

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**VAN İLİNDE BULUNAN *Cuscuta approximata* BAB.'NİN MOLEKÜLER
TANISININ YAPILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bernur ANLAYIŞ
Danışman: Prof. Dr. İlhan KAYA TEKBUDAK

VAN – 2024

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**VAN İLİNDE BULUNAN *Cuscuta approximata* BAB.'NİN MOLEKÜLER
TANISININ YAPILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bernur ANLAYIŞ

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
FYL-2023-10438 No'lu proje ile desteklenmiştir.

VAN – 2024

KABUL VE ONAY SAYFASI

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda **Prof. Dr. İlhan KAYA TEKBUDAK** danışmanlığında, **Bernur ANLAYIŞ** tarafından sunulan “**Van İlinde Bulunan *Cuscuta approximata* Bab.’nın Moleküler Tanısının Yapılması**” başlıklı bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 05/01/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. İlhan KAYA TEKBUDAK

İmza:

Üye: Doç. Dr. Mustafa USTA

İmza:

Üye: Doç. Dr. İbrahim DEMİR

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06/02/2024 tarih ve 7-2 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

.....
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Bernur ANLAYIŞ



ÖZET

VAN İLİNDE BULUNAN *Cuscuta approximata* BAB.'NİN MOLEKÜLER TANISININ YAPILMASI

ANLAYIŞ, Bernur

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhan KAYA TEKBUDAK

Ocak 2024, 43 sayfa

Cuscuta approximata Bab. (yonca küskütü) Türkiye’de yoğun olarak bulunmakta ve özellikle yonca üretim alanlarında ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır.

Bu çalışmada, Van ilinde 7 farklı bölgeden biriktirilen *C. approximata*’ya ait toplamda 19 popülasyon örneğinin moleküler tanılaması yapılmıştır. Çalışmada örneklerden izole edilen genomik DNA’lardan ITS bölgelerinin çoğaltılması amacıyla evrensel ITS4 ve ITS5 primerleri kullanılmıştır. Bu primerler yardımıyla, rDNA’da yer alan ITS1, 5,8S ve ITS2 bölgeleri PCR yoluyla çoğaltılmıştır. DNA dizilimi yapılan *C. approximata* türünün genom bilgileri farklı programlar (Geneious Software, CLC Main Workbench) kullanılarak analiz edilmiştir. Bu sonuçlar ile *Cuscuta approximata*’nın Van ilinde varlığı tespit edilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda ise Van ilinden toplanan örneklerin kendi içinde ve gen bankasında yer alan diğer izolatlar ile %97’den fazla benzerlik oluşturduğu tespit edilmiştir. Örneklerimizin filogenetik ilişkileri değerlendirildiğinde birbirleri ile yakın ilişkili olduğu görülmüştür. *C. approximata* örneklerinden elde edilen DNA dizileri Gen Bankası’na (NCBI) kaydedilerek dünyadaki diğer araştırmacıların kullanımına sunulmuştur.

Çalışmada, nrDNA ITS bölgesi uzunluğunun 682-716bp arasında olduğu belirlenmiştir. Popülasyonlarda, örnek toplanan alanlar arasında genetik farklılaşma olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; Van ilinde farklı alanlardan biriktirilen *C. approximata* adlı türün moleküler olarak tanılanması, tarımsal alanlardaki etkisini azaltmak için bazı mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: *Cuscuta approximata* bab., ITS, Moleküler tanılama

ABSTRACT

MOLECULAR DIAGNOSIS OF *Cuscuta approximata* BAB. FOUND IN VAN PROVINCE

ANLAYIS, Bernur

M.Sc. Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Ilhan KAYA TEKBUDAK

January 2024, 43 pages

Cuscuta approximata Bab. (alfalfa dodder) is abundant in Turkey and causes serious economic losses, especially in alfalfa production areas.

In this study, molecular identification of a total of 19 population samples of *C. approximata* collected from 7 different regions in Van province was performed. In the study, universal ITS4 and ITS5 primers were used to amplify ITS regions from genomic DNAs isolated from samples. With the help of these primers, the ITS1, 5.8S and ITS2 regions in the rDNA were amplified by PCR. Genome information of the *C. approximata* species, whose DNA was sequenced, was analyzed using different programs (Geneious Software, CLC Main Workbench). With these results, the presence of *C. approximata* in Van province was determined. As a result of bioinformatic analysis, it was determined that the samples collected from Van province had more than 97% similarity within themselves and with other isolates in the gene bank. When the phylogenetic relationships of our samples were evaluated, it was seen that they were closely related to each other. The DNA sequences obtained from *C. approximata* samples were registered in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Bank and made available to all researchers around the world.

In this study, it was determined that the length of the nrDNA ITS region varied between 682 and 716 bp base pairs. It has been determined that there is genetic differentiation between the areas where samples were collected in the populations. In conclusion, molecular identification of the species *C. approximata* collected from different areas in Van province will contribute to the development of some control methods to reduce its impact on agricultural areas.

Keywords: *Cuscuta approximata* bab., ITS, Molecular diagnostics



TEŐEKKÖR

Bu tez çalıőmasında, her tŒrlŒ ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. İlhan KAYA TEKBUDAK'a teőekkŒr ederim. Ayrıca çalışmamın laboratuvar çalıőmalarında, analiz aşamasında bŒyŒk desteğinden dolayı Dr. Őęr. Őyesi Mustafa USTA'ya ve bu sŒrete desteklerini esirgemeyen Azat SŒME'ye hayatımın ve çalışmamın her aşamasında beni destekleyen baőta annem ve babam olmak ũzere ailemin bŒtŒn ũyelerine teőekkŒrŒ borç bilirim. Ayrıca, alıőmaya FYL-2023-10438 proje ile mali destek sağlayan Van YYŒ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonuna teőekkŒrlerimi sunarım.

2024

Bernur ANLAYIŞ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1 Materyal.....	11
3.2 Yöntem	11
3.2.1 Van İlinde Yonca Üretim Alanlarından Toplanan <i>Cuscuta</i> <i>Approximata</i> Bab. Adlı Türe Ait Örneklerin Seçimi	12
3.2.2 <i>Cuscuta Approximata</i> Bab. Türünün Moleküler Tanılamasının Yapılması	12
3.2.2.1 <i>Cuscuta Approximata</i> Bab. Türünün Genomik DNA İzolasyonu	13
3.2.2.2 ITS Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması ve Elektroforez.....	14
3.2.2.3 Sanger Yöntemi ile Çift Yönlü Direk Dizileme Yapılması	16
3.2.2.4 DNA Dizilerinin Gen Bankasına Girilmesi	16
3.2.2.5 Çoklu Dizi Karşılaştırma (Alignment) Yapılması	16
3.2.2.6 Filogenetik Analizlerin Yapılması.....	17
4. BULGULAR.....	19
4.1 ITS Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması ve Elektroforez	19
4.2 Sanger Yöntemi ile Çift Yönlü Direk Dizileme Yapılması	20
4.3 DNA Dizilerinin Gen Bankasına Girilmesi.....	20
4.4 Filogenetik Analizlerin Yapılması	30
4.5 Çoklu Dizi Karşılaştırma (Alignment) Yapılması.....	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33

KAYNAKLAR.....	37
ÖZ GEÇMİŞ.....	43



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1	Van ilinde <i>Cuscuta approximata</i> Bab.'nın toplandığı alanlar ve örnek numaraları	12
Çizelge 3.2	PCR işlemi için kullanılan bileşenler ve miktarlarının hazırlanması.....	15
Çizelge 3.3	Küsküt türlerinin PCR ile araştırılmasında kullanılan sıcaklık döngüleri	15
Çizelge 4.1	<i>C. approximata</i> 'ya ait örnek numaraları, gen uzunlukları, gen bankası erişim numaraları	20
Çizelge 4.2	1 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	21
Çizelge 4.3	2 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	21
Çizelge 4.4	3 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	22
Çizelge 4.5	4 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	22
Çizelge 4.6	5 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	23
Çizelge 4.7	6 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	23
Çizelge 4.8	7 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	24
Çizelge 4.9	9 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	24
Çizelge 4.10	11 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	25
Çizelge 4.11	13 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	25
Çizelge 4.12	22 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	26

Çizelge 4.13	56 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	26
Çizelge 4.14	100 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	27
Çizelge 4.15	120 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	27
Çizelge 4.16	520 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	28
Çizelge 4.17	911 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	28
Çizelge 4.18	916 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	29
Çizelge 4.19	920 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	29
Çizelge 4.20	1778 numaralı <i>C. approximata</i> 'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi	30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1	<i>Cuscuta approximata</i> 'nın çiçek yapısı; 1, 2: çiçek, 3: çanak yapraklar (var. <i>approximata</i>), 4: çanak yapraklar (var. <i>macranthera</i>), 5: ovaryum, 6: taç yapraklar, 7: scale.....	3
Şekil 2.1	Tekrarlanabilen rRNA birimleri ve ITS bölgeleri.....	9
Şekil 3.1	Van ilinde <i>Cuscuta approximata</i> Bab. adlı türün toplandığı alanlar.....	11
Şekil 3.2	<i>Cuscuta approximata</i> Bab.'nın DNA izolasyon aşamaları	14
Şekil 3.3	<i>Cuscuta approximata</i> Bab.'ya ait örneklerin elektroforez cihazında koşturulması	16
Şekil 4.1	<i>Cuscuta approximata</i> 'nın 1, 7, 10, 12, 13, 56, 1778 numaralı örneklerine ait ITS bölgelerinin jel görüntüleri. M: Marker	19
Şekil 4.2	<i>Cuscuta approximata</i> 'nın 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 numaralı örneklerine ait ITS bölgelerinin jel görüntüleri. M: Marker	19
Şekil 4.3	Neighbor joining (Bootsrap: 1000) modeline göre <i>Cuscuta approximata</i> Bab. türüne ait filogenetik ağaç	31
Şekil 4.4	Pairwise identity yöntemine göre dizilerin yüzde benzerlik oranı	32



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamalarıyla aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
μ	Mikron
μ l	Mikrolitre
Bp	Baz çifti
°C	Santigrad
dk	Dakika
Gr	Gram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mg/ml	miligram/mililitre
ml	Mililitre
Mm	Milimetre
mM	Milimolar
Rpm	Dakikadaki döngü sayısı
Sn	Saniye
Kısaltmalar	Açıklama
A	Adenin
AMV	Alfaalfa Mozaik Virüs
C	Sitozin
CMV	Sitomegalovirüs
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleosid Trifosfat
ETOH	Etil Alkol / Etanol
G	Guanin
ITS	Internal Transcribed Spacer

Kısaltmalar

Açıklama

MP	Multiparamedik
NCBI	National Center For Biotechnolo İnförmatıon
NOR	Nükleolar Organizer Region
nrDNA	Nüklear Ribozomal DNA
nrRNA	Nüklear Ribozomal RNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rdna	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleikasit
spp	Alt Tür
T	Timin
Taq DNA Polimeraz	Termo Stabil DNA Polimeraz Enzimi
UV	Ultra Viyole

1. GİRİŞ

Cuscuta L. cinsi Convolvulaceae familyasında yer almaktadır (Yuncker, 1932; Kuijt, 1969; Parker ve Riches, 1993; Liao vd., 2000).

Dünya çapında parazit bitkiler arasında tarım ürünlerine verdiği ekonomik kayıplar açısından *Cuscuta*, *Striga* ve *Orobanche*'den sonra gelmektedir. Bu cinsin 16 türü istilacı olup, dünya çapında çok sayıda tarım ürününde verim kayıplarına neden olmaktadır (Parker ve Riches 1993; Dawson vd., 1994; Costea ve Tardif, 2006).

Sistematik açıdan *Cuscuta* cinsi, sorunlu parazit gruplarından biri olarak kabul edilir. Bu cinse ilişkin son detaylı çalışmalar 90 yıl önce Yuncker tarafından gerçekleştirilmiştir (Yuncker, 1932). Engelmann (1859)'dan sonra Yuncker (1932) *Cuscuta* cinsini üç alt cins (*Cuscuta*, *Grammica* ve *Monogynella*) şeklinde gruplandırmıştır (Garcia ve Martin, 2007).

Anavatanı Akdeniz ve Orta Asya olan ve ilk defa Babington tarafından tanımlanan (Yuncker, 1932, Nemli vd., 2010) yonca küskütünün (*Cuscuta approximata* Bab.) sistematikteki yeri şu şekildedir (Davis, 1978; Uluğ vd., 1993; Seçmen vd., 2008);

Bölüm: Magnoliophyta (Angiospermae)

Altbölüm: Spermatophyta

Sınıf: Magnoliopsida (Dicotyledonae)

Altsınıf: Asteridae

Takım: Solanales

Familiya: Cuscutaceae

Cins: *Cuscuta* L.

Tür: *Cuscuta approximata* Bab.

Küsküt tohumunun toprakta kalma süresi oldukça uzun olduğundan kontrolü zordur. Parazit olarak yaşadığı için kültür bitkilerinin gelişiminin zayıflamasına, durmasına, hatta ölmesine sebep olur. Parazitlediği çevreleyerek güneşlenme, havalandırma, gelişim ve büyüme gibi faaliyetlerini engeller.

Küsküt bitkisi genellikle 3.000 ile 25.000 arasında tohum içerir ve olgunlaşan tohumların bazıları yere düşerek çimlenir. Bu cinse ait türlerin birçoğu çimlenme gücünü kaybetmeden toprak yüzeyinde 5-15 yıl kadar hareketsiz kalır ve uygun koşullar sağlandığında çimlenir. Küsküt tohumları optimum 15 ila 38 °C arasındaki sıcaklıklarda

çimlenir (Hutchison ve Ashton, 1979). Çimlenip toprak yüzeyine çıkan tohumlar temel kök salarak toprak yüzeyinde sürgün oluşturur ve sürgün çevresindeki bitkiye temas ederek konukçu bitki ile kaynaşır, emeçlerini bitkinin gövdesine daldırır, daha sonra kök kaybolur ve küsküt konukçu bitki gövdesinden beslenerek gelişimine devam eder. Bu bitki tutunduğu kültür bitkisini zayıflatarak önemli düzeyde ürünün verim ve kalitesinin düşmesine neden olur (Uygur, 1991). Küskütün uzantıları topraktan çıktığında konukçu bir bitki ile bağlantı kuramazsa, 1-5 hafta süresince toprakta canlı fakat hareketsiz kalır ve sonra ölürlür. Küsküt diastaz enzimi salgılayarak etrafını sardığı bitkide nişastanın parçalanmasına sebep olur (Kadıoğlu, 1992). Bununla birlikte *Cuscuta* cinsine ait bazı türler bazı virüs türlerinin sağlıklı bitkilere taşınmasında görev alırlar (Çalı vd., 1993).

Yabancı otlarla mücadelenin ilk adımı bu bitkilerin teşhislerinin doğru yapılmasıdır. Yabancı otların genç gelişme dönemleri mücadele yöntemlerine en duyarlı olduğu dönemdedir. Bu sebeple yabancı otları gelişimlerinin ilk aşamasında tanımak, kontrol yöntemlerinin seçilmesine destek olur (Carey vd., 1993).

Kültür bitkilerinin verimini arttırmanın bir yolu da günümüz bitki koruma yöntemleri kapsamında yabancı otlarla mücadele edilebilmesidir. Bu amaçla yabancı otların biyolojisinin, ekolojik isteklerinin, ekonomik fayda ve zararlarının, mücadele yöntemlerinin, kültür bitkileriyle etkileşimlerinin yanında popülasyonların yaygınlık ve yoğunluk seviyelerinin de bilinmesi gerekmektedir (Ekim ve Akman, 1993; Özer, 1993; Özer vd., 1998; Türe ve Köse, 2000).

Cuscuta spp. ılıman, yarı tropik ortamları tercih eder ve tohumları dinlenmeye girer. Sıcaklık ve ışık yalnızca çimlenme ve fide gelişme dönemleri için gereklidir. Fakat parazitlik dönemindeki önemi bilinmemektedir.

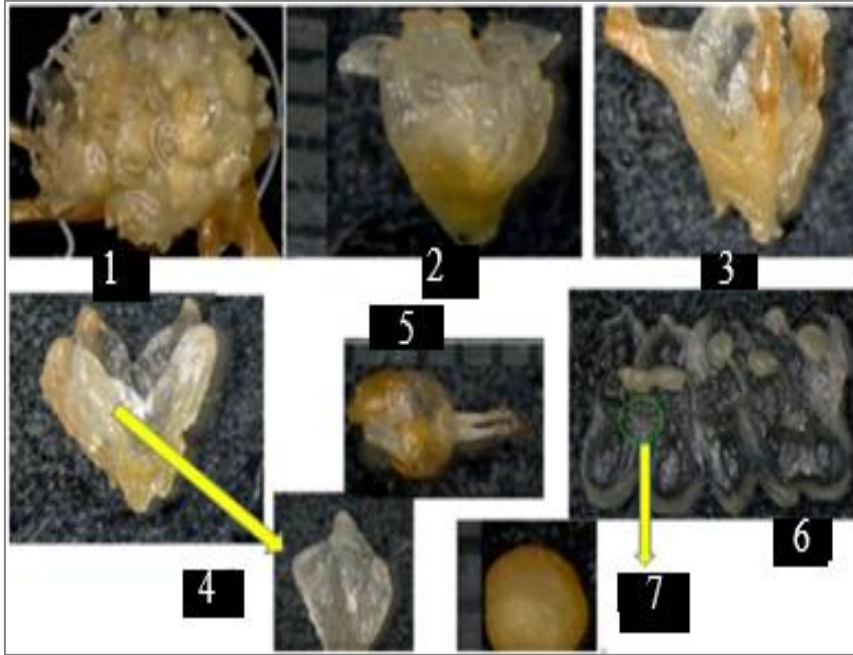
Küsküt ile kontrol teknikleri içerisinde bulaşma ve yayılmayı engelleyici tedbirlerin alınması; elle yolma, yakma, derin sürüm gibi mekanik savaş uygulaması, konukçusu olmayan bitkilerin münavebe programına dahil edilmesi, geç dikim, dayanıklı kültür bitkisi yetiştirme, biyolojik savaş ve kimyasal savaş gibi kontrol yöntemleri yer almaktadır.

Küskütle en önemli mücadele yöntemlerinden biri, bulaşmayı önlemek için sertifikalı temiz tohum kullanmaktır. *Cuscuta* cinsine ait türlerin temiz alanlara suyla taşınmasını engellemek için, küskütle bulaşık alanlardan geçen su ile temiz alanlar sulanmamalıdır. Bu parazit bitki ile bulaşık tarlalarda hayvanlar otlatıldığı zaman,

tohumlar hayvanların sindirim sisteminde canlılıklarını korurlar. Bu sebeple bulaşık tarlalarda hayvanlar otlatılmamalı ve hayvanlara yedirilen çiftlik gübreleri iyi fermente edilmiş olmalıdır. Kullanılan alet ve ekipmanların temizliğine dikkat edilmesi de mücadele açısından oldukça önemlidir (Tepe vd., 1997; Lanini ve Kogan, 2005).

Cuscuta approximata Bab. (yonca küskütü) Türkiye’de yonca alanlarında en yoğun rastlanan türdür. Bununla beraber *Cuscuta campestris* Yuncker (tarla küskütü) adlı tür de yonca üretim alanlarında problem oluşturmaktadır.

Yonca küskütünün tohumları soluk pembe veya gri renktedir ve tohumların köşeleri belirgin ve yaklaşık 1.1mm uzunluğunda, 0.9mm genişliğindedir. Tohumun etrafı beyaz bir çizgi ile çevrilidir (Kadioğlu, 1992). *C. approximata* yapraksız, ince, ipliksi yapıda sarılıcı gövdeye sahiptir. Çiçekler küçük ve kimoza çiçek durumundadır. Taç yapraklar bileşik olup genellikle beş parçalı, nadiren dört veya üç parçalıdır. Ovaryum iki bölmeden (karpel) oluşur ve her bölme de tohum taslağı bulunur. İki dişicik sapı vardır ve dişicik tepesi uzundur. Erkek organları petal tüpüne bitişiktir ve çoğu türde erkek organların altında "staminal brakte" adı verilen pulsu yaprakçıklar yer alır. Bitkinin meyvesi kapsül şeklinde, tohum kotiledonları yapraksız ya da iz şeklinde, embriyo ise iplik şeklindedir (Nemli, 1978) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 *Cuscuta approximata*'nın çiçek yapısı; 1, 2: çiçek, 3: çanak yapraklar (var. *approximata*), 4: çanak yapraklar (var. *macranthera*), 5: ovaryum, 6: taç yapraklar, 7:scale (Demir, 2016)

Popülasyon genetiği, bir canlı grubunda mevcut bireyler arasındaki benzerlik ve farklılıkların nedenlerini inceleyen bir bilim dalı olarak bilinmektedir. Bir popülasyonun benzerlik ve farklılıkları biliniyorsa bunların sonraki nesillere nasıl aktarıldığı da anlaşılabilir (Şimşek, 1993).

C. approximata Türkiye genelinde özellikle de Doğu Anadolu Bölgesi'nde yonca üretim alanlarında ciddi verim kayıplarına sebep olmaktadır.

Çalışmanın amacı;

A) Van ilinde yonca üretim alanlarından toplanan *Cuscuta approximata* Bab. adlı türe ait örneklerin seçimi.

B) Ribozomal DNA'lar üzerinde bulunan ITS (Baldwin, 1992) dizileri kullanılarak *C. approximata* türlerinin korunmuş bölgelerine ait DNA sekanslarının tespit edilmesiyle Van ilinde ki bu türün moleküler tanılanmasının yapılması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Küsküt (*Cuscuta* spp.) genellikle yonca, domates, patates ve şeker pancarında önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu bitkinin tohumlarını, yonca ve keten tohumlarından uzaklaştırmak kolay değildir (Parker ve Riches, 1993). Küskütün patates, domates ve şekerpancarında da parazit olarak yaşadığı Lübnan'da yapılan bir çalışmada belirlenmiştir (Haidar ve Bibi, 1995).

İran'da 1983-1986 yılları arasında yürütülen bir çalışmada, en düşük bulaşma oranına sulama kanallarıyla 120 adet/ha, en yüksek bulaşma oranına ise 10 milyon adet/ha ile hayvan yeminde rastlanmıştır (Dastgheib, 2006).

Yürütülen çalışmalar da küskütün üzerinde parazit olarak yaşadığı bitkileri çoğunlukla fide aşamasında veya gelişimlerinin ilk dönemlerinde yakaladığı belirlenmiştir. Bu evrede küsküt iplikleri fidenin etrafını tamamen sararak, fidenin zayıf gelişmesine neden olur ve bitki çiçek ve meyve vermeden ölür (Nemli, 1989).

Önemli verim kayıplarına neden olan *Orobanche*, *Striga* ve *Cuscuta* cinslerine ait bitkiler çimlenebilmek için konukçuya ihtiyaç duymazlar (Vail vd., 1990; Benvenuti vd., 2005; Dawson vd., 1994).

Hutchisan ve Ashton (1979) yaptıkları bir çalışmada, küsküt tohumlarının 15 ile 38 °C'lik toprak sıcaklığında çimlendiğini ve ortalama çimlenme sıcaklıklarının ise 30 °C olduğunu belirlemişlerdir.

Yapılan bir çalışmada küskütün özellikle yoncada sorun oluşturduğu ve yoncanın besin maddelerine olarak bitkiyi doğrudan zayıflattığı belirtilmiştir (Reynolds, 2006).

Küsküt sulama kanallarında birikerek yoğun tarım yapılan alanlarda daha fazla yayılma olanağı bulur. Aynı zamanda bu bitki, pirinç dahil birçok konukçu aralığına sahiptir. Bununla beraber küsküt çok sayıda tıbbi bitkiyi de parazitlemektedir (Jayasinghe vd., 2004).

Hindistan'da ekili ve nadasa bırakılmış alanlarda küskütün mücadelesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, *Cuscuta* cinsine ait türlerin önemli verim kayıplarına neden olduğu belirlenmiştir (Kondap ve Kumar, 1993).

Van'da yonca üretim alanlarında *C. approximata*'nın dağılımı ve yoğunluğunun belirlenmesine yönelik olarak yapılan bir araştırmada, yonca üretim alanlarının önemli bir kısmının küskülle bulaşık olduğu tespit edilmiştir (Yıldırım ve Tepe, 2021).

Güney Avustralya'da gerçekleştirilen bir araştırmada, küsküt tohumlarının olgunlaşıp bazı hayvanlar tarafından tüketildiğinde bu hayvanların midelerinde deformasyona uğramadan hayvanların dışkıları ile beraber toprağa geri aktarıldığı belirlenmiştir (Anonim, 2005).

Cuscuta cinsine ait türlerin tohumları kışı toprakta veya hayvan gübresi içerisinde geçirmektedir. Küskütün gövdesinin tamamı kış donlarından zarar görmez. İlbaharda uygun koşullarda ölmeyen bitki gövdeleri ve tohumları yeniden gelişmeye başlar. Bu bitki tarlaya, küskütle bulaşık yonca tohumu ekilerek, bulaşık otlarla, insan ve küskütle bulaşık yonca ile beslenen hayvanların gübresi ile ve aynı zamanda sulama suyu ile taşınmaktadır (Anonim, 2009).

Cuscuta tohumları ile ilgili yürütölen bir araştırmada, tavuk gübresi ve solarizasyonun küsküt tohumlarının canlılığını yitirme etkinliğini ölçmek amacıyla ilk olarak 0-5 cm toprak derinliğinde malçlama yöntemi ile solarizasyon yapılmış ve sonuç olarak; küsküt tohumlarının 6 hafta 10'ar dakikalık solarizasyon uygulaması sonrasında canlılıklarını kaybettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, tek başına tavuk gübresi kullanımının toprak sıcaklığında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı ve bu gübrenin küsküt tohumlarını öldürmediği belirlenmiştir (Haidar ve vd., 1999).

Hull (2022) yaptığı bir çalışmada, CMV ve TMV virüslerinin küsküt yoluyla sağlıklı bitkilere bulaştığını deneysel olarak tespit etmiştir.

Tepe vd. (1997), yerli ve hibrit yonca çeşitlerinin küsküte dayanıklı olup olmadığını; varsa bölgeye hangi çeşitlerin önerilebileceğini tespit etmek amacı ile yürüttükleri çalışmada, *C. approximata*'nın tüm çeşitlere kolaylıkla bağlanıp parazitleyebildiğini, ancak hızlı gelişen çeşitlere daha az zarar verdiğini belirlemişlerdir

Bitki moleküler çalışmaları son 25 yılda hızla gelişim göstermiştir (Wen vd., 1997; Kellog, 1998). Bu gelişim ile beraber dizi analizlerinin kullanılması (Ro vd., 1997) moleküler sistematik için önemli destek sağlamıştır. Dizi analizi yöntemleri, canlıların coğrafi kökenlerinin belirlenmesinden (Allan vd., 2004), organizmaların filogenilerinin moleküler olarak kanıtlanmasına kadar birçok alanda kullanılmaktadır (Cohen ve Weydmann, 2005; Ogden ve Whiting, 2005)

1960'lı yıllara kadar sistematik bilgiler morfolojik ve davranışsal farklılıklara bağlı olarak belirlenmiştir. Biyolojik makromoleküller 1960'lı yıllardan sonra önemli evrimsel ve sistematik roller üstlenmiştir (Soltis vd., 1997).

Filogenetik tahmin, kladistik ve nükleotit dizileme tekniklerinin mevcut olması nedeniyle makro ve mikro evrimsel çalışmalar için önemlidir (Castelloe ve Templeton, 1994; Vogler ve DeSalle, 1994). Son on yıl boyunca araştırmaların bir kısmında, nükleer ve organel genomların çeşitli moleküler markırları kullanılarak filogeniye odaklanılmıştır (Avisse, 1994). nrDNA'nın ITS dizileri, yakından ilişkili angiosperm turleri arasındaki filogenetik ilişkileri çözmek için (Pandey ve Ali, 2006), bitkisel materyallerin moleküler kimlik doğrulaması (Zhang vd., 2007), genetik çeşitlilik değerlendirmesi (Mondini vd., 2009), spesifik varyasyon çalışması (Haque vd., 2009) ve DNA barkodu (Zuo vd., 2011) yaygın olarak kullanılmıştır. nrDNA bölgesi filogenetik olarak bilgilendirici özelliğe sahiptir (Baldwin vd., 1995).

Ekolojik çalışmalar, genetik ilişkiyi belirlerken ve ayrıca hedef bitki turleri için koruma programlarına yol gösterirken gereklidir (Anikster ve Noy-Meir, 1991). DNA'ya dayalı moleküler markırlar, hem bitki turleri içindeki genetik çeşitliliği ölçmek hem de yakından ilişkili genotipleri tanımlamak ve karakterize etmek için özellikle faydalıdır (Jasieniuk ve Maxwell, 2001).

Moleküler biyolojide kullanılan yeni yöntemler türe özgü gen bölgelerinin tespitiyle beraber, bitki türlerinin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Bu nedenle rDNA'nın ITS bölgeleri bitkilerde moleküler sistematik ile ilgili çalışmalar da yoğun olarak kullanılan uygulamalardan biridir (Baldwin vd., 1995).

rDNA bölgeleri; küçük alt birim 18S rDNA, 5.8S rDNA ve büyük alt birim 28S rDNA olmak üzere 3 bölümden oluşmaktadır. 18S rDNA yüksek oranda korunmuş DNA bölgelerinden biridir. Bu bölgeler alem, şube ve sınıf düzeyindeki filogenetik çalışmaların yeniden yapılandırılmasında kullanılmaktadır. 5.8S rDNA bölgesi, rDNA en küçük uzunluğa sahip olan bölgedir. Bu bölgenin baz uzunluğunun istenilen büyüklükte (163-164 baz çifti) olmaması nedeniyle filogenetik çalışmalarda tek başına kullanılmamaktadır. 28S rDNA bölgesi en uzun bölge olup, baz içeriği bakımından daha fazla çeşitliliğe sahiptir. (Baldwin, 1992).

DNA'nın oldukça konservatif genlere sahip olması ve ITS bölgeleri arasında yer alması kullanım avantajı sağlamaktadır (Baldwin vd., 1995).

ITS bölgeleri son yıllarda yaygın olarak kullanılan bir bölgedir (Baldwin vd., 1999). Bu tarz çalışmalarla, taksonların nrDNA ITS bölgeleri çoğaltılıp baz polimorfizmi incelenerek taksonlar içindeki akrabalık dereceleri tespit edilebilmektedir. Son zamanlar

da bitkilerin teşhisinde morfolojik özelliklerin yanında moleküler verilerin de kullanımı artmıştır (Mummenhoff vd., 1997).

ITS baz sıralarının incelenmesiyle varılan sonuçlar, taksonomik kategoriler de var olan problemlerin çözümü açısından ciddi katkılar sağlar. Genellikle taksonların ITS varyasyonları incelenerek ilgili taksonların akrabalıkları tespit edilmeye çalışılmaktadır. (Baldwin vd., 1995). ITS, geniş bir bitki yelpazesinde cins ve tür düzeyinde çok sayıda sistematik çalışmada kullanılmıştır. ITS-1 ve ITS-2 olmak üzere iki iç boşluk, 5.8S, 18S ve 26S nükleer ribozomal RNA (nrRNA) alt birimlerini kodlayan genler içerisinde bulunur. ITS-1 ve ITS-2 ortalama 300 baz çifti uzunluğunda iken, 5.8S alt biriminin uzunluğu kapalı tohumlularda sabittir ve 163-164 baz çifti uzunluğuna sahiptir (Baldwin, 1992).

ITS'nin amplifikasyonu ve sekanslanması için evrensel primerler kullanılabilir. Primerler başlangıçta fungal rRNA amplifikasyonu için tasarlanmıştır ve mantar (*Saccharomyces*), böcek (*Drosophila*) ve bitki (*Oryza sativa* ve *Hordeum vulgare*) dizilerinden köken almıştır (White vd., 1990).

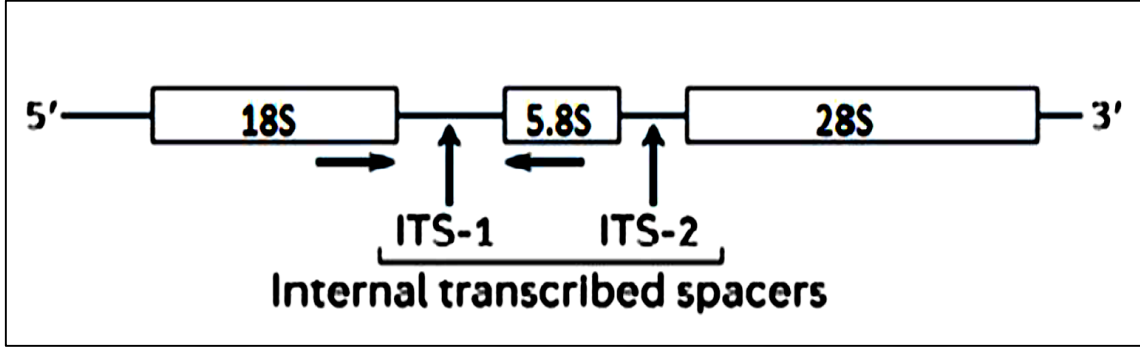
ITS Bölgesinin Özellikleri;

- Filogenetiğin yeniden yapılanmasında uygun veri sağlayacak yeterli boyuta sahiptir (600–700bp).
- Genomik DNA üzerinde yüksek tekrarlama özelliği gösterir.
- Cins ve tür düzeyinde filogenetik olarak dağılmış DNA içerikleri hakkında net bilgiler sağlar.
- rDNA gen bölgelerine oranla daha hızlı nükleotid baz değişiklikleri gösterir.
- ITS1 ve ITS2 bölgeleri farklı seviyelerde filogenetik veri sağlar. Bu bölgeler temel alınarak yapılan analizlerde ITS1 sonuçları daha yoğun filogenetik çözüm sunmakta ve nükleotid içeriği ITS2'ye göre %29 oranında daha fazla değişkenlik göstermektedir.
- rDNA'nın 18S, 5.8S ve 26S alt birimlerinin oluşumunda rol oynar (Baldwin vd., 1995).

Ökaryotik canlılarda 5.8S gen bölgesi sıklıkla ITS bölgeleriyle beraber incelenir.

Genomik DNA üzerindeki rDNA bölgeleri sıralı olarak tekrarlanan diziler halindedir ve birden fazla gen yapısından meydana gelir. rDNA tekrarları; genomik DNA'nın NOR (nükleolar organizasyon bölgesi) bölgelerinde yerleşmiş ve 18S küçük alt

birim, 5.8S ve 28S büyük alt birim rDNA'ları kodlayan genlerden oluşur. Bu bölge rDNA'nın alt birimleri tarafından kopyalanır ve korunmuş bölgeleri (18S, 5.8S ve 28S) birbirinden ayıran iki bölümden (ITS1 ve ITS2) oluşur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Tekrarlanabilen rRNA birimleri ve ITS bölgeleri (Underhill ve Iliev, 2014)

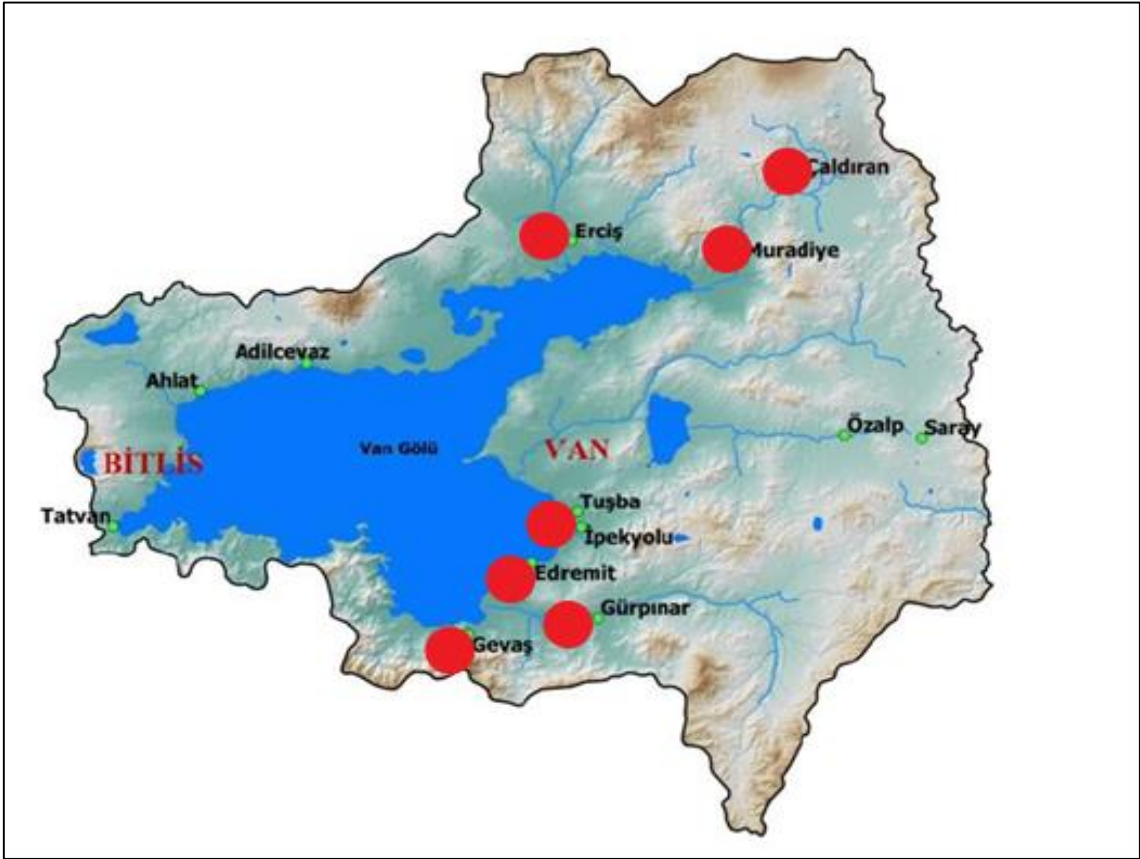
Birçok canlının teşhisi yapılırken DNA sekanslarının öncelikli kullanımının önemi artmakta ve bu sekanslar türlere ait genetik barkodlar olarak tanımlanmaktadır (Hebert vd., 2003, Savolainen vd., 2005). DNA sekanslarının öncelikli bilgi kaynağı olarak kullanılması, yapılan morfolojik teşhise göre çok sayıda avantaj sağlar. Bu avantajlar: i) fenotipik kaynaklı problemlerin yanlış teşhise yol açması, ii) morfolojik olarak belirlenmesi zor olan taksonların tespiti, iii) morfolojik teşhislerde kullanılan anahtarların incelenen özellik açısından belirli bir döneme ya da cinsiyete ait olması ve iv) bu anahtarların yorumlanmasında çok iyi bir deneyime gereksinim duyulmasıdır (Hebert vd., 2003).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Van ili yonca alanlarında yayılış gösteren *Cuscuta approximata* Bab. adlı parazit bitki çalışmanın materyalini oluşturmaktadır.



Şekil 3.1 Van ilinde *Cuscuta approximata* Bab. adlı türün toplandığı alanlar

3.2 Yöntem

Projede öngörülen çalışmalar iki ana başlık altında incelenmiştir.

- Van ilinde yonca üretim alanlarından toplanan *Cuscuta approximata* Bab. adlı türe ait örneklerin seçimi.
- Cuscuta approximata* Bab. türünün moleküler tanılamasının yapılması

3.2.1 Van İlinde Yonca Üretim Alanlarından Toplanan *Cuscuta Approximata* Bab. Adlı Türe Ait Örneklerin Seçimi

Van ili yonca üretiminin yoğun olarak yapıldığı alanlardan daha önceden toplanan *C. approximata* türüne ait 19 bitki örneği seçilmiş ve bu bitkiler üzerinde moleküler çalışmalar yürütülmüştür. Toplanan örnekler ve toplandığı alanlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Van ilinde *Cuscuta approximata* Bab.’nın toplandığı alanlar ve örnek numaraları

İçeler	Örnek numarası
Van-Merkez, Otluca Köyü	1
Van-Gürpınar, Sevindik Köyü	2
Van-Erciş, Çobandüzü Köyü	3
Van-Erciş, Merkez	4
Van-Muradiye	5
Van, Muradiye-Çaldıran Yolu	6
Van-Gürpınar, Parmakkapı Köyü	7
Van-Muradiye, Yenişehir Mahallesi	9
Van-Gevaş, Merkez	11
Van-Bostaniçi	13
Van-Mollakasım	22
Van-Çaldıran, Yukarı Çanak Köyü	56
Van-Edremit, Köprüler Köyü	100
Van-Muradiye, Açıkoy Köyü	120
Van-Gevaş	520
Van-Erciş, Kocapınar Köyü	911
Van-Gürpınar, Otbiçer Köyü	916
Van-Edremit, Köprüler Köyü	920
Van-Gürpınar, Hoşap	1778

3.2.2 *Cuscuta Approximata* Bab. Türünün Moleküler Tanılamasının Yapılması

Bu aşamada sırasıyla uygulanan yöntemler;

- 1) *Cuscuta approximata* Bab. türünün genomik DNA izolasyonu,
- 2) ITS bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve elektroforez,
- 3) Sanger yöntemi ile çift yönlü direk dizileme yapılması,
- 4) DNA dizilerinin gen bankasına girilmesi,
- 5) Çoklu dizi karşılaştırma (alignment) yapılması,
- 6) Filogenetik analizlerin yapılması.

3.2.2.1 *Cuscuta Approximata* Bab. Türünün Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için daha önceden toplanmış ve herbaryum örneği haline getirilmiş örneklerin gövde dokuları kullanılmıştır. Mevcut çalışmanın ana materyalini teşkil eden bitki DNA'larının izole edilmesinde Thermo firmasına ait DNA izolasyon kitinden faydalanılmıştır. Her bir örneği temsil edecek şekilde bitki örneğinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Herbaryum örneği haline getirilmiş bitkilerin gövde dokularından 0,10 gr tartılarak havan içerisinde öğütülmüştür. Üzerine 500 mikrolitre Lysis Buffer A ilave edilmiş ve 1.5 mililitrelik mikro tüp içerisine 10-30 miligram (mg) arasında ezilmiş bitki dokusu transfer edilmiştir. Bu tüplerin üzerine 50 mikrolitre Lysis Buffer B ve 20 mikrolitre RNAase eklenip 1 dakika boyunca vortekslenmiştir. Daha sonra 65 °C'de 10 dakika boyunca shaking water bath ile inkübe edilmiş ve inkübasyon süresince ara sıra tüpler ters düz edilmiştir. Örneklerin üzerine 130 µl protein çökeltme solüsyonu ilave edilmiştir. Tüplerdeki solüsyon vortekslenerek iyice karıştırılmış ve 5 dakika buz içerisinde soğutulmuştur. Ardından 5 dakika boyunca 14.000 rpm devirde santrifüj edilmiştir. Hazırladığımız karışımdan 550 mikrolitre temiz tüplere aktarılmış, tüplerin üzerine 400 mikrolitre bitki DNA bağlama solüsyonu ve 400 mikrolitre %96'lık etanol eklenmiştir. Hazırlanan karışımdan 600-700 mikrolitre spin kolon tüplerine aktarılmıştır. Bu karışım 50 kere ters yüz edilmiş ve elde edilen karışım örnekleri 1 dakika süreyle 8.000 rpm devirde santrifüj edilmiştir. Bu aşamada DNA'nın rengi kapalı beyaz bir renkten açık yeşil bir renk aralığına kadar değişmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıp tüpler kâğıt bir havlu üzerine konarak sıvının süzülmesi sağlanmıştır. Tüplerdeki pelletin üzerine 500 µl yıkama bufferı 1 ilave edilip DNA pelletlerini yıkamak için tüpler birkaç defa ters yüz edilmiştir. Tüpler, 1 dakika süreyle 10.000 rpm devirde santrifüj edilip alttaki sıvı dökülerek etanol uzaklaştırılmıştır. Tüplerdeki pelletin üzerine 500 µl yıkama bufferı 2 ilave edilip, DNA pelletlerini yıkamak için tüpler birkaç defa ters yüz edilmiştir. Tüpler 3 dakika süreyle 14.000 rpm devirde tekrar santrifüj edilip alttaki sıvı dökülerek etanol uzaklaştırılmıştır. Altaki akışkan sıvı atılmış, üstteki DNA pelleti 1.5 ml'lik yeni tüplerin içine konulmuştur. Üzerine 100 ml yıkama buffırı eklenmiş ve üstteki küçük tüp atılmıştır. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilen sıvı 2 dakika 12.000 rpm de santrifüj yapılarak DNA elde edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 *Cuscuta approximata* Bab.'nın DNA izolasyon aşamaları

3.2.2.2 ITS Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması ve Elektroforez

İzole edilmiş genomik DNA'lardan ITS bölgelerinin çoğaltılması için evrensel ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ve ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAA CAAG G-3') primerleri kullanılmıştır. Bu primerler yardımıyla, rDNA'da yer alan ITS1, 5,8S ve ITS2 bölgeleri PCR yoluyla çoğaltılmıştır. Çift zincirli DNA üzerinden bu bölgelerin çoğaltılması 200 µl'lik tüplerde; 10X'lik reaksiyon tamponundan 3 µl, 2,5 mM MgCl₂'den 3 µl, 0,25 mM dNTP'den 5'er µl, 50 ng/µl her bir primerden 1 µl, 1 ünite Taq

DNA polimeraz (Promega) ve yaklaşık olarak 50-100 ng genomik DNA'dan 2 µl içeren karışım distile su ile 50 µl son hacme tamamlanarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 PCR işlemi için kullanılan bileşenler ve miktarlarının hazırlanması

PCR Bileşenleri	Miktar (µl)
10x PCR buffer	5 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
ITS-4	1 µl
ITS-5	1 µl
Taq DNA polimeraz	0.4 µl
Kalıp DNA	2 µl
Su	36,6 µl
Toplam	50 µl

Hazırlanan PCR karışımına aşağıda verilen sıcaklık döngüsü 36 termal döngü şeklinde uygulanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Küsküt türlerinin PCR ile araştırılmasında kullanılan sıcaklık döngüleri

94 °C'de2 dk DNA çift zincirinin ayrılması	} Toplam 36 döngü
94 °C'de.....1 dk DNA çift zincirinin ayrılması	
55 °C'de.....1 dk primerlerin bağlanması	
72 °C'de.....2 dk DNA sentezi	
72 °C'de.....10 dk son uzama	

PCR uygulamaları Eppendorf MaterCycler cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR sonrası elde edilen ürünler % 1.5-2'lik agaroz jelde koşturulmuştur. Elektroforez işlemi sonunda elde edilen jel uygun bir kap içerisinde 100 ml steril saf su ve 30 µl EtBr (0.5 µg/ml) solüsyonunda 20 dakika süreyle sallayıcı platform üzerinde boyanmıştır (Sambrook vd., 1989). Ardından jelde boyanan DNA'yı görünür hale getirmek amacı ile jel görüntüleme ve analiz sisteminde görüntülenmiştir.



Şekil 3.3 *Cuscuta approximata* Bab.'ya ait örneklerin elektroforez cihazında koşturulması

3.2.2.3 Sanger Yöntemi ile Çift Yönlü Direk Dizileme Yapılması

ITS bölgesinin Sanger yöntemiyle çift yönlü dizilemesi MSM A.Ş. firmasına yaptırılmıştır.

3.2.2.4 DNA Dizilerinin Gen Bankasına Girilmesi

DNA dizilemesi yapılan *C. approximata* türüne ait genom bilgileri CLC Main Work Bench V.20 programında Clustal W programı ile analiz edilmiştir. DNA dizilemesi sonrasında Gen Bankasında araştırılması BLAST programı ile gerçekleştirilmiştir. Farklı alanlardan alınan *C. approximata* türüne ait örneklerden elde edilen DNA dizileri, National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gen bankasına kayıtları yapılarak dünyadaki tüm araştırmacıların kullanımına sunulmuştur.

3.2.2.5 Çoklu Dizi Karşılaştırma (Alignment) Yapılması

Van ilinde 19 farklı alandan alınan ve DNA dizilemesi yapılan *C. approximata* bitkilerinden elde edilen genom verileri kullanılarak CLC Main Work Bench V.20 programında Clustal W ile çoklu diziler hizalanmış ve nükleotit asit dizileri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma yapılırken yine aynı program kullanılarak türün kendi

aralarında ve diğer dünya izolatları arasındaki benzerlik yüzdelerinden yararlanılarak karşılaştırma yapılmıştır. Buna göre diziler arasında en yüksek ve en düşük benzerlik oranları hesaplanmıştır.

3.2.2.6 Filogenetik Analizlerin Yapılması

CLC Main Work Bench V.20 programında Clustal W yöntemine göre dizilerin filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Birbirine benzeyen diziler kümeler halinde dallanmıştır. Oluşan bu grupta birbirine en yakın bireyler saptanmıştır. CLC Main Work Bench V.20 programında Clustal W ile çoklu diziler hizalanmış ve nükleotit dizileri karşılaştırılmıştır. Ayrıca CLC Main Work Bench V.20 programında Clustal W ile seçilen izolatların dünya izolatları ile göstermiş oldukları benzerlikler incelenmiştir. Sequence Demarcation Tool Version 1.2 (SDTv1.2) programı kullanılarak *Cuscuta approximata* benzerlik yüzde oranları belirlenmiştir. Oluşturulan soy ağaçlarının güvenilirliğini arttırmak amacıyla 1000 tekerrürlü bootstrap analizi uygulanmıştır. Filogenetik ağaç oluştururken dış grup olarak Amerikan pokeweed (*Phytolacca americana* L.) izolatı kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1 ITS Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması ve Elektroforez

C. approximata'ya ait ITS bölgesi çoğaltılmış ve jel görüntüleme yapılmıştır. Buna göre 1, 7, 10, 12, 13, 56, 1778 numaralı örnekler için PCR ürünleri 682 ile 716 baz çifti uzunluğunda fragment vermiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 *Cuscuta approximata*'nın 1, 7, 10, 12, 13, 56, 1778 numaralı örneklerine ait ITS bölgelerinin jel görüntüleri. M: Marker

C. approximata'ya ait ITS bölgesi çoğaltılmış, jel görüntüleme yapılmış ve 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 numaralı örnekler için ITS bölgeleri 682 ile 716 baz çifti uzunluğunda fragment vermiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2 *Cuscuta approximata*'nın 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 numaralı örneklerine ait ITS bölgelerinin jel görüntüleri. M: Marker

4.2 Sanger Yöntemi ile Çift Yönlü Direk Dizileme Yapılması

C. approximata'ya ait elde edilen PCR ürünleri MSM firması tarafından yapılan DNA dizilemesi sonucunda BLAST analizine göre incelenmiş ve analiz sonucunda tüm örneklerin *C. approximata*'ya ait olduğu belirlenmiştir.

4.3 DNA Dizilerinin Gen Bankasına Girilmesi

C. approximata'ya ait örneklerin DNA dizilemesi yapıldıktan sonra izolatların gen bankasına kayıtları yapılmıştır. *C. approximata*'nın gen bankasına kaydı yapılan örnek numaraları, gen uzunlukları (bp) ve baz dizilerine ait gen bankası erişim numaraları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 *C. approximata*'ya ait örnek numaraları, gen uzunlukları, gen bankası erişim numaraları

İlçeler	Örnek numarası	Baz Uzunluğu (bp)	Gen Bankası Erişim Numarası
Van-Merkez, Otluca Köyü	1	681	OR889472
Van-Gürpınar, Sevindik Köyü	2	682	OR915469
Van-Erciş, Çobandüzü Köyü	3	682	OR915471
Van-Erciş, Merkez	4	682	OR915473
Van-Muradiye	5	682	OR915476
Van, Muradiye-Çaldıran Yolu	6	682	OR915475
Van-Gürpınar, Parmakkapı Köyü	7	681	OR915477
Van-Muradiye, Yenişehir Mahallesi	9	685	OR915478
Van-Gevaş, Merkez	11	683	OR915481
Van-Bostaniçi	13	681	OR916314
Van-Mollakasım	22	681	OR916313
Van-Çaldıran, Yukarı Çanak Köyü	56	681	OR915486
Van-Edremit, Köprüler Köyü	100	716	OR976474
Van-Muradiye, Açıkyol Köyü	120	633	OR976476
Van-Gevaş	520	683	OR915487
Van-Erciş, Kocapınar Köyü	911	683	OR915488
Van-Gürpınar, Otbiçer Köyü	916	683	OR915520
Van-Edremit, Köprüler Köyü	920	683	OR915524
Van-Gürpınar, Hoşap	1778	681	OR915526

Van'ın Otluca köyünden biriktirilen ve gen bankası erişim numarası OR889472 olan 1 numaralı örneğe ait rDNA üzerindeki DNA dizisinin 681 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 1 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi

GGAAGGAGAAGTGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAA
CCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGGTT
GTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGCGCGGTATGCGCCAAGGATT
ACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTCAGCAT
CTTTATAAACAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG
TAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAAC
GCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGACGTG
TCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTATGGT
GCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGCCA
GAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGCGGATATCAAGACCCGTTGGAGTCAA
GTGATTTGGCTTACGAAGTGCATCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCA
TATCATTAAGCGGAGGA

Van'ın Gürpınar ilçesinin Sevindik Köyü'nden toplanan ve gen bankası erişim numarası OR915469 olarak tespit edilen 2 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA üzerindeki DNA dizisi 682 bp uzunluğunda bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 2 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi

GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAA
ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG
TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGCGCGGTTTTCGCGCAAGGA
TTACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATGGTCAGC
ATCTTTATAAACAATATGACTCTCGGCAAGGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAA
CGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGA
ACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCAGGTCGGCCTGGGTGTCACGTGACG
TGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTATG
GTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGCC
TAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGCGGATATCAAGACCCGTTGGAGTCA
AAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCATCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAG
CATAAAAAAAGGGGGGGA

Van'ın Erciş İlçesi Çobandüzü Köyü'nden biriktirilen ve gen bankasına kaydı yapılan ve erişim numarası OR915471 olarak belirlenen 3 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA üzerindeki DNA dizisinin 682 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 3 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi
GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAA ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGCGCGGTATGCGCCAAGGA TACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTGCGGGTATGCGGGCATTGTCAGC ATCTTTATAAACAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAA CGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGA ACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGACG TGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTATG GTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGCC TAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTGCGGATATCAAGACCCGTTGGAGTCA AAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAG CATATCAATAAGCGGAGGA

Van'ın Erciş İlçesi'nden toplanan, gen bankasına kaydı yapılan ve erişim numarası OR915473 olan 4 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA üzerindeki DNA dizisinin 682 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 4 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi
GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAA ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGCGCGGTATGCGCCAAGGA TACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTGCGGGTATGCGGGCATTGTCAGC ATCTTTATAAACAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAA CGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGA ACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGACG TGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTATG GTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGCC TAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTGCGGATATCAAGACCCGTTGGAGTCA AAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAG CATATCAAAAACGCGGAGG

Van'ın Muradiye İlçesi'nden biriktirilen ve gen bankası erişim numarası OR915476 olarak tespit edilen 5 numaralı örneğe ait rDNA üzerinde 682 bp uzunluğunda DNA dizisi belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 5 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi

GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAA
ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG
TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGCGCGGTATGCGCCAAGGA
TACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTCAGC
ATCTTTATAAACAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAA
CGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGA
ACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGACG
TGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATGGTAT
GGTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGC
CTAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGCGATATCAGGACCCGTTGGAGTC
AAAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA
GCATATCAATAACCGAAGGA

Van'ın Muradiye Çaldıran yolu üzerinden toplanan ve gen bankası erişim numarası OR915475 olan 6 numaralı *C. approximata* örneğine ait DNA dizisi 682 bp uzunluğunda olmuştur (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 6 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi

GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAA
ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG
TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGCGCGGTATGCGCCAAGGA
TACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTCAGC
ATCTTTATAAACAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATAAAAAA
CGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGA
ACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGACG
TGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTATG
GTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGCC
TAGAGTGCAAAGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGCGATATCAAGACCCGTTGGAGTCA
AAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA
CATATCAATAAGCGGAGGA

Van'ın Gürpınar İlçesi'nin Parmakkapı Köyü'nden toplanan ve gen bankası erişim numarası OR915477 olan 7 numaralı *C. approximata*'ya ait DNA dizisinin 681 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 7 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi

GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTCGAA
ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG
TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGCGCGGTATGCGCCAAGGA
TACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTCAGC
ATCTTTATAAACAATATGACTCTCGGCAAAGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAA
CGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGA
ACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCACCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGACG
TGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTATG
GTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGCC
TAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGCGGATATCAAGACCCGTTGGAGTCA
AAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAG
CATATCAATAAGCGGAGG

Van'ın Muradiye İlçesi Yenişehir Mahallesi'nden toplanan, gen bankasına kaydı yapılan ve erişim numarası OR915478 olan 9 numaralı *C. approximata*'ya ait DNA dizisinin 685 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 9 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi

GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTCGAA
ACCTGCCAAGCAGTTTTGACTTTGAGAACTTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGT
GGTTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGCGCGGTATGCGCCAAG
GATTACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTCA
GCATCTTTATAAACAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAG
AACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTT
GAACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGA
CGTGTCGCTCCCTTCTAGTTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTAT
GGTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGC
CTAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGCGGATATCAAGACCCGTTGGAGTC
AAAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCCAGGTCACGCGGGACTACCCGCTGAGTTTTA
GCACATCAATAAGCGGAGGA

Van'ın Gevaş İlçesi'nden toplanıp gen bankasına kaydı yapılan ve erişim numarası OR915481 olan 11 numaralı *C. approximata*'ya ait DNA dizisi baz çifti uzunluğu 683 bp olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 11 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA 'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi

GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTCGAA
ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG
TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGGCGCGGTATGCGCCAAGG
ATTACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTTCAG
CATCTTTATAACAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGA
ACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGAC
GTGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTAT
GGTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGC
CTAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTGGCGGATATCACGACCCGTTGGAGTCA
AAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAG
CATATCAATAAGCGGAGGA

Van'ın Bostaniçi Mahallesi'nden biriktirilen ve gen bankası erişim numarası OR916314 olan 13 numaralı örneğe ait rDNA üzerinde 681 bp uzunluğunda DNA dizisi belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 13 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA 'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi

GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTCGAA
CCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGGTT
GTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGGCGCGGTATGCGCCAAGGATT
ACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTTCAGCAT
CTTTATAACAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG
TAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAAC
GCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTGGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGACGTG
TCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATGGTATGG
TGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGGTGTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGCCT
AGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTGGGGATATCAAGACCCGTTGGAGTCAA
AGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCCACGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTATTC
ATATCATTAAGCGGAGGA

Van'ın Mollakasım İlçesi'nden toplanan, gen bankasına kaydı yapılan ve erişim numarası OR916313 olan 22 numaralı *C. approximata*'ya ait DNA dizisi baz çifti uzunluğu 681 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 22 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA 'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi

GGAAGGAGAAGTCGTAGACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGA
AACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTG
GTTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGCGCGGTATGCGCCAAGG
ATTACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTCAG
CATCTTTATAAACAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGA
ACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGAC
GTGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTAT
GGTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGC
CTAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGCGGATATCAAGACCCGTGGAGTCA
AAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAG
CATATCAATAAGCGGAG

Van'ın Çaldıran İlçesi'nin Yukarı Çanak Köyü'den biriktirilen ve gen bankası erişim numarası OR915486 olan 56 numaralı *C. approximata*'ya ait 681 bp uzunluğunda DNA dizisi belirlenmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 56 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA 'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi

GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAA
ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG
TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGCGCGGTTTTCGCGCAAGGA
TTACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTCAGC
ATCTTTATAAACAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAA
CGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGA
ACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGACG
TGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTATG
GTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGCC
TAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGCGGATATCAAGACCCGTGGAGTCAA
AGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCCAGGTCATGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAG
ATATCAATAAGCGGAGGA

Van'ın Edremit İlçesi Köprüler Köyü'nden toplanan ve gen bankası erişim numarası OR915479 olan 100 numaralı *C. approximata*'ya ait DNA dizisi baz çifti uzunluğu 716 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14 100 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi
GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAA ACCTGCCAAGCAGTTTTGACTTTGAGAACTTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGT GGTTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGCGCGGTATGCGCCAAG GATTACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTCA GCATCTTTATAACAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAG AACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTT GAACGCAAGTTGCGCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGA CGTGTGCGTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGT ATGGTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGT GCCTAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGGGATATCAAGACCCGTTGGAG TCAAAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCATCCAGGTCACGCGGGACTACCCGCTGAGTTT TAGCACATCAATAAGCGGAGGA

Van'ın Muradiye İlçesi Açıkyol Köyü'nden toplanan, gen bankasına kaydı yapılan ve erişim numarası OR915480 olan 120 numaralı *C. approximata*'ya ait DNA baz çifti uzunluğu 633 bp olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15 120 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi
AAGTGTAACAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAACCTGCCAAG CAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGGTTGTGCTTTT GGTGCACCATGATGAATAACAAACCCCGCGCGGTATGCGCCAAGGATTACTAAACTG AGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTCAGCATCTTTATAAA CAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAAT GCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGC GCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGACGTGTCGCTCCCTT CTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTATGGTGCGGTGGGA TGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGCCTAGAGTGCAA CGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGGGATATCAAGACCCGTTGGAGTCAAAGTGATTTGGCT TACGAAGTGCATCCAGGTCAGGCGG

Van'ın Gevaş İlçesi'nden biriktirilen ve gen bankası erişim numarası OR915487 olan 520 numaralı *C. approximata*'ya ait DNA dizisinin 683 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16 520 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi
GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAA ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGCGCGGTATGCGCCAAGGA TTACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTGCGCGTTATGCGGGCATTGTCAGC ATCTTGATAACAATATGACTCTCGCAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAA CGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGA ACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGACG TGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATGGTAT GGTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGC CTAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTGCGGATATCAAGACCCGTTGGAGTC AAAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCATCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA GCATATCAAATTCGCGGAGGA

Van'ın Erciş İlçesi Kocapınar Köyü'nden toplanan, gen bankasına kaydı yapılan ve erişim numarası OR915488 olarak kaydedilen 911 numaralı *C. approximata*'ya ait DNA dizisinin 683 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17 911 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi
GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAA ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGGCGCGGTATGCGCCAAGG ATTACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTGCGCGTTATGCGGGCATTGTCAG CATCTTTATAACAATATGACTCTCGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGA ACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTG AACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGAC GTGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTAT GGTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGC CTAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTGCGGATATCAAGACCCGTTGGAGTC AAAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCATCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA GCATATCAATAAGCGGAGGA

Van'ın Gürpınar İlçesi Otbiçer Köyü'nden biriktirilen ve gen bankası erişim numarası OR915520 olan 916 numaralı örneğe ait rDNA üzerinde 683 baz çifti uzunluğunda DNA dizisi belirlenmiştir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18 916 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi
GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAA ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGGCGCGGTATGCGCCAAGG ATTACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTGAG CATCTTTATAAACAATATGACTCTCGGCAAGGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGA ACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTG AACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCAGGTCTGCCTGGGTGTCACGTGAC GTGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTAT GGTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGC CTAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGGGATATCAAGACCCGTTGGAGTC AAAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA GCATATCAATAAGCGGAGGA

Van'ın Edremit İlçesi Köprüler Köyü'nden toplanan, gen bankasına kaydı yapılan ve erişim numarası OR915524 olan 920 numaralı *C. approximata*'ya ait DNA dizisi baz uzunluğu 683 bp olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19 920 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi
GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAA ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGGCGCGGTATGCGCCAAGGA TTACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATGGTCAGC ATCTTTATAAACAATATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAA CGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGA ACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTGACG TGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTATG GTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGGTGGTTGTGC CTAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGGGATATCAAGACCCGTTGGAGTC AAAGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA GCATATCAATAAGCGGAGGA

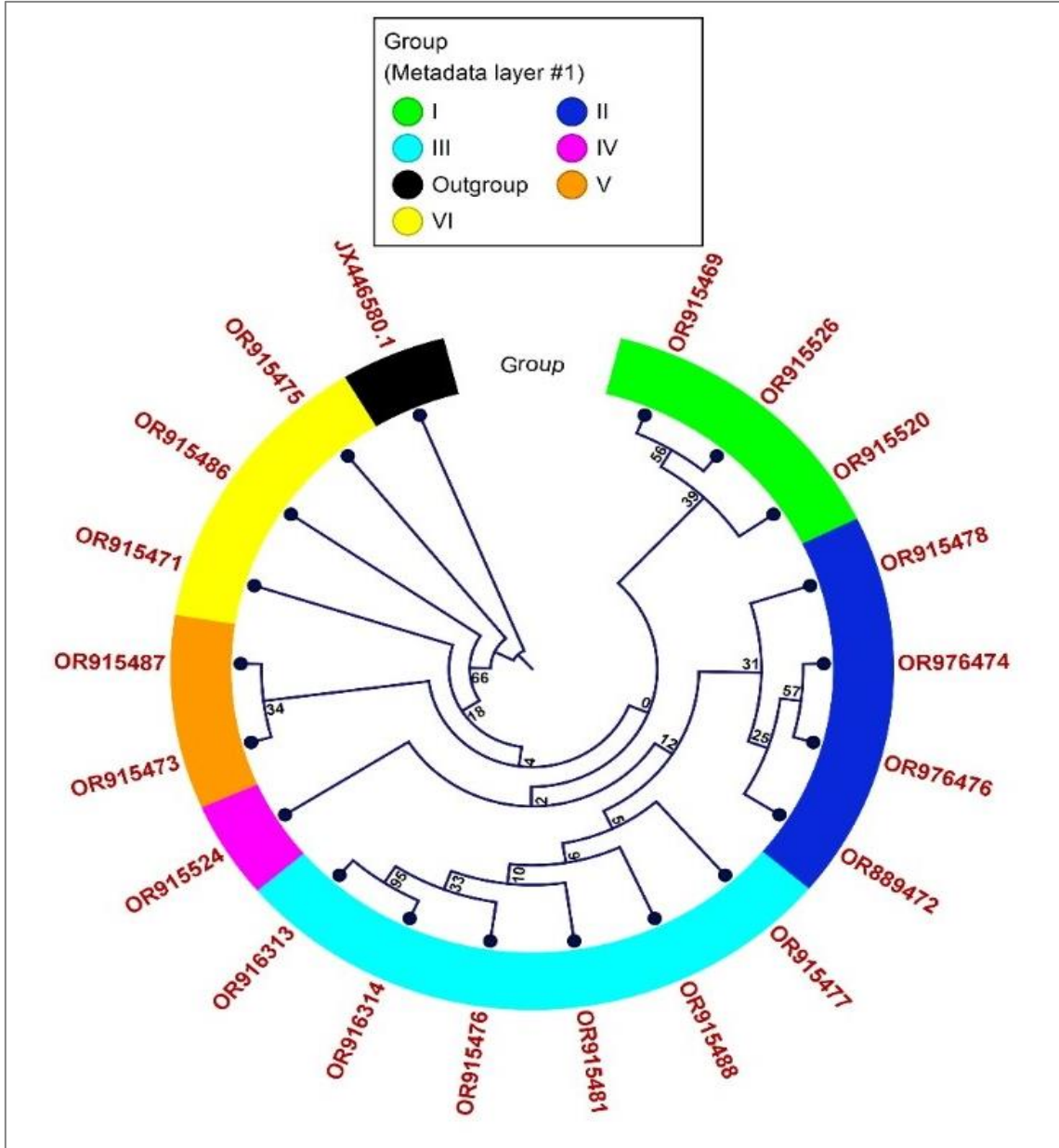
Van'ın Gürpınar İlçesi Hoşap Köyü'nden toplanan ve gen bankası erişim numarası OR915526 olarak belirlenen 1778 numaralı örneğe ait rDNA üzerinde 681 bp uzunluğunda DNA dizisi belirlenmiştir (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20 1778 numaralı *C. approximata*'ya ait rDNA'sı üzerindeki ITS4-ITS5 bölgesine ait nükleik asit baz dizisi

Nükleik Asit Baz Dizisi
GGAAGGAGAAGTCGTAGCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAA ACCTGCCAAGCAGTTTGACTTGAGAACTTGTGCCAAAATACCAACGCAACCTCGTTGTGG TTGTGCTTTTGGGTGCGACCATGATGAATAACAAACCCCGGCGCGGTTTTCGCGCAAGGA TACTAAACTGAGATTGCTGCCTTGCCCTGCTCCGTTTCGCGGTTATGCGGGCATTGTCAGC ATCTTTATAACAATATGACTCTCGGCAAGGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAA CGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGA ACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATCAGGCTTAGGGCACGTGCGGCCTGGGTGTCACGTGACG TGTCGCTCCCTTCTAGATTTTTTTGGGAGGAGCGGATCATGTCCTCCCGTGCCTATTGTATG GTGCGGTGGGATGAAATGCTTGATACTGTTGATGGACGTTCTGGCGATTGGTGGTTGTGCC TAGAGTGCAAACGTCGTTCCACGTTCAATCGTTTTCGCGGATATCAAGACCCGTGGAGTCAA AGTGATTTGGCTTACGAAGTGCGATCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTAAGC ATATCAATAAGCGGAGGA

4.4 Filogenetik Analizlerin Yapılması

CLC Main Workbench Neighbor joining (Bootsrap:1000) yöntemine göre dizilerin filogenetik ağacı oluşturulmuş ve birbirine benzeyen diziler kümeler halinde 6 gruba dallanmıştır. Filogenetik ağaç oluştururken dış grup olarak Amerikan pokeweed (*Phytolacca americana* L.) izolatı kullanılmıştır. Oluşan I. grupta, OR915469 (Van-Gürpınar, Sevindik Köyü) OR915526 (Van-Gürpınar, Hoşap) ve OR915520 (Van-Gürpınar, Otbiçer Köyü) örnekleri yer almıştır. OR915478 (Van-Muradiye, Yenişehir Mahallesi), OR976474 (Van-Edremit, Köprüler Köyü), OR976476 (Van-Muradiye, Açıkyol Köyü) ve OR889472 (Van-Merkez, Otluca Köyü) numaralı örnekler aynı grupta (II. Grup) kümelenmiştir. Gen bankası ulaşım numarası OR915477 (Van-Gürpınar, Parmakkapı Köyü), OR915488 (Van-Erciş, Kocapınar Köyü), OR915481 (Van-Gevaş, Merkez), OR915476 (Van-Muradiye), OR916314 (Van-Bostaniçi) ve OR916313 (Van-Mollakasım) olan örnekler ayrı bir grupta (III. grup) yer almıştır. OR915524 (Van-Edremit, Köprüler Köyü) numaralı örnek diğer gruplardan ayrılmıştır. Gen bankası ulaşım numarası OR915473 (Van-Erciş, Merkez) örnek ile gen bankası ulaşım numarası OR915487 (Van-Gevaş) olan örnek aynı grup içerisinde yer almıştır. OR915471 (Van-Erciş, Çobandüzü Köyü), OR915486 (Van-Çaldıran, Yukarı Çanak Köyü) ve OR915475 (Van, Muradiye-Çaldıran Yolu) ulaşım numaralı örnekler ise ayrı bir grupta toplanmıştır (Şekil 4.3).

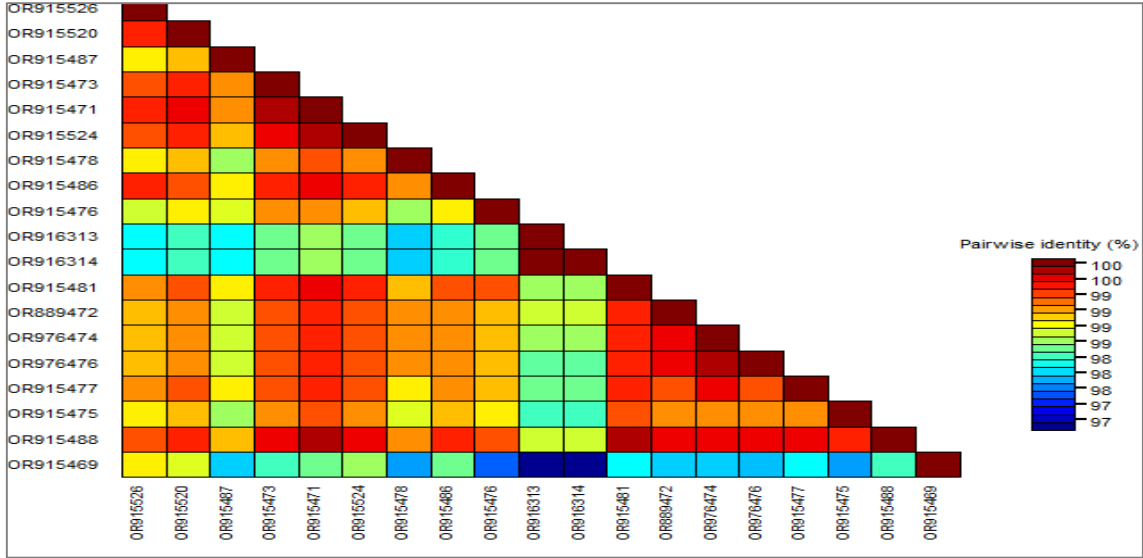


Şekil 4.3 Neighbor joining (Bootsrap: 1000) modeline göre *Cuscuta approximata* Bab. türüne ait filogenetik ağaç

Şekil 4.3'te yer alan filogenetik ağaçta kullanılan izolatların birbirleri ile çok yakın benzerlik gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu dallanma tesadüfi olmayıp istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur. Elde edilen filogenetik ağaç, *C. approximata* izolatlarının coğrafik dağılışının temel alındığını göstermiştir.

4.5 Çoklu Dizi Karşılaştırma (Alignment) Yapılması

Genom verileri kullanılarak CLC Main Work Bench V.20 programında Clustal W ile çoklu diziler hizalanmış ve nükleotit asit dizileri karşılaştırılmıştır. Bu modele göre örneklerin birbirine olan uzaklığı %97 ile %100 arasında değişmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Pairwise identity yöntemine göre dizilerin yüzde benzerlik oranı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Küsküt tam parazit istilacı bir bitkidir ve mücadelesi oldukça zordur. Türkiye genelinde yonca üretim alanlarında yoğun olarak bulunan yonca küskütü (*Cuscuta approximata* Bab.) adlı türün önemli verim kayıplarına neden olduğu bilinmektedir. Bu tür ile doğru mücadele yöntemlerinin belirlenmesi için doğru teşhis edilmesi gerekmektedir. Evrimleşmeyle beraber tür içi bazı varyasyonlar görülmektedir. Bu sonuçlar farklı ekolojik koşullarda yaygın olan bu türün moleküler olarak tanılanması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu türe ait örneklerin moleküler tanılanması yapılması yeni yöntemlerin kullanılma gerekliliğini ortaya koymuştur. Ülkemizde *C. approximata*'nın biyolojisi ve mücadelesi ile ilgili bazı çalışmalar yapılmasına karşın moleküler tanılanmasına yönelik olarak herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada, Van ilinde 7 farklı alandan toplanan *C. approximata*'ya ait 19 örnek üzerinde moleküler çalışmalar yürütülmüştür. Bu örneklerden 4'ü Gürpınar, 4'ü Muradiye, 3'ü Erçiş, 2'si Gevaş, 2'si Edremit, 1'i Van Merkez, 1'i Bostaniçi, 1'i Mollakasım ve 1'ide Çaldıran'dan alınmıştır.

Türkiye'de küsküt cinsi ile ilgili en geniş sistematik çalışmalara "Flora of Turkey" (Davis, 1978) ve "Çiçekli Parazitlerden *Cuscuta* L.'nin Anadolu Türleri Üzerinde Morfolojik ve Sistematik Araştırmalar" (Nemli, 1978) adlı eserlerde yer verilmiştir. Yıldırım ve Tepe (2011)'nin Van'da yonca üretim alanlarında *C. approximata*'nın dağılımı ve yoğunluğunun belirlenmesine ve Kurt ve Tepe (2011)'nin ise Van'da *C. approximata*'nın bulaşma yollarının belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada Gürpınar, Muradiye-Çaldıran, Erçiş, Merkez-Edremit-Gevaş ve Özalp-Saray bölgelerinde bu türün yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda araştırmacıların morfolojik, yoğunluk ve bulaşma yollarının belirlenmesine yönelik olarak yaptıkları çalışmalar, bu türe ait tarafımızca yapılan moleküler tanılamayı destekler niteliktedir.

Doğu Anadolu Bölgesi'nin bazı lokalitelerinden alınan *Cuscuta* cinsine ait *Cuscuta approximata*'nın moleküler teşhisi, Keskin vd. (2017), tarafından gerçekleştirilmiştir. Türkiye'nin değişik coğrafik bölgelerinden biriktirilen *Cuscuta* L. cinsine ait türlerin filogenetik ilişkilerine yönelik yapılan bir çalışmada tarım ve tarım dışı alanlarda en yaygın türlerden birinin *Cuscuta approximata* Bab. olduğu belirlenmiştir

(Demir vd., 2020). Türkiye’de *C. campestris*’in genetik çeşitliliği ile ilgili yapılan bir çalışmada bölgeler arasında coğrafik farklılıktan kaynaklanan, populasyonlar içinde genetik çeşitlilik olduğu belirlenmiştir (Özbek ve Kaya, 2021). Sonuçlarımız bu üç çalışma ile korelasyon halindedir.

Filogenetik tahmin, kladistik ve nükleotid dizileme teknikleri kullanılmaya başladığından beri makro ve mikro evrim çalışmaları önem kazanmıştır (Castelloe ve Templeton, 1994; Vogler ve DeSalle, 1994). Son yirmi yılda, bazı araştırmalar, organel genomların yanı sıra nükleer ve çeşitli moleküler belirteçleri kullanarak filogeniyeye odaklanmıştır (Avise, 1994).

Angiospermelerin yakın türleri arasındaki filogenetik ilişkileri çözmek için, nrDNA bölgesi üzerinde bulunan ITS dizileri; bitkisel materyallerin moleküler doğrulaması (Zhang vd., 2007), genetik çeşitlilik değerlendirmesi (Mondini vd., 2009), intra-spesifik varyasyon çalışması (Haque vd., 2009) ve DNA barkodlama (Zuo vd., 2011) çalışmaları yaygın olarak kullanılmaktadır (Pandey ve Ali, 2006).

ITS çok sayıda filogenetik araştırmada çok sayıda bitki türünde tür içi ve türler arası düzeyde kullanılmıştır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular ışığında;

C. approximata’nın Türkiye’de son yıllarda özellikle yonca üretim alanlarında ciddi problem olmaya başladığı gözlenmiştir.

Van ilinde çeşitli bölgelerinden *C. approximata* adlı türe ait biriktirilen örnekler için moleküler tanımlama yapılmıştır.

Evrim süreciyle birlikte bitkilerde tür içi ve türler arasında bazı varyasyonların oluştuğu bilinmektedir. Bu sebeple bitkilerde revizyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Türkiye’de ve dünyada *C. approximata*’nın biyolojisi ve kontrolüne yönelik bazı çalışmalar yapılmasına karşın türün moleküler tanımlamasına yönelik çalışmalar yetersiz düzeydedir.

Çalışmada *C. approximata*’ya ait Van ilinin 7 farklı bölgesinden alınan 19 bitki örneğinin rDNA’sı üzerinde bulunan ITS bölgeleri çoğaltılmış ve DNA dizilemeleri gerçekleştirilmiştir. Dizileme sonucunda *C. approximata*’ya ait örneklerin gen uzunluklarının 682 ile 716 bp arasında yer aldığı belirlenmiştir. En düşük baz uzunluğu 633 bp ile Van-Muradiye, Açıkyol Köyü’nden toplanan ve en yüksek baz uzunluğu 716 bp ile Van-Edremit, Köprüler Köyü’nden toplanan örneklerde belirlenmiştir. Sonuç

olarak, *C. approximata*'ya ait bireylerin rDNA'ları üzerinde yer alan ITS bölgelerinin filogenetik ağacı belirlemek için gerekli bilgiyi sağlaması bakımından yeterli uzunlukta olduğu belirlenmiştir.

Özbek ve Kaya (2021) tarafından Türkiye genelinden toplanan *C. campestris* adlı türe ait örneklerin filogenetik ilişkilerinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan çalışmada nrDNA ITS bölgesi uzunluğunun 570 ile 679 bp arasında değiştiği belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise *C. approximata*'ya ait nrDNA ITS bölgesi uzunluğu 682 ile 716 bp arasında yer almış ve sonuçlarımız yukarıdaki çalışma ile paralellik göstermiştir.

CLC Main Work Bench V.20 programında Clustal W ile ikili karşılaştırma (Pairwise identity) yöntemine göre diziler arasındaki genetik uzaklık hesaplanmıştır. Bu modele göre türlerin birbirine olan uzaklığı %97 ile %100 arasında değişmiş ve önemli düzeyde benzerliklerin ve yakınlığın olduğu belirlenmiştir. Birbirine benzeyen türler aynı grupta yer almıştır. Bu türe ait benzerlik gösteren 19 örnekten 6 grup oluşmuştur.

Bu çalışma ile, *C. approximata* türüne ait alt türlerin varlığının moleküler düzeyde belirlenmesi ve etkili mücadele stratejilerinin oluşturulması için, ileride farklı moleküler markırlar kullanılarak ve kloroplast düzeyinde çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Ekotipler arasındaki tür farklılığının belirlenmesi herbisit toleransındaki farklılıkları yansıtabilir. Aynı zamanda ekotip dağılımının ve optimum herbisit uygulamalarının belirlenmesi yonca alanlarında verimliliği artırabilir.

Farklı bölgelerden toplanan *C. approximata* popülasyonları arasındaki önemli genetik farklılaşma; yabancı ot popülasyonları arasında sınırlı gen akışı, bölgelerdeki yabancı ot mücadelesinin gücü, tohum dağılımı ve düşük tohum verimi, polen göçü ve yabancı otun üreme şekli gibi muhtemelen birkaç faktörle ilişkilidir. Ekotipler arasındaki genetik çeşitlilik, herbisit toleransında gözlemlenen farklılıkları yansıtabilir ve Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde *C. approximata*'nın kontrolünün etkinliğini artıracak temel bilgiler sağlar.



KAYNAKLAR

- Allan, G. J., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Boerner, E., Zimmer, E. A. (2004). Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island Lotus (Fabaceae: Loteae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(1), 123-138.
- Anikster, Y., Noy-Meir, I. (1991). The wild-wheat field laboratory at Ammiad: Population dynamics of the wheat progenitor, *Triticum turgidum* var. *Dicoccoides*, in a natural habitat in Eastern Galilee. *Israel Journal of Botany*, 40(5-6), 351-362.
- Anonim. (2005). *Dodderandgoldendodder. Primary industries agriculture*. Erişim tarihi: 03 Haziran 2022. Erişim adresi: <http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/pestsweeds/weeds/profiles/dodder>.
- Anonim. (2009). Dodder (*Cuscuta* spp.) Rears Its Ugly Head in Western Ohio in 2009. The Ohio University. Erişim tarihi: 03 Haziran 2022. Erişim adresi: <http://sheep.osu.edu/2009/10/06/dodder-cuscuta-spp-rears-its-ugly-head-inwestern-hio-in-2009/>.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall: New York.
- Baldwin, B. G., and Markos, S. (1999). Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S 26S rDNA. Congruence of ETS and ITS trees of calycadenia (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10, 449-463.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., C. S., C., Donoghue, M. J. (1995). The its region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82(2), 247-277.
- Baldwin, B.G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1(1), 3-16.
- Bennett, C. W. (1944). Studies of dodder transmission of plant viruses. *Phytopathology*, 34, 905-932.
- Benvenuti, S., Dinelli, G., Bonetti, A., Catizone, P. (2005). Germination ecology, emergence and host detection in *Cuscuta campestris*. *Weed Research*, 45, 270-278.
- Carey, J. B., Kells, J. J., Renner, K. A. (1993). Common weed seedlings of michigan. *Extension Bulletin E-1363*, Michigan State University, Department of Crop and Soil Sciences, USA.
- Castelloe, J., Templeton, AR. (1994). Root probability for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3, 102-113.
- Cohen, B. L., Weydmann, A. (2005). Molecular evidence that phoronids are a subtaxon of brachiopods (Brachiopoda: Phoronata) and that genetic divergence of metazoan phyla began long before the early cambrian. *Organisms Diversity & Evolution*, 5(4), 253.
- Costea, M., Tardif, F. J. (2006). *Biology of Canadian weeds. Cuscuta campestris* Yuncker, *C. gronovii* Willd. Ex Schult., *C. umbrosa* Beyr. ex Hook., *C. epithimum* (L.) L. and *C. epilinum* Weihe, Can. Plant Sci.

- Çalı, S., Erdiler, G., Ekim, T. (1993). Orta Anadolu Bölgesi yonca ekim alanlarındaki yabancı otlar ve virüs hastalıklarıyla ilişkileri. **Türkiye I. Herboloji Kongresi Bildirileri**, 3-5 Şubat 1993, Adana.
- Dastgheib, F. (2006). Relative importance of crop seed, manure and irrigation water as sources of weed infestation. *Weed Research*, 29, 113 – 116.
- Davis, P. H. (1978). Flora of Turkey. *Edinburgh at the University Press*, 22(6), 527.
- Dawson, J. H., Musselman, L. J., Wolswinkel, P., Dorr, I. (1994). Biology and control of cuscuta. *Reviews of Weed Science*, 6, 265-31.
- Demir, İ. (2016). *Türkiye’de Cuscuta L. cinsine ait türlerin sistematik, palinolojik ve filogenetik yönden incelenmesi*, Yüksek lisans tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye.
- Demir, İ., Kaya, İ., Usta, M., Sipahioğlu, H. M. (2020). Molecular phylogeny based on its sequences of nrDNA of some species belonging to dodder (*Cuscuta L.*) genus from various ecological sites of Turkey. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(3), 1332-1340.
- Ekim, T., Yıldırım, A. (1993). Yabancı Otlarda Teşhis Problemleri. **I. Herboloji Kongresi Bildirileri**, 3-5 Şubat 1993, Adana.
- Engelmann, G. (1859). Systematic arrangement of the species of the genus *Cuscuta* with critical remarks on old species and descriptions of new ones. *Transactions of the Academy of Science of St. Louis*, 1, 453-523.
- Garcia, M. A., Martin, M. P. (2007). Phylogeny of *Cuscuta* subgenus *Cuscuta* (Convolvulaceae) based on nrDNA ITS and chloroplast trnL intron sequences. *Systematic Botany*, 32(4), 899-916.
- Haidar, M. A., Bibi, W. (1995). Common weeds of Lebanon. *Arab and Near East Plant Protection Newsletter*, 34.
- Haidar, M. A., Iskandarani, N., Sidahmed, M., Baalbaki, R. (1999). Response of field dodder (*Cuscuta campestris*) seeds to soil solarization and chicken manure. *Faculty of Agricultural and Food Sciences, American University of Beirut, Beirut, Lebanon*, 6, 253–258.
- Haque, I., Bandyopadhyay, R., Mukhopadhyay, K. (2009). Intraspecific variation in commiphora wightii populations based on internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) sequences of rDNA. *Diversity*, 1, 89-101.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 270, 313-321.
- Hull, R. (2002). **Matthews’ plant virology**. Academic Press, Elsevier: California, USA.
- Hutchison, J. M., Ashton, F. M. (1979). Effect of desiccation and scarification on the permeability and structure of the seed coat of *Cuscuta campestris*. *American Journal of Botany*, 66, 40–46.
- Jasieniuk, M., Maxwell, B. D. (2001). Plant diversity: new insights from molecular biology and genomics technologies. *Weed Sci.*, 49, 257-265.
- Jayasinghe, C., Wijesundara, D. S. A., Tennekoon, K. U., Marambe, B. (2004). *Cuscuta* species in the lowlands of Sri Lanka, their host range and host–parasite association. *Tropical Agricultural Research*, 16, 223241.
- Kadioğlu, İ. (1992). Kusküt (*Cuscuta* spp.) ve mücadelesi. *ÇÜ, Ziraat Fak., Bitki Koruma Koruma Bölümü Herboloji Haberleri*, 3(5), 1-11.
- Kellogg, E. A. (1998). Who's related to whom Recent results from molecular systematic studies. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(2), 149.

- Keskin F., Kaya I., Usta, M., Demir, I., Sipahioglu, H.M., Nemli, Y. (2017). Molecular cloning and sequence analysis of the its region of nuclear ribosomal DNA for species identification in dodders (*Cuscuta*; Convolvulaceae). *International Journal of Agriculture and Biology*, 19(6), 1447-1451. Doi: <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0442>.
- Kondap, S. M., Kumar, R. M. (1993). Management of *Cuscuta* in croplands and fallows. Integrated weed management for sustainable agriculture. **Proceedings of the International Symposium (Hisar, India, 18–20 November). Indian Society of Weed Science**, Hisar, 407–411.
- Kuijt, J. (1969). *The biology of parasitic flowering plants*. University of California Press: Berkeley.
- Kurt, G. (2011). *Van'da Yonca Kuskütü (Cuscuta approximata Bab.)'nün bulaşma yollarının belirlenmesi*, yüksek lisans tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye.
- Lanini, W. T., Kogan, M. (2005). Biology and management of *Cuscuta* in crops. *Ciencia E Investigación Agraria*, 32(3), 165-179.
- Liao, G. I., Chen, M. Y., Kuoh, C. S. (2000). *Cuscuta* L. (Convolvulaceae) in Taiwan. *Tai*, 45, 226-234.
- Mondini, L., Noorani, A., Pagnotta, M. A. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1, 19-35.
- Mummenhoff, K., Franzke, A., Koch, M. (1997). Molecular phylogenetic of *thlaspi* s.l. (Brassicaceae) based on chloroplast DNA restriction site variation and sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany*, 75, 469-487.
- Nemli, Y. (1978). *Çiçekli Parazitlerden Cuscuta L.'nin Anadolu türleri üzerinde morfolojik ve sistematik araştırmalar*, Doçentlik tezi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Fitopatoloji ve Ziraat Botanik Kürsüsü, Bornova- İzmir, Türkiye.
- Nemli, Y. (1989). Bazı kültür bitkilerinin kuskütün (*Cuscuta campestris* Yunck.) çimlenmesine ve gelişmesine etkisi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25, 245–255.
- Nemli, Y., Yergin, R., Tamer, Ş., Molai, P., Uludag, A. (2010). Book of abstracts. **2nd International Workshop on Invasive Plants in the Mediterranean Type Regions of the World**. 02/06-08-2010, Trabzon, Türkiye.
- Ogden, T. H., Whiting, M. F. (2005). Phylogeny of ephemeroptera (Mayflies) based on molecular evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(3), 625.
- Özbek, A., Kaya, İ. (2021). Türkiye'de *Cuscuta campestris* Yunck'in genetik çeşitliliğinin belirlenmesi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye.
- Özer, Z. (1993). Niçin yabancı ot bilimi (herboloji). **Türkiye I. Herboloji Kongresi Bildirileri**. Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüsü Yayınları, 3-5 Şubat 1993 Adana, 1-7.
- Özer, Z., Kadioğlu, İ., Önen, H., Tursun, N. (1998). *Herboloji (yabancı ot bilimi)*. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fak. Yay. No: 20, Tokat.
- Pandey, A. K., Ali, M. A. (2006). Molecular markers in plant systematics I: nuclear sequences. In S. Kumar (Ed.), *Plant sciences research in India: challenges and prospects* (pp. 21-36). Botanical Survey of India: Dehradun, India.
- Parker, C., Riches, C. R. (1993). *Parasitic weeds of the world*. Biology and control, CAB International: Wallingford, UK.

- Reynolds, S. G. (2006). *Providing winter bases for transhumant herders in altai*. Some Consequences and Lessons Learned: Xinjiang, China.
- Ro, K. E., Keener C. S., McPherson B. A. (1997). Molecular phylogenetic study of the ranunculaceae: Utility of the nuclear 26s ribosomal DNA in inferring intrafamilial relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8(2), 117.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E. (2008). *Tohumlu bitkiler sistematigi*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi: İzmir.
- Soltis, D. E., Soltis P. S., Nicrent D. L., Johnson L. A., Hahn W. J., Hoot S. B., Sweere J. A., Kuzoff R. K., Kron K. A., Chase M. W., Swensen S. M., Zimmer E. A., Chaw S. M., Gillespie L. J., Kress W. J., Sytsma K, J. (1997). Angiosperm phylogeny inferred from 18 S ribosomal DNA sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 84, 381.
- Şimşek, Y. (1993). *Orman ağaçları ıslahına giriş*. Muhtelif Yayınlar Serisi No: 65, Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları: Ankara.
- Tepe, I., Deveci, M., Keskin, B. (1997). Küsküt (*Cuscuta approximata* Bab.)'ün bazı yonca çeşitlerini parazitlenme ve zarar seviyeleri üzerinde Araştırmalar. **Türkiye II. Herboloji Kongresi Bildirileri**. İzmir, Türkiye.
- Türe, C., Köse, Y. B. (2000). Eskişehir ve çevresindeki bazı tarım alanlarında yayılış gösteren yabancı ot florası üzerine bir araştırma. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 24, 327–331.
- Uluğ, E., Kadioğlu, İ., Üremiş, İ. (1993). *Türkiye'nin yabancı otları ve bazı özellikleri*. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü: Adana, Türkiye.
- Uygur, F. N. (1991). Yoncada cuscuta spp. (Küsküt, verem otu) kontrolü. Herboloji haberleri. *Ç.Ü, Ziraat Fak., Bitki Koruma Bölümü*, 2(3), 1–5.
- Vail, S. L., Dailey, O. D., Blanchard, E. J., Pepperman, A. B., Riopel, J. L. (1990). Terpenoid precursors of strigol as a seed germination stimulant of broomrape (*Orobanche ramosa*) and witchweed (*Striga asiatica*). *Journal of Plant Growth Regulation*, 9, 77–83.
- Vogler, A. P., DeSalle, R. (1994). Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 393-405.
- Wen, J., Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber K., Scheiner, O., Breiteneder, H. (1997). The potential of betv1 homologues, a nuclear multigene family, as phylogenetic markers in flowering plants, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8(3), 317.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (Ed.), *PZR protocols: A Guide to Methods and Applications* (Pp: 315-322). Academic Press: New York, USA.
- Yıldırım, S., Tepe, I. (2011). *Van'da yonca alanlarında yonca küskütü (Cuscuta approximata Bab.)'nün dağılımı ve yoğunluğunun belirlenmesi*. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye.
- Yıldırım, S. Tepe, I. (2021). Van'da yoncada küçük tohumlu yonca küskütü (*Cuscuta approximata* Bab.)'nün dağılımı ve yoğunluğu. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*, 24(1), 42-50.

- Yuncker, T. G. (1932). The genus *Cuscuta*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, 18(2), 109-331.
- Zhang, Y. B., Shaw, P. C., Sze, C. W., Wang, Z. T., Tong, Y. (2007). Molecular authentication of Chinese herbal materials. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15(1), 14.
- Zuo, Y., Chen, Z., Kondo, K., Funamoto, T., Wen, J., Zhou, S. (2011). DNA barcoding of panax species. *Planta Medica*, 77(2), 182-187. doi: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1250166>.





ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Bernur ANLAYIŞ

Eğitim Bilgileri

Lisans :
Üniversite : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Fakülte : Ziraat Fakültesi
Bölüm : Bitki Koruma
Mezuniyet Yılı : 2019-2020





VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih 05/01/2024

Tez Başlığı: Van İlinde Bulunan *Cuscuta approximata* Bab.'nın Moleküler Tanısının Yapılması

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışmamın, kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan toplam 66 (32) sayfalık kısmına ilişkin, 05/01/2024 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından İdenticate adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre tezin benzerlik oranı %19' dur.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı : Bernur ANLAYIŞ
Öğrenci No : 20910001316
Anabilim Dalı: Bitki Koruma
Programı : Tezli Yüksek Lisans
Statüsü : (X) Yüksek lisans () Doktora

DANIŞMAN
UYGUNDUR

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR