar otu sürgünleri; b) sürgünler; c) tüberküller



Şekil 4.11. Domates genotiplerinde toprak yüzeyine çıkan sürgün ve toprak altında kalan canavar otu tüberkülleri; **a)** ve **e)** 186nt mutant **b)** ve **f)** 18nt mutant **c)** ve **g)** TorryF1; **d)** ve **h)** BizimköyF1 domates çeşidi

Denemelerde çiçeklenme öncesi toplam canavar otu sürgün sayısı, çiçeklenme döneminde toplam canavar otu sürgün sayısı, tohum bağlama dönemindeki toplam canavar otu sürgün sayısı, toplam canavar otu sürgün sayısı ve canavar otu sürgün ve tüberküllerin toplam biyokütle verileri alınarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.11).

Çiçeklenme öncesi dönemdeki toplam canavar otu sürgün sayısına bakıldığında genotipler arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu görülmektedir (Çizelge 4.6). Çiçeklenme öncesi canavar otu sürgün sayısı, ticari domates çeşidi Naim F1 de ortalama 12 iken, 267F1 (WT) genotipinde ortalama 18.6, Heterozigot 186nt genotipinde 14, 18nt mutant genotipte yaklaşık 9 ve 186nt de ise hiç sürgün gelişimi olmamıştır. 186nt genotipinin olduğu saksılarda çiçeklenme öncesi dönemde hiç canavar otu sürgününün görülmemesi bu genotipin bir dayanıklılık sergilediğini göstermiştir.

Çizelge 4.6. Domates genotiplerinde dikimden 130 gün sonra canavar otunun çiçeklenme öncesi, çiçeklenme dönemi ve tohum oluşumu dönemindeki toplam sürgün sayısına etkisi

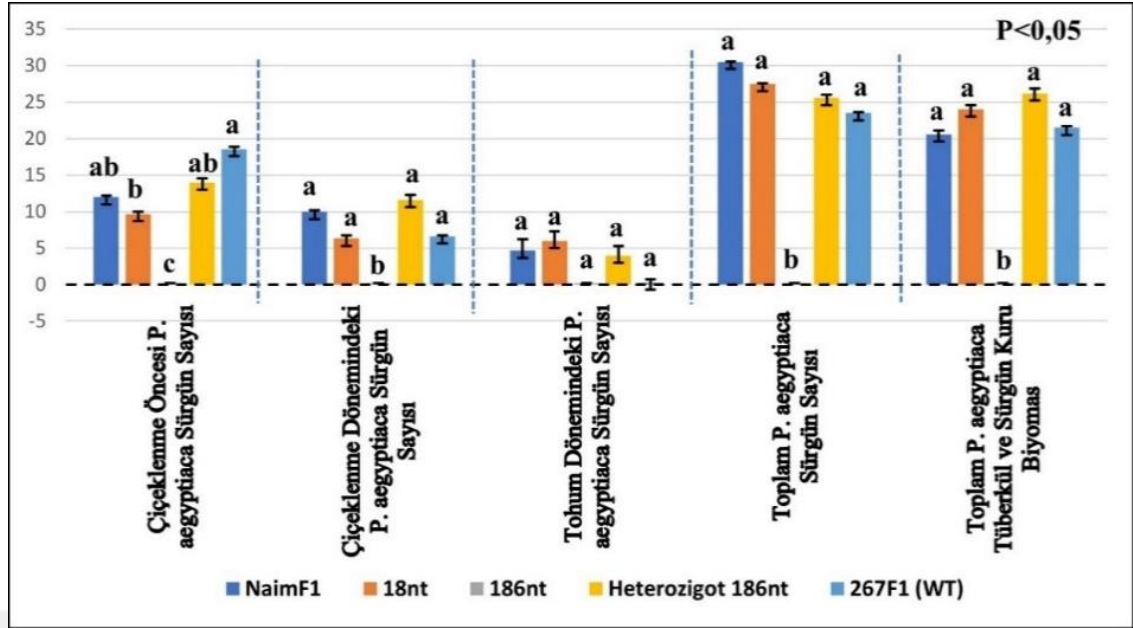
Genotipler	1. Saksı Denemesi (Dikimden 130 gün sonra)		
	Çiçeklenme Öncesi Toplam <i>P. aegyptiaca</i> Sürgün Sayısı ORT ± SS*	Çiçeklenme Dönemindeki Toplam <i>P. aegyptiaca</i> Sürgün Sayısı ORT ± SS*	Tohum Dönemindeki Toplam <i>P. aegyptiaca</i> Sürgün Sayısı ORT ± SS*
18nt	9.66 ± 0.28 b	6.33 ± 0.41 a	6.00 ± 1.33 a
186nt	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 a
267F1 (WT)	18.6 ± 0.29 a	6.66 ± 0.07 a	0.33 ± 0.40 a
Heterozigot 186nt	14.0 ± 0.57 ab	11.6 ± 0.70 a	4.00 ± 1.28 a
NaimF1	12.0 ± 0.23 ab	10.6 ± 0.17 a	4.66 ± 1.56 a
CV (%)	15.9	21.4	147.7
LSD (%5)	0.60	0.68	1.99
P Değeri	0.0001	0.0001	0.4
Serbestlik Derecesi	10	10	10

*ORT: Ortalama, SS: Standart sapma,
Aynı sütündeki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır

Çiçeklenme döneminde toplam canavar otu sürgün sayısına bakıldığında genotipler arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu görülmektedir (Çizelge 4.6). Ticari domates çeşidi Naim F1 de ortalama oluşan çiçeklenme dönemindeki canavar otu sürgün sayısı 10.6 iken, 267F1 (WT) genotipi ortalama 6.6, Heterozigot 186nt genotipinde 11.6, 18nt mutant genotipte 6.33 186nt de ise hiç çiçeklenme döneminde canavar otu sürgün gelişimi olmamıştır.

Tohum döneminde toplam canavar otu sürgün sayısına bakıldığında genotipler arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.6).

Deneme sonunda genotiplerin toplam canavar otu sürgün sayısı verilerine bakıldığında genotipler arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu görülmektedir. (Çizelge 4.7). 186nt genotipinde canavar otu sürgün oluşumu gerçekleşmemiş fakat denemeye alınan diğer tüm genotiplerdeki bitki başına toplam canavar otu sürgün sayısı 23-30 arasında değişmiştir. Yine canavar otu sürgün ve tüberkül biyokütlesine paralel olarak genotipler arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.12. Domates genotiplerinde dikimden 130 gün sonra *P. aegyptiaca*'nın çiçeklenme öncesi, çiçeklenme dönemi ve tohum oluşumu dönemindeki sürgün sayısına, toplam *P. aegyptiaca* sürgün sayısına ve toplam *P. aegyptiaca* tüberkül ve sürgün kuru biyokütlesine etkileri

Çizelge 4.7. Domates genotiplerinin dikiminden 130 gün sonra canavar otunun toplam sürgün sayısına ve toplam sürgün ve tüberküllerin kuru ağırlığına etkisi

Genotipler	1. Saksı Denemesi (Dikimden 130 gün sonra)	
	<i>P. aegyptiaca</i> Toplam Sürgün Sayısı ORT ± SS*	Toplam <i>P. aegyptiaca</i> Tüberkül ve Sürgün Kuru Ağırlığı ORT ± SS*
18nt	27.5 ± 0.08 a	24.0 ± 0.54 a
186nt	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
267F1 (WT)	23.5 ± 0.10 a	21.5 ± 0.18 a
Heterozigot 186nt	25.6 ± 0.39 a	26.2 ± 0.64 a
NaimF1	30.5 ± 0.07 a	20.6 ± 0.53 a
CV (%)	7.18	18.2
LSD (%5)	0.34	0.82
P Değeri	0.0001	0.0001
<i>Serbestlik Derecesi</i>	10	10

*ORT: Ortalama, SS: Standart sapma

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır

İkinci saksı denemesi değerlendirildiğinde çiçeklenme öncesi dönemdeki toplam canavar otu sürgün sayısına bakıldığında genotipler arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu görülmektedir (Çizelge 4.8). Ticari domates çeşidi Bizimköy F1 çeşidinde ortalama oluşan çiçeklenme öncesi canavar otu sürgün sayısı 53 iken, Torry F1 de

ortalama oluşan çiçeklenme öncesi canavar otu sürgün sayısı 36, 18nt mutant genotipte yaklaşık 55, 186nt de ise ortalama 10 adet çiçeklenme öncesi canavar otu sürgünü oluşmuştur.

Çiçeklenme döneminde toplam canavar otu sürgün sayısına bakıldığında genotipler arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu görülmektedir (Çizelge 4.8). Ticari domates çeşidi Bizimköy F1 çeşidinde ortalama oluşan çiçeklenme dönemi canavar otu sürgün sayısı 13 iken, Torry F1 de ortalama oluşan çiçeklenme dönemi canavar otu sürgün sayısı 7, 18nt mutant genotipte yaklaşık 30, 186nt de ise hiç çiçeklenme dönemi canavar otu sürgünü oluşmamıştır.

Tohum döneminde toplam canavar otu sürgün sayısına bakıldığında genotipler arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Domates genotiplerinin dikimden 90 gün sonra *P. aegyptiaca*'nın çiçeklenme öncesi sürgün sayısı, çiçeklenme dönemindeki sürgün sayısı ve tohum dönemindeki sürgün sayısına etkisi

Genotipler	2. Saksı Denemesi (Dikimden 90 gün sonra)		
	Çiçeklenme Öncesi Dönemdeki <i>P. aegyptiaca</i> Sürgün Sayısı ORT ± SS*	Çiçeklenme Dönemindeki <i>P. aegyptiaca</i> Sürgün Sayısı ORT ± SS*	Tohum Dönemindeki <i>P. aegyptiaca</i> Sürgün Sayısı ORT ± SS*
18nt	55.0 ± 11.7 a	30.0 ± 8.91 a	0.25 ± 0.30 a
186nt	10.7 ± 6.13 c	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 a
TorryF1	36.2 ± 10.1 b	7.25 ± 3.56 bc	0.50 ± 0.47 a
BizimköyF1	53.8 ± 16.7 a	13.8 ± 12.5 b	0.00 ± 0.00 a
CV (%)	30.3	61.8	57.3
LSD (%5)	15.80	10.5	0.37
P Değeri	0.0001	0.0001	0.28
Serbestlik Derecesi	16	16	16

*ORT: Ortalama, SS:Standart Sapma

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır

Deneme sonunda genotiplerin toplam canavar otu sürgün sayısı verilerine bakıldığında genotipler arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Toplam *P. aegyptiaca* sürgün sayısında Bizimköy F1 ticari domates çeşidinde ortalama 68,6 adet sürgün oluşmuş, bunu ortama 44 adet sürgünle Torry F1 çeşidi takip etmiştir. Mutant genotip 18nt de ise BizimköyF1 ticari domates çeşidi ile aynı istatistiki gurupta yer almış ortalama 85.2 canavar otu sürgünü oluşumuna neden olmuştur. En az sürgün oluşumu ortalama 107 sürgün sayısı ile 186nt genotipinde olmuştur. Yine canavar otu sürgün ve tüberkül biyokütlesinde de paralel olarak genotipler arasındaki fark

istatistiki olarak anlamlı bulunmuş, en düşük canavar otu biyokütlesi 186nt genotipinden elde edilmiştir.

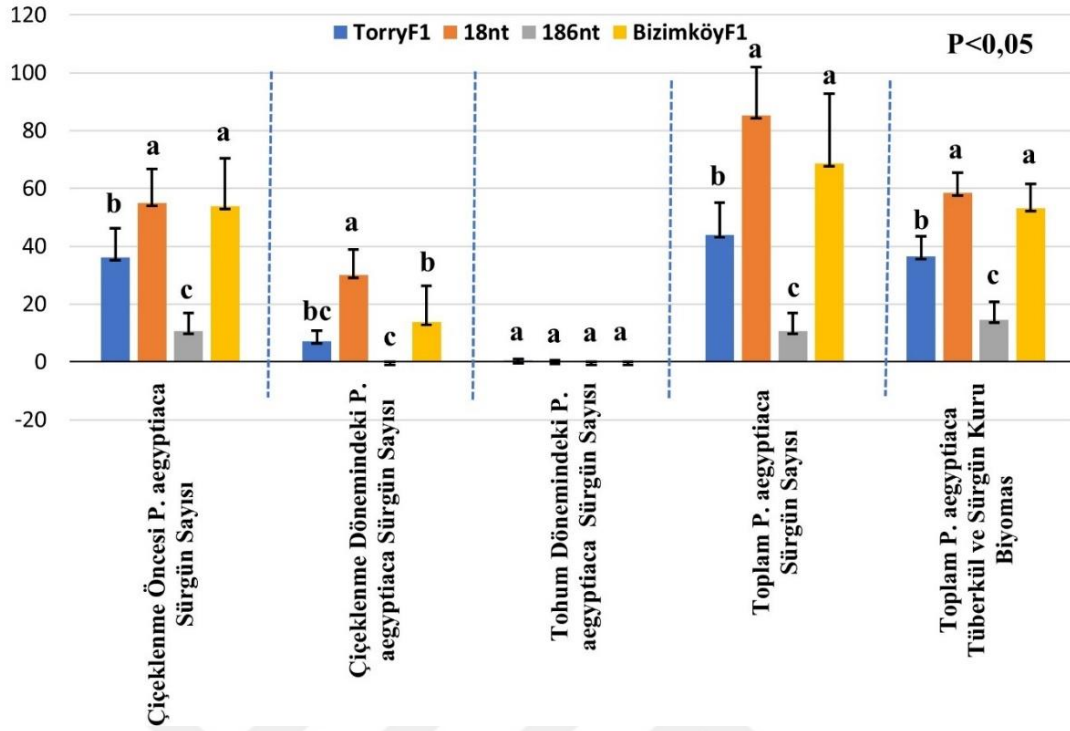
Çizelge 4.9. Domates genotiplerinin dikiminden 90 gün sonra *P. aegyptiaca*'nın sürgün sayısına ve toplam sürgün ve tüberküllerin kuru biyokütlesine etkisi

Genotipler	2. Saksı Denemesi (Dikimden 90 gün sonra)	
	Toplam <i>P. aegyptiaca</i> Sürgün Sayısı ORT ± SS*	Toplam <i>P. aegyptiaca</i> Tüberkül ve Sürgün Kuru Biyokütle ORT ± SS*
18nt	85.2 ± 16.8 a	58.5 ± 6.98 a
186nt	10.7 ± 6.13 c	14.5 ± 6.22 c
TorryF1	44.0 ± 11.0 b	36.5 ± 6.98 b
BizimköyF1	68.6 ± 24.2 a	53.2 ± 8.31 a
CV (%)	30.9	17.6
LSD (%5)	21.60	9.6
P Değeri	0.0001	0.0001
<i>Serbestlik Derecesi</i>	16	16

*ORT: Ortalama, SS:Standart sapma

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır

Birinci saksı denemesine göre ikinci saksı denemesinde genel olarak canavar otu sürgün sayılarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İlk denemede 186nt genotipinde hiç canavar otu sürgünü oluşmazken ikinci denemede oluştuğu görülmüştür. Yine de canavar otu için değerlendirilen parametreler içinde istatistiki olarak anlamlı bulunan tüm parametrelerde, en düşük canavar otu sürgün sayısı ile 186nt genotipi öne çıkmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.13. Domates genotiplerinin dikimden 90 gün sonra *P. aegyptiaca* çiçeklenme öncesi çiçeklenme, tohum dönemindeki sürgün sayısına, toplam *P. aegyptiaca* sürgün sayısına ve toplam *P. aegyptiaca* tüberkül ve sürgün kuru biyokütlesine etkileri

İki saksı denemesinin ortalamasına bakıldığında toplam *P. aegyptiaca* sürgün sayısı ve toplam sürgün ve tüberkül biyokütlesi bakımından ticari domates çeşidi BizimköyF1 ve mutant domates genotipi 18nt, genotipler arasında istatistiksel olarak en fazla sürgün sayısına ve toplam sürgün ve tüberkül kuru biyokütlesine sahip olanlar genotipler olduğu görülmüştür. Mutant 186nt genotipi ortalama 6.7 *P. aegyptiaca* sürgün sayısı ile en az sürgün oluşturan ve 9.06 en düşük biyokütle değerine sahip genotip olup, hem en az *P. aegyptiaca* sürgün sayısında hem de en düşük biyoküttele değerine sahip genotip olmuştur (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Domates genotiplerinin 1. ve 2. saksı denemesi ortalamasına göre *P. aegyptiaca*'nın sürgün sayısı ile toplam sürgün ve tüberküllerin kuru biyokütlesi üzerine etkisi

Genotipler	1. ve 2. Saksı Denemelerinin Ortalaması		
	Toplam <i>P. aegyptiaca</i> Sürgün Sayısı ORT ± SS*	Toplam <i>P. aegyptiaca</i> Tüberkül ve Sürgün Kuru Biyokütle ORT ± SS*	Örnek Sayısı (n)
18nt	63.5 ± 32.5 a	45.5 ± 19.7 a	8
186nt	6.70 ± 7.20 c	9.06 ± 8.85 c	8
Heterozigot 186nt	25.6 ± 10.9 bc	26.2 ± 14.7 bc	3
267F1 (WT)	23.5 ± 2.50 bc	21.5 ± 4.03 bc	3
TorryF1	44.0 ± 11.0 ab	36.5 ± 6.98 ab	5
BizimköyF1	68.6 ± 24.4 a	53.2 ± 8.31 a	5
NaimF1	30.5 ± 2.00 bc	20.6 ± 9.39 bc	3
CV (%)	50.6	40.2	
LSD (%5)	27.70	17.6	
P Değeri	0.0001	0.0001	
Serbestlik Derecesi	28	28	

*ORT: Ortalama, SS: Standart sapma

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır

4.5 Genotiplerin Gen Ekspresyon Analizleri

4.5.1 RNA miktar ve kalitesinin belirlenmesi

Biodrop cihazı ile ölçülen total RNA miktarlarını ve RNA'nın saflığını belirten A260/280 ve A260/230 oranları kullanılarak farklı genotipler için alınan RNA örnekleri hem konsantrasyon (ng/μl) hem de saflık açısından değerlendirilmiştir. 18nt genotipi için üç ayrı örnek alınmış ve RNA miktarları sırasıyla 188.8 ng/μl, 40 ng/μl ve 200.8 ng/μl olarak ölçülmüştür. A260/280 oranları, RNA saflığını ifade eden bir göstergedir ve bu oranların genellikle 2.0-2.2 aralığında olması beklenmektedir. 18nt genotipine ait örneklerin A260/280 oranları 2.18 ile 2.27 arasında değişmekte, bu da RNA'nın protein kontaminasyonu açısından oldukça saf olduğunu göstermektedir. A260/230 oranları da 2.5 ile 2.75 arasında olup, RNA'nın organik bileşikler veya tuzlarla kontamine olmadığını göstermektedir. 1000 ng RNA elde etmek için kullanılan hacim ise 4.98 ile 25 μl arasında değişmektedir, bu da örnekler arasındaki RNA konsantrasyon farklarını göstermektedir. 186nt genotipinde ise RNA miktarları 142.4 ng/μl, 145.6 ng/μl ve 203.2 ng/μl olarak ölçülmüştür. A260/280 oranları yine saflığın iyi olduğunu gösteren 2.19 civarındadır. A260/230 oranları ise 2.33 ile 2.61 arasında değişmekte olup, genellikle

kabul edilebilir sınırlar içindedir. 1000 ng RNA elde etmek için gereken hacimler 4.92 µl ile 7.02 µl arasında değişmiştir. 267 F1 (WT) genotipinde ise RNA konsantrasyonları büyük farklılıklar göstermektedir. 36.8 ng/µl ile düşük bir RNA miktarı ölçülmüşken, 190.4 ng/µl ve 80.8 ng/µl gibi daha yüksek değerler de kaydedilmiştir. A260/280 oranları bu genotipte de 2.18 ile 2.24 arasında olup RNA'nın saflığını göstermektedir. A260/230 oranı 3.28 gibi yüksek bir değer göstermiştir, bu da örneklerden birinde olası organik kontaminasyonun daha az olduğunu işaret edebilir. 1000 ng RNA elde etmek için gereken hacimler 5.25 µl ile 27.17 µl arasında değişmiştir (Çizelge 4.11).

Domates genotiplerinin RNA miktarlarının farklılık gösterdiği ve RNA saflık oranlarının genellikle kabul edilebilir düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. Domates genotiplerinin Biodrop ölçüm sonucu total RNA Miktarları

Genotip	Örnek No	ng/µl	A260/280	A260/230	1000 ng için 1 (µg)
18nt	1-1	188.8	2.22	2.68	5.30
	1-2	40.0	2.27	2.50	25.00
	1-3	200.8	2.18	2.75	4.98
186nt	2-1	142.4	2.19	2.61	7.02
	2-2	145.6	2.19	2.33	6.87
	2-3	203.2	2.19	2.37	4.92
267 F1 (WT)	3-1	36.8	2.19	3.28	27.17
	3-2	190.4	2.18	2.61	5.25
	3-3	80.8	2.24	2.52	12.38

4.5.2 DNase uygulaması

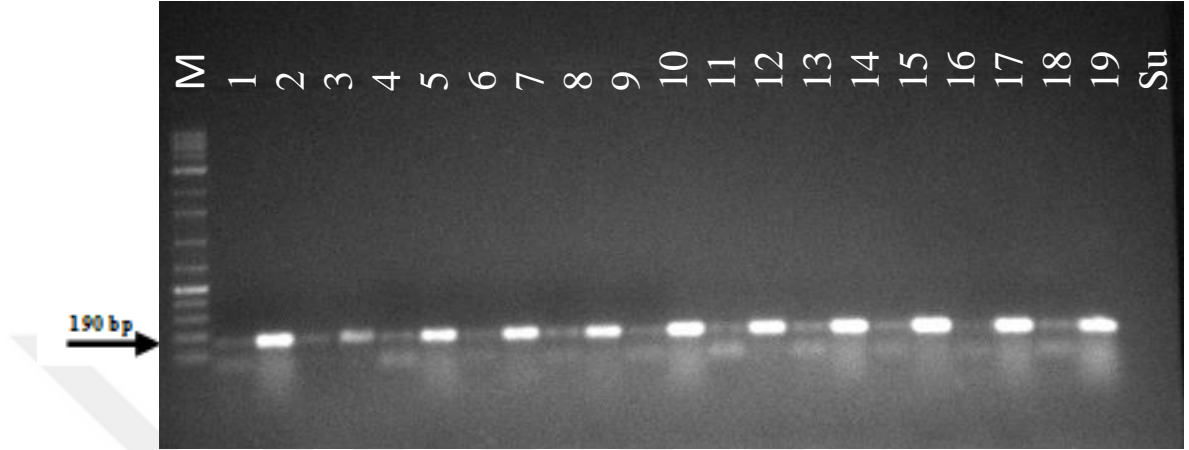
Total RNA örneklerinde DNA kontaminasyonu olup olmadığının belirlenmesi amacıyla DNase uygulaması yapılmıştır. Actin primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez jel sonuçları görülmektedir.

Sol taraftaki "M" sütunu, moleküler markör olarak kullanılan 100 bp DNA ladder'ı temsil etmekte ve jel üzerinde boyut karşılaştırması için referans görevi görmektedir. Jel elektroforezi sonucu görülen 190 bp bantlar elde edilmiş ve bu da başarılı bir PCR amplifikasyonu olduğunu göstermiştir.

DNase uygulanmış RNA örneklerine ait kuyucuklarda net bantlar görülmektedir, bu da RNA örneklerinin genomik DNA kontaminasyonu içermediğini göstermektedir. DNase uygulanmamış RNA örneğine bant görülmektedir. DNase işlemi yapılmadığı için

bu bantlar muhtemelen genomik DNA kontaminasyonuna olduğunu göstermektedir. Bu da DNase uygulanmamış RNA örneklerinin kontamine olabileceğini göstermiştir.

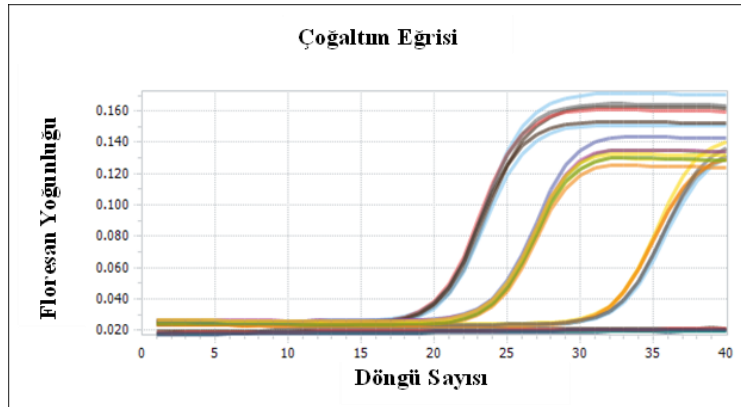
Bu sonuçlara göre, DNase uygulaması yapılan örneklerde RNA'daki olası DNA kontaminasyonunun giderildiği ve Actin primerleriyle yapılan PCR amplifikasyonunda sadece cDNA'nın hedeflendiği doğrulanmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Actin primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri; [M: Moleküler markör (100 bp DNA ladder, GeneAll); 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19: DNase uygulaması yapılan RNA örnekleri, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18: DNase uygulaması yapılmayan RNA örnekleri

4.5.3 RT-qPCR işlemleri

Genotiplere ait *CCD7*, *CCD8* ve *BetaKaroten* genlerinin ekspresyon değerlerinin tespit edilebilmesi amacıyla referans (housekeeping) gen olarak Actin geni kullanılmıştır. Actin geninin RT-qPCR' da başarılı bir şekilde çoğaltım eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Aktin geninin 18nt, 186nt ve 267F1 (WT) bitkilerindeki çoğaltım eğrileri

Genotiplerin *CCD7*, *CCD8* ve *BetaKaroten* genlerinin ekspresyon değerlerini ΔCt yöntemiyle belirlenmiş olup her genotip için ortalama \pm standart sapma (ORT \pm SS)

şeklinde Çizelge 4.11 'te verilmiştir. Genotipler arasında *CCD7* geninde farkların önemli olmadığı fakat *CCD8* ve *BetaKaroten* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki farkların istatistiki olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). 18nt genotipinde *CCD7* geninin ekspresyon değeri 5.23, 186nt genotipinde bu değer 5.77, 267F1 (WT) genotipinde ise *CCD7* ekspresyonu 4.39 olarak belirlenmiştir. *CCD7* geninin ekspresyon değeri 267F1 (WT) genotipinde diğer genotiplere göre sayısal olarak daha düşük bulunmuştur. Ancak, genotipler arasında *CCD7* ekspresyonunda anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.12).

18nt genotipinde *CCD8* geninin ekspresyon değeri 10.33 olarak belirlenmiştir. 186nt genotipinde bu değer 11.23'e çıkmıştır. 267F1 (WT) genotipinde ise *CCD8* ekspresyonu 9.87 olarak bulunmuştur. 186nt genotipinde *CCD8* gen ekspresyonunun diğer genotiplere göre yüksekken, 18nt ve 267F1 (WT) genotipleri arasında ise *CCD8* ekspresyonunda anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 4.16).

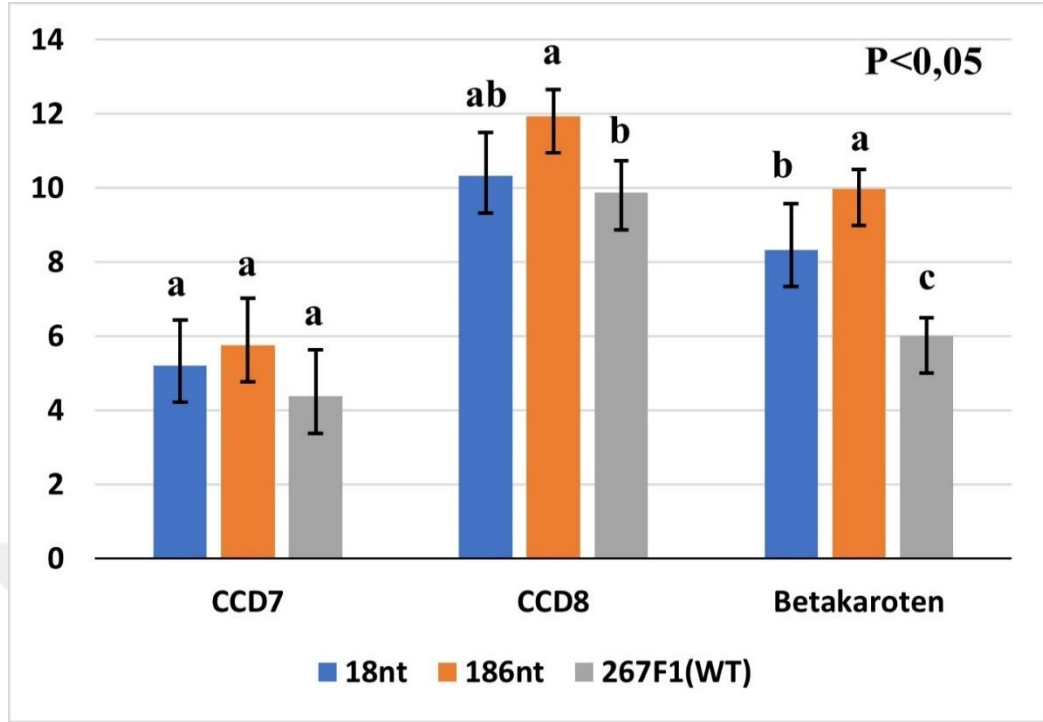
18nt genotipinde *BetaKaroten* gen ekspresyonu 8.34 olarak ölçülmüştür. 186nt genotipinde bu değer 9.99 ye çıkmıştır. 267F1 (WT) genotipinde ise *BetaKaroten* ekspresyonu 6.01 olarak belirlenmiştir. *BetaKaroten* geninin ekspresyonu 186nt genotipinde diğer genotiplere göre daha yüksek bulunmuştur. 18nt ve 267F1 (WT) genotipleri arasındaki farkta istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Domates Genotiplerinin *CCD7*, *CCD8* ve *BetaKaroten* genlerinin ekspresyon değerlerini (ΔCt)

Genotipler	<i>CCD7</i> Geni Ekspresyon Değeri (ΔCt) ORT \pm SS*	<i>CCD8</i> Geni Ekspresyon Değeri (ΔCt) ORT \pm SS*	<i>BetaKaroten</i> Geni Ekspresyon Değeri (ΔCt) ORT \pm SS*
18nt	5.23 \pm 1.22 a	10.3 \pm 1.17 ab	8.34 \pm 1.23 b
186nt	5.77 \pm 1.25 a	11.2 \pm 0.71 a	9.99 \pm 0.52 a
267F1 (WT)	4.39 \pm 1.26 a	9.87 \pm 0.87 b	6.01 \pm 0.48 c
CV (%)	24.2	9.01	10.16
LSD (%5)	1.21	0.91	0.80
P Değeri	0.07	0.01	0.0001
Serbestlik Derecesi	24	24	24

*ORT: Ortalama, SS: Standart sapma

Aynı sütündeki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır

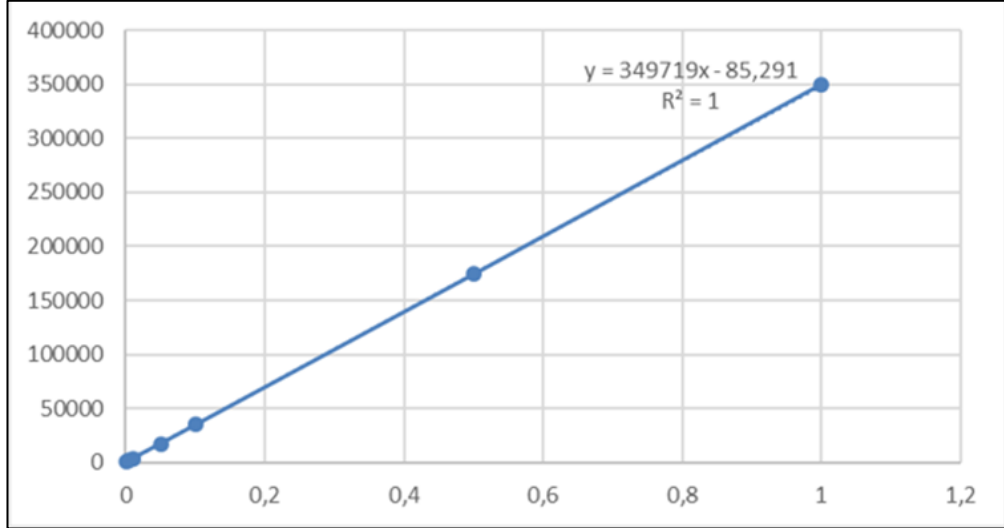


Şekil 4.16. Domates genotiplerinin CCD7, CCD8 ve BetaKAROTEN genlerinin ekspresyon değerleri (ΔC_t)

4.6 Genotiplerin Orobanchol İçeriklerinin Belirlenmesi

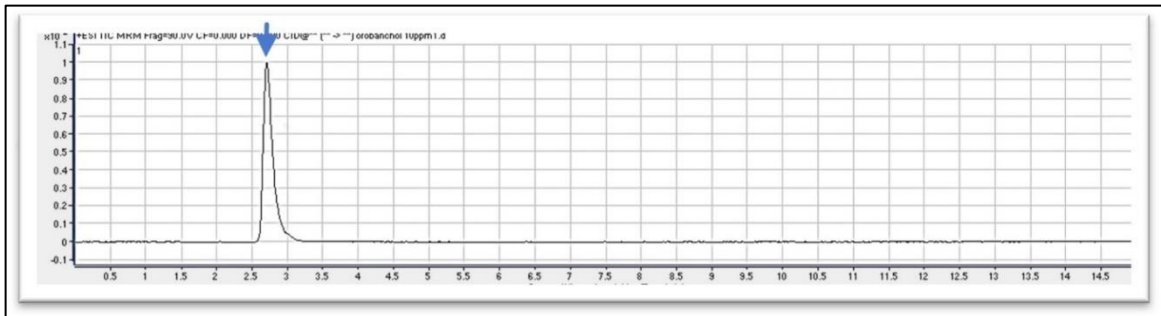
Domates genotiplerinin kök ekstraktlarından orobanchol miktarını belirlemek amacıyla yapılan analizlerde kullanılan LC-MS/MS cihazının doğruluğunu değerlendirmek için bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.17).

Grafikte görülen doğrusal regresyon analizi, orobanchol miktarının cihaz tarafından ölçülen sinyal ile doğrudan orantılı olduğunu göstermektedir ($y = 34971x - 85.291$). Kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 1 olarak bulunmuştur, bu da ölçümlerin son derece yüksek bir doğrulukla gerçekleştirildiğini ve sinyal yoğunluğu ile orobanchol konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi mükemmel bir şekilde yansıttığını göstermektedir. Bu sonuçlar, yöntem doğruluğunun yüksek olduğunu ve orobanchol miktarlarının güvenilir bir şekilde ölçüldüğünü ortaya koymuştur.



Şekil 4.17. Orobanchol kalibrasyon grafiği

Şekil 4.18'de, orobanchol standardının LC-MS/MS cihazı ile analizinde elde edilen alıkonma zamanı (retention time) grafiği gösterilmektedir. Orobancholün tespit edildiği pik noktası 2.5 dakika civarında oluşmuştur ve en yüksek sinyal yoğunluğunun bu zaman diliminde elde edildiğini ve analiz edilen numunenin orobanchol içerdiğini doğrulamıştır. Alıkonma zamanı (retention time)'nın net ve keskin olması, cihazın doğru bir şekilde orobancholü ayırt ettiğini ve tespit ettiğini göstermektedir. Ayrıca, analiz sırasında herhangi bir başka önemli bileşik interferansı gözlenmemiştir, bu da metot spesifitesinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur.



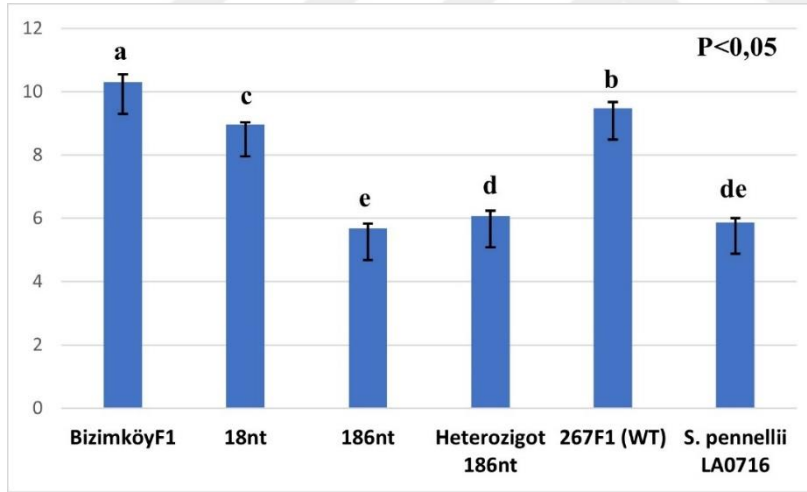
Şekil 4.18. Orobanchol hormonunun alıkonma zamanı (retention time) eğrisi

Mutant genotipler ile WT, ticari domates çeşitleri ve yabani domates aksesyonu *S. pennellii* LA0716 kök dokularından elde edilen ekstraktlarda bulunan orobanchol miktarları ppb cinsinden hesaplanarak ortalama değer ve standart sapma (ORT ± SS) olarak verilmiştir (Çizelge 4.13). En yüksek orobanchol miktarı 10.3 ± 0.24 ppb ile BizimköyF1 genotipinde gözlemlenirken, bunu 9.48 ± 0.20 ppb ile 267F1 (WT) genotipi takip etmiştir. En düşük orobanchol içeriği ise 5.68 ± 0.16 ppb ile mutant genotiplerden 186nt genotipinde belirlenmiştir. Diğer genotipler arasında 18nt genotipi 8.96 ± 0.08 ppb, Heterozigot 186nt genotipi 6.08 ± 0.16 ppb ve *S. pennellii* LA0716 genotipinde 5.88 ± 0.12 ppb orobanchol tespit edilmiştir (Çizelge 4.13). Sonuç olarak 186nt'deki orobanchol miktarının WT'ye göre anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur (Şekil 4.19).

Çizelge 4.13. Domates genotiplerinin kök ekstraktlarındaki orobanchol miktarları (ppb)

Genotipler	Orobanchol (ppb) ORT ± SS*
18nt	8.96 ± 0.08 c
186nt	5.68 ± 0.16 e
Heterozigot 186nt	6.08 ± 0.16 d
267F1 (WT)	9.48 ± 0.20 b
BizimköyF1	10.3 ± 0.24 a
<i>S. pennellii</i> LA0716	5.88 ± 0.12 de
CV (%)	2.17
LSD (%5)	0.29
P Değeri	0.0001
Serbestlik Derecesi	12

*ORT: Ortalama, SS: Standart sapma



Şekil 4.19. Domates genotiplerinin kök ekstraktlarındaki orobanchol miktarları (ppb)

5. TARTIŞMA

Canavar otları (*Orobancha* spp. / *Phelipanche* spp.), dünya genelinde kültür bitkilerinde önemli ekonomik zararlar meydana getirmektedirler (Eizenberg ve Goldwasser, 2018). Zorunlu kök paraziti olan canavar otları ile mücadelede çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Fakat, bu parazit bitkilerin toprak altında gelişmeleri, özelleşmiş bir organ olan emeçleri (haustoryum) aracılığıyla konukçu bitkiye tutunmaları, ayrıca fazla miktarda tohum üretmeleri, tohumlarının kolay yayılması, yalnızca belirli koşullarda çimlenmeleri ve tohumlarının uzun süre toprakta canlı kalabilmesi gibi kendilerine özgü biyolojik özellikleri etkin bir şekilde kontrol edilmelerini zorlaştırmaktadır (Fernández-Aparicio vd. 2016). Canavar otlarına karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, mücadelede en etkili yöntemlerden biridir (Frost vd. 1997). Bu dayanıklılık genellikle bir veya iki dominant gen tarafından kontrol edilen, baskın alellerle sağlanan dikey dayanıklılık ve genellikle birden fazla lokusta yer alan aleller aracılığıyla kalıtılan kısmi yatay dayanıklılık olarak tanımlanmaktadır (Molinero-Ruiz vd. 2009).

Canavar otlarına karşı dayanıklılık ıslahı çalışmaları özellikle ayçiçeği, bakla ve bezelye olmak üzere birçok kültür bitkisine karşı başarıyla gerçekleştirilmiştir (Román vd. 2002; Tang vd. 2003; Valderrama vd. 2004). Ayçiçeğinde *O. cumana*'ya karşı dayanıklılığı *HaOr* geni sağlamaktadır (Pubert vd. 2024). *O. cumana*'nın yeni virulent ırklarının oluşarak bu dayanıklılığı kırdığı bildirilmektedir (Fernández-Melero vd. 2023). Şimdiye kadar *O. cumana*'nın A'dan H'ye kadar sekiz ırkı tanımlanmıştır (Pubert vd. 2024). Virulent ırkların ortaya çıkması ayçiçeğinde *O. cumana*'ya karşı dayanıklılık ıslahı çalışmalarını da hızlandırmakta ve yeni dayanıklılık genlerinin haritalanarak ıslah çalışmalarında kullanılmasına neden olmaktadır (Tang vd. 2003; Sisou vd. 2021). Ayçiçeğinde canavar otuna karşı dayanıklılığı sağlayan tek dominant genin (*HaOr*) bulunmasının aksine diğer kültür bitkilerinde canavar otlarına karşı dayanıklılık genellikle poligenik özellik göstermektedir (Pérez-Vich vd. 2013). Önemli bir sebze türü olan domates, dünya genelinde yetiştirilmekte olup canavar otları tarafından kolayca enfekte edilebilmektedir (Disciglio vd. 2016). Yapılan kapsamlı taramalara rağmen, canavar otuna karşı tek bir dayanıklılık mekanizması henüz bildirilmemiştir (El-Halmouch vd. 2006). Bu nedenle kültür bitkilerinde yeni biyoteknolojik yaklaşımların kullanılarak, kültür bitkilerine dayanıklılık kazandırılması önem kazanmıştır (Aly vd. 2021).

Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar düzenleme sistemi (CRISPR/Cas9), genom düzenleme için kullanılan en yeni yöntemdir (Pinello vd. 2016). CRISPR/Cas9 sisteminde kılavuz RNA (sgRNA)-Cas9 kullanılarak belirli bir genomik bölge hedeflenip indel mutasyonları gerçekleştirilebilmektedir (Jhu vd. 2023). Cas9-sgRNA tarafından tanınan bir protospacer bitişik motifi (PAM) ile takip edilen 18-20 nükleotitik hedef RNA dizisi, çift sarmallı DNA kırıklarına yol açmakta, DNA tamiri sırasında, homolojiye dayanmayan uç birleştirme (NHEJ) mekanizması ile kırık bölgelerde ekleme veya silme gerçekleştirilebilmekte ve bu da proteinin işlevini değiştirebilmektedir (Sternberg vd. 2014). Bu yeni tekniğin, son derece hassas, ucuz ve uygulanmasının nispeten kolay olması gelecekteki tarımsal gelişmeler için önemli bir potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir (Bartkowski vd. 2018). Nitekim bu teknik, tütün (Jogam vd. 2023), buğday (Liang vd. 2017), mısır (Gao vd. 2020) ve domates

(Chaudhuri vd. 2022) dahil olmak üzere birçok kültür bitkisinde başarıyla uygulanmıştır. Domateste bu tekniğin kullanılarak canavar otlarına karşı dayanıklılık geliştirilmesi, strigolakton sentezinin azaltılması hedeflenerek gerçekleştirilmektedir (Al-Babili ve Bouwmeester, 2015). Domateste strigolakton sentezinden sorumlu genler karoten üretim yolağında bulunan Carotenoid Cleavage Dioxygenase (*CCD*) genlerdir (Liu vd. 2015). Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nde yürütülen bir doktora tezi kapsamında SL üretiminde önemli rol oynayan genlerden olan *CCD7* geninin CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak manipüle edilmesi sonucu elde edilen bitkilerden 18 nükleotitlik in frame mutasyonu gerçekleşmiş 18nt isimli genotip ve 186 nükleotitlik in frame mutasyonu gerçekleşmiş 186nt isimli genotip seçilmiştir (Bülbül, 2021). Bu tez çalışmasında CRISPR/Cas9 tekniği ile elde edilmiş olan bu genotiplerin (18nt ve 186nt) T2 ve T3 homozigot bitkilerinin canavar otuna karşı dayanım seviyeleri araştırılmıştır.

Tohum örneklerinden yapılan total nükleik asit izolasyonu sonucu önceki çalışmalarda da olduğu gibi genomik DNA elde edilebilmiştir (Dimitrijević vd. 2012; Dongo vd. 2012).

Genomik DNA' ları elde edilen canavar otu popülasyonlarının (S1-2021, S2-2021, Ç1-2021, Ç2-2021, G1-2021, G2-2021, T1-2021, T2-2021, D1-2021, I1-2021, I2-2021, K1-2021, K2-2021, AK-2021, AE-2021) türe özgü AB101 (Schneeweiss vd. 2004), *rps2* (Park vd. 2007) ve ITS350 (Aly vd. 2012) primer çiftleri kullanılarak doğrulamaları yapılmış ve ITS350 primeri *P. aegyptiaca* için *rps2* primeri ise *P. ramosa* türlerine özgü DNA bandı elde edilmiştir. Bu sonuçlar Park vd. (2007); Aly vd. (2012) ile uyumluluk göstermiştir. Böylece canavar otuna karşı dayanıklılığın belirlenmesi çalışmaları *P. aegyptiaca* türü olan I1-2021 popülasyonu ile devam ettirilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan *P. aegyptiaca* I1-2021 popülasyonu tohumlarının canlılık oranları Gibot-Leclerc vd. (2004) TTC tohum boyama metodu modifiye edilerek belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda, kontrol olarak kullanılan otoklavlanmış tohumların endospermelerinin hiç boyanmaması metodun sağlıklı sonuç verdiğini göstermiştir. Benzer şekilde parazit bitkilerin tohum canlılık testleri için tetrazolium tuzunun kullanıldığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Thorogood vd. 2009). Paralel olarak tetrazolium testinin tohumların fizyolojik kalitesinin değerlendirilmesinde önemli bir rol oynadığı ve test, yaşam ve canlılık indeksleri gibi bilgilerin yanı sıra, mekanik hasar, böcek zararı, hasat öncesi hava koşulları ve depolama sırasında meydana gelen bozulmalar gibi olası tohum kalitesi sorunlarının teşhisini sağladığı bildirilmiştir (França-Neto ve Krzyzanowski, 2019).

Genotiplerin kök salgılarının canavar otunun tohum çimlenmesine etkisinin belirlenebilmesi amacıyla, Floková vd. (2020) tarafından geliştirilen metotta belirtildiği gibi, domates kök dokusundan strigolaktonların hızlı ekstraksiyonu gerçekleştirilebilmiş ve bu ekstraktlar canavar otu tohumlarına Petri kaplarında uygulanmıştır. Denemelerde pozitif kontrol olarak sentetik strigolakton analogu GR24 kullanılmıştır. Literatürde de canavar otu için GR24 ün uygun bir çimlenme stimülanı olduğu bildirilmiştir (Zwanenburg vd. 2009; Brun vd. 2018). GR24 uygulanan Petri kabı denemelerinde 3.35×10^{-5} M konsantrasyonunda kullanılması, *P. aegyptiaca*'nın tohumlarının yaklaşık %84-87 çimlenmesini sağlamıştır. Çimlenme oranları daha önce yapılan tohum canlılık testleri ile de uyusmaktadır. Ayrıca GR24 kullanılarak yapılan çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermekle birlikte, kullanılan GR24 ün konsantrasyonu, saflığı ve kullanılan

tohumların çimlenme uyarıcısına verdikleri tepkiye bağlı olarak da çimlenme yüzdeleri değişebilmektedir. Örneğin 3.35×10^{-5} M uygulandığı Petri kaplarında *P. aegyptiaca* tohumlarının çimlenme oranının yaklaşık %70 olduğu (Bai vd. 2020), 1×10^{-6} M GR24 uygulandığında %82 (Goldwasser vd. 2008) olduğu bildirilmiştir. Nitekim Arslan ve Uygur (2013), *P. aegyptiaca* ve *P. ramosa* ile yaptıkları çalışmada tohum çimlenmesini en fazla teşvik eden stimülantın GR24 (1 ppm) olduğunu bildirmişlerdir. Konukçunun bulunmadığı ortamlarda GR24, canavar otu tohumlarının çimlenmesini teşvik etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Fernández-Aparicio vd. 2011; Ibdah vd. 2014).

Üç farklı sıcaklıkta (18°C, 20°C ve 22°C) yapılan denemelere bakıldığında sıcaklığın etkisine bağlı olarak tohumların çimlenme oranlarında değişiklik olsa da her üç sıcaklıkta da en düşük çimlenme oranları 186nt mutant genotipinden elde edilmiştir. 186nt genotipi, *CCD7* geninin ilk exonunda, her iki allelede de 186 baz silinmesiyle elde edilmiştir (Bülbül, 2021). *SICCD7* geni domateste strigolakton biyosentezinde görev alan genlerden biridir (Vogel vd. 2010). Strigolaktonların, rizosfer sinyal aktivitesine sahip olan fitohormonlar olduğu ve bitki kökünden salgılanmaları sonucu kök paraziti yabancı otlar *Striga*, *Orobancha* ve *Phelipanche* türlerinin çimlenmelerini teşvik ettiği bilinmektedir (Bouwmeester vd. 2003). Vogel vd. (2010), RNA interferans (RNAi) tekniği ile domateste *SICCD7* geninde yaptıkları susturmada üç farklı mutant genotip (6931, 6936 ve 7170) elde etmişlerdir. WT olan M82 hattının kök eksudatının uygulandığında *O. ramosa*'da çimlenme oranı %90 iken, mutant genotiplerde çimlenme oranlarının düştüğü, 6931 de yaklaşık %30 iken 6931 ve 7170 de yaklaşık %10 olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Butt vd. (2018), çeltik (*Oryza sativa* L.)'te CRISPR/Cas9 tekniği ile iki farklı sgRNA tasarlayarak *OsCCD7* geninin 1. ve 7. exonunu hedeflemişlerdir. Hem monoallelik mutasyon içeren (*dl1* ve *dl2*), hem de biallelik mutasyon içeren (*hl1*, *hl2*, *hl3*, *hl4*, *hl5*, *hl6* ve *hl7*) toplam 9 genotip elde etmişlerdir. *Striga hermonthica*'nın çimlenme oranı WT (*O. sativa* L. ssp. *japonica* cv Nipponbare) kök salgılarının uygulandığı Petri kaplarında yaklaşık %50 iken, *hl6* mutant genotipinde yaklaşık %20, diğer genotiplerde ise yaklaşık %10 çimlenme oranı ile GR24 e kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

Bu çalışmada yapılan Petri kabı denemelerinde *CCD7* geninin hedeflendiği diğer çalışmalarda olduğu gibi strigolakton sentezinin azalması neticesinde, 186nt mutant genotipinin kök salgıları *P. aegyptiaca* tohumlarının çimlenmesini önemli oranda düşürmüştür. Diğer mutant genotip olan 18nt nin çimlenme oranı hem ticari çeşide (Torry F1) hem de WT (267 F1)'e görev düşük olmasına rağmen yine de 186nt genotipinin performansını gösterememiştir. Bunun nedeninin 18nt genotipinde *CCD7* geninin ilk ekzonunda meydana gelen 18 bazlık mutasyonunun strigolakton sentezinde yeterli değişikliğe sebep olmaması olduğu düşünülmüştür.

Genotiplerin hidroponik deneme ile enfeksiyondan sonraki farklı günlerde (10., 15., 20. ve 30. günler) *P. aegyptiaca*'ya karşı tepkilerine bakıldığında, 186nt genotipinin diğer ticari domates çeşitleri olan TorryF1 ve BizimköyF1 ile karşılaştırıldığında tüberkül gelişimine engel olduğunu ve bu nedenle bir dayanıklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Enfeksiyondan 10 gün sonra, 186nt genotipinde 1-2 mm çapındaki *P. aegyptiaca* tüberkül gelişimi büyük ölçüde engellenmiş ve neredeyse hiç tüberkül oluşumu gözlenmemiştir. Fakat TorryF1 ticari çeşidinin enfeksiyondan sonra 10. günde *P. aegyptiaca* ile daha hızlı bir şekilde etkileşime geçerek tüberkül oluşumuna neden

olduğu görülmüştür. 30. günde dahi, 186nt genotipi >2 mm çapında tüberkül gelişimi sınırlı olmuştur ve bu da TorryF1 genotipinin tüberkül gelişiminden çok daha düşük bir seviyede kalmıştır. Örneğin, Joel vd. (2013), domates ve tütün bitkilerinde tüberkül gelişiminin, parazit bitkinin hayatta kalması için gerekli bir süreç olduğunu ve bu sürecin baskılanmasının konukçu bitkiye büyük avantaj sağladığını belirtmiştir. Mutant genotip 186nt nin kök salgıları nedeniyle *P. aegyptiaca* tohum çimlenmesinin diğer genotiplere göre daha düşük olduğu Petri kabı denemelerinde belirlenmiştir. Fakat bu genotipin *CCD7* geni tamamen kapatılmadığından strigolakton sentezi devam etmiş, dolayısıyla *P. aegyptiaca* çimlenmesi tamamen engellenmemiştir. Çimlenen tohumların hidroponik deneme sonuçlarında haustorium oluşturarak domates köküne tutundukları görülmektedir. Fakat oluşan tüberküllerin gelişimlerinin sınırlı kalmasının olası nedenleri tartışılmaktadır. Literatürde de tüberkülün, *Orobanche*, *Harveya*, *Cistanche* ve *Alectra* türlerinde olduğu gibi *Phelipanche* türlerinde de parazit bitkilerin terminal haustoryumları tarafından konukçu ile ilk vasküler bağlantı kurulduktan sonra geliştiği bildirilmiştir (Joel, 2013).

Tüberkül, genç parazit fidesinde, konukçunun kök yüzeyinin hemen üzerinde oluşan bir şişlik olup, zamanla meristem dokusu geliştirerek 'haustoryal kökler' oluşturabilmektedir (Joel, 2013). Tam parazit Orobanchaceae familyası türlerinde tüberkül, nişasta biriktirmekte ve bu nişasta, daha sonraki büyüme evrelerinde, özellikle çiçek ve tohum gelişimi sırasında kullanılmaktadır (Joel ve Losner-Goshen, 1994; Qing-Liang vd. 2011). Aynı zamanda bilindiği gibi nişasta, bitkilerde en önemli uzun vadeli enerji depolama karbonhidratıdır ve düşük/yüksek sıcaklık veya kuraklık gibi abiyotik stres koşullarında parçalanarak osmotik olarak aktif bileşikler ve enerji üreterek bitkinin hayatta kalmasını sağlamak için kullanılmaktadır (McDowell vd. 2008; Uemura ve Steponkus, 2003). Tüberkül gelişiminin, konukçu bitkiden sağlanan besinlere bağlı olduğu rapor edilmiştir (Aber vd. 1983). Literatürdeki bilgiler ışığında, bu çalışmada mutant genotip 186nt de tüberkül gelişiminin yavaş olması ve önemli oranda engellenmesinin nedeninin konukçu bitkiden yeterince besin gelememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hemiparazit bir bitki olan *Santalum album*'da depolanan nişastanın parazit bitkinin gelişimi ile su ve besin maddelerinin konukçu bitkiden emilimi ve taşınması ile ilgili fizyolojik süreçlerde potansiyel olarak rol oynadığı da bildirilmiştir (Zhou vd. 2021). Parazit bitki tüberküllerindeki tüm şekerlerin konsantrasyonları, aynı bileşiklerin konukçu köklerindeki konsantrasyonlarından altı ila sekiz kat daha yüksek olduğu, dolayısıyla tüberküllerde güçlü bir birikim olduğu bildirilmiştir (Westwood, 2013). *P. ramosa*'da sakkaroz birikimi yerine, sakkarozun invertaz enzimleri ile heksozlar, mannitol ve nişasta gibi diğer bileşiklere metabolize edildiği ve parazit bitkinin osmotik potansiyelinin iyileştiği belirlenmiştir (Westwood, 2013). Nitekim, *P. ramosa*'nın en az bir invertaz enzim geninin, tohum çimlenmesi sırasında ve sonraki tüm büyüme evrelerinde yüksek seviyelerde ifade edildiği tespit edilmiştir (Draie vd. 2011).

Bu çalışmada da mutant genotip 186nt de tüberkül oluşumu olsa dahi konukçu bitkiden yeterince besin maddesi gelmemesi nedeniyle tüberküllerin diğer ticari çeşitlere göre gelişimlerinin sınırlandığı görülmüştür. Nitekim Aly vd. (2009) mannitolün *Orobanche*'nin gelişimi için çok önemli olduğunu bildirmişlerdir. Tüberkül oluşumunun kontrol edilmesinin, konukçu bitki-parazit etkileşiminde kritik bir faktör olduğunu ve bu mekanizmanın domatestede önemli bir dayanıklılık göstergesi olduğu görülmektedir. CRISPR/Cas9 tekniği ile elde edilen genotiplerin canavar otuna karşı dayanıklılık

çalışmalarına bakıldığında test metotlarında kök bölgesi tepkilerinin incelenmemiş olduğu, saksı denemeleri ile dayanıklılığın toplam canavar otu sürgün sayısı ile ilişkilendirildiği görülmüştür (Bari vd. 2019; Bari vd. 2021; Bari vd. 2021).

Genotiplerin saksı denemeleri ile *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklılığını belirlemek üzere kurulan iki farklı deneme denemeden, ilk denemede 186nt mutant genotipte hiç *P. aegyptiaca* sürgünü oluşmazken, ikinci saksı denemesinde saksı başına ortalama yaklaşık 10 adet *P. aegyptiaca* sürgünü olduğu görülmüştür. Ticari çeşitlerde oluşan canavar otu sürgün sayısının 186nt mutant genotipine yaklaşık 4-6 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Mutant genotiplerde strigolakton sentezinin azalması sonucunda özellikle *CCD7* mutant 186nt toplam çimlenen parazit tüberkülleri ve sürgünlerinin sayısında, ticari çeşitler ve WT ile karşılaştırıldığında önemli bir azalma ve daha geç çiçeklenme olduğu görülmüştür. Buna karşılık, ticari çeşitlerin *P. aegyptiaca* enfeksiyonuna oldukça duyarlı olduğu görülmüştür. Strigolactonların Orobanchaceae familyasına ait kök paraziti yabancı otların çimlenmesini teşvik etmede kritik bir rol oynadığı (Yoneyama vd. 2010) ve *CCD7* geninin domateste strigolakton sentezinden sorumlu genlerden olduğu bilinmektedir (Al-Babili ve Bouwmeester, 2015). Saksı denemelerinde de *CCD7* geninin ilk ekzonunda meydana gelen 186 bazlık silinmenin, strigolakton salgısının azaltılması sonucunda *P. aegyptiaca*'nın karşı bir dayanım oluşturduğu görülmüştür. Parazit bitki dayanıklılığı için strigolakton sentezine odaklanan diğer çalışmalara da bakıldığında (Bari vd. 2019), CRISPR/Cas9 tekniği ile *CCD8* geninin ikinci ekzonunu hedefleyerek dört *CCD8Cas9* mutant domates hattı elde etmişlerdir. Bu çalışmaya benzer şekilde SL eksikliği nedeniyle *CCD8Cas9* mutantları, yapılan saksı denemelerinde WT bitkilerine göre toplam *P. aegyptiaca* sürgün sayısında üç mutant genotipte yaklaşık dört kat, bir genotipte ise yirmi kat azalma olduğu bildirilmiştir. Yine benzer şekilde Bari vd. (2021), CRISPR/Cas9 aracılığıyla iki homolog ATP bağlayıcı kaset alt grubu G (*ABCG*) geni, *ABCG44* (*Solyc08g067610*) ve *ABCG45* (*Solyc08g067620*) genlerinin 21. ekzonunda mutasyon gerçekleştirerek domateste *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklılık geliştirmeyi amaçlamışlardır. Hedeflenen mutasyon işlemiyle elde edilen iki mutant genotipte (*abcg44* ve *ABCG44/ABCG45*) yapılan saksı denemeleri ile *P. aegyptiaca*'nın sürgün sayısında WT bitkilerine göre yaklaşık beş kat azalma olduğu belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada ise Bari vd. (2021), domateste CRISPR/Cas9 tekniğini kullanarak *MAX1* geninin üçüncü ekzonu hedeflenmiş ve *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklılık sağlamayı amaçlamışlardır. *MAX1Cas9* homozigot ve aynı zamanda heterozigot mutant hatların yapılan saksı denemelerinde *P. aegyptiaca* sürgün sayısının her iki mutantta da WT bitkilerine göre yaklaşık 10 kat düştüğü belirlenmiştir.

Genotiplere ait *CCD7*, *CCD8* ve *BetaKaroten* genlerinin ifade değerleri RT-qPCR için referans (housekeeping) gen olarak kullanılan β -actin geni farklı doku ve koşullarda nispeten sabit ifadesi nedeniyle bir referans gen olarak kabul edilmektedir (Jain vd. 2006). Bu çalışmada elde edilen PCR sonuçları, DNase uygulanmış RNA örneklerinin genomik DNA kontaminasyonundan arındırıldığını ve sadece cDNA amplifikasyonunun gerçekleştiğini göstermiştir. Literatürde de benzer şekilde, genomik DNA kontaminasyonunun, özellikle RT-PCR deneylerinde yanlış pozitif sonuçlara yol açabileceği sıklıkla vurgulanmaktadır (Raff vd. 1997). Bu sebeple, DNase işlemi,

kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve bu çalışmada da başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Domates yapraklarından elde edilen total RNA kullanılarak yapılan RT-qPCR işleminde 186nt genotipinde *CCD7* geninin yapraktaki ekspresyonunun WT e göre değişmediği, *CCD8* ve *BetaKaroten* genlerinin ise arttığı belirlenmiştir. CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak elde edilen mutant genotiplerin hem editlenen genlerde hem de karoten biyosentezi yolağında bulunan farklı genlerin ifadesinin belirlendiği çalışmalara bakıldığında Bari vd. (2019), CRISPR/Cas9 tekniği ile *CCD8* geninin ikinci ekzonunu hedefleyerek elde ettikleri dört *CCD8Cas9* mutant domates hattında karotenoid biyosenteziyle ilgili genlerden *SICCD8*, *SIPDS1* ve *SILCY-β* ifadesini kök dokusu kullanarak RT-qPCR ile belirlemişlerdir. Üç geninde ekspresyon seviyesinin WT bitkilerine kıyasla arttığı belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada Bari vd. (2021), CRISPR/Cas9 tekniği ile *ABCG44* (*Solyc08g067610*) ve *ABCG45* (*Solyc08g067620*) genlerinin 21. ekzonunda mutasyon gerçekleştirilerek domateste *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklılık geliştirmeyi amaçlamışlardır. Hedeflenen mutasyon işlemiyle elde edilen iki mutant genotipte (*abcg44* ve *abcg44/abcg45*) bir aylık fidelerin hem köklerinde hem de yaprak ve gövdelerindeki *ABCG44* ve *ABCG45* genlerinin ifade düzeylerini belirlemişlerdir. Buna göre *ABCG44* geninin ifadesinin gövde ve kök dokusuna kıyasla yapraklarda daha yüksek bulunmuşken, *ABCG45* geninin ifadesi kök dokusunda yaprak ve gövdeye göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca hem *abcg44* hem de *abcg44/abcg45* mutantlarında kök dokusunda *ABCG44* ve *ABCG45*'in transkript seviyelerinde kademeli bir artış olduğu belirlenmiştir. Karotenoid-biyosentez yolağının ara ürünü olan trans-β-karoten, SL üretimi için bir öncül olarak işlev gördüğü ve bu yolla bitkinin, SL içeriğinin geri besleme (negatif feedback) mekanizması ile kontrol edildiği daha önce bildirilmiştir (Foo vd. 2005; Arite vd. 2007). Karotenoid yolağındaki geri besleme düzenlenmesinin (feedback regulation) test edilmesi amacıyla Bari vd. (2021), Cas9 mutantlarında aynı zamanda *CCD8* ve *MAX1* genlerinin ifadelerini analiz ettiklerinde ilginç bir şekilde, Cas9 ile düzenlenmiş *abcg44* ve *abcg44/abcg45* T1 bitkilerinde her iki genin ifadesi de WT kıyasla önemli ölçüde azaldığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada da özellikle Cas9 mutanti 186nt de karotenoid yolağında bulunan diğer genler *CCD8* ve *BetaKaroten* genlerinin ifadesinin arttığı belirlenmiştir. Bu durum, bu hatlarda SL biyosentez genlerinin geri besleme düzenlenmesinin etkilendiğini düşündürmektedir. Bari vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada ise domateste CRISPR/Cas9 tekniğini kullanarak *MAX1* geninin üçüncü ekzonu hedeflenmiş ve *MAX1Cas9* homozigot mutant genotipin köklerinde *CCD8*, *MAX1*, *ABCG45* ve *PDS1* genlerinin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Bu çalışmaya benzer şekilde mutasyon gerçekleştirilen gen olan *MAX1* geninin, diğer genlerden *CCD8* ve *ABCG45* ile ifade düzeyinin WT bitkisi ile kıyaslandığında değişmediği fakat karotenoid yolağında yer alan diğer gen olan *PDS1* geninin ifade düzeyinin WT e göre arttığı belirlenmiştir.

Orobancholün strigolakton hormonları içerisinde canavar otunun çimlenmesini en fazla stimüle eden hormon olduğu bildirilmiştir (Fernandez-Aparicio vd. 2014). Bu nedenle domates kök ekstraktları elde edilerek LC-MS/MS cihazında orobanchol miktarları belirlenmiştir. Orobanchol miktarı özellikle mutant genotip 186nt de WT e göre önemli oranda düşmüştür. CRISPR/Cas9 tekniği ile SL sentezinde görev alan farklı genlerin hedeflendiği çalışmalarda da orobanchol içeriklerinin WT ye göre azaldığı tespit edilmiştir. Örneğin Bari vd. (2019) *CCD8Cas9* mutant hatlarında, orobanchol (SL) içeriği

önemli ölçüde azalırken, Bari vd. (2021) domatesin kök salgısındaki SL miktarını önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir.

Kök paraziti bitkilere karşı konukçu bitkide dayanıklılık oluşturmak için yeni biyoteknolojik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Strigolaktonlar, Carotenoid Cleavage Dioxygenase7 (*CCD7*), Carotenoid Cleavage Dioxygenase8 (*CCD8*) ve More Axillary Growth 1 (*MAX1*) genlerinin görev aldığı bir yolak aracılığıyla karotenoidlerden türetilen bitki hormonlarıdır. SL'ler, dal oluşumunu engelleyen hormonlar olarak görev yapar ve kök paraziti yabancı otların çimlenmesi için zorunlu olarak gereklidir. Daha önce bu yolakta yer alan genlerden *CCD8* (Bari vd. 2019), *MAX1* (Bari vd. 2021) hedeflenerek *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklılık belirlenmiştir. Söz konusu çalışmalardan farklı olarak CRISPR/Cas9 tekniği ile domatesteki *CCD7* geninin ilk ekzonunda meydana gelen 186 bazlık in-frame mutasyonunun bir kök paraziti olan *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklılık kazandırdığı bu çalışma ile ilk kez belirlenmiştir.



6. SONUÇLAR

Canavar otlarıyla mücadelede dayanıklı çeşitlerin kullanılması kimyasalların neden olduğu çevresel sorunları azaltmakta ve mücadele için en yaygın ve etkin yöntemlerden birisini oluşturmaktadır. Gen düzelleme teknolojilerinden olan CRISPR-Cas9 tekniği kullanılarak domatesta SL biyosentezinde görev alan *CCD7* geninin ilk ekzonunda yapılan 18 ve 186 nükleotit in-frame delesyonu ile elde edilen 18nt ve 186nt mutant domates genotiplerinin WT ve yaygın olarak kullanılan ticari domates çeşitlerine göre sağladıkları dayanıklılık durumları bu tez çalışmasında araştırılmıştır.

Antalya, Isparta ve Burdur illeri canavar otunun sorun olduğu domates seralardan alınan örneklerden yapılan moleküler tür teşhisi sonucunda toplam 15 popülasyondan 12 sinin *P. aegyptiaca* türü olduğu belirlenmiştir. Canavar otu tohum canlılık testlerinde modifiye edilmiş TTC testinin başarıyla kullanılabileceği belirlenmiştir.

Domates genotiplerine ait kök ekstraktlarının *P. aegyptiaca*'nın çimlenmesi üzerine etki denemelerinde, her iki mutant domates genotipi 18nt ve 186nt nin ticari domates çeşidi Torry F1'e göre, *P. aegyptiaca*'nın tohum çimlenmesini önemli oranda düşürmüştür. 20°C'de yapılan Petri kabı deneme sonuçlarında 18nt genotipi ticari domates çeşidi Torry F1'e göre *P. aegyptiaca* tohum çimlenmesini %30 azaltırken, 186nt genotipi %74 oranında azaltmıştır. Çimlenen tohumların domates köklerine tutunmalarını ve sonraki gelişim aşamalarını incelemek amacıyla yapılan hidroponik deneme sonuçları ticari domates çeşidine göre mutant genotiplerde *P. aegyptiaca* tüberkül oluşumunun önemli oranda azaldığı ve oluşan tüberküllerin konukçu bitkiden beslenemediklerinden büyüyemedikleri görülmüştür. Özellikle 186nt genotipinin *P. aegyptiaca*'nın tüberkül gelişimine engel olduğu belirlenmiştir. *P. aegyptiaca* enfeksiyonundan 30 gün sonra dahi 2 mm'den büyük tüberkül sayısı ortalama bitki başına ticari çeşit Torry F1'de 3.08 iken mutant genotipler 18nt de 0.83, 186nt de ise 0.16 olarak belirlenmiştir. Literatüre göre konukçu bitkide strigolakton sentezinin azalması parazit bitki tohumlarının çimlenmesinin azalttığı bilinmektedir. Fakat bu çalışmada aynı zamanda strigolakton sentezinin azalmasına rağmen, çimlenen tohumların konukçu bitkiye tutunmasına rağmen, oluşan tüberküllerin gelişimlerinin zayıf olduğu ya da gelişemediği görülmüştür. Bu sonuç konukçu bitki parazitizm ilişkisinde, parazit konukçu bitkiye tutunduktan sonraki gelişim aşamalarında strigolaktonların rolünün araştırılması gerektiğini göstermiştir. Saksı denemesi sonuçlarına göre de 186nt genotipi diğer mutant domates genotipi 18nt ve ticari domates çeşitlerine göre *P. aegyptiaca* sürgün sayısını önemli oranda düşürdüğü belirlenmiş, 186nt genotipinin WT kıyasla toplam sürgün sayısını %71 azalttığı belirlenmiştir. Mutant domates genotipi 18nt ve 186nt genotiplerinde *CCD7* geninin ifadesinin WT genotipine kıyasla değişmediği fakat 186nt genotipinde karotenoid yolağında bulunan diğer genler olan *SICCD8* ve *Betakaroten* genlerinin ifadelerinin sırasıyla yaklaşık %22 ve %39 arttığı belirlenmiştir. Orobanchol hormon miktarının mutant domates genotipi 186nt de WT genotipine kıyasla önemli oranda düştüğü LC-MS/MS analizi ile belirlenmiştir. Kök ekstraktlarındaki toplam orobanchol miktarı ppb düzeyinde 18nt genotipinde yabani tip (WT)'e kıyasla %5 azalmışken, 186nt genotipinde yaklaşık %40 oranında azaldığı belirlenmiştir.

S. pennellii LA0716 aksesyonunun yapılan tüm denemelerde mutant genotip 186nt' ye yakın sonuçlar vermesi, bir dayanıklılık mekanizması olduğundan mı yoksa

diğer genotiplere göre yeterince kök biyokütlesi geliştiremediğinden dolayı mı olduğu tartışmaya açık bir konudur.

CRISPR/Cas9 tekniği ile *CCD7* geninin modifikasyonunun, *P. aegyptiaca*'ya karşı domateste dayanıklılık gösterebileceği bu çalışma ile belirlenmiştir. *SICCD7* geninin ilk ekzonunda meydana gelen 186 bazlık mutasyonun *P. aegyptiaca*'ya karşı WT kıyasla bir dayanıklılık sağladığı fakat 18 bazlık mutasyonun bu dayanıklılığı sağlamadığı belirlenmiştir. Yani mutant 186nt genotipi dayanıklılık sağlarken, 18nt genotipinin *P. aegyptiaca* dayanımında tam anlamıyla etkili olmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışma ile ilk defa, domateste *CCD7* geninde meydana gelen mutasyonların, *P. aegyptiaca*'ya karşı geliştirdiği savunma yanıtları belirlenmiştir. Ayrıca tüm deney aşamaları (toplam strigolakton ekstraksiyonu, çimlenme ve hidroponik deneme) optimize edilmiştir. Bu optimizasyonlar ileride yapılacak çalışmalarda da kullanılabilir, hızlı ve doğru bir şekilde farklı genotiplerin farklı canavar otu türlerine karşı test edilmesini sağlayacaktır.

Bu çalışma ile domateste *CCD7* geninin *P. aegyptiaca*'ya karşı dayanıklılık geliştirmede kullanılabileceği gösterilmiştir. Bitki paraziti yabancı otların domates üretimi üzerindeki etkisi ve mücadelelerinin zorluğu göz önüne alındığında, bu yeni dayanıklılığın ıslah çalışmalarında kullanılabilme olanağı doğmaktadır.

CRISPR/Cas9 tekniği ile yapılan dayanıklılık çalışmaları, parazit bitkilerle mücadelede etkili bir strateji olabileceği düşünülmektedir; 186nt genotipinin *P. aegyptiaca*'da hem çimlenmeyi hem de tüberkül gelişimini engelleyen bir dayanıklılık ortaya koyduğu belirlenmiştir. Fakat bu genotipin performansının, doğal olarak canavar otu ile bulaşık alanlarda da değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca domates üretiminde sorun olan diğer canavar otu türlerinden *Phelipanche ramosa* ve/veya *Orobanche cernua* gibi türlerle de genotipin performansının test edilmesi faydalı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Abdallah, F., Kumar, S., Amri, A., Mentag, R., Kehel, Z., Mejri, R. K., Triqui, Z. E. A., Hejjaoui, K., Baum, M., ve Amri, M. (2021). Wild Lathyrus species as a great source of resistance for introgression into cultivated grass pea (*Lathyrus sativus* L.) against broomrape weeds (*Orobanche crenata* Forsk. and *Orobanche foetida* Poir.). *Crop Science*, 61(1), 263-276.
- Aber, M., Fer, A., ve Sallé, G. (1983). Etude du transfert des substances organiques de l'hôte (*Vicia faba*) vers le parasite (*Orobanche crenata* Forsk.): Transfer of Organic Substances From the Host Plant *Vicia faba* to the Parasite *Orobanche crenata* Forsk. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 112(4), 297-308.
- Abu-Gharbieh, W., Makkouk, K., ve Saghir, A. (1978). Response of different tomato cultivars to the root-knot nematode, tomato yellow leaf curl virus, and *Orobanche* in Jordan.
- Abu-Irmaileh, B. (1991). Soil solarization controls broomrapes (*Orobanche* spp.) in host vegetable crops in the Jordan Valley. *Weed Technology*, 5(3), 575-581.
- Acharya, B. D. (2012). Assessment of different non-host crops as trap crop for reducing *Orobanche aegyptiaca* Pers. seed bank. *Ecoprint: An International Journal of Ecology*, 19, 31-38.
- Aksoy, E., ve Uygur, F. N. (2008). Effect of broomrapes on tomato and faba bean crops.
- Al-Babili, S., ve Bouwmeester, H. J. (2015). Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annual review of plant biology*, 66(1), 161-186.
- Al-Wakeel, S. A., Moubasher, H., Gabr, M. M., ve Madany, M. M. (2013). Induced systemic resistance: an innovative control method to manage branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.) in tomato. *European Journal of Biology*, 72(1), 9-21.
- Alcántara, E., Morales-García, M., ve Díaz-Sánchez, J. (2006). Effects of broomrape parasitism on sunflower plants: growth, development, and mineral nutrition. *Journal of plant Nutrition*, 29(7), 1199-1206.
- Aly, R., Cholakh, H., Joel, D. M., Leibman, D., Steinitz, B., Zelcer, A., Naglis, A., Yarden, O., ve Gal-On, A. (2009). Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. *Plant biotechnology journal*, 7(6), 487-498.
- Aly, R., Eizenberg, H., Kocherman, M., Abu-Nassar, J., Taha, L., ve Saadi, I. (2012). Use of ITS nuclear sequences from *Phelipanche aegyptiaca* as a direct tool to detect single seeds of broomrape species in the soil. *European journal of plant pathology*, 133, 523-526.
- Aly, R., Matzrafi, M., ve Bari, V. K. (2021). Using biotechnological approaches to develop crop resistance to root parasitic weeds. *Planta*, 253, 1-11.
- Aly, R., Plakhin, D., ve Achdari, G. (2006). Expression of sarcotoxin IA gene via a root-specific tob promoter enhanced host resistance against parasitic weeds in tomato plants. *Plant Cell Reports*, 25, 297-303.

- Amusan, I. O., Rich, P. J., Housley, T., ve Ejeta, G. (2011). An in vitro method for identifying postattachment Striga resistance in maize and sorghum. *Agronomy journal*, 103(5), 1472-1478.
- Amusan, I. O., Rich, P. J., Menkir, A., Housley, T., ve Ejeta, G. (2008). Resistance to Striga hermonthica in a maize inbred line derived from Zea diploperennis. *New Phytologist*, 178(1), 157-166.
- Arite, T., Iwata, H., Ohshima, K., Maekawa, M., Nakajima, M., Kojima, M., Sakakibara, H., ve Kyojuka, J. (2007). DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *The Plant Journal*, 51(6), 1019-1029.
- Arslan, Z., ve Uygur, F. (2013). Potency of some synthetic stimulants and root exudates on the germination of phelipanche spp. *Journal of Agricultural Sciences*, 19(3), 198-206.
- Avdeyev, Y., Scherbinin, B., Ivanova, L., ve Avdeyev, A. (2002). Studying of tomato resistance to broomrape and breeding varieties for processing. VIII International Symposium on the Processing Tomato 613,
- Babiker, A., Mohamed, E., ve El-Mana, M. (1994, 8-12 November 1993). *Orobanche problem and management in the Sudan* Proceedings of the third international workshop on Orobanche and related Striga research, Amsterdam, Netherlands.
- Bai, J. R., Wei, Q., Shu, J. S., Gan, Z. X., Li, B. J., Yan, D. L., Huang, Z. J., Guo, Y. M., Wang, X. X., Zhang, L. X., Cui, Y. N., Lu, X. X., Lu, J. H., Pan, C. Y., Hu, J. L., Du, Y. C., Liu, L., ve Li, J. M. (2020). Exploration of resistance to Phelipanche aegyptiacain tomato. *Pest management science*, 76(11), 3806-3821.
- Bai, Y., ve Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of botany*, 100(5), 1085-1094.
- Bari, V. K., Abu Nasser, J., ve Aly, R. (2021). CRISPR/Cas9 mediated mutagenesis of MORE AXILLARY GROWTH 1 in tomato confers resistance to root parasitic weed Phelipanche aegyptiaca. *Scientific Reports*, 11(1).
- Bari, V. K., Abu Nasser, J., Meir, A., ve Aly, R. (2021). Targeted mutagenesis of two homologous ATP-binding cassette subfamily G (ABCG) genes in tomato confers resistance to parasitic weed Phelipanche aegyptiaca. *Journal of Plant Research*, 134(3), 585-597.
- Bari, V. K., Abu Nasser, J., Kheredin, S. M., Gal-On, A., Ron, M., Britt, A., Steele, D., Yoder, J., ve Aly, R. (2019). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 in tomato provides resistance against the parasitic weed Phelipanche aegyptiaca. *Scientific Reports*, 9.
- Bartkowski, B., Theesfeld, I., Pirscher, F., ve Timaeus, J. (2018). Snipping around for food: economic, ethical and policy implications of CRISPR/Cas genome editing. *Geoforum*, 96, 172-180.
- Bauske, E. M., Zehnder, G. M., Sikora, E. J., ve Kemble, J. (1998). Southeastern tomato growers adopt integrated pest management. *HortTechnology*, 8(1), 40-44.
- Bellis, E. S., Kelly, E. A., Lorts, C. M., Gao, H., DeLeo, V. L., Rouhan, G., Budden, A., Bhaskara, G. B., Hu, Z., ve Muscarella, R. (2020). Genomics of sorghum local

- adaptation to a parasitic plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(8), 4243-4251.
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology advances*, 32(1), 170-189.
- Berner, D., Kling, J., ve Singh, B. (1995). Striga research and control. A perspective from Africa. *Plant Disease*, 79(7), 652-660.
- Bernhard, R. H., Jensen, J., ve Andreassen, C. (1998). Prediction of yield loss caused by *Orobanche* spp. in carrot and pea crops based on the soil seedbank. *Weed research*, 38(3), 191-197.
- Boari, A., ve Vurro, M. (2004). Evaluation of *Fusarium* spp. and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche ramosa*). *Biological Control*, 30(2), 212-219.
- Boubakri, H. (2023). Recent progress in CRISPR/Cas9-based genome editing for enhancing plant disease resistance. *Gene*, 866, 147334.
- Bouwmeester, H. J., Matusova, R., Zhongkui, S., ve Beale, M. H. (2003). Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 358-364.
- Brahmi, I., Mabrouk, Y., Brun, G., Delavault, P., Belhadj, O., ve Simier, P. (2016). Phenotypical and biochemical characterisation of resistance for parasitic weed (*Orobanche foetida* Poir.) in radiation-mutagenised mutants of chickpea. *Pest management science*, 72(12), 2330-2338.
- Brun, G., Braem, L., Thoiron, S., Gevaert, K., Goormachtig, S., ve Delavault, P. (2018). Seed germination in parasitic plants: what insights can we expect from strigolactone research? *Journal of Experimental Botany*, 69(9), 2265-2280.
- Butt, H., Jamil, M., Wang, J. Y., Al-Babili, S., ve Mahfouz, M. (2018). Engineering plant architecture via CRISPR/Cas9-mediated alteration of strigolactone biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 18, 1-9.
- Bülbül, C. (2021). *Development of broomrape (Orobanche spp., Phelipanche spp.) - resistant tomato (Solanum lycopersicum) using gene editing technology (CRISPR) / Cas9* [Doctorate Thesis, Akdeniz University]. Antalya.
- Bülbül, F., Aksoy, E., Uygur, S., ve Uygur, N. (2009). Broomrape (*Orobanche* Spp.) Problem in the Eastern Mediterranean Region of Turkey/El Problema Del Jopo (*Orobanche* Spp.) En La Región Mediterránea Oriental De Turquía Problème Dû À L'orobanche (*Orobanche* Spp.) Dans La Région Méditerranéenne Orientale De La Turquie. *Helia*, 32(51), 141-152.
- Cagáň, L., ve Tóth, P. (2003). A decrease in tomato yield caused by branched broomrape (*Orobanche ramosa*) parasitization. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 6, 65-68.
- Castillejo, M. A., Amiour, N., Dumas-Gaudot, E., Rubiales, D., ve Jorrín, J. V. (2004). A proteomic approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in pea (*Pisum sativum*). *Phytochemistry*, 65(12), 1817-1828.
- Castillejo, M. Á., Maldonado, A. M., Dumas-Gaudot, E., Fernández-Aparicio, M., Susín, R., Diego, R., ve Jorrín, J. V. (2009). Differential expression proteomics to

- investigate responses and resistance to *Orobanche crenata* in *Medicago truncatula*. *Bmc Genomics*, 10, 1-17.
- Chaudhuri, A., Halder, K., ve Datta, A. (2022). Classification of CRISPR/Cas system and its application in tomato breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(2), 367-387.
- Cubero, J., ve Hernández, L. (1991). Breeding faba bean (*Vicia faba* L.) for resistance to *Orobanche crenata* Forsk. *Options Méditerranéennes*, 10, 51-57.
- Cubero, J. I. (1986). Breeding for resistance to *Orobanche* and *Striga*: a review. Workshop biology and control of *Orobanche*, Wageningen.
- Çiftçi, M. B., ve Tapkı, N. (2023). Türkiye'nin hatay ilinde açıkta domates üretiminin pazarlama yapısının analizi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 10(1), 18-26.
- Dalela, G., ve Mathur, R. (1971). Resistance of varieties of eggplant, tomato and tobacco to broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.). *PANS Pest Articles ve News Summaries*, 17(4), 482-483.
- de Zélicourt, A., Letousey, P., Thoiron, S., Champion, C., Simoneau, P., Elmorjani, K., Marion, D., Simier, P., ve Delavault, P. (2007). Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanche* parasitic plants. *Planta*, 226, 591-600.
- Demircan, S. (2023). *Domates Ürün Raporu* T. E. v. P. G. E. Müdürlüğü.
- Díaz-Ruiz, R., Torres, A., Gutierrez, M. V., Rubiales, D., Cubero, J. I., Kharrat, M., Satovic, Z., ve Román, B. (2009). Mapping of quantitative trait loci controlling *Orobanche foetida* Poir. resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *African Journal of Biotechnology*, 8(12).
- Díaz-Ruiz, R., Torres, A. M., Satovic, Z., Gutierrez, M. V., Cubero, J. I., ve Román, B. (2010). Validation of QTLs for *Orobanche crenata* resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) across environments and generations. *Theoretical and Applied Genetics*, 120, 909-919.
- Díaz, J., Norambuena, H., ve López-Granados, F. (2006). Caracterización del holoparasitismo de *Orobanche ramosa* en tomate bajo condiciones de campo. *Agricultura Técnica*, 66(3), 223-234.
- Dimitrijević, A., Pejović, I., Imerovski, I., Dedić, B., Pajević, S., ve Miladinović, D. (2012). DNA isolation from dry samples of broomrape-the effect of isolation method and sample storage on DNA yield and quality. *Romanian agricultural research*(30), 349-357.
- Disciglio, G., Lops, F., Carlucci, A., Gatta, G., Tarantino, A., Frabboni, L., Carriero, F., ve Tarantino, E. (2016). Effects of different methods to control the parasitic weed *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel in processing tomato crops. *Italian Journal of Agronomy*, 11(1), 39-46.
- Domínguez, J., Melero-Vara, J., Miller, J., ve Fernández-Martinez, J. (1996). Screening for resistance to broomrape (*Orobanche cernua*) in cultivated sunflower. *Plant Breeding*, 115(3), 201-202.
- Dongo, A., Leflon, M., Simier, P., ve Delavault, P. (2012). Development of a high-throughput real-time quantitative PCR method to detect and quantify

- contaminating seeds of *Phelipanche ramosa* and *Orobanche cumana* in crop seed lots. *Weed research*, 52(1), 34-41.
- Dor, E., Alperin, B., Wininger, S., Ben-Dor, B., Somvanshi, V. S., Koltai, H., Kapulnik, Y., ve Hershenhorn, J. (2010). Characterization of a novel tomato mutant resistant to the weedy parasites *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Euphytica*, 171, 371-380.
- Dor, E., Yoneyama, K., Wininger, S., Kapulnik, Y., Yoneyama, K., Koltai, H., Xie, X., ve Hershenhorn, J. (2011). Strigolactone deficiency confers resistance in tomato line SL-ORT1 to the parasitic weeds *Phelipanche* and *Orobanche* spp. *Phytopathology*, 101(2), 213-222.
- Doudna, J. A., ve Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293). Springer.
- Draie, R., Péron, T., POUVREAU, J. B., Véronési, C., Jégou, S., Delavault, P., Thoiron, S., ve Simier, P. (2011). Invertases involved in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa*: characterization of the dominant soluble acid isoform, PrSAI1. *Molecular Plant Pathology*, 12(7), 638-652.
- Dubey, N. K., Eizenberg, H., Leibman, D., Wolf, D., Edelstein, M., Abu-Nassar, J., Marzouk, S., Gal-On, A., ve Aly, R. (2017). Enhanced Host-Parasite Resistance Based on Down-Regulation of *Phelipanche aegyptiaca* Target Genes Is Likely by Mobile Small RNA. *Frontiers in plant science*, 8.
- Echevarría-Zomeño, S., Pérez-de-Luque, A., Jorrín, J., ve Maldonado, A. M. (2006). Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 4189-4200.
- Eizenberg, H., Colquhoun, J. B., ve Mallory-Smith, C. A. (2003). Variation in clover response to small broomrape (*Orobanche minor*). *Weed Science*, 51(5), 759-763.
- Eizenberg, H., ve Goldwasser, Y. (2018). Control of Egyptian broomrape in processing tomato: A summary of 20 years of research and successful implementation. *Plant Disease*, 102(8), 1477-1488.
- Eizenberg, H., Hershenhorn, J., Ephrath, J. H., ve Kanampiu, F. (2013). Chemical Control. In D. M. Joel, J. Gressel, ve L. J. Musselman (Eds.), *Parasitic Orobanchaceae* (pp. 415-428). Springer.
- Eizenberg, H., Lande, T., Achdari, G., Roichman, A., ve Hershenhorn, J. (2007). Effect of Egyptian broomrape (*Orobanche aegyptiaca*) seed-burial depth on parasitism dynamics and chemical control in tomato. *Weed Science*, 55(2), 152-156.
- Ejeta, G. (2005). Integrating biotechnology, breeding, and agronomy in the control of the parasitic weed *Striga* spp in sorghum. In *the wake of the double helix: from the green revolution to the gene revolution*, Bologna Bologna, 239-251.
- Ejeta, G. (2007). Breeding for *Striga* resistance in sorghum: exploitation of an intricate host-parasite biology. *Crop Science*, 47, S-216-S-227.

- Ejeta, G., ve Butler, L. G. (1993). Host plant resistance to *Striga*. *International crop science I*, 561-569.
- El-Halmouch, Y., Benharrat, H., ve Thalouarn, P. (2006). Effect of root exudates from different tomato genotypes on broomrape (*O. aegyptiaca*) seed germination and tubercle development. *Crop Protection*, 25(5), 501-507.
- En-Nahli, Y., Hejjaoui, K., Mentag, R., Es-Safi, N. E., ve Amri, M. (2023). Large field screening for resistance to broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) in a global lentil diversity panel (GLDP)(*lens culinaris* Medik.). *Plants*, 12(10), 2064.
- Ertürk, Y., ve Çirka, M. (2015). Türkiye ve Kuzey Doğu Anadolu Bölgesi (KDAB)'nde Domates Üretimi Ve Pazarlaması. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 25(1), 84-97.
- FAOSTAT. (2022). *Crops and livestock products*. Retrieved 10.03.2024 from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Fernández-Aparicio, M., Del Moral, L., Muños, S., Velasco, L., ve Pérez-Vich, B. (2022). Genetic and physiological characterization of sunflower resistance provided by the wild-derived Or Deb2 gene against highly virulent races of *Orobanche cumana* Wallr. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(2), 501-525.
- Fernandez-Aparicio, M., Kisugi, T., Xie, X., Rubiales, D., ve Yoneyama, K. (2014). Low strigolactone root exudation: a novel mechanism of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.) resistance available for faba bean breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 7063-7071.
- Fernández-Aparicio, M., Reboud, X., ve Gibot-Leclerc, S. (2016). Broomrape weeds. Underground mechanisms of parasitism and associated strategies for their control: a review. *Frontiers in plant science*, 7, 135.
- Fernández-Aparicio, M., Yoneyama, K., ve Rubiales, D. (2011). The role of strigolactones in host specificity of *Orobanche* and *Phelipanche* seed germination. *Seed Science Research*, 21(1), 55-61.
- Fernández-Martínez, J., Domínguez, J., Pérez-Vich, B., ve Velasco, L. (2008). Update on breeding for resistance to sunflower broomrape/actualización de la situación de la mejora genética de girasol para resistencia al jopo/mise à jour des actions de sélection pour la résistance à l'orobanche du tournesol. *Helia*, 31(48), 73-84.
- Fernández-Melero, B., Martín-Sanz, A., Del Moral, L., Pérez-Vich, B., ve Velasco, L. (2023). A novel sunflower broomrape race with unusual virulence potentially caused by a mutation. *Frontiers in plant science*, 14, 1236511.
- Fernández-Aparicio, M., Sillero, J., ve Rubiales, D. (2009). Resistance to broomrape in wild lentils (*Lens* spp.). *Plant Breeding*, 128(3), 266-270.
- Fernández-Martínez, J., Melero-Vara, J., Muñoz-Ruz, J., Ruso, J., ve Domínguez, J. (2000). Selection of wild and cultivated sunflower for resistance to a new broomrape race that overcomes resistance of the Or5 gene. *Crop Science*, 40(2), 550-555.
- Fishman, M. R., ve Shirasu, K. (2021). How to resist parasitic plants: pre-and post-attachment strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, 62, 102004.

- Floková, K., Shimels, M., Andreo Jimenez, B., Bardaro, N., Strnad, M., Novák, O., ve Bouwmeester, H. J. (2020). An improved strategy to analyse strigolactones in complex sample matrices using UHPLC–MS/MS. *Plant Methods*, 16(1), 1-17.
- Fondevilla, S., Fernández-Aparicio, M., Satovic, Z., Emeran, A. A., Torres, A. M., Moreno, M. T., ve Rubiales, D. (2010). Identification of quantitative trait loci for specific mechanisms of resistance to Orobanche crenata Forsk. in pea (*Pisum sativum* L.). *Molecular Breeding*, 25, 259-272.
- Foo, E., Bullier, E., Goussot, M., Foucher, F., Rameau, C., ve Beveridge, C. A. (2005). The branching gene RAMOSUS1 mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *The Plant Cell*, 17(2), 464-474.
- Foy, C., Jacobsohn, R., ve Jain, R. (1987). Evaluating tomato lines for resistance to glyphosate and/or Orobanche aegyptiaca Pers.
- Foy, C., Jacobsohn, R., ve Jain, R. (1988). Screening of Lycopersicon spp. for glyphosate and/or Orobanche aegyptiaca Pers. resistance. *Weed research*, 28(5), 383-391.
- Fracchiolla, M., ve Boari, A. (2003). Effect of the infestation of Orobanche ramosa on tomato and cauliflower yield. *Informatore Fitopatologico*, 53, 52-53.
- França-Neto, J. d. B., ve Krzyzanowski, F. C. (2019). Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science*, 41(3), 359-366.
- Frodin, D. G. (2004). History and concepts of big plant genera. *Taxon*, 53(3), 753-776.
- Frost, D., Gurney, A., Press, M., ve Scholes, J. (1997). Striga hermonthica reduces photosynthesis in sorghum: the importance of stomatal limitations and a potential role for ABA? *Plant, Cell ve Environment*, 20(4), 483-492.
- Gagne, G., Roeckel-Drevet, P., Grezes-Besset, B., Shindrova, P., Ivanov, P., Grand-Ravel, C., Vear, F., Tourvieille de Labrouhe, D., Charmet, G., ve Nicolas, P. (1998). Study of the variability and evolution of Orobanche cumana populations infesting sunflower in different European countries. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 1216-1222.
- Gao, H., Gadlage, M. J., Lafitte, H. R., Lenderts, B., Yang, M., Schroder, M., Farrell, J., Snopek, K., Peterson, D., ve Feigenbutz, L. (2020). Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR–Cas9. *Nature biotechnology*, 38(5), 579-581.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., ve Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120, 881-902.
- Gibot-Leclerc, S., Corbineau, F., Sallé, G., ve Côme, D. (2004). Responsiveness of Orobanche ramosa L. seeds to GR 24 as related to temperature, oxygen availability and water potential during preconditioning and subsequent germination. *Plant Growth Regulation*, 43, 63-71.
- Gil, J. (1999). Resistance in *Vicia sativa* L. to Orobanche crenata Forsk. *Congresos y Jornadas-Junta de Andalucía (España)*,
- Gobena, D., Shimels, M., Rich, P. J., Ruyter-Spira, C., Bouwmeester, H., Kanuganti, S., Mengiste, T., ve Ejeta, G. (2017). Mutation in sorghum LOW GERMINATION

- STIMULANT 1 alters strigolactones and causes Striga resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(17), 4471-4476.
- Goldwasser, Y., ve Rodenburg, J. (2013). Integrated agronomic management of parasitic weed seed banks. In D. M. Joel, J. Gressel, ve L. J. Musselman (Eds.), *Parasitic Orobanchaceae* (pp. 393-413). Springer Verlag.
- Goldwasser, Y., Yoneyama, K., Xie, X., ve Yoneyama, K. (2008). Production of strigolactones by *Arabidopsis thaliana* responsible for *Orobanche aegyptiaca* seed germination. *Plant Growth Regulation*, 55, 21-28.
- Gomez-Roldan, V., Fervas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J.-P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., ve Portais, J.-C. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455(7210), 189-194.
- González-Verdejo, C. I., Fernández-Aparicio, M., Córdoba, E. M., ve Nadal, S. (2020). Identification of *Vicia ervilia* germplasm resistant to *Orobanche crenata*. *Plants*, 9(11), 1568.
- Grenier, C., Ibrahim, Y., Haussmann, B. I., Kiambi, D., ve Ejeta, G. (2007). Marker-assisted selection for Striga resistance in sorghum. In *Integrating new technologies for Striga control: Towards ending the witch-hunt* (pp. 159-171). World Scientific.
- Grenier, C., Rich, P., Mohamed, A., Ellicott, A., Shaner, C., ve Ejeta, G. (2001). Independent inheritance of Igs and IR genes in sorghum. 7th International Parasitic Weed Symposium, A. Fer, P. Thalouarn, DM Joel, LJ Musselman, C. Parker, and JAC Verkleij, eds (Nantes, France),
- Gurney, A., Slate, J., Press, M., ve Scholes, J. (2006). A novel form of resistance in rice to the angiosperm parasite *Striga hermonthica*. *New Phytologist*, 169(1), 199-208.
- Gurney, A. L., Grimanelli, D., Kanampiu, F., Hoisington, D., Scholes, J., ve Press, M. (2003). Novel sources of resistance to *Striga hermonthica* in *Tripsacum dactyloides*, a wild relative of maize. *New Phytologist*, 160(3), 557-568.
- Gutiérrez, N., Palomino, C., Satovic, Z., Ruiz-Rodríguez, M., Vitale, S., Gutiérrez, M., Rubiales, D., Kharrat, M., Amri, M., ve Emeran, A. (2013). QTLs for *Orobanche* spp. resistance in faba bean: identification and validation across different environments. *Molecular Breeding*, 32, 909-922.
- Hasegawa, S., Tsutsumi, T., Fukushima, S., Okabe, Y., Saito, J., Katayama, M., Shindo, M., Yamada, Y., Shimomura, K., ve Yoneyama, K. (2018). Low infection of *Phelipanche aegyptiaca* in micro-tom mutants deficient in CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2645.
- Hatami Maleki, H., Darvishzadeh, R., ve Zeinalzadeh-Tabrizi, H. (2024). Identification of Resistance Sources Against *Orobanche cernua* in Tobacco Germplasm. *Journal of Crop Health*, 1-11.
- Haussmann, B., Hess, D., Omany, G., Folkertsma, R., Reddy, B., Kayentao, M., Welz, H., ve Geiger, H. (2004). Genomic regions influencing resistance to the parasitic weed *Striga hermonthica* in two recombinant inbred populations of sorghum. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1005-1016.

- Hausmann, B., Hess, D., Omany, G., Reddy, B., Welz, H., ve Geiger, H. (2001). Major and minor genes for stimulation of *Striga hermonthica* seed germination in sorghum, and interaction with different *Striga* populations. *Crop Science*, 41(5), 1507-1512.
- Hausmann, B. I., Hess, D. E., Welz, H.-G., ve Geiger, H. H. (2000). Improved methodologies for breeding *Striga*-resistant sorghums. *Field Crops Research*, 66(3), 195-211.
- Hearne, S. J. (2009). Control—the *Striga* conundrum. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(5), 603-614.
- Hershenhorn, J., Eizenberg, H., Dor, E., Kapulnik, Y., ve Goldwasser, Y. (2009). *Phelipanche aegyptiaca* management in tomato. *Weed research*, 49, 34-47.
- Hibberd, J., Quick, W., Press, M., Scholes, J., ve Jeschke, W. (1999). Solute fluxes from tobacco to the parasitic angiosperm *Orobancha cernua* and the influence of infection on host carbon and nitrogen relations. *Plant, Cell ve Environment*, 22(8), 937-947.
- Ibdah, M., Dubey, N. K., Eizenberg, H., Dabour, Z., Abu-Nassar, J., Gal-On, A., ve Aly, R. (2014). Cucumber Mosaic Virus as a carotenoid inhibitor reducing *Phelipanche aegyptiaca* infection in tobacco plants. *Plant signaling ve behavior*, 9(10), e972146.
- Ish-Shalom-Gordon, N., Jacobsohn, R., ve Cohen, Y. (1993). Inheritance of resistance to *Orobancha cumana* in sunflower.
- Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A. K., ve Khurana, J. P. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications*, 345(2), 646-651.
- Jhu, M.-Y., Ellison, E. E., ve Sinha, N. R. (2023). CRISPR gene editing to improve crop resistance to parasitic plants. *Frontiers in Genome Editing*, 5, 1289416.
- Jhu, M.-Y., ve Sinha, N. R. (2022). Parasitic plants: an overview of mechanisms by which plants perceive and respond to parasites. *Annual review of plant biology*, 73(1), 433-455.
- Joel, D. M. (2000). The long-term approach to parasitic weeds control: manipulation of specific developmental mechanisms of the parasite. *Crop Protection*, 19(8-10), 753-758.
- Joel, D. M. (2009, 8-12 June 2009). Taxonomic and avolutionary justifications for considering *Phelipanche* as a seperate genus. 10th World Congress of Parasitic Plants, Kuşadası, Turkey.
- Joel, D. M. (2013). Functional Structure of the Mature Haustorium. In D. M. Joel, J. Gressel, ve L. J. Musselman (Eds.), *Parasitic Orobanchaceae* (pp. 25-60).
- Joel, D. M., Chaudhuri, S. K., Plakhine, D., Ziadna, H., ve Steffens, J. C. (2011). Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobancha cumana*. *Phytochemistry*, 72(7), 624-634.

- Joel, D. M., Gressel, J., ve Musselman, L. J. (2013). Parasitic Orobanchaceae. *Parasitic mechanisms and control strategies*. New York.
- Joel, D. M., ve Losner-Goshen, D. (1994). The attachment organ of the parasitic angiosperms *Orobanche cumana* and *O. aegyptiaca* and its development. *Canadian Journal of Botany*, 72(5), 564-574.
- Jogam, P., Sandhya, D., Alok, A., Peddaboina, V., Singh, S. P., Abbagani, S., Zhang, B., ve Allini, V. R. (2023). Editing of TOM1 gene in tobacco using CRISPR/Cas9 confers resistance to Tobacco mosaic virus. *Molecular Biology Reports*, 50(6), 5165-5176.
- Kaundun, S. S., Martin-Sanz, A., Rodríguez, M., Serbanoiu, T., Moreno, J., Mcindoe, E., ve Le Goupil, G. (2024). First case of evolved herbicide resistance in the holoparasite sunflower broomrape, *Orobanche cumana* Wallr. *Frontiers in plant science*, 15, 1420009.
- Kaur, S., Ibdah, M., Simon, P., Yoneyama, K., Tholl, D., ve Westwood, J. (2024). Differential host resistance of wild and cultivated carrots to *Phelipanche* and *Cuscuta*. The 17th World Congress on Parasitic Plants, Nara, Japan.
- Kavuluko, J., Kibe, M., Sugut, I., Kibet, W., Masanga, J., Mutinda, S., Wamalwa, M., Magomere, T., Odeny, D., ve Runo, S. (2021). GWAS provides biological insights into mechanisms of the parasitic plant (*Striga*) resistance in sorghum. *BMC Plant Biology*, 21(1), 392.
- Kaya, Y. (2014). Current situation of sunflower broomrape around the world. Proceedings of the 3rd International Symposium on Broomrape (*Orobanche* spp.) in Sunflower,
- Kebreab, E., ve Murdoch, A. (2001). Simulation of integrated control strategies for *Orobanche* spp. based on a life cycle model. *Experimental Agriculture*, 37(1), 37-51.
- Kim, S., Akintunde, A., ve Walker, P. (1999). Responses of maize inbreds during development of *Striga hermonthica* infestation. *Maydica*, 44(4), 333-339.
- Kleifeld, Y., Goldwasser, Y., Herzlinger, G., Joel, D., Golan, S., ve Kahana, D. (1994). The effects of flax (*Linum usitatissimum* L.) and other crops as trap and catch crops for control of Egyptian broomrape (*Orobanche aegyptiaca* Pers.). *Weed research*, 34(1), 37-44.
- Klein, O., ve Kroschel, J. (2002). Biological control of *Orobanche* spp. with *Phytomyza orobanchia*, a review. *Biocontrol*, 47, 245-277.
- Kohlen, W., Charnikhova, T., Lammers, M., Pollina, T., Tóth, P., Haider, I., Pozo, M. J., de Maagd, R. A., Ruyter-Spira, C., ve Bouwmeester, H. J. (2012). The tomato CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 (S 1 CCD 8) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *New Phytologist*, 196(2), 535-547.
- Koltai, H., LekKala, S. P., Bhattacharya, C., Mayzlish-Gati, E., Resnick, N., Winger, S., Dor, E., Yoneyama, K., Yoneyama, K., ve Hershenhorn, J. (2010). A tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. *Journal of Experimental Botany*, 61(6), 1739-1749.

- Kostov, K., Batchvarova, R., ve Slavov, S. (2007). Application of chemical mutagenesis to increase the resistance of tomato to *Orobanche ramosa* L. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13(5), 505-513.
- Labrousse, P., Arnaud, M., Serieys, H., Bervillé, A., ve Thalouarn, P. (2001). Several mechanisms are involved in resistance of *Helianthus* to *Orobanche cumana* Wallr. *Annals of botany*, 88(5), 859-868.
- Lane, J., Child, D., Moore, T., Arnold, G., ve Bailey, J. (1997). Phenotypic characterisation of resistance in *Zea diploperennis* to *Striga hermonthica*. *Maydica*, 42(1), 45-51.
- Letousey, P., De Zélicourt, A., Vieira Dos Santos, C., Thoiron, S., Monteau, F., Simier, P., Thalouarn, P., ve Delavault, P. (2007). Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. *Plant Pathology*, 56(3), 536-546.
- Li, J., ve Timko, M. P. (2009). Gene-for-gene resistance in *Striga*-cowpea associations. *Science*, 325(5944), 1094-1094.
- Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Q., Liu, J., Zhang, H., Liu, C., ve Ran, Y. (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature communications*, 8(1), 14261.
- Lins, R. D., Colquhoun, J. B., ve Mallory-Smith, C. A. (2007). Effect of small broomrape (*Orobanche minor*) on red clover growth and dry matter partitioning. *Weed Science*, 55(5), 517-520.
- Liu, L., Shao, Z., Zhang, M., ve Wang, Q. (2015). Regulation of carotenoid metabolism in tomato. *Molecular plant*, 8(1), 28-39.
- Livak, K. J., ve Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Longo, A., Lo Monaco, A., ve Mauromicale, G. (2010). The effect of *Phelipanche ramosa* infection on the quality of tomato fruit. *Weed research*, 50(1), 58-66.
- Louarn, J., Boniface, M.-C., Pouilly, N., Velasco, L., Pérez-Vich, B., Vincourt, P., ve Muñoz, S. (2016). Sunflower resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) is controlled by specific QTLs for different parasitism stages. *Frontiers in plant science*, 7, 590.
- Lu, Y., Melero-Vara, J., García-Tejada, J., ve Blanchard, P. (2000). Development of SCAR markers linked to the gene Or5 conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 625-632.
- Lynn, D. G., ve Chang, M. (1990). Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. *Annual review of plant biology*, 41(1), 497-526.
- Maiti, R., Ramaiah, K., Bisen, S., ve Chidley, V. L. (1984). A comparative study of the haustorial development of *Striga asiatica* (L.) Kuntze on sorghum cultivars. *Annals of botany*, 54(4), 447-457.

- Manen, J.-F., Habashi, C., Jeanmonod, D., Park, J.-M., ve Schneeweiss, G. M. (2004). Phylogeny and intraspecific variability of holoparasitic Orobanche (Orobanchaceae) inferred from plastid rbcL sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(2), 482-500.
- Mannagetta, B. (1930). *Orobanchaceae* (Vol. 96). Das Pflanzenreich.
- Martín-Sanz, A., Pérez-Vich, B., Rueda, S., Fernández-Martínez, J. M., ve Velasco, L. (2020). Characterization of post-haustorial resistance to sunflower broomrape. *Crop Science*, 60(3), 1188-1198.
- Mauromicale, G., Monaco, A. L., ve Longo, A. M. (2008). Effect of branched broomrape (Orobanche ramosa) infection on the growth and photosynthesis of tomato. *Weed Science*, 56(4), 574-581.
- Mbuvu, D. A., Masiga, C. W., Kuria, E., Masanga, J., Wamalwa, M., Mohamed, A., Odeny, D. A., Hamza, N., Timko, M. P., ve Runo, S. (2017). Novel sources of witchweed (Striga) resistance from wild sorghum accessions. *Frontiers in plant science*, 8, 116.
- McDowell, N., Pockman, W. T., Allen, C. D., Breshears, D. D., Cobb, N., Kolb, T., Plaut, J., Sperry, J., West, A., ve Williams, D. G. (2008). Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist*, 178(4), 719-739.
- Menz, J., Modrzejewski, D., Hartung, F., Wilhelm, R., ve Sprink, T. (2020). Genome edited crops touch the market: a view on the global development and regulatory environment. *Frontiers in plant science*, 11, 586027.
- Minoia, S., Petrozza, A., D'Onofrio, O., Piron, F., Mosca, G., Sozio, G., Cellini, F., Bendahmane, A., ve Carriero, F. (2010). A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC research notes*, 3, 1-8.
- Mohamed, A., Ellicott, A., Housley, T., ve Ejeta, G. (2003). Hypersensitive response to Striga infection in sorghum. *Crop Science*, 43(4), 1320-1324.
- Molinero-Ruiz, M., GARCÍA-RUIZ, R., MELERO-VARA, J. M., ve Domínguez, J. (2009). Orobanche cumana race F: performance of resistant sunflower hybrids and aggressiveness of populations of the parasitic weed. *Weed research*, 49(5), 469-478.
- Nelson, D. C. (2021). The mechanism of host-induced germination in root parasitic plants. *Plant physiology*, 185(4), 1353-1373.
- Omanya, G., Haussmann, B., Hess, D., Reddy, B., Kayentao, M., Welz, H., ve Geiger, H. (2004). Utility of indirect and direct selection traits for improving Striga resistance in two sorghum recombinant inbred populations. *Field Crops Research*, 89(2-3), 237-252.
- Ouédraogo, J. T., Tignegre, J.-B., Timko, M. P., ve Belzile, F. J. (2002). AFLP markers linked to resistance against Striga gesnerioides race 1 in cowpea (*Vigna unguiculata*). *Genome*, 45(5), 787-793.

- Paduchuri, P., Gohokar, S., Thamke, B., ve Subhas, M. (2010). Transgenic tomatoes-a review. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* 1(2), 69-72.
- Park, J.-M., Manen, J.-F., ve Schneeweiss, G. M. (2007). Horizontal gene transfer of a plastid gene in the non-photosynthetic flowering plants *Orobanche* and *Phelipanche* (Orobanchaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(3), 974-985.
- Parker, C. (2012). Parasitic weeds: a world challenge. *Weed Science*, 60(2), 269-276.
- Parker, C. (2013). The Parasitic Weeds of the Orobanchaceae. In *Parasitic Orobanchaceae* (pp. 499). Springer.
- Parker, C., ve Riches, C. R. (1993). *Parasitic weeds of the world: biology and control*.
- Pérez-de-Luque, A., González-Verdejo, C. I., Lozano, M. D., Dita, M. A., Cubero, J. I., González-Melendi, P., Risueño, M. C., ve Rubiales, D. (2006). Protein cross-linking, peroxidase and β -1, 3-endoglucanase involved in resistance of pea against *Orobanche crenata*. *Journal of Experimental Botany*, 57(6), 1461-1469.
- PÉREZ-DE-LUQUE, A., Rubiales, D., Cubero, J. I., Press, M., Scholes, J., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Plakhine, D., ve Joel, D. (2005). Interaction between *Orobanche crenata* and its host legumes: unsuccessful haustorial penetration and necrosis of the developing parasite. *Annals of botany*, 95(6), 935-942.
- Pérez-Vich, B., Akhtouch, B., Knapp, S., Leon, A., Velasco, L., Fernández-Martínez, J., ve Berry, S. (2004). Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 92-102.
- Pérez-Vich, B., Velasco, L., Rich, P. J., ve Ejeta, G. (2013). Marker-assisted and physiology-based breeding for resistance to root parasitic Orobanchaceae. *Parasitic Orobanchaceae: Parasitic mechanisms and control strategies*, 369-391.
- Perez-Vich, B. a., Velasco, L., Rich, P. J., ve Ejeta, G. (2013). Marker-Assisted and Physiology-Based Breeding for Resistance to Root Parasitic Orobanchaceae. In D. M. Joel, J. Gressel, ve L. J. Musselman (Eds.), *Parasitic Orobanchaceae* (pp. 369-385). Springer.
- Pérez-de-Luque, A., Fondevilla, S., Pérez-Vich, B., Aly, R., Thoiron, S., Simier, P., Castillejo, M., Fernández-Martínez, J., Jorrín, J., ve Rubiales, D. (2009). Understanding *Orobanche* and *Phelipanche*-host plant interactions and developing resistance. *Weed research*, 49, 8-22.
- Pérez-de-Luque, A., Moreno, M., ve Rubiales, D. (2008). Host plant resistance against broomrapes (*Orobanche* spp.): defence reactions and mechanisms of resistance. *Annals of Applied Biology*, 152(2), 131-141.
- Pierce, S., Mbwaga, A., Press, M., ve Scholes, J. (2003). Xenognosin production and tolerance to *Striga asiatica* infection of high-yielding maize cultivars. *Weed research*, 43(2), 139-145.
- Pinello, L., Canver, M. C., Hoban, M. D., Orkin, S. H., Kohn, D. B., Bauer, D. E., ve Yuan, G.-C. (2016). Analyzing CRISPR genome-editing experiments with CRISPResso. *Nature biotechnology*, 34(7), 695-697.

- Pubert, C., Boniface, M.-C., Legendre, A., Chabaud, M., Carrère, S., Callot, C., Cravero, C., Dufau, I., Patrascoiu, M., ve Baussart, A. (2024). A cluster of putative resistance genes is associated with a dominant resistance to sunflower broomrape. *Theoretical and Applied Genetics*, 137(5), 103.
- Pustovoit, V. S. (1966). *Selection, seed culture and some agrotechnical problems of sunflower*. Delhi, India
- Qasem, J., ve Kasrawi, M. (1995). Variation of resistance to broomrape (*Orobanche ramosa*) in tomatoes. *Euphytica*, 81, 109-114.
- Qasem, J. R. (2019). Branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.) control in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by trap crops and other plant species in rotation. *Crop Protection*, 120, 75-83.
- Qing-Liang, C., Ya-Min, J., Zhi-Fen, W., Cheng-Gang, S., Jing-Bin, Z., ve Yu-Hai, G. (2011). Postembryonic development of *Cistanche tubulosa* (Schrenk) Wight. *Pakistan Journal of Botany*, 43, 1823-1830.
- Radwan, M., Abdalla, M., Fischbeck, G., Metwally, A., ve Darwish, D. (1988). Variation in reaction of faba bean lines to different accessions of *Orobanche crenata* Forsk. *Plant Breeding*, 101(3), 208-216.
- Raff, T., Giet, M. v. d., Endemann, D., Wiederholt, T., ve Paul, M. (1997). Design and testing of β -actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. *Biotechniques*, 23(3), 456-460.
- Raiola, A., Rigano, M. M., Calafiore, R., Frusciante, L., ve Barone, A. (2014). Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. *Mediators of inflammation*, 2014(1), 139873.
- Reynolds, M., ve Langridge, P. (2016). Physiological breeding. *Current Opinion in Plant Biology*, 31, 162-171.
- Ricroch, A., Eriksson, D., Miladinović, D., Sweet, J., Van Laere, K., ve Woźniak-Gientka, E. (2024). *A Roadmap for Plant Genome Editing*. Springer Nature.
- Rispail, N., Dita, M. A., González-Verdejo, C., Pérez-de-Luque, A., Castillejo, M. A., Prats, E., Román, B., Jorrín, J., ve Rubiales, D. (2007). Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe. *New Phytologist*, 173(4), 703-712.
- Román, B., Tórres, A., Rubiales, D., Cubero, J., ve Satovic, Z. (2002). Mapping of quantitative trait loci controlling broomrape (*Orobanche crenata* Forsk) resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Genome*, 45.
- Rubiales, D. (2018). Can we breed for durable resistance to broomrapes? *Phytopathologia Mediterranea*, 57(1), 170-185.
- Rubiales, D., ve Fernández-Aparicio, M. (2012). Innovations in parasitic weeds management in legume crops. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32, 433-449.
- Rubiales, D., Fernández-Aparicio, M., Pérez-de-Luque, A., Castillejo, M. A., Prats, E., Sillero, J. C., Rispail, N., ve Fondevilla, S. (2009). Breeding approaches for crenate broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) management in pea (*Pisum*

- sativum L.). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(5), 553-559.
- Rubiales, D., Fernández-Aparicio, M., Wegmann, K., ve Joel, D. (2009). Revisiting strategies for reducing the seedbank of Orobanche and Phelipanche spp. *Weed research*, 49, 23-33.
- Rubiales, D., Fondevilla, S., ve Fernández-Aparicio, M. (2020). Development of pea breeding lines with resistance to Orobanche crenata derived from pea landraces and wild Pisum spp. *Agronomy*, 11(1), 36.
- Rubiales, D., Moreno, M., ve Sillero, J. (2005). Search for resistance to crenate broomrape (Orobanche crenata Forsk.) in pea germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 853-861.
- Rubiales, D., Pérez-de-Luque, A., Fernández-Aparico, M., Sillero, J. C., Román, B., Kharrat, M., Khalil, S., Joel, D. M., ve Riches, C. (2006). Screening techniques and sources of resistance against parasitic weeds in grain legumes. *Euphytica*, 147, 187-199.
- Rubiales, D., Pérez-de-Luque, A., Joel, D. M., Alcántara, C., ve Sillero, J. C. (2003). Characterization of resistance in chickpea to crenate broomrape (Orobanche crenata). *Weed Science*, 51(5), 702-707.
- Satish, K., Gutema, Z., Grenier, C., Rich, P. J., ve Ejeta, G. (2012). Molecular tagging and validation of microsatellite markers linked to the low germination stimulant gene (lgs) for Striga resistance in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theoretical and Applied Genetics*, 124, 989-1003.
- Sauerborn, J. (1991, 24-30 June 1991). The economic importance of the phytoparasites Orobanche and Striga. 5th international symposium of parasitic weeds, Nairobi, Kenya.
- Sauerborn, J., Linke, K. H., Saxena, M. C., ve Koch, W. (1989). Solarization; a physical control method for weeds and parasitic plants (Orobanche spp.) in Mediterranean agriculture. *Weed research*, 29(6), 391-397.
- Saunders, A. R. (1942). South Africa Sorghum Breeding. *South Africa Department of Agriculture and Forestry Science Bulletin*, 14.
- Schneeweiss, G., Park, J., Manen, J., Colwell, A., ve Weiss-Schneeweiss, H. (2005). Phylogenetic relationships of Orobanche and related genera: evidence from molecular and karyological data. 8th GfBS Annual Conference Abstracts. Org. Divers. Evol,
- Schneeweiss, G. M., Colwell, A., Park, J.-M., Jang, C.-G., ve Stuessy, T. F. (2004). Phylogeny of holoparasitic Orobanche (Orobanchaceae) inferred from nuclear ITS sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(2), 465-478.
- Serghini, K., de Luque, A. P., Castejón-Muñoz, M., García-Torres, L., ve Jorrín, J. V. (2001). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (Orobanche cernua Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *Journal of Experimental Botany*, 52(364), 2227-2234.

- Siame, B. A., Weerasuriya, Y., Wood, K., Ejeta, G., ve Butler, L. G. (1993). Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(9), 1486-1491.
- Sisou, D., Tadmor, Y., Plakhine, D., Ziadna, H., Hübner, S., ve Eizenberg, H. (2021). Biological and transcriptomic characterization of pre-haustorial resistance to sunflower broomrape (*Orobanche cumana* W.) in sunflowers (*Helianthus annuus*). *Plants*, 10(9), 1810.
- Stall, W. M., ve Gilreath, J. P. (2002). Weed control in tomato. *Weed management in Florida fruits and vegetables*, 2003, 55-58.
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., ve Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Biophysical Journal*, 106(2), 695a.
- Sukno, S., Melero-Vara, J., ve Fernández-Martínez, J. (1999). Inheritance of resistance to *Orobanche cernua* Loeﬂ. in six sunflower lines. *Crop Science*, 39(3), 674-678.
- Swarbrick, P., Huang, K., Liu, G., Slate, J., Press, M., ve Scholes, J. (2008). Global patterns of gene expression in rice cultivars undergoing a susceptible or resistant interaction with the parasitic plant *Striga hermonthica*. *New Phytologist*, 179(2), 515-529.
- Tan, S., Evans, R. R., Dahmer, M. L., Singh, B. K., ve Shaner, D. L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61(3), 246-257.
- Tang, S., Heesacker, A., Kishore, V. K., Fernandez, A., Sadik, E. S., Cole, G., ve Knapp, S. J. (2003). Genetic mapping of the Or5 gene for resistance to *Orobanche* race E in sunflower. *Crop Science*, 43(3), 1021-1028.
- Teryokhin, E. S. (1997). *Weed Broomrapes: systematics, ontogenesis, biology, evolution*. Aufstieg-Verlag Landshut, Germany.
- Tester, M., ve Langridge, P. (2010). Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 327(5967), 818-822.
- Thorogood, C., Rumsey, F., ve Hiscock, S. (2009). Seed viability determination in parasitic broomrapes (*Orobanche* and *Phelipanche*) using fluorescein diacetate staining. *Weed research*, 49(5), 461-468.
- Timko, M. P., Huang, K., ve Lis, K. E. (2012). Host resistance and parasite virulence in *Striga*-host plant interactions: A shifting balance of power. *Weed Science*, 60(2), 307-315.
- Toker, C., Yadav, S. S., ve Solanki, I. (2007). Mutation breeding. *Lentil: an ancient crop for modern times*, 209-224.
- Tomato Genome Consortium, x. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635.
- Torres-Vera, R., García, J. M., Pozo, M. J., ve López-Ráez, J. A. (2016). Expression of molecular markers associated to defense signaling pathways and strigolactone biosynthesis during the early interaction tomato-*Phelipanche ramosa*. *Physiological and molecular plant pathology*, 94, 100-107.

- TÜİK. (2023). *Bitkisel Üretim İstatistikleri*. Retrieved 25 February 2024 from <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=Tarim-111>
- Twyford, A. D. (2018). Parasitic plants. *Current Biology*, 28(16), R857-R859.
- Uemura, M., ve Steponkus, P. (2003). Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, Cell ve Environment*, 26(7), 1083-1096.
- Vaidya, P., Raghavender, B., ve Mukuru, S. (1991). Progress in breeding resistance to *Striga asiatica* in sorghum at the ICRISAT center.
- Valderrama, M., Román, B., Satovic, Z., Rubiales, D., Cubero, J., ve Torres, A. (2004). Locating quantitative trait loci associated with *Orobanche crenata* resistance in pea. *Weed research*, 44(4), 323-328.
- Vogel, J. T., Walter, M. H., Giavalisco, P., Lytovchenko, A., Kohlen, W., Charnikhova, T., Simkin, A. J., Goulet, C., Strack, D., ve Bouwmeester, H. J. (2010). SICCD7 controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. *The Plant Journal*, 61(2), 300-311.
- Vogler, R., Ejeta, G., ve Butler, L. (1996). Inheritance of low production of *Striga* germination stimulant in sorghum. *Crop Science*, 36(5), 1185-1191.
- Wakabayashi, T., Hamana, M., Mori, A., Akiyama, R., Ueno, K., Osakabe, K., Osakabe, Y., Suzuki, H., Takikawa, H., ve Mizutani, M. (2019). Direct conversion of carlactonoic acid to orobanchol by cytochrome P450 CYP722C in strigolactone biosynthesis. *Science Advances*, 5(12), eaax9067.
- Wang, L., Wang, B., Yu, H., Guo, H., Lin, T., Kou, L., Wang, A., Shao, N., Ma, H., ve Xiong, G. (2020). Transcriptional regulation of strigolactone signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 583(7815), 277-281.
- Watling, J., ve Press, M. (2001). Impacts of infection by parasitic angiosperms on host photosynthesis. *Plant Biology*, 3(03), 244-250.
- Weese, T. L., ve Bohs, L. (2007). A three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (Solanaceae). *Systematic botany*, 32(2), 445-463.
- Westwood, J. H. (2013). The physiology of the established parasite–host association. In *Parasitic Orobanchaceae: Parasitic mechanisms and control strategies* (pp. 87-114). Springer.
- Williams, C. (1959). Resistance of sorghum to witchweed. *Nature*, 184(4697), 1511-1512.
- Wu, Z., Sun, S., Wang, F., ve Guo, D. (2011). Establishment of regeneration and transformation system of *Lycopersicon esculentum* microtom. *British Biotechnology Journal*, 1(3), 53-60.
- Ye, X., Zhang, M., Zhang, M., ve Ma, Y. (2020). Assessing the performance of maize (*Zea mays* L.) as trap crops for the management of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). *Agronomy*, 10(1), 100.
- Yokota, T., Sakai, H., Okuno, K., Yoneyama, K., ve Takeuchi, Y. (1998). Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. *Phytochemistry*, 49(7), 1967-1973.

- Yoneyama, K., Awad, A. A., Xie, X., Yoneyama, K., ve Takeuchi, Y. (2010). Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant and Cell Physiology*, 51(7), 1095-1103.
- Yoshida, S., Cui, S., Ichihashi, Y., ve Shirasu, K. (2016). The haustorium, a specialized invasive organ in parasitic plants. *Annual review of plant biology*, 67(1), 643-667.
- Zare, G., ve Dönmez, A. (2014). A new species of Orobanche (Orobanchaceae) from Turkey. *Phytotaxa*, 184(3), 148-154.
- Zermane, N., Souissi, T., Kroschel, J., ve Sikora, R. (2007). Biocontrol of broomrape (*Orobanche crenata* Forsk. and *Orobanche foetida* Poir.) by *Pseudomonas fluorescens* isolate Bf7-9 from the faba bean rhizosphere. *Biocontrol science and technology*, 17(5), 483-497.
- Zhou, X., Tan, Z., Zhou, Y., Guo, S., Sang, T., Wang, Y., ve Shu, S. (2022). Physiological mechanism of strigolactone enhancing tolerance to low light stress in cucumber seedlings. *BMC Plant Biology*, 22, 1-17.
- Zhou, X. R., Zhang, N. N., Zhao, Y. M., Dai, L., Xu, D. P., Xu, G. F., ve Tian, J. (2021). Distribution dynamics and roles of starch in non-photosynthetic vegetative organs of *Santalum album* Linn., a hemiparasitic tree. *Frontiers in plant science*, 11, 532537.
- Zwanenburg, B., Mwakaboko, A. S., Reizelman, A., Anilkumar, G., ve Sethumadhavan, D. (2009). Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(5), 478-491.

ÖZGEÇMİŞ

Esra ÇİĞNİTAŞ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2020-2024	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2017-2019	19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Samsun
Lisans 2005-2009	Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Erzurum

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırmacı 2019-Devam Ediyor	Tarım ve Orman Bakanlığı Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bitki Sağlığı Bölümü, Antalya
Mühendis 2010-2019	Tarım ve Orman Bakanlığı Ayancık İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Ziraat Yüksek Mühendisi, Ayancık, Sinop

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Cignitas, E., Basbagci, G., Sulu, G., & Kitiş, Y. E., (2024). Fusarium fujikuroi as a potential biocontrol agent of the parasitic weed Phelipanche aegyptiaca in tomato. *Journal of Phytopathology*, vol.172, no.3.
- 2- Cignitas, E., & Mennan, H. (2023). Weed Management Through Herbicide Application to Increase Flax (*Linum usitatissimum* L.) Straw Yield. *Turkish Journal of Weed Science*, 26(2), 98-105.
- 3- Başbağcı, G., Çiğnitaş, E., & Kitiş, Y. E. (2023). Batı Akdeniz Bölgesi Örtü Altı Domates Alanlarında Sorun Olan Canavar Otu (*Phelipanche* spp.) Türlerinden İzole Edilen Funguslar. *Turkish Journal of Weed Science*, 26(2), 106-113.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1- Çiğnitaş, E., Şimşek, C., Kitiş, Y. E., Pınar, H., Karabeniz, A., Kaba, A., ... Soylu, İ.(2024). *CRISPR/Cas9-Mediated modification of CCD7 gene enhances tomato resistance against Phelipanche spp.* . The 17th World Congress on Parasitic Plants (pp.38). Nara, Japan
- 2- Sülü, S.M. & Cignitas, E. (2023). Impact of Different Weed Management Methods on the Soil Bacterial Diversity in Sage. V. International Agricultural, Biological & Life Science Conference (AGBIOL) (Oral presentation). 18-20/09/2023. Edirne, Turkey.
- 3- Cignitas, E., Basbagci, G., Sulu, G. and Kitiş, Y.E. 2023. Molecular Identification of Fusarium spp. on infected broomrape (*Phelipanche* spp.) seeds. 2nd. International Molecular Plant Protection Congress (Oral Presentation). 15-18/05/2023. Bursa, Turkey
- 4- Şimşek, C., Soylu, İ., Pınar, H., Kaba, A., Karabeniz, A., Kitiş, Y. E., Çiğnitaş, E. Mutlu, N. (2023). Development of resistance against broomrape (*Orobanche* spp., *Phelipanche* spp.) using CRISPR/-cas9 technology in tomato (*Solanum lycopersicum*). 2nd International Molecular Plant Protection Congress (Oral Presentation). 15-18/05/2023. Bursa, Turkey
- 5- Kayıkci, H.C., Cignitas, E., Mutlu, N. (2023). The role of ncRNAs in Parasitic Plant Infection and Some Strategies of Struggling in Tomato Breeding. 2nd International Molecular Plant Protection Congress (Poster Presentation). 15-18/05/2023. Bursa, Turkey
- 6- Cignitas, E., Uysal, F., Beşen, T., Yüksel, K., & Kitiş, Y. E., (2023). Weed Vegetation in Cultivated Sage (*Salvia officinalis* l. and *Salvia fruticosa* mill.) in Türkiye: Diversity and Species Composition. Workshop of the European Weed Research Society (EWRS) Working Group Weed Vegetation and Biodiversity. (Oral Presentation). 10-12/05/2023. Prague, Czech Republic.
- 6- Çiğnitaş, E., & Kitiş, Y. E., (2023). Weeds Containing Pyrrolizidine Alkaloids and Their Effects . 1st International Conference on Scientific and Innovative Studies (pp.99-105). Konya, Turkey

7- Cignitas, E., & Kitis, Y.E. (2022). Comparison of the Effect of Tomato Root Extracts Obtained by Two Different Extraction Methods on The Germination of Broomrape at Four Different Temperature. 16th World Congress on Parasitic Plant. (Oral Presentation). 3-8/07/2022. Nairobi, Kenya.

8- Cignitas, E., & Kitis, Y.E. (2022). Molecular Identification of Phelipanche species from the western Mediterranean region of Türkiye. 19th European Weed Research Society Symposium (Oral Presentation). 20-23/06/2022 Athens, Greece.

9- Cignitas, E. & Mennan, H. (2019). Effects of Some Pre- and Post-Emergence Herbicides on Weeds in Fiber Flax. International Agricultural Sciences Congress (Oral Presentation). 30 June-07 July 2019 Budapest, Hungary.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1-Çiğnitaş, E., Şimşek, C., Kitiş, Y. E., Pınar, H., Karabeniz, A., Kaba, A., Soylu, İ., Mutlu, N. (2023). Gen Düzenleme Teknolojisi (CRISPR/Cas9) ile Elde Edilen Domates Genotiplerinin Canavar Otuna (Phelipanche spp.) Karşı Dayanıklılık Seviyelerinin Belirlenmesi. Türkiye Herboloji Kongresi (Sözlü sunum). 19-21 Ekim 2023.Şanlıurfa, Türkiye.

2- Pınar, H., Şimşek, C., Çiğnitaş, E., Kitiş, Y. E., Karabeniz, A., Kaba, A., Soylu, İ., Yiğit, M.A., Duruk, Z., Mutlu, N. (2023). Gen düzenleme teknolojisi (CRISPR/Cas9) ile domates ve patlıcanda herbisitlere ve Canavar Otuna (Phelipanche spp.) karşı dayanıklılığın geliştirilmesi. Türkiye Herboloji Kongresi (Sözlü sunum). 19- 21 Ekim 2023. Şanlıurfa, Türkiye.

3- Çiğnitaş, E., Uysal, G., Çalışkan, S. (2023). Meloidogyne incognita'nın Amaranthus albus L.'taki İlk Raporu. Türkiye Herboloji Kongresi (Poster sunum). 19-21 Ekim 2023. Şanlıurfa, Türkiye.

4- Çiğnitaş, E. & Başbağcı, G. (2023). Domateste Sorun Olan Mısırlı Canavar Otu (Phelipanche aegyptiaca Pers.) Mücadelesinde Trichoderma spp. Uygulaması. Türkiye Herboloji Kongresi (Poster sunum). 19-21 Ekim 2023. Şanlıurfa, Türkiye.

Kitap ve/veya Kitap Bölümleri

1-Çiğnitaş, E; Kitiş, Y.E. (2022). Yabancı Ot Yönetiminde Allelopatiden Yararlanma Olanakları. Ed: M.H.; P.F. Yabancı Ot Biliminde Güncel Konular. IKSAD International Publishing. Syf: 523-568.

Projeler

1-Proje Adı: “Örtü Altı Domates Üretiminde Sorun Olan Canavar Otu Türlerinde (Phelipanche spp.) Hastalık Oluşturan Fungal Etmenlerin Belirlenmesi ve Canavar Otuna Karşı Biyolojik Mücadele Potansiyellerinin Araştırılması”, Türkiye Bilimsel Araştırmalar Kurumu projesi (TÜBİTAK), 123O933, Araştırmacı, Devam ediyor.

2- Proje Adı: “Bazı Yabancı Ot Türlerinin *Phelipanche aegyptiaca* (Pers.) Pomel ve *Orobanche cumana* Wallr.'ya Karşı Allelopatik Etkisinin Araştırılması”, Türkiye Bilimsel Araştırmalar Kurumu projesi (TÜBİTAK), 124O134, Araştırmacı, Devam

ediyor.

3- Proje Adı: “Mısırlı Canavar Otuna (*Phelipanche aegyptiaca* (Pers.) Pomel) Karşı Bazı Yabancı Ot Türlerinin Biyo-herbisidal Etkilerinin Araştırılması”, Akdeniz Üniversitesi Normal Araştırma Projesi (NAP), FBA-2024-6597, Araştırmacı, Devam ediyor.

4- Proje Adı: “Domateste Gen Düzenleme Teknolojisi (CRISPR) Kullanılarak Canavar Otu (*Orobancha spp.*, *Phelipanche spp.*)’na Dayanıklı Anaç Geliştirilmesi”, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü ARGE Projesi (TAGEM-ARGE), TAGEM-21/AR-GE/02, Araştırmacı, Devam ediyor.

5- Proje Adı: “Adaçayı (*Salvia fructosa* Mill.)’da Sorun Olan Yabancı Otlar ve Mücadelesine Yönelik Araştırmalar”, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Projesi (TAGEM), TAGEM/BSAD/U/21/A2/P4/3967, Proje Lideri, Devam ediyor.

6- Gen Düzenleme Teknolojisi CRISPR ile Elde Edilen Domates Genotiplerinin Canavar Otuna *Phelipanche spp.* Karşı Dayanıklılık Durumlarının ve Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi, Akdeniz Üniversitesi Normal Araştırma Projesi (NAP), FBA-2022-5970, Araştırmacı, (2022-2024).

7- Proje Adı: “Keten Yetiştiriciliğini Geliştirme Projesi”. Bitkisel üretim Genel Müdürlüğü Projesi (BÜGEM), Uzman, (2017-2018).