

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**EMS MUTAGENİ KULLANILARAK KLOROSULFORON (SU GRUBU)
HERBİSİTİNE KARŞI DAYANIKLI SOYA (*Glycine max* L.)
MUTANTLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE ALS GENİNİN DİZİ ANALİZİ**

Rüstem ÜSTÜN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HAZİRAN 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**EMS MUTAGENİ KULLANILARAK KLOROSULFORON (SU GRUBU)
HERBİSİTİNE KARŞI DAYANIKLI SOYA (*Glycine max* L.)
MUTANTLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE ALS GENİNİN DİZİ ANALİZİ**

Rüstem ÜSTÜN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HAZİRAN 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EMS MUTAGENİ KULLANILARAK KLOROSULFORON (SU GRUBU)
HERBİSİTİNE KARŞI DAYANIKLI SOYA (*Glycine max* L.)
MUTANTLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE ALS GENİNİN DİZİ ANALİZİ**

Rüstem ÜSTÜN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**Bu tez
T.C. Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FDK-2018-3775 nolu proje ile desteklenmiştir.**

HAZİRAN 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EMS MUTAGENİ KULLANILARAK KLOROSULFORON (SU GRUBU)
HERBİSİTİNE KARŞI DAYANIKLI SOYA (*Glycine max* L.)
MUTANTLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE ALS GENİNİN DİZİ ANALİZİ

Rüstem ÜSTÜN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 18/06/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent UZUN (Danışman)

Prof. Dr. Hasan BAYDAR

Doç. Dr. Sabri ERBAŞ

Doç. Dr. Hüseyin ÇANCI

Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ÖZET

EMS MUTAGENİ KULLANILARAK KLOROSULFORON (SU GRUBU) HERBİSİTİNE KARŞI DAYANIKLI SOYA (*Glycine max* L.) MUTANTLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE ALS GENİNİN DİZİ ANALİZİ

Rüstem ÜSTÜN

Doktora Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent UZUN

Haziran 2020; 192 sayfa

Soya (*Glycine max* L.) yağ bitkileri içerisinde en fazla üretime sahip olan bir baklagil bitkisi. Dünyada hem yağ hem de protein kaynağı olarak kullanılmaktadır. Her bir kültür bitkisinde olduğu gibi soyada da verimi kısıtlayan en önemli unsurlardan bir tanesi yabancı otlardır. Dünyada ve ülkemizde transgenik olmayan soya yetiştiriciliğinde kullanılabilecek soyaya ruhsatlı herbisit sayısı çok kısıtlı düzeydedir. Sürekli aynı türden herbisit kullanımı, yabancı otlarda direnç oluşumuna neden olmakta ve mücadelesi bu nedenle her geçen gün zorlaşmaktadır. Dar yapraklıların yanında, geniş yapraklı yabancı otların tek bir herbisit aracılığıyla soyaya zarar vermeden kontrol edilebilmesi önemli bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada sülfonilüre (SU) grubu yabancı ot ilaçlarına dayanıklı soya mutantlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Arısoy soya çeşidinin 10.000 adet tohumuna %0.1 oranında EMS uygulanmış ve 4150 adet M₁ bitkisi yetiştirilmiştir. M₁ popülasyonundan elde edilen 300.000 M₂ bitkisi SU grubu herbisite karşı dayanıklılık bakımından test edilmiştir. Testlemelerde sürat ve güvenilirliği sağlamak için M₂ bitkileri tarla yanında hidroponik sistem altında da gözlemlenmiştir. Tarla testlemelerinde 7, hidroponik sistemde 3 bitki olmak üzere toplam 10 potansiyel dayanıklı bitki seçilmiştir. Hidroponik sistem altında yapılan konfirmasyon testlemelerinde tarladan seçilen 1 bitkinin dayanıklı olduğu teyit edilmiştir. Dayanıklı bitkide herbisit önerilen dozunun 2 (60 ppm) ve 3 (90 ppm) katları ile tekraren testlemeler yapılmış ve kontroller ölürken, dayanıklı bitkide hiç bir semptomun oluşmadığı bir kez daha görülmüştür. Elde edilen bu dayanıklılığın ALS geninde meydana getirmiş olduğu değişikliklerin incelenmesi için moleküler seviyede analizler yapılmıştır. Bu amaçla dayanıklı bitki kendilenmiş ve 8 döl yetiştirilmiştir. 8 dölün 2 si hassas ve 6 sı dayanıklı olarak açılım göstermiştir. Bu altı dayanıklı bitkiden elde edilen DNA'larda yapılan sekans analizleri neticesinde 8 nokta mutasyonu tespit edilmiş ve bunların 7 tanesinde anlamlı amino asit değişikliği bulunmuştur. *Arabidopsis thaliana* model bitkisinin ALS gen protein sekans dizilimi baz alındığında, dayanıklı mutant dölllerinde tirozin-154 serin (Tyr154-Ser), alanin-155 valin (Ala155-Val), valin-163 aspartat (Val163-Asp), prolin-197 serin (Pro197-Ser), glisin-609 valin (Gly609-Val), threonin-616 metiyonin (Thr616-Met) ve glutamin-644 histidin (Gln644-His) amino asit değişiklikleri tespit edilmiştir. Dayanıklılık gösteren 6 mutant dölde ortak olan tek mutasyon *Arabidopsis thaliana* ALS gen sekansına göre 197. noktadaki prolin-197 serin

değişikliğidir. Bu veriler ışığında soyadaki herbisit dayanıklılığı hem moleküler hem de fenotipik olarak gösterilmiştir. EMS mutasyon yöntemi ile elde edilen bu dayanıklılığın genetik dayanıklılık olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER; ALS geni, EMS, Herbisit dayanıklılık, Klorosulforon, Mutasyon, Soya, *Glycine max*

JÜRİ: Prof. Dr. Bülent UZUN

Prof. Dr. Hasan BAYDAR

Doç. Dr. Sabri ERBAŞ

Doç. Dr. Hüseyin ÇANCI

Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SOYBEAN (*Glycine max* L.) MUTANTS RESISTANT TO CHLORSULFURON (SU GROUP) HERBICIDE THROUGH EMS MUTAGEN AND ALS GENE SEQUENCE ANALYSES

Rüstem ÜSTÜN

PhD Thesis in Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Bülent UZUN

June 2020; 192 Pages

Soybean (*Glycine max* L.) is a legume plant that has the highest production among oilseed plants. It uses as a source of both oil and protein in the world. As in other crop plants, weeds are one of the most important factors reducing yield in soybean. The number of herbicides registered for soybean is very limited for the non transgenic production in the world as in Turkey. Consecutive applications of herbicides with the same mode of action in the same field may cause herbicide resistance in weeds and thus struggling with weeds are getting difficult gradually. Applying only one herbicide to control broad-leaf weeds along with narrow-leaf ones without damaging soybean is an important issue. From this perspective, it is aimed to develop soybean mutants resistant to sulfonylurea (SU) herbicides. For this purpose, 0.1% EMS was applied to 10.000 seeds of the Arisoy soybean variety and 4150 M₁ plants were grown. 300.000 M₂ plants obtained from the M₁ population were tested for resistance to the SU group herbicide. In order to accelerate the process and ensure reliability in the tests, M₂ plants were also screened under the hydroponic system beside the field conditions. 7 plants from open field conditions and 3 plants from hydroponic system were selected as potential herbicide resistant mutants. These were further evaluated for confirmation in hydroponic system and 1 mutant come from open field condition confirmed as a herbicide resistant. This resistant source were also exposed to 60 ppm and 90 ppm doses which were 2 and 3 times more than the optimum dose of herbicide to see the resistance level and the mode. The resistant mutant showed no symptoms again in this higher doses. Analyses at molecular level were conducted to determine changes in the ALS gene of the resistant source. For this purpose, the resistant plant was selfed and 8 progenies were grown. 2 out of 8 progenies were susceptible to the herbicide while the remains were resistant to the herbicide. DNA sequence analysis indicated that 8 point mutations were detected and 7 sense amino acid changes were found in these six resistant progenies. According to the ALS gene protein sequence of the *Arabidopsis thaliana* model plant, tyrosine-154 serine (Tyr154-Ser), alanine-155 valine (Ala155-Val), valine-163 aspartate (Val163-Asp), proline-197 serine (Pro197-Ser), glycine-609 valine (Gly609-Val), threonine-616 methionine (Thr616-Met) and glutamine-644 histidine (Gln644-His) amino acid changes were founded in these resistant plants. Only one common mutation in six mutant progenies is the proline-197 serine alteration at point 197 according to the *Arabidopsis thaliana* ALS gene sequence. By these data, herbicide resistance was

confirmed by both molecularly and phenotypically. It has been determined that the resistance obtained by EMS mutation provided target site resistance.

KEYWORDS; ALS gene, EMS, Herbicide resistance, Chlorsulfuron, Mutation, Soybean, *Glycine max*

COMMITTEE: Prof. Dr. Bülent UZUN

Prof. Dr. Hasan BAYDAR

Assoc. Prof. Dr. Sabri ERBAŞ

Assoc. Prof. Dr. Hüseyin ÇANCI

Assoc. Prof. Dr. Cengiz İKTEN



ÖNSÖZ

Ülkemizde bitkisel yağ tüketimi giderek artmaktadır. Ülkemizin bulunduğu coğrafya ve iklim özellikleri bakımından yağlı tohumlu bitkilerin üretimi açısından büyük bir potansiyele sahip olmasına rağmen, yeterince yağlı tohumlu bitki ekilmemekte ve yağ ihtiyacını karşılayacak seviyelerde üretim gerçekleştirilememektedir. Oluşan bitkisel yağ açığı ithalat yoluyla karşılanmaktadır. Dünya genelinde Yağlı tohumlu bitkilerin üretiminde soya birinci sırada iken memleketimizde ekim alanı oldukça düşük seviyelerdedir. Ülkemizin artan yağ açığını kapatmak için soya ekimini ve üretimini artırmaya yönelik bir takım çalışmalar yapmak gerekmektedir. Soya bitkisinde üretimi artırmak için işçilik ve girdi maliyetlerini azaltmak amaçlanmaktadır. Bu amaçla yabancı ot mücadelesinde herbisit kullanılmaktadır. Yabancı otlar, kültür bitkisi ile su, ışık, mineral besin maddeleri ve yer bakımından rekabet ederek kültür bitkisinin verim ve kalitesini düşürmektedir. Roundup dayanıklı soya çeşitlerinin GDO (Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar) olmasından ve Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı raporda glifosatın memelilerde, insan ve hayvan hücrelerinde “DNA ve kromozom hasarı” yaptığı bildirilmesinden dolayı kullanımı kısıtlanmalıdır. İnsanlar ve hayvanlar için toksik ve kanserojen değeri oldukça düşük olan sülfonilüre (SU) grubu herbisitlerin kullanılması büyük önem arz etmektedir. Bu amaç doğrultusunda en çok ekimi yapılan soya çeşitlerinden Arısoy’a EMS uygulanarak mutasyon meydana getirilmiştir. Daha sonra hem sera hem de arazi koşullarında herbisit dayanıklı hat taraması yapılmıştır. Aynı zamanda genetik olarak dayanıklılık teyit edilmiştir. Bu dayanıklı hat kısa zamanda agronomik özellikleri taranarak tescil ve patent başvurusunda bulunulacaktır. GDO olmayan bir soya tohumu ülkemiz açısından çok büyük kıymetli olacaktır ve elde edilecek yeni tip soya hatları ülkemiz adına büyük bir kazanç olacaktır.

Tez çalışmasının yürütülmesinde FDK-2018-3775 nolu proje ile destekleyerek maddi imkân sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve tez çalışmasında arazi ve sera çalışmaları için alan ve moleküler analizler için laboratuvar ve ekipmanları sağlayan Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümüne, birim ve imkânlarından yararlandığım Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü’ne teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde, bana yeni vizyonlar açan, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve örnek aldığım kıymetli bilim insanı olan danışman hocam Prof. Dr. Bülent UZUN’a teşekkürü bir borç bilerek şükranlarımı sunuyorum.

Tez izleme komitesinde yer alarak tezin planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar her aşamasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek, her türlü desteği ve laboratuvar imkânını veren değerli hocam Doç. Dr. Cengiz İKTEN’e, bilgi ve desteğini eksik etmeyen sayın hocam Doç. Dr. Hüseyin ÇANCI’ya teşekkürlerimi sunarım. Tez savunma sınavımda yer alarak beni onurlandıran, değerli paylaşımları ve önerileri ile tezime değer katan sayın Prof. Dr. Hasan BAYDAR ve Sayın Doç. Dr. Sabri ERBAŞ’a en içten dileklerimle teşekkür ederim. Tecrübe ve öğretilerini benimle paylaşan her

durumda yardımını ve bilgisini esirgemeyerek katkıda bulunan Doç. Dr. Engin Yol'a teşekkür ederim.

Hidroponik sistemleri ve seralarını kullanmam konusunda desteğini ve yardımlarını esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Deniz HAZAR'a, Öğr. Gör. Esra OKUDUR'a ve Zir. Müh. Ömer Faruk BORA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez sürecinde destek ve yardımları ile hep yanımda olan Öğr. Gör. Lokman ALTINKAYA'ya, Öğr. Gör. Recep BALKIÇ'a laboratuvar aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Hilal Şule TOSUN'a, Arş. Gör. Birgül GÜDEN'e, ve Zir. Müh. Emine DOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Beni çocukluğumdan bu zamana kadar hep destekleyerek ve cesaretlendirerek bu günlere gelmemi sağlayan aileme sonsuz teşekkür ederim. Bu doktora sürecinde beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma, dostlarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	5
2.1. Soya ve Özellikleri	5
2.2. Herbisitlerin Sınıflandırılması.....	9
2.3. Herbisit Dayanıklılık Tanımı ve Mekanizması	15
2.3.1. Hedef bölge dayanıklılığı	18
2.3.2. ALS hedef bölge çapraz dayanıklılık	22
2.3.3. Hedef bölge dışı dayanıklılık.....	25
2.4. ALS Sentezi.....	29
2.5. EMS Mutageni ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	31
2.6. ALS Dayanıklılık Çalışmaları	42
2.7. Hidroponik Sistem Çalışmaları	61
3. MATERYAL VE METOT	65
3.1. Materyal.....	65
3.1.1. Mutasyon uygulanan Arısoy çeşidinin özellikleri	65
3.1.2. Deneme yerinin toprak yapısı ve iklim değerleri	65
3.1.3. Uygulanan herbisit etken maddesi ve özellikleri.....	66
3.2. Metot	69
3.2.1. EMS uygulaması ve M ₁ bitkilerinin ekimi	69
3.2.2. M ₁ bitkilerinin yetiştirilmesi ve tek bitki hasadı.....	73
3.2.3. Herbisit etkili dozunun belirlenmesi.....	76
3.2.4. Hidroponik (durgun su kültürü) sistemin oluşturulması.....	77
3.2.5. M ₂ bitkilerin tarlaya ekilmesi ve herbisit uygulaması	81
3.3.1. Dayanıklı bitkilerin DNA analizi.....	82

3.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri	84
4. BULGULAR	89
4.1. EMS Uygulamaları ve M ₂ Popülasyonu Oluşturma.....	89
4.2. Herbisit Etkili Dozu Belirleme Çalışmaları	91
4.3. Su Kültürü Testleme Çalışmaları	93
4.4. Tarla Şartlarında Herbisit Testleme Çalışmaları	95
4.5. Moleküler Çalışmalar	101
4.6. Sekans Analizleri.....	102
5. TARTIŞMA	117
6. SONUÇLAR	129
7. KAYNAKLAR	131
8. EKLER.....	157
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “EMS mutageni kullanılarak klorosulforon (su grubu) herbisitine karşı dayanıklı soya (*Glycine max* L.) mutantlarının geliştirilmesi ve ALS geninin dizi analizi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

18/06/2020

Rüstem ÜSTÜN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	: Adenin
B	: Bor
bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
Ca	: Kalsiyum
CaCO ₃	: Kalsiyum Karbonat
cm	: Santimetre
Cu	: Bakır
da	: Dekar
ddH ₂ O	: Distile-Deiyonize Su
dk	: Dakika
g	: Gram
G	: Guanin
ha	: Hektar
EC	: Elektrokondüktivite
Fe	: Demir
K	: Potasyum
Kb	: Kilobaz
Mg	: Magnezyum
Na	: Sodyum
N	: Azot
P	: Fosfor
pH	: Hidrojen gücü
S	: Kükürt
Zn	:Çinko
°C	: Santigrat derece

Kısaltmalar

AHAS	: Asetohidroksiasit
ALS	: Asetolaktat Sentez
BATEM	: Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
BLSS	: Biyolojik Yaşam Destek Sistemleri
EMS	: Etil Metan Sülfanat
ESA	: Avrupa Uzay Ajansı
IMI	: İmidazolin
IMI-R	: İmidazolin-dayanıklı
MELISSA	: Mikro Ekolojik Yaşam Destek Sistemi Alternatifi
ND	: Belirlenemeyen
NFT	:Besin Film Tekniği
NMU	: N-nitrozo - N-metil üre
PCR	: Polymerase Chain Reaction - Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
PTB	: Pirimidiniltiyobenzoat Grubu Herbisitleri
RWC	: Bağlı Su İçeriği
R	: Yüksek Dayanıklı Biyotip
r	: Kısmen Dayanıklı Biyotip
S	:Hassas Biyotip
SCT	: Sülfonil-aminokarbonil-triazolinon
SU	: Sülfonilüre Grubu Herbisitleri
SU-S	: Sülfonilüre Hassas
TP	: Triazolopirimidin Grubu Herbisitleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Herbisit dayanıklılık aksiyon komitesi (HRAC) tarafından yapılan herbisit etki alanları ve sınıflandırma sistemi (Delye vd. 2013)	13
Şekil 2.2. Dallanmış zincirli amino asitleri valin, lösin ve isolösin'in sentez şeması. ...	30
Şekil 3.1. Klorosulforon kimyasal yapısı.....	68
Şekil 3.2. 2017 yılına ait EMS uygulaması çalışmaları	69
Şekil 3.3. 2017 yılına ait EMS uygulanmış tohumların ekimi.....	70
Şekil 3.4. 2018 yılı ilk EMS uygulaması ve tohumların araziye ekimi	71
Şekil 3.5. 2018 yılına ait 2. EMS uygulaması, tarlaya ekilerek ardından damlama sulama sistemi kurulması	72
Şekil 3.6. 2018 yılına ait 3. EMS uygulaması ve tohumların çimlenmesi.....	73
Şekil 3.7. M ₁ bitkilerin deneme arazisine ekilmesi ve yetiştirilmesi.....	74
Şekil 3.8. M ₁ bitkilerin tek tek hasat edilmesi ve ayrı ayrı zarflara konulması	75
Şekil 3.9. Herbisit dozunun belirlenmesi.....	76
Şekil 3.10. Hidroponik sistemin ve besin solüsyonun hazırlanışı	77
Şekil 3.11. Hidroponik sistemde bitkilerin yetiştirilmesi	79
Şekil 3.12. Su kültüründe bitkilere herbisit uygulaması	80
Şekil 3.13. Su kültüründen saksıya aktarılan bitkilerin yetiştirilmesi	80
Şekil 3.14. M ₂ bitkilerinin ekilmesi ve yetiştirilmesi	81
Şekil 3.15. M ₂ bitkilerine herbisit uygulaması.....	82
Şekil 3.16. Dayanıklı bitkiler ait DNA izolasyonu ve agaroz jel görüntüsü.....	83
Şekil 3.17. Kullanılan PCR cihazları; a) MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler; b) PeQlab Primus 25 advanced Thermocycler.....	85
Şekil 3.18. Tezde kullanılan jel görüntüleme sistemleri; a) i-MyRun marka elektroforez cihazı; b) INGENIUS marka jel görüntüleme cihazı.....	87
Şekil 4.1. 2017 yılı EMS uygulanmış tohumların hasadı	89
Şekil 4.2. 2018 yılında M ₁ bitkilerinin yetiştirilmesi ve hasat edilmesi	90
Şekil 4.3. Herbisit doz belirleme çalışması a) 10 ppm; b) 20 ppm; c) 30 ppm; d) 70-80-90 ppm dozlarında yapılan uygulamalar	92
Şekil 4.4. Herbisit uygulaması sonrası bitkilerde oluşan kahverengileşme semptomları.....	93
Şekil 4.5. Herbisit uygulaması sonrası bitkilerin kuruması	94

Şekil 4.6. Su kültüründe dayanıklı gözlemlenen hatların saksıya alınması, yetiştirilmesi ve tohum elde edilmesi.....	94
Şekil 4.7. Deneme arazisinin herbisit uygulama öncesi ve herbisit uygulandıktan 4 gün sonra görüntüsü	95
Şekil. 4.8. Tarlada herbisit uygulaması sonrası bitki semptomları	96
Şekil. 4.9. Herbisit uygulaması sonrası dayanıklı bitkilerin seleksiyonu ve etiketlenmesi	97
Şekil 4.10. a) Hidroponik sistemde dayanıklı seleksiyonu; b) hassas bitki; c) dayanıklı bitki	97
Şekil 4.11. Serada 60 ve 90 ppm konfirmasyon dayanıklılık testlemesi. (A hassas Arısoy çeşidi, B herbisit dayanıklı mutantlar)	99
Şekil 4.12. EMS mutagen uygulaması, iş akışı ve sonuç şeması.....	100
Şekil 4.13. GmAHAS1 primeri ile çoğaltılan ve yaklaşık 2100 bp PCR ürünleri; 1 ve 13 nolu örnek 1 kb'lik ladder, 2-9 nolu örnekler dayanıklı bitki 10-11 nolu örnekler hassas bitki 12 nolu örnek negatif kontrol örnek (su).....	101
Şekil 4.14. 404. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; a) dayanıklı bitki; b) hassas bitki.....	104
Şekil 4.15. 407. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; a) dayanıklı bitki; b) hassas bitki.....	104
Şekil 4.16. 408. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; a) dayanıklı bitki; b) hassas bitki.....	105
Şekil 4.17. 431. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; a) dayanıklı bitki; b) hassas bitki.....	105
Şekil 4.18. 532. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; a) dayanıklı bitki; b) hassas bitki.....	106
Şekil 4.19. 1768. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; a) dayanıklı bitki; b) hassas bitki.....	106
Şekil 4.20. 1790. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; a) dayanıklı bitki; b) hassas bitki.....	107
Şekil 4.21. 1875. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; a) dayanıklı bitki; b) hassas bitki.....	107

Şekil 4.22. MEGA-X programı ile yapılan aligment görüntüsü; KC254821.1 ve KC254825.1 Ghio vd (2013) sırasıyla dayanıklı ve hassas bitki referans sekans, 1-2-3-4-6 herbisit dayanıklı gözlemlenen soya mutantları, 7-8 herbisit hassas Arısoy çeşidi.	108
Şekil 4.23. GmAHAS1 primeri ile çoğaltılan ve CLUSTAL OMEGA programı ile yapılan Protein dizi analiz görüntüsü; <i>Arabidopsis thaliana</i> referans bitki; KC254821.1 Ghio vd (2013) dayanıklı soya bitkisi; Herbisit dayanıklı soya mutanı TAR1-1, TAR1-2, TAR1-3, TAR1-4, TAR1-6; Herbisit hassas Arısoy çeşidi (ok işaretleri amino asit değışikliğı olan noktaları göstermektedir)	111
Şekil. 4.24. Protein dizisine göre oluşturulan filogenetik ağaç	112
Şekil 4.25. GmAHAS4 primeri ile çoğaltılan ve CLUSTAL OMEGA programı ile yapılan Protein dizi analiz görüntüsü; <i>Arabidopsis thaliana</i> referans bitki; Dayanıklı, herbisit dayanıklı soya mutanı; Hassas, herbisit hassas Arısoy çeşidi.....	114
Şekil 4.26. GM13 primeri ile çoğaltılan ve CLUSTAL OMEGA programı ile yapılan Protein dizi analiz görüntüsü; <i>Arabidopsis thaliana</i> referans bitki; Dayanıklı, herbisit dayanıklı soya mutanı; Hassas, herbisit hassas Arısoy çeşidi.....	115
Şekil 4.27. GM15 primeri ile çoğaltılan ve CLUSTAL OMEGA programı ile yapılan Protein dizi analiz görüntüsü; <i>Arabidopsis thaliana</i> referans bitki; Dayanıklı, herbisit dayanıklı soya mutanı; Hassas, herbisit hassas Arısoy çeşidi.....	116

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Etki Şekillerine göre herbisitlerin sınıflandırılması.....	11
Çizelge 2.2. Şimdiye kadar ALS gen bölgesindeki mutasyonlardan kaynaklı rapor edilen herbisit dayanıklı bitkiler (Tranel vd. 2020)	55
Çizelge 3.1. Deneme arazisinin toprak analiz sonuçları	66
Çizelge 3.2. 2018 ve 2019 yılı yetiştirme sezonu meteorolojik verileri	66
Çizelge 3.3. Klorosulforon etken maddeli herbisitinin kullanılabileceği ürün grubu ve etki ettiği yabancı ot grubu uygulama dozu ve dönemi.....	67
Çizelge 3.4. Hoagland Besin solüsyonu içeriği	78
Çizelge 3.5. Tez çalışmasında kullanılan primerler, dizilimi ve ürün büyüklükleri.....	84
Çizelge 3.6. Tez çalışmasında yürütülen PCR protokolü ve solüsyon oranları.....	85
Çizelge 4.1. Potansiyel dayanıklı gözlemlenen bitkilerin ilk konfirmasyon testlemesindeki çimlenme, dayanıklı ve hassas bitki sayıları	98
Çizelge 4.2. İlk konfirmasyon testlemesinde potansiyel dayanıklı gözlemlenen bitkilerin tekrar ikinci kez testleme sonuçları	99

1. GİRİŞ

Soya (*Glycine max* L.) anavatanı Doğu Asya olup ilk üretimi ve gıda maddesi olarak kullanımı milattan önceki yıllarda Çin'de olduğu kabul edilmektedir (Arioğlu 1999). Yazlık ve tek yıllık bir yağ bitkisi olan soya tohumlarında %36–40 protein, %18–24 yağ, %26 karbonhidrat ve %18 madensel maddeler içermektedir (Arioğlu 2007). Yüksek kalitede protein içeriğinin yanı sıra, insan vücudunda bulunan yağ metabolizmasını düzenleyen çok değerli yağ asitlerine de sahiptir. Bu yağ asitleri şeker hastalığı, damar sertliği gibi rahatsızlıklarda olumlu bir etkiye sahiptir ve aynı zamanda kandaki kolesterol seviyesini düşürerek kalp krizi riskini de azaltmaktadır.

Coğrafi ve tarihi kaynaklara göre, soya muhtemelen Çin'de M.Ö. 1700-1100 arasında Shang ailesi tarafından kültüre alındığı bildirilmiştir (Gai 1997; Gai ve Guo 2001; Hymowitz ve Newell 1981; Qui vd. 1999). Soyanın kültüre alındığı bölgeyle ilgili kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Farklı araştırmacılar soyanın kuzeydoğu Çin'de (Fukuda 1933), Çin merkezli sarı ırmak vadisi'nin orta kısmı ve aşağı taraflarında (Hymowitz ve Newell 1981; Xu 1986; Zhou vd. 1998), güney Çin'de (Wang vd. 1973; Gai vd. 1999, 2000; Shimamoto vd. 1998), Sichuan, Shaanxi, Shanxi, Hebei ve Shandong şehirlerini içine alan Çin'in güneybatısından kuzeydoğusundaki koridorda (Zhou vd. 1999), aynı zamanda birçok merkezde (Lu 1977; Dong vd. 2001) kültüre alınmış olabileceğini belirtmişlerdir.

Soya M.Ö. 4. ya da 5. yüzyılda Kore Yarımadası'na geldiği rapor edilmiştir (Kim 1993). Soya, Kore ya da Çin'den Japonya'ya gelmiş olma ihtimalinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Li ve Nelson 2001). Soya, Japonya ve Kore'de diğer ülkelerden daha önce yetiştirildiğine dair kanıtlar, onların ikincil gen merkezi olarak kabul edilmesini sağlamıştır. Soya, diğer Asya ülkelerine yayılması ile ilgili yayınlanmış bir tarihçe bulmak zordur, fakat soya; Vietnam, Endonezya, Hindistan ve Nepal'de diğer güneydoğu ve merkezi Asya bölgelerinde uzun süredir yetiştirilmekte olduğu bilinmektedir.

Soya, misyonerler ve denizciler tarafından Çin ve Japonya'dan Avrupa'ya getirilmiştir. Soya, 17. yüzyılın başında Avrupa'ya getirilmişse de verimli olarak yetiştirilememiştir. Soya, Avrupa'da 1740'de Fransa'da botanik bahçelerinde ve 1790'da Royal Botanical Garden, Kew, İngiltere'de yetiştirilmiştir. Soya, birçok Avrupa ülkesinde ilk başlarda peyzaj bahçelerinde yetiştirilmiş, tarım arazisi olarak ekimi oldukça sınırlı olduğu bildirilmiştir (Morse 1927). 1765'te ABD sınırlarında ilk ekimi gerçekleştirilmiş ve bu tarihten beri yetiştirilmeye devam edilmiştir. 1919-1924 yılları arasında ABD'de 8 eyalette birden soya ekimi yapılmış ve zamanla 26 eyalete yayılmıştır. Soya tarımı en çok ABD'de gelişmiştir. Soyanın Türkiye'ye gelişi ise 1930'larda gerçekleşmiş ve ilk denemeler Karadeniz Bölgesi'ne yapılmıştır.

Soya; pamuk tohumu, yer fıstığı, ayçiçeği, kolza, keten, susam, aspir gibi uluslararası pazarda ve dünya genelinde üretilen başlıca yağ bitkileri arasında birinci sırada yer almaktadır. Dünya genelinde soya, pamuk, yer fıstığı, ayçiçeği, kolza, keten, susam, aspir gibi üretilen başlıca yağlı tohumlu bitkiler içerisinde 361 milyon ton üretimle %61 paya sahiptir. Bu üretimi sırasıyla Brezilya (126 milyon ton), ABD (96 milyon ton) ve Arjantin (54 milyon ton) en çok üretim yapan ülkeler olup yaklaşık soya üretiminin %80'den fazlasına sahiptirler (Soystats 2019). Soya hem üretim alanı ve

miktarı bakımından hem de uluslararası ihracat ve ithalat yönünden önemli bir yağ bitkisidir (Denis 1994). Geleneksel tüketim olarak en fazla Asya'da kullanılmakta, batı ülkelerinde ise daha çok sanayide protein ve yağ kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Singh 1992). Ekonomik değer olarak soya proteini, soya yağı değerine göre daha fazladır (Stanton ve Blumenfeld 1992).

Türkiye'de soya ekimi ilk defa 1930'lu yıllarda Karadeniz Bölgesi'nde yapılmış ve daha sonraki yıllarda ülkemizin diğer bölgelerine yayılmıştır. Türkiye'de yaklaşık 900 bin hektar yağlı tohumlu bitkiler ekilmektedir. Ekim alanında ilk dört sırayı sırasıyla ayçiçeği (yaklaşık 735 bin ha.), yerfıstığı (yaklaşık 44 bin ha.), kolza (yaklaşık 38 bin ha.) ve soya (yaklaşık 33 bin ha.) almaktadır. Soyada 35 bin hektar ekim alanından toplam 150 bin ton ürün elde edilmektedir ve Türkiye verim ortalaması 426 kg.da⁻¹ olmaktadır (TÜİK 2019). İller bazında değerlendirildiği zaman sırasıyla Adana (20 bin hektar), Mersin (9 bin hektar) ve Osmaniye (2.5 bin hektar) ilk 3 sırada olup, Türkiye üretiminin yaklaşık %92'sini oluşturmaktadır (TÜİK 2019).

Soya, toprak isteği bakımından fazla seçici değildir. Pamuk ve buğdayın yetiştiği her toprakta rahatlıkla yetişebilmektedir. Ancak, fazla kumlu ve taşlı topraklarda yetiştirildiğinde, verim düşük olmaktadır. Soya ekilecek toprağın kumlu-tınlı, organik maddece zengin olması halinde, tohum verimi yüksek olmaktadır. Soyada verimin yüksek ve nodozite oluşumunun istenilen düzeyde olabilmesi için toprak pH'sının 6.2-6.8 arasında olması gerekmektedir. Düşük pH derecelerinde nodül oluşumu için çok gerekli olan molibden elementinin alımı azalır, alüminyum ve mangan gibi elementlerde bitkiye toksik etkide bulunmaktadır. Toprakta pH'nın yüksek olması halinde ise bitkide; demir, bakır ve çinko gibi element eksiklikleri ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle çok kireçli topraklarda soya ekimi önerilmez.

Birçok kültür bitkisi yetiştiriciliğinde verim ve kaliteyi düşüren problemlerin başında yabancı otlar gelmektedir. Yabancı otlar tarımın başlangıcından bu yana insanoğlunu en çok uğraştıran problemlerin başında gelmekte ve halen de meydana getirdikleri sorunlar tarımda göz ardı edilmeyecek boyutlardadır. Bazı araştırmacılar kültür bitkilerine göre değişmekle birlikte yabancı otların verdiği zarar %90'lara kadar ulaşabildiğini bildirmişlerdir (Lacey 1985). Yabancı otlar, kültür bitkisi ile su, ışık, mineral besin maddeleri ve yer bakımından rekabet ederek kültür bitkisinin verimini ve kalitesini düşürmektedir. Özellikle kültür bitkisi henüz yeterli büyümeyi gerçekleştirilmeden, yabancı otlar kısa zamanda gelişmekte ve mücadele edilmediklerinde hızla tarlaya yayılarak verimi önemli oranlarda azaltmaktadır. Aynı zamanda yabancı otlar kültürel işlemleri zamanında ve istenilen etkinlikte yapılmasını engellemekte, hastalık ve zararlılara konukçuluk yapmaktadır. Bu nedenle tarım yapılan alanların tamamına yakınında yabancı ot mücadelesi yapılmaktadır. Mekanik ve elle kontrol yöntemleri daha çok az gelişmiş ülkelerde uygulanmakla beraber ülkemizde tarım işçisi bulmakta çekilen sıkıntılardan dolayı girdi maliyeti artmaktadır. Geleneksel olarak başlangıçta yabancı otlarla mücadele elle çapa ile ve yakılarak yapılsa da II. Dünya Savaşı'nın ardından arsenik pentoksit gibi inorganik zehirlerin bulunması ile kimyasallar kullanılmaya başlanmıştır. Günümüze çok farklı etki mekanizmasına sahip değişik özelliklerde herbisitler geliştirilmiştir ve tarım alanlarında kullanılan kimyasallar sınıfında en çok kullanılan grup olarak yer almaktadır. Herbisitlerin maliyetinin ucuz olması, uygulanabilirliğinin kolay olması ve hızlı bir şekilde sonuç vermesi gibi özelliklerinden dolayı çiftçiler tarafından yabancı otlarla mücadelede her

zaman ilk tercih olmaktadır. Büyük ve geniş arazilerde ekim yapıldığını göz önüne alırsak, bitkiye ve insanlara zararlı etki yapmayan seçici ot ilaçları kullanmak büyük bir kolaylık sağlamaktadır.

Yabancı ot kontrolü kültürel, mekanik, biyolojik ve kimyasal yöntemlerle sağlanabilmektedir. Bununla birlikte, gelişmiş ülkelerde işçilik pahalıdır, bu nedenle mahsul üretimi büyük ölçüde kimyasal ot kontrol yöntemlerine dayanmaktadır. ABD’de tarımsal ürünler üzerindeki herbisit kullanımı 1940’ların sonlarında önemli ölçüde artmış ve o zamandan beri ABD pazarına hâkim olmaya devam etmiştir (Timmons 2005). Herbisitler; kullanımdaki basitlikleri, daha fazla etkinliği ve daha da önemlisi iş gücü ve zamandan tasarruf ederek kontrol maliyetlerini azalması sebebiyle yabancı ot kontrolü için ana araçlar haline gelmiştir (McErlich ve Boydston 2013). Yabancı otların seçici kontrolü için herbisitlerin ortaya çıkması mahsul üretimini, yabancı ot kaynaklı verim kayıplarını ve üreticilerin yüksek kaliteli ürünler elde etmesine büyük katkıda bulunmuştur.

Soyada yabancı otlardan kaynaklanan verim kayıplarını önemli derece artıran etkenlerin başında yabancı otlar gelmektedir. Yabancı ot kontrolü soyada yüksek verim elde etmek için büyük önem taşıyan bir uygulamadır ve mücadele edilmedikleri takdirde ciddi bir sorun haline gelmektedir. Bu nedenle yabancı ot kontrolü soya üretiminin ayrılmaz bir parçasıdır. Soyanın çimlenme ve ilk gelişim döneminde yabancı otlar; nem, ışık ve besin maddeleri bakımından rekabet etmektedir ve bu en kritik dönemi oluşturmaktadır. Soya, büyümesinin erken aşamalarında ciddi ot rekabeti ile karşı karşıya kalmaktadır. Üreticiler, ileri teknolojilerde bile yabancı otların yüksek kayıplara sebep olduğunu belirtmektedirler. Son zamanlardaki araştırmalar, soya plantasyonlarındaki yabancı ot türlerinin yoğunluğunun ve dağılımının verim kayıpları üzerinde önemli parametreler olduğunu bildirmiştir. Bunun nedeni yabancı ot türlerinin güneş ışığı, su ve besin maddeleri ile rekabet etmesi istila ve türlerin yoğunluk seviyelerine bağlı olarak hasat işlemlerini engellemesi sonucu soya kalitesine kayıplara sebep olmaktadır (Reis ve Vivian 2011). Kachroo vd. (2003) yabancı otların ot yoğunluğuna, doğasına, çevresel durumuna ve ot rekabeti süresine bağlı olarak %40-60 oranında verim kayıplarına sebep olabildiğini belirtmişlerdir. Yapılan bir çalışmada, yabancı otlar tek başına soya veriminde ortalama %37’lik bir azalmaya neden olurken, diğer mantar hastalıkları ve tarımsal zararlılar kayıplarının da %22’sini oluşturduğunu bildirmişlerdir (Oerke ve Dehne 2004). Soya yetiştiriciliğinde ekimden sonra ilk 20 ila 45 gün arası yabancı ot rekabeti için en kritik dönem olarak kabul edilir ve bu dönemde optimum verim için yabancı otları kontrol altında tutmak gerekmektedir. (Sharma vd. 2007). Tahminlere göre, Amerika Birleşik Devletleri’nde yabancı otların yılda birkaç milyar ABD doları zarar verdiği düşünülmektedir. Ortalama 75 milyon ton üretim yapan Brezilya’da, yabancı ot kontrolü harcamalarının toplam üretim maliyetinin %3 ila %5’ini temsil ettiği tahmin edilmektedir. Bu da Brezilya’da soyada sadece yabancı ot kontrolü için kullanılan 1.2 milyar ABD dolarından fazla olduğu anlamına gelmektedir.

Yabancı ot biyolojisi üzerine yapılan güncel çalışmalar, büyük ölçüde tarımsal uygulamalar yetiştirme sistemleri ve çevre etkileri nedeniyle değişmektedir. Araştırmalar temel yabancı ot biyolojisini anlamaya doğru yoğunlaşmıştır (Bhowmik 1997). Yabancı ot türlerinin, popülasyonlarının ve biyotiplerinin tarımsal uygulamalardan dolayı nasıl geliştiğini tahmin çok önemlidir. Bu bilgi, soya bitkilerinde yabancı ot kontrol uygulamalarının geliştirilmesine yardımcı olmaktadır. Yabancı ot

yoğunluğu, tohum gelişim süreçleri, demografik varyasyon, yabancı ot-kültür bitkisi rekabeti ve üreme biyolojisi yabancı ot mücadelesinde diğer önemli biyolojik faktörlerdendir (Buhler vd. 1997).

Ülkemizde artan nüfusla birlikte bitkisel yağ tüketimi giderek artmaktadır. Ülkemizin toprak özellikleri ve iklim koşulları bakımından, yağlı tohumlu bitkilerin üretimi açısından büyük bir potansiyele sahip olmasına rağmen yağ ihtiyacını karşılayacak seviyelerde üretim gerçekleştirilememekte ve oluşan bitkisel yağ açığı ithalat yoluyla karşılanmaktadır. Bu ithalatın en önemli nedenleri ham yağ ve yağlı tohumlu bitkilerin üretiminin yetersiz seviyede olmasıdır. Bitkisel yağ yetersizliği yüzünden her yıl önemli miktarlarda yağlı tohum ve ham yağ ithalatı yapılmaktadır. Bu durum ülke ekonomisi için büyük döviz kayıplarına neden olmakla birlikte, ülkemizi yağlı tohum ve ham yağ yönünden dışa bağımlı hale getirmektedir (BYSD, 2018). Ülkemizin artan yağ açığını kapatmak için soya üretimini artırmaya yönelik birtakım çalışmalar yapmak gerekmektedir. Soya bitkisinde ruhsatlı ot ilacının az oluşu ve sürekli aynı tip herbisitlerin kullanılması sonucu gelecekte herbisitler dayanıklı yabancı otların oluşması kaçınılmazdır. Bu sebeplerden dolayı gelecekte diğer herbisitlerle döngüye girebilecek yeni total herbisitlere ihtiyaç duyulacaktır. ALS (Asetolaktat sentez)'yi inhibe edici herbisitlerin kullanılması, yüksek yabancı ot kontrolü etkinliği, yüksek yabancı ot seçiciliği ve memelilerde düşük düzeylerde toksik etkilerinden (Sharner ve Singh 1997) dolayı ekolojik yönden daha az zararlı herbisitlerin kullanılması önem kazanmaktadır. Aynı zamanda ALS herbisitlerinin toprakta parçalanma sürelerinin az olması sebebiyle toprakta kalıcılığı az olmaktadır. Bu yönüyle de uygulandıktan sonra yeni yetiştirme sezonunda ekilecek bitki için herbisit zararı daha az seviyede kalmaktadır.

Bu tez çalışmasında Arısoy çeşidine EMS uygulanarak ALS herbisit dayanıklılığına sahip soya hattı elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda M₂ döneminde klorosulforon etken maddeli herbisite karşı dayanıklılık seleksiyonu yapılması ve daha sonra dayanıklılık gösteren hatların molaküler analizinin yapılması planlanmıştır. Elde edilecek dayanıklı bir hat geliştirilmesi durumunda direk patent ve tescil başvurusunda bulunulacaktır. Ülkemizde SU grubu herbisite dayanıklı GDO olmayan bir çeşit bulunmamaktadır. Böyle bir çeşidin ülkemiz ve dünya genelinde yapacağı etki ve ekonomik değer çok büyük olacağı öngörülmektedir. Herbisitlere dayanıklı transgenik olmayan yerli ve milli bir soya çeşidinin ülkemize katkısı büyük olacaktır. Uygulanan mutasyonlar bitkilerde kalıcı birçok değişiklik meydana getirmektedir. Herbisit dayanımı dışında birçok farklı istenilen agronomik özelliğinde ortaya çıkma ihtimali bulunmaktadır. Böylece farklı agronomik karakterler bakımından yeni genetik varyasyonlar oluşturma ihtimali bulunmaktadır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Soya ve Özellikleri

Soya kazık köklü bir bitkidir ve ana köke bağlı olarak kuvvetli bir saçak kök sistemine sahiptir. Soya, başlangıçta kazık kök oluşumunu takiben sonrasında çok sayıda ikincil kök oluşumu gösteren tek yıllık bir bitkidir. 150-200 cm derinliğe kadar inebilir fakat genellikle 60-70 cm derinlikte yoğunlaşmaktadır. Çiçeklenme başlangıcından itibaren bu kazık ve saçak kökler üzerinde çok sayıda yumrucuklar oluşmaktadır.

Çeşide ve bitki boyuna göre değişmek üzere 10-15 boğumdan oluşan soya sapları dik ve sert yapıda olup, üzeri sık tüylerle kaplıdır. Bitki boyu; çeşide, ekim zamanına ve bakım şartlarına bağlı olarak 60-150 cm arasında değişmektedir. Genetik açıdan sap uzamasını kontrol eden iki lokus vardır (*Dt1* ve *Dt2*) (Woodworth 1933; Bernard 1972). İndeterminant büyüme tipinde (*Dt2*) çiçeklenme sonrasında sap uzaması, boğum oluşumu, uzayan ve gittikçe sivrileşen ana sap ve dalların gelişimi şeklinde devam etmektedir. Determinant büyüme tipinde (*dt1*) çiçeklenme sonrasında genellikle sapın büyüme kısmında körleşme ve salkım şeklinde çiçek oluşumu meydana gelmektedir. Çiçeklenme zamanı ve olgunlaşma süresinin sap morfolojisi üzerinde etkisiyle bu her iki büyüme tipinde de önemli farklılıklar meydana gelmektedir. İki fenotipin ara formu bir fenotip *Dt2* geni ile kontrol edilmekte ve yarı determinant olarak isimlendirilmektedir (Bernard 1972). Thompson vd. (1997) *Dt1* gen bölgesinde üçüncü bir allel *dt1-t'*'yi belirlemiştir. Bu allel *Dt2*'ye yakın bir bitki fenotipi meydana getirmekle birlikte ana sapta daha az boğum ve dal uçlarında daha uzun yaprakçıkların oluşumuna sebep olmaktadır.

Soya vejetatif gelişimini takiben generatif döneme geçmektedir. Soya yaprakları 3 yaprakçıktan oluşan bileşik yaprak biçimindedir. Erkençi çeşitlerden geç olgunlaşan çeşitlere doğru yaprak iriliği artmaktadır. Koltuk altı tomurcukları 2-35 arası çiçek oluştururlar ve bu çiçeklerin %20-80'i dökülür. Erkençi ve geç dönemde oluşan çiçekler genellikle tohum tutmamaktadır. Çiçek rengi çeşitlere göre değişmekle birlikte beyaz veya mor renkte olmaktadır. Soyanın kelebek şeklindeki çiçeği tipik olarak beş farklı çanak yaprakтан oluşan boru şeklinde ve beş parçadan oluşan taç yapraklara sahiptir. Erkek organlar kendine döllenmeyi sağlamak için stigmanın etrafında küme halindedirler. Dişi organ; bir adet ovaryum, dişi borusu ve stigmadan meydana gelmektedir. Ovaryumda dört adet yumurtalık vardır. Dış kıvrımlarda beş ve iç kıvrımlarda dört erkek organ olmak üzere 9 erkek organ iki kıvrımın içinde düzenli halde bulunmaktadır. Dokuz stamenin iki kıvrımı kendilerini filament üzerindeki tek bir kıvrıma göre hizalamıştır. Dişi organın etrafındaki dizilimde daha büyük ve yaşlı erkek organlar yerini genç ve daha küçük erkek organlara bırakmaktadır. Tek olan erkek organ (10. erkek organ) en son ortaya çıkmaktadır. Polenler stigma tepesine dökülürler. Polen, dişi borusu boyunca ilerlemektedir. Polenin tepesi açılır ve içinden iki adet sperm hücresi çıkmaktadır. Sperm hücrelerinden birincisi yumurtayla birleşir ve zigotu oluşturur, ikinci sperm hücresi ise ikincil çekirdek ile birleşerek endospermi oluşturmaktadır. Soya, erkek organlar stigma etrafını çepeçevre sardığı ve direk polenler dişi tepesine yapıştığından dolayı yüksek oranda kendine tozlanır fakat %1'den az da olsa yabancı tozlanabilmektedir (Carlson ve Lersten 2004).

Tohumlar tozlaşma sonrası 50-80 gün içerisinde olgunlaşmaktadır. Baklalar 3-5 cm uzunlukta ve 1 cm kalınlıkta olmakta, hafif boğumlu ve tüylü olup, içlerinde genellikle 2-4 tohum bulunmaktadır. Yeşil renkli baklalar olgunlaşma döneminde sarı ya da kahverengiye dönüşmektedir. Bitkide bakla sayısı çeşide ve ekim sıklığına göre değişmektedir. Bir metrekare alanda 35-40 bitkinin bulunduğu normal ekilişlerde, bir bitkide 30-40 bakla bulunurken, bu rakam uzun boylu ve geç olgunlaşan çeşitlerde veya daha seyrek ekimler nedeniyle bol dallanmış bitkilerde 300'ün üzerine çıkabilmektedir. Soya tohumları yassı ya da yuvarlak şekilli olmaktadır. Tohum kabuğu rengi ise sarı veya kahverenginin değişik tonlarındadır. Tohum göbeğinin rengi en belirgin çeşit özelliği olarak beyaz, sarı, kahverengi, gri, yeşil ya da siyah renklerde olabilmektedir. Tohum iriliği çeşide ve yetiştirme şartlarına göre değişiklik göstermektedir.

Yetiştirme süresi boyunca 2400-3600°C sıcaklık toplamına gereksinim duymakta olan soya bitkisi yazlık bir bitkidir. Soyada fotosentez için en uygun hava sıcaklığı 25-30°C'dir. Hava sıcaklığı 30°C'nin üzerine çıktığında, fotosentez olumsuz yönde etkilenmektedir. Yetiştirme süresi boyunca hava sıcaklığı 35°C'nin üzerine çıktığında, çiçek ve baklalarda silkme (dökülme) başlamaktadır. Hava sıcaklığının yüksek olduğu dönemlerde toprakta yeterince suyun (rutubetin) bulundurulması gerekmektedir. Aksi halde hava sıcaklığı soyanın büyüme ve gelişmesini olumsuz etkilemektedir. Soya tohumları 4-40°C arasında çimlenebilmektedir. Çimlenme için en uygun toprak sıcaklığı 25-30°C'dir. Toprak sıcaklığı azaldıkça, tohumun çimlenme süresi uzamakta ve sürme gücü zayıflamaktadır.

Soya çeşitleri, yetiştirme bölgesine bağlı olarak 13 ayrı olgunluk grubuna ayrılmıştır. "000", "00" ve "0" grubundaki soya genotipleri Dünyanın kuzey bölgelerine uyum sağlamaktadır. "I", "II" ve "III" gruptaki çeşitler güney bölgelere doğru daha iyi uyum sağlamaktadır. Daha aşağı bölgelerde "IV", "V" ve "VI" gruptaki çeşitler uyum sağlamaktadır. Ekvator bölgesinde ise, "VII", "VIII", "IX" ve "X" gruba ait soya genotipleri iyi uyum sağlamışlardır. Ülkemiz açısından ise Trakya Bölgesinden başlayarak Çukurova'ya kadar uzanan alanlar için, "0" grubu ile "V" grup arasındaki olgunluk grubuna ait genotipler kolaylıkla yetiştirilebilmektedir. Bir bölgenin soya yetiştirmeye elverişli toplam gün sayısının bilinmesi çeşit seçiminde kritik önem taşımaktadır. Tarıma elverişli gün sayısı az ise o bölge için erkenci çeşitlerin kullanılması daha uygundur. Bu süre çok uzun ise daha geççi çeşitlerin seçilmesi uygun olacaktır. Bu bilgiler ışığında Trakya Bölgesi için "00", "0" ve "I" gruptaki soya çeşitleri uygun iken, Karadeniz Bölgesinde "II" ve "III" gruptaki soya çeşitleri, Akdeniz Bölgesi ve Çukurova için de "III", "IV" ve "V" gruptaki soya genotiplerinin kullanılması daha uygun olmaktadır.

Soya bitkisinin büyüme ve gelişmesini etkileyen en önemli iklim faktörlerinden biri de gün uzunluğudur. Soya kısa gün bitkisidir. Gün uzunluğu arttıkça, çiçeklenme başlangıcı önemli ölçüde gecikmektedir. Soyada çiçeklenme için kritik gün uzunluğu 10-12 saat arasında değişmektedir. Geç olgunlaşan soya çeşitleri, gün uzunluğuna daha duyarlıdır. Uzun gün şartlarında soya bitkisi daha fazla sayıda çiçek oluşturmakta, ancak çiçeklerin silkme oranı artmaktadır.

Soyanın yetiştirme mevsiminin yaz dönemi olması sebebiyle suya olan ihtiyacı oldukça fazla olmaktadır. Yetiştirme süresi boyunca toplam 500-700 mm su tüketmektedir. Bölgelere göre değişmekle beraber soyanın haftalık su tüketimi 50

mm'ye kadar çıkabilmektedir. Soya tohumları çimlenebilmesi için kendi ağırlığının %50'si kadar su alması gerekmektedir. Bu nedenle ekimin tavlı toprağa yapılması çok büyük önem arz etmektedir. Soya bitkisinin suya en fazla ihtiyaç duyduğu devre, çiçeklenme başlangıcından baklaların olgunlaşmasına kadar geçen süredir. Bu dönemde yapılan yeterli sulama verim artışı yönünden büyük fayda sağlamaktadır. Aksi durumlarda baklaların tam kendini büyütememesi, çiçeklerdeki silkmelere bağlı olarak önemli verim kayıpları yaşanabilmektedir.

Dünya genelinde soya ıslahında şu anda genetik çeşitliliğin sadece küçük bir kısmı kullanıma uygundur. Dünyadaki en eski ve geniş ulusal ıslah programı Çin ve ABD'de bulunmaktadır. Amerika ve Kanada'daki soya genetik tabanı dardır (Gizlice vd. 1996; Burton 1997; Singh ve Hymowitz 1999). Kuzey Amerika kökenli kamuya ait 6 eskiden kalma soya çeşitleri 1947'den 1988'e kadar ABD soya üretiminin %60'ını oluşturmuştur (Gizlice vd. 1996). DNA marker analizleri, bu eskiden kalma hatların oldukça çeşitli olduğunu göstermektedir (Thompson ve Nelson 1998). Çeşit geliştirme ve verim arttırma amaçlı yapılan seleksiyonda kullanılan bu hatlar oldukça farklı özelliklere sahiptir (Kisha vd. 1998; Brown-Guedira vd. 2000; Li vd. 2001). ABD'deki soya üretimindeki genetik tabanı genişletme çabaları uzun süredir devam etmektedir (Hartwig 1973). Son zamanlardaki elde edilen bulgular, bilim adamları tarafından umut verici olduğu bildirilmiştir.

Çin'deki soya ıslahının genetik tabanı Amerika'daki soya ıslah tabandan çok daha geniştir. 1923'ten 1995'e kadar piyasaya sürülen Çin'e ait 651 adet soya çeşidinin pedigrisi, 339 atadan gelmekte olduğunu göstermiştir. Bu çeşitler üretimin genetik tabanının %80'ine katkıda bulunan eskiden kalma hatların 190 kadarını içermektedir (Cui vd. 2000). DNA marker sistemlerine göre, Çin'in kuzeydoğu, merkez ve güney bölgeleri olmak üzere soya yetiştirilen üç büyük bölgesi genetik tabanı farklıdır ve bu bölgelerde bağımsız gen havuzu olduğu belirlenmiştir (Li vd. 2001).

Dünyada soya dar genetik tabanlı olmasına rağmen, soya ıslahı önemli gelişim göstererek devam etmektedir. ABD ve Kanada'nın üretim alanlarındaki 60 yıllık ortak bölgesel testlerden toplanan verileri analiz ederek, Wilcox (2001) yıllık verim yükseliş oranının 21.6 (olgunluk grubu 00), 25.8 (olgunluk grubu 0), 30.4 (olgunluk grubu I), 29.3 (olgunluk grubu II), 30.6 (olgunluk grubu III), ve 29.5 (olgunluk grubu IV) kg ha⁻¹ olduğunu belirtmiştir. Son yıllardaki verim yükselme oranları önceki yıllara eşit ya da daha yüksek olmaktadır. 1961'de dünya verim ortalaması 1.13 Mt ha⁻¹ iken, 2004 yılında bu sayı 2.23 Mt ha⁻¹ yükselmiştir. Bu 43 yıllık süreçte verim neredeyse 2 katına çıkarılmıştır. Bunda en önemli etkenlerin başında birçok özellik ve karakter bakımından yürütülen ıslah programları gelmektedir. Soyada kullanılmış çeşitli ıslah prosedürleri vardır ve hala kullanılmaktadır (Orf vd. 2004). Bunlar içerisinde tek bitki seleksiyonu ve kış aylarında yetiştiricilik sistemleri melezlemeden verim testlerine kadar olan zamanı büyük oranda kısaltarak büyük etkide bulunmuştur. Geçmişten günümüze kadar gelişen mekanizasyon ve otomasyon sistemleri ıslah programının randımanını ve hızını arttırmıştır.

Dünyada üretilen tek yıllık yağlı tohumlu bitkiler arasında en fazla üretilen bitkisel yağ soya tohumu yağıdır (%52). Soya yağının başlıca yağ asitleri palmitik (C16:0), stearik (C18:0), oleik (C18:1), linoleik (C18:2) ve linolenik (C18:3) asittir. Piyasada yaygın olarak bulunan soya çeşitleri %11 palmitik, %3 sterik, %22 oleik, %56

linoleik ve %8 linolenik asit içermektedir (Wilcox 1985). Yüksek linolenik asit içeriği (%7-9 arası) düşük lezzetlilik (balıksı, renkli, otsu, kavunumsu) ve soya yağı stabilitesi ile yakından ilişkilidir (Dutton vd. 1951). Soya ıslahçıları soya yağı kalitesini arttırmak için programlar başlatmışlardır. Mounts vd. (1988) hem kuzey hem de güney soya genetik kaynaklarından gelen 5000'den fazla soya örneğinin yağ asidi kompozisyonunu analiz etmiş ve düşük linolenik (%4.2) ve normal oleik asit içeriğine sahip PI361099B hattını tanımlamıştır. Düşük linolenik asit içeriği çevre şartlarından bağımsız olarak stabilitesini korumuştur. Soyada genetik kaynağının %3 ya da daha az linolenik asit içeriğine sahip bir hat bulunamamıştır (Hammond ve Fehr 1975). Genetik çalışmalar F_1 bitkilerinin yağ içeriğinin önemli ölçüde dişi ebeveynin kendilenen tohumlarınınkinden farklılık göstermediğini belirtmişler ve soyadaki yağ sentezinin büyük ölçüde ana genotipi tarafından belirlendiğini bildirmişlerdir (Singh ve Hadley 1968). Benzer şekilde, soya tohumunda yağ asidi kompozisyonu dişi ebeveyn tarafından belirlenmektedir (Hammond vd. 1972). Yağ içeriği ve tohum verimi negatif ilişkiye sahip olduğundan dolayı (Burton 1985) soya yağının %20'nin üzerine çıkarmak için yapılan ıslah çalışmaları başarısız olmuştur.

Soya bir baklagil bitkisi olmasından dolayı köklerindeki nodüllerde *Rhizobium japonicum* bakterisi ile birlikte yaşam sayesinde havanın serbest azotunu toprağa bağlamaktadır. Baklagillerin toprağa bağladıkları azot miktarı çeşide ve çevre koşullarına göre değişmekle birlikte, yılda genel olarak ortalama 5-19 kg da⁻¹ aralığındadır. Uygun ve iyi şartlarda soya 30 kg da⁻¹ miktarına kadar havanın serbest azotunu toprağa bağlayabildiği belirtilmiştir (Keyser ve Li 1992). Bu sayede doğal yollardan hem kendi azot gereksinimini sağlamakta hem de kendisinden sonra ekilecek bitki için azotça zengin bir toprak bırakmaktadır. Ayrıca ülkemizde Ege, Akdeniz ve GAP projesinin devreye girmesiyle Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde tahıl hasadından sonra ikinci ürün olarak yetiştirilebilme imkânlarından dolayı ayrı bir öneme sahiptir.

Bir bölgede uygulanacak ekim nöbetine bölgenin iklimi, toprak karakteri, yetiştirilen bitki çeşitleri ve ekonomik koşullar etki etmektedir. Baklagiller ekildikleri toprakların verimliliklerini artırmaktadırlar. Ekim nöbetine baklagillerin sokulması ile o tarladan kaldırılan ürün miktarında belirli bir artış sağlanabilmektedir. Baklagil köküyle ortak yaşama giren *Rhizobium* türü bakteriler, havada serbest halde bulunan, ancak bitkiler tarafından doğrudan yararlanılamayan azotu yaşadıkları ortama bağlarlar. Atmosferden alınarak bitki köklerinde bakteriler tarafından oluşturulan yumrular içerisinde biriktirilen azot, bitkinin hasadından sonra mikroorganizmalar tarafından parçalanarak element hale geçmektedir. Bu şekilde baklagiller köklerinin yayıldığı toprak katmanlarını organik azotça zenginleştirmekte ve daha sonra ekilen bitkiler için azotça zengin toprak bırakmaktadır. Baklagillerin ekim nöbetinde yer alması azotlu ticari gübrelerin kullanımını azaltacağından hem ekonomik yönden fayda sağlamakta, hem de toprak ve toprak suyu kirlenmesi yönünden ayrı bir önem taşımaktadır. Yemelik baklagillerin ekildikleri toprakları organik maddece zenginleştirmeleri yanında toprağın ısınma, havalanma ve su tutma güçlerini artırmaktadır. Bazı çapa gören baklagillerin tarlayı yabancı otlardan arınmış halde bırakmaları nedeniyle, kendinden sonra ekilecek bitkilere uygun toprak koşulları hazırlayarak ekim nöbetinde önemli ve pozitif rol oynamaktadırlar.

2.2. Herbisitlerin Sınıflandırılması

Herbisit, kültür bitkisi dışındaki bitkileri öldürmek veya bitkilerin büyümesini bastırmak için kullanılan kimyasal bir madde veya kültürlü biyolojik organizmalardır. Herbisite dayanıklı bitkiler, yabancı otları kontrol etmede birçok avantaja sahip oldukları için dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. Herbisitler genellikle yabancı otların önemli enzimlerini, hayati biyokimyasal olaylarını veya fizyolojik süreçlerin proteinlerini engelleyerek etki etmektedir. Örneğin; imidazolin, sülfonilüre ve glifosat gibi herbisitler amino asit biyosentezinin kritik enzimlerini inhibe ederek; ariloksi fenoksi propiyonat ve sikloheksandion etken maddeli herbisitler, yağ asidi biyosentezinin önemli bir enzimini engelleyerek; triazin etken maddeli herbisitler D1 proteinine bağlanarak fotosentezin elektron taşınımını bloke ederek bitkileri öldürmektedir. Yaygın ve etkili bir yaklaşım olan herbisit kullanımı kültürel işlemlere kıyasla çiftçilere büyük fayda ve kolaylık sağlamaktadır. Herbisitlerin uygulabilirliğinin kolay olması ve ekolojik koşullardan az etkilenmesinden dolayı üreticiler tarafından çok tercih edilmektedir. Son zamanlarda dünya genelinde yabancı otlarla kimyasal mücadeleye bağlı olarak yabancı otlarda herbisit dayanıklılığı öne plana çıkmıştır.

Herbisitler, 1940'larda 2,4-D'nin piyasaya sunulmasından bu yana tarımın ayrılmaz bir parçası olmuştur (Powles ve Holtum 1994). Herbisitlerin kullanılmaya başlamasıyla geliştirilen yabancı ot kontrolü, giderek artan dünya nüfusu için gıda üretimini önemli boyutlara çıkarmıştır (LeBaron ve Gressel 1982). Herbisitler yabancı otlarla mücadelede toprak işlemenin yerine kullanılan, toprak işlemesiz bir uygulama olarak pratik bir yöntemdir (Dill vd. 2010). Herbisit uygulaması, kültürel mücadele yöntemlerine göre daha kolay, daha ucuz ve daha güvenilir olduğu için yetiştiriciler tarafından yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Heap 1999). Bu yüksek kullanım oranı günümüze kadar devam etmiştir. Herbisit kullanımı popülerliğinin artmasıyla birlikte zaman içerisinde 25 farklı etki şekline (mode of action) sahip 200'den fazla aktif madde geliştirilmiştir (Green 2014). Yabancı otlara karşı toprak işleme ve diğer mücadele yöntemlerinin yerine kimyasal mücadelenin tercih edilmesi, özellikle aynı etki şekline sahip herbisitlerin aynı alanda sürekli olarak kullanılması sonucu yabancı otlarda herbisit dayanıklılığı ortaya çıkabilmektedir.

Herbisitler ya da diğer adıyla yabancı ot öldürücüler pestisit sınıfına aittir ve tarım, peyzaj, ormancılık ve sanayi alanlarında istenmeyen bitkilerin etkin şekilde yok edilmesi için kullanılmaktadır. Herbisit kullanımı, yabancı ot popülasyonlarını sınırlamak ve ortadan kaldırmak için gerekli olsa da kendi problemlerini ve risklerini beraberinde getirmektedir. Bu yüzden ekonomik ve çevresel etkileri hesaba katarak en az ölçülerde kullanılmalıdır (Pimentel vd. 1991). Herbisitlerin aşırı kullanımı, doğal seleksiyon veya mutasyonlar sonucu zamanla geliştirdikleri bazı yabancı ot türlerinin herbisit direnci kazanmasından dolayı yabancı ot kontrolü ile ilgili sorunlar giderek artmaktadır (Owen ve Zelaya 2005). Yabancı otlar seçici herbisitlere karşı dayanıklılık veya geniş spektrumlu herbisitlere (seçici olmayan) karşı dayanıklılık kazanabilmektedir. Yabancı otlar; emilim, metabolizma, translokasyon, detoksifikasyon ve etki alanı dayanıklılık gibi mekanizmalar geliştirerek herbisitlere karşı dayanıklılık geliştirmişlerdir (Van Eerd vd. 2005; Ma vd. 2013).

Herbisitler etki şekli, kimyasal gruplar ve uygulama zamanı olarak farklı gruplara göre sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmalara göre herbisit uygulama

zamanı, çeşidi ve miktarı büyük önem arz etmektedir. Miktar ve uygulama zamanının ayarlanması koşuluyla, belirli bir herbisite dayanıklı yabancı ot türünün bile belirli bir herbisite duyarlı hale gelebilmektedir. Öte yandan, herbisitlerin aşırı kullanımı mahsule zarar verebilmekte ve aynı zamanda yabancı otlara dayanıklılık kazandırabilmektedir. Bu nedenle, herbisit uygulamasında bu stratejiler arasında bir denge kurmak ve maksimum etki için en uygun şartları sağlamak çok önemlidir. Uygulama zamanına bağlı olarak, herbisitler çıkış öncesi ve çıkış sonrası diye ikiye ayrılmaktadır.

Herbisitlerin etki şekilleri kimyasal bileşimlerine bağlı olarak hassas bitkilerin çeşitli biyokimyasal yollarla bitkilerin gelişimini ve yaşamını kontrol etmeye odaklanmaktadır. Bir bitki sırasıyla çıkış, fide, vejetatif, çiçeklenme ve olgunluk dönemlerinden geçmektedir ve herbisit genelde bitkilerin hassas olduğu çıkış ve fide döneminde uygulamak büyük önem arz etmektedir. Herbisit spesifik etki tarzına bağlı olarak hayati olaylarını etkileyeceği bitkinin enzimini veya biyolojik bir sistemini içermekte, böylece düzenli bitki büyümesini ve gelişimini bozarak bitkinin ölümüne neden olmaktadır. Bununla birlikte, herbisitlerin etki şekli hakkında derinlemesine bilgi sahibi olmanın, belirli bir ürün için spesifik bir herbisit seçilmesine, bitkide ortaya çıkan semptomlarını anlama ve uygun bir ürün yönetimi stratejisi tasarlanması açısından oldukça önemlidir. Bu sebeplerden; herbisit etki mekanizmasını, herbisit sınıflandırılma gruplarını bilmek ve ona göre hareket etmek birçok yönden fayda sağlamaktadır.

Herbisit direncinin daha etkili şekilde idare edilip yönetilebilmesi için, etki şekillerine göre herbisitlerin sınıflandırılması daha faydalı olacağı ifade edilmiştir. (Forouzesh vd. 2015). Herbisit etki bölgesi için üç sınıflandırma sistemi vardır. İlk olarak, Amerikan Yabancı Ot Bilimi Derneği (WSSA) sınıflandırma sistemi 1997 yılında yalnızca ABD ve Kanada'da kullanılan Arapça rakamlara dayanarak oluşturulmuştur (Mallory-Smith ve Retzinger 2003). İkincisi, Avustralya Sınıflandırma Sistemi 1990'ların başlarında harflere dayanarak oluşturulmuş ve yalnızca Avustralya'da kullanılmıştır. Üçüncüsü, 1989'da kurulan ve diğer tüm ülkelerde kullanılan Herbisit Dayanıklılık Aksiyon Komitesinin (HRAC) sınıflandırma sistemidir (Retzinger ve Mallory-Smith, 1997). HRAC sınıflama sistemi de harflere dayanmaktadır (Çizelge 1.1.).

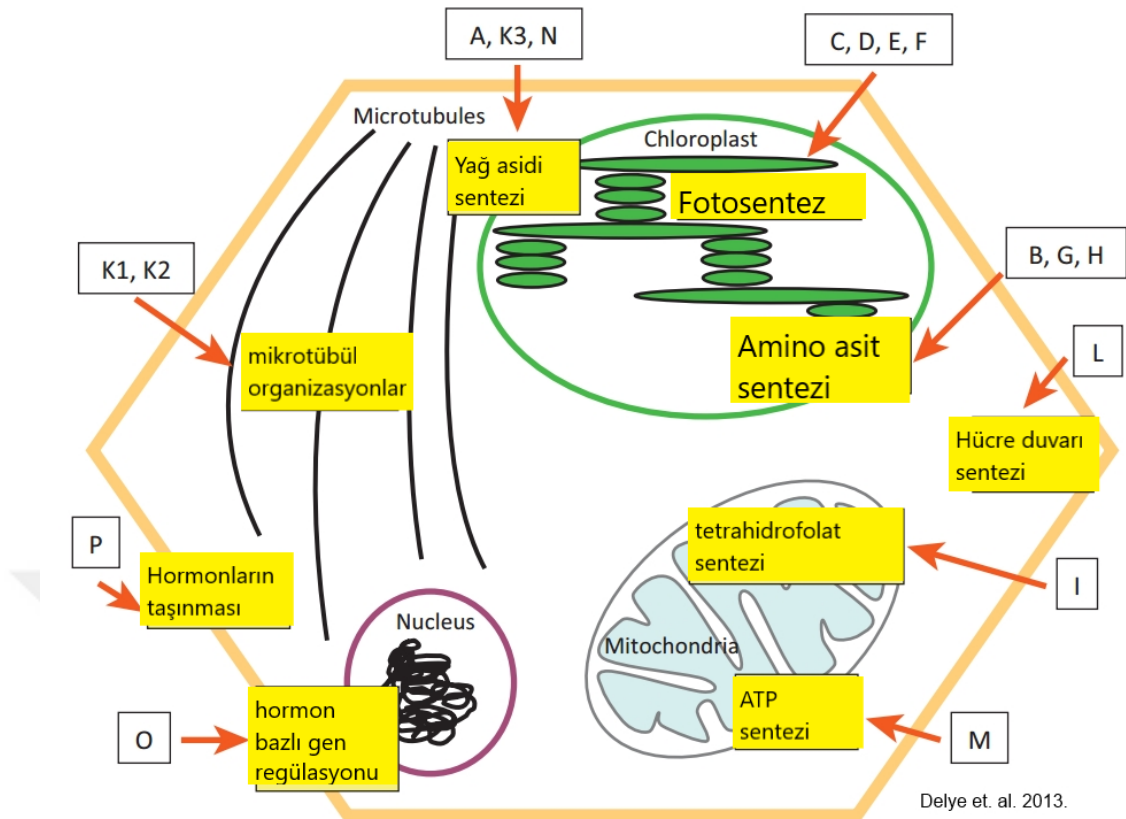
Farklı herbisit grupları bitkilerde protein, amino asit, yağ asidi, ATP, hücre duvarı sentezi, fotosentez ve bazı hormonal mekanizmaları hedef almaktadır (Delye vd. 2013) (Şekil 1.1).

Çizelge 2.1. Etki Şekillerine göre herbisitlerin sınıflandırılması

Grup	Aksiyon modu	Kimyasal grubu	WSSA grubu
A	Asetil-CoA karboksilazin inhibisyonu (ACCase)	Aryloxyphenoxypropionates Cyclohexanediones	1
B	Asetolaktat sentezin inhibisyonu (ALS)	Sulfonylureas Imidazolinones Triazolopyrimidines Pyrimidinylthiobenzoates	2
C₁	Fotosistemde II fotosentezin inhibisyonu	Triazines Triazinones Uracils Pyridazinones Phenylcarbamates	5
C₂	Fotosistemde II fotosentezin inhibisyonu	Phenylureas Amides	7
C₃	Fotosistemde II fotosentezin inhibisyonu	Hydroxybenzonitriles Benzothiadiazole Phenylpyridazine	6
D	Fotosistem-I elektron saptırma	Bipyridyliums	22
E	Protoporfirinojen oksidasyon inhibisyonu (Protox)	Diphenyl ethers N-Phenylphthalimides Thiadiazoles Oxadiazoles Triazolinones	14
F₁	Ağartma: fitoen desatüraz (PDS) adımı karotenoid biyosentezinin inhibisyonu	Pyridazinones Nicotinanilides Others	12
F₂	Ağartma: 4-Hidroksi-fenil dioksijenazin hibisyonu (4-HPPD)	Triketones Isoxazoles Pyrazoles	28
F₃	Ağartma: karotenoid biyosentezinin inhibisyonu (bilinmeyen hedef)	Triazoles Isoxazolidinones Phenylureas	11 13 11
G	EPSP sentezinin inhibisyonu	Glycines	9

Çizelge 2.1.'in devamı

Grup	Aksiyon modu	Kimyasal grubu	WSSA grubu
H	Glutamin sentezinin inhibisyonu	Phosphinic acids	10
I	Di-hidropteroat sentezinin (DHP) inhibisyonu	Carbamates	18
K ₁	Mikrotüp birleştirme inhibisyonu	Dinitroanilines Phosphoramidates Pyridazines Benzoic acids	3
K ₂	Mitoz inhibisyonu	Carbamates Benzyl ethers	23 27
K ₃	Hücre bölünmesi inhibisyonu	Chloroacetamides Carbamates Acetamides Benzamides Oxyacetamides	15
L	Hücre duvarı (selüloz) biyosentezinin inhibisyonu	Nitriles Benzamides	20 21
M	Ayırma (membran bozulması)	Dinitrophenols	24
N	Lipid biyosentezinin inhibisyonu - ACCase inhibisyonu değil	Thiocarbamates Phosphorodithioates Benzofurans Chlorocarbonic acids	8 26
O	Sentetik oksinler	Phenoxycarboxylic acids Benzoic acid Pyridine carboxylic acids Quinoline carboxylic acids Others	4
P	İndoleaketik asit etkisinin inhibisyonu	Phthalamate Semicarbazone	19
Z	Bilinmeyen	Arylamino propionic acids Organoarsenicals Others	25 17 8,27



Delye et. al. 2013.

Şekil 2.1. Herbisit dayanıklılık aksiyon komitesi (HRAC) tarafından yapılan herbisit etki alanları ve sınıflandırma sistemi (Delye vd. 2013)

Etkili yabancı ot kontrolü için herbisit kullanımının önemi göz önüne alındığında, herbisit performansını etkileyen faktörleri anlamak oldukça önemlidir. Başarılı bir yabancı ot kontrolü sadece bir herbisit kimyasal özelliklerine değil, aynı zamanda bitki ve çevre ile etkileşimine de bağlıdır. Bitki morfolojik ve anatomik özelliklerinin yanı sıra çevre koşulları herbisitlerin uygulama anında etkinliğinin belirlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Hedef bitki içerisine herbisit emilimi, büyük ölçüde atmosfer, toprak veya toprak-atmosfer arasındaki etkileşimine göre değişmektedir. Sıcaklık, nem, bağıl nem ve güneş radyasyonu gibi çeşitli çevresel faktörler bir bitkinin fizyolojik durumunu ve herbisitlere duyarlılığını etkilemektedir. Bu faktörler arasındaki etkileşimler, herbisit performansı üzerindeki etkilerinin kesin olarak belirlenmesini karmaşık hale getirmektedir. Buna ek olarak, CO₂ konsantrasyonundaki artış ve bunun küresel sıcaklık ve yağış üzerindeki etkileri nedeniyle küresel iklimdeki değişikliklerin bitki büyümesi ve herbisit performansı üzerinde önemli etkileri olmaktadır (Varanasi vd. 2016).

Yabancı otlar; ekili tarım arazileri ve ekili olmayan alanlarda ortaya çıkarak üretime, halk sağlığına zarar vermektedir. Yabancı ot kontrolü dünyanın dört bir yanındaki çiftçiler ve yabancı ot bilimcilerinin odak noktası haline gelmiştir. Yabancı ot kontrolü için kültürel, mekanik, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, herbisitlerin kullanımıyla kimyasal yabancı ot kontrolü çoğu gelişmiş ülke için en ekonomik ve yaygın olarak kullanılan bir yöntem olmaktadır. Son yıllarda, bitki verimini iyileştirme, emek ve enerji tasarrufu dolayısıyla tarım maliyetini azaltma

potansiyeli nedeniyle Çin, Hindistan ve Afrika dâhil olmak üzere dünyanın her bölgesinde herbisit kullanımı artmıştır (Gianessi 2013). Yabancı ot kontrolünün odağı, herbisit kullanımının çevre üzerindeki etkisini ve herbisite dayanıklı yabancı otların gelişimini azaltmak için entegre stratejilere doğru kaymaktadır. Buna rağmen, herbisitler, uygulama kolaylığı ve maliyet etkinliği nedeniyle yabancı ot kontrolünün temelini oluşturmaktadır. Sürdürülebilir tarım üretiminde herbisit kullanımının önemi göz önüne alındığında, iklim değişikliğinin ve iklim faktörlerinin gelecekte yabancı otları kontrol etmek için herbisitlerin etkinliğini etkileyip etkilemediğini anlamak önemli olacaktır. Çeşitli çalışmalar iklim değişikliğinin ürün verimliliği üzerindeki etkisine odaklanmıştır, ancak özellikle herbisit etkinliği, herbisite dayanıklı yabancı otların gelişimi üzerindeki etkilerine ve yabancı ot mücadelesi üzerindeki etkilere daha az çalışılmıştır.

İklim faktörlerinin herbisit etkinliği üzerindeki etkisini anlamak için, çevre koşullarının herbisit performansını nasıl etkilediğini anlamak gerekmektedir. Herbisitlerin başarılı bir şekilde kullanılması, herbisit uygulaması öncesinde, sırasında ve sonrasında çevresel koşullara bağlıdır. Çevre sadece bitkilerin büyümesini ve fizyolojisini değil, aynı zamanda herbisit ve bitki-herbisit arasındaki etkileşimi de etkilemektedir. Işık, CO₂, sıcaklık, toprak nemi, bağıl nem, yağış ve rüzgâr gibi çevresel faktörlerin bitkilerde uygulanan herbisit etkinliğini etkilemektedir. Bu faktörler, herbisitlerin bitki içine girişini ve taşınmasını değiştirerek veya bitkilerin büyüme ve fizyolojik özelliklerini değiştirerek dolaylı olarak herbisit etkinliğini etkileyebilmektedir. Yapraktan uygulanan herbisitler birçok çevresel faktörden etkilenmekte iken, toprağa uygulanan herbisitler esas olarak toprak nemi ve sıcaklığından etkilenmektedir.

Işık, bitki büyümesini ve gelişmesini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir. Işık yoğunluklarındaki değişim, bitkilerin anatomisini, morfolojisini ve büyümesini değiştirmekte ve bu da herbisit performansını etkilemektedir. Işık fotosentez için enerji kaynağıdır ve fotosentez oranı bitkinin floem translokasyon hızını belirlemektedir (Devine 1989). Net fotosentez miktarı tipik olarak ışık yoğunluğu ile artmakta ve daha yüksek fotosentez sonucunda floem translokasyonu yapraklara uygulanan sistemik herbisitlerin hareketini artırmaktadır. Yüksek ışık yoğunluğunda stomalar açık kalır, böylece yapraklara uygulanan herbisitler için doku penetrasyonunu artırmaktadır. Tersine, düşük ışık yoğunluğunda; bitkiler, mevcut ışığı yakalamak ve fotosentez talebini karşılamak için daha spesifik yaprak alanı ve bitki yüksekliğine sahip daha ince yapraklar üretme eğilimindedir (Steinger vd. 2003). Bitki büyümesi ve yaprak anatomisindeki bu değişiklikler, bitki tarafından emilen ve tutulan herbisit miktarını etkilemektedir. Daha fazla bitki dallanması, yüzey kapsama alanını ve herbisitlerin emilimini arttırırken, daha kalın yapraklar herbisitlerin yayılmasını yavaşlatarak herbisit aktivitesini azaltmaktadır. (Riederer ve Schonherr 1985).

Sıcaklığın, herbisit etkinliği üzerinde doğrudan ve dolaylı etkileri bulunmaktadır. Sıcaklığın bitki büyümesi ve gelişmesi üzerinde karmaşık etkileri vardır. Fotosentez, floem translokasyonu, solunum ve protoplazmik akış, bitkide sıcaklığa bağlı bazı fizyolojik süreçlerdir. Bu işlemlerin hızında ve miktarında değişiklikler dolaylı olarak herbisit penetrasyonunu ve translokasyonunu etkilemektedir. Çimlenme, fide büyüme hızı ve yaprak anatomisi (yaprak alanı, yaprak şekli ve kütikula gelişimi), hava ve toprak sıcaklığından etkilenmekte ve bu da bitkilerin herbisitlere en

duyarlı olduğu zamanı belirlemektedir (Hull vd. 1975). Guo ve Al-Khatib (2003), *Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus rudis* ve *Amaranthus palmeri* fide büyüme oranlarının yüksek sıcaklıklarda arttığını ve fidelerin küçük olduğu dönemin üstten herbisit uygulamaları için en ideal zaman olduğunu bildirmişlerdir.

Sıcaklık, herbisit difüzyonu, kütikula tabakasının viskozitesi ve spray çözeltilerinin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkileri sebebiyle herbisit performansını doğrudan etkileyebilmektedir (Price 1983). Daha yüksek sıcaklıklar, kütikula tabakasının viskozitesini düşürebilir, böylece herbisitlerin kütikula içinden geçirgenliğini ve difüzyonunu artırabilmektedir. *Desmodium tortuosum*'da ^{14}C -glifosatın 22°C'de alımının ve translokasyonunun, 16°C'ye göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Sharma ve Singh 2001). Benzer şekilde, soyada Roundup Ready 35°C'de ^{14}C -glifosatın 15°C'ye göre daha fazla meristematik dokulara taşınmıştır ve yüksek sıcaklıklarda daha fazla glifosat hasarı ortaya çıkmıştır (Pline vd. 1999). Flumiclorac etken maddeli herbisitte sıcaklık 10°C'den 40°C'ye yükselince sirken (7 kat) ve kırmızı köklü tilkikuyruğu (3 kat) yabancı otlar türlerinde daha yüksek aktivite göstermiştir (Fausey ve Renner 2001). Her ne kadar yüksek hava sıcaklıkları herbisit hem emilimini hem de translokasyonunu hızlandırma eğiliminde olsa da bazı durumlarda yüksek sıcaklıklar da hızlı metabolizmayı tetikleyebilmekte ve böylece hedef bitkiler üzerindeki herbisit aktivitesini azaltabilmektedir (Kells vd. 1984; Johnson ve Young 2002).

32°C'de mezotrin etken maddeli herbisit imam pamuğu ve pıtrak yabancı ot türlerinde emilimi ve taşınımı 3 kat artış gözlenmiştir. Buna karşılık, aynı sıcaklıkta mezotrin etkinliği kaba meyveli su keneviri (*Amaranthus tuberculatus*) ve çatalotu (*D. sanguinalis*) türlerinde altı ve yedi kat azalmıştır (Johnson ve Young 2002). Benzer şekilde, mezotrin etkinliği *Amaranthus palmeri* türünde sıcaklık 25°C'den 40°C'ye yükseltilince düşmüştür ve yüksek sıcaklıkta mezotrin metabolizmasında bir artış gözlenmiştir (Godar vd. 2015). Yüksek sıcaklıklar ayrıca spray damlacıklarının çabuk kuruması nedeniyle herbisit alımının azalmasına neden olabilmektedir (Devine vd. 1993). Sıcaklık bazı herbisitlerin uçuculuğunu da etkilemektedir (van Rensburg ve Breeze 1990; Strachan vd. 2010). Soyada sıcaklık 15°C'den 30°C'ye yükseltilince dikamba uygulanmasına bağlı fenotipik zarar %0'dan %40'a yükselmiştir (Behrens ve Lueschen 1979). Bu etkiler esas olarak yapraktan uygulanan herbisitlerde gözlemlenmiştir. Topraktan uygulanan herbisitlerde toprak sıcaklığı bitki içinde herbisitlerin hareketini ve geçirgenliğini etkilemektedir. Yüksek toprak sıcaklıkları, uçucu ve mikrobiyal parçalanmayı artırarak toprağa uygulanan herbisitlerin etkinliğini azaltabilmektedir.

2.3. Herbisit Dayanıklılık Tanımı ve Mekanizması

Amerikan Yabancı Ot Bilimi Derneği, herbisit direncini ve herbisit toleransını, bir bitkinin öldürücü bir herbisit dozuna maruz kaldıktan sonra hayatta kalma, yaşam döngüsünü tamamlama ve çoğalma yeteneğini devam ettirme olarak tanımlanmıştır (WSSA 1998). Bazı araştırmacılar ise tarımsal alanlarda herbisit dayanıklılığını, ilk zamanlarda hassas olan bir bitkinin zamanla o herbisite dayanıklı hale gelerek, normal öldürücü dozda kullanılmasına rağmen hayat döngüsünü tamamlamak olarak ifade etmişlerdir (Heap ve Lebaron 2001).

ALS'yi inhibe edici herbisitlerin keşfi, yabancı ot bilimi tarihinde önemli bir başarı olmuştur. Diğer birçok herbisite özgü tipik olarak hektar başına kilogramın aksine, bu ALS etkili herbisitler hektar başına gram olarak kullanılmaktadır. Böylece, 1980'lerde mahsullere uygulanan toplam herbisit miktarındaki düşüşün en büyük sebebi olmuştur (Bellinder vd.1994). ALS'yi inhibe edici herbisitler, yüksek yabancı ot kontrolü etkinliği, yüksek yabancı ot seçiciliği ve düşük düzeylerde memeli toksik etkisinden dolayı tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır (Sharner ve Singh 1997). Asetolaktat sentez ya da asetohidroksiasit sentez (AHAS, EC 2.2.1.6) olarak adlandırılan, dallı zincirli esansiyel amino asitler olan valin, lösin ve izölösin biyosentezinde rol alan ilk enzimdir (Ray 1984; Duggleby vd. 2008). ALS inhibitörleri olarak tarif edilen herbisitlerin 15 kimyasal sınıf bulunmaktadır (Saari vd. 1994). ALS, beş kimyasal herbisit gruplarının ortak hedef bölgesidir; sülfonilüre, imidazolin, triazolopirimidin, pirimidinil-tiyobenzoatlar ve sülfonilamino-karbonil-triazolinon (Shimizu vd. 2002). Bunlardan, kimyasal olarak birbirine benzer olmayan sülfonilüre, imidazolin ve triazolopirimidin herbisitler ticari hale getirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Asetolaktat sentez inhibitörü herbisitler şu anda beş kimyasal grupta 54 aktif etken madde ile en büyük etki alanı herbisit grubunu oluşturmaktadır ve dünya tarımında ilk kez 1982'de piyasaya sürüldükleri tarihten beri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Herbisit dayanıklılığı ilk defa Harper 1956 yılında söz edilmiş ve yabancı otların herbisitlere karşı zamanla dayanıklılık oluşturabileceğini belirtmiştir. Aynı etki mekanizmasına sahip herbisitlerin sürekli kullanılmasından dolayı herbisitlere dayanıklılık durumu ilk defa 1964 yılında bildirilmiştir. Şimdiye kadar 262 tür (152 dikotiledon ve 110 monokotiledon) herbisite dayanıklılık tespit edilmiştir. Bu türlerde 512 farklı dayanıklılık vakası (tür x etki alanı) bulunmuştur. Yabancı otlar bilinen 26 herbisit etki bölgesinin 23'üne ve 167 farklı herbisite karşı dayanıklılık rapor edilmiştir. 70 ülkede 92 üründe herbisite dayanıklı yabancı otlar rapor edilmiştir (Heap 2020).

Bitkiler ot ilacına karşı çapraz dayanıklılık (cross resistance) ve çoklu dayanıklılık (multiple resistance) diye iki gruba ayrılmaktadır (Heap ve Lebaron 2001, Vencil vd. 2012). Çapraz dayanıklılık, tek bir gen veya mekanizma tarafından farklı veya aynı kimyasal herbisit gruplarına herbisitlere dayanıklılık olarak tanımlanmaktadır (Preston ve Powles, 2002). Bitkilerde herbisit çapraz dayanıklılık mekanizmaları; hedef bölge çapraz dayanıklılığı (target site cross resistance) ve hedef bölge dışı çapraz dayanıklılık (non-target site cross resistance) diye iki ana kategoriye ayrılmaktadır (Delye vd. 2015; Feng vd. 2016). Birincisi, herbisit bağlama bölgesinin değişmesinden veya artmasından kaynaklanan hedef bölge dayanıklılık (TSR) mekanizmasıdır. Bu mekanizma bir herbisit hedef bölgeye bağlanma yeteneğini önleyen veya azaltarak etkisini ortadan kaldıran bir mekanizmadır. Hedef bölge dışı çapraz dayanıklılık (NTSR) ise, bitkide herbisit alımını ve taşınmasını azaltan, gelişmiş bitki metabolizması (Yuan vd. 2007) veya hedef bölgeye ulaşan herbisit miktarını azaltan mekanizmalar sayesinde oluşan dayanıklılıktır. Bununla birlikte hedef olmayan bölge direnci ACCase, ESPS, ALS ve PSII inhibitörlerine karşı dayanıklılıkta büyük öneme sahip olduğu ifade edilmiştir (Delye 2013). Çoklu dayanıklılık terimi ise, bir bitkinin birden fazla dayanıklılık mekanizmasını ile farklı herbisitlere karşı dayanıklılık sağlaması olarak ifade edilmiştir (Hall vd.1994; Rubin 1997; De Prado ve Franco 2004). Bunun kontrolünün en karışık olduğu durum ise, hem hedef bölge, hem de hedef bölge dışı

dayanıklılık mekanizmalarının aynı bitkide çıkmasıdır. Örneğin, ACCase (Acetyl-CoA carboxylase) inhibitörü herbisit uygulaması sonucunda, hem ACCase, hem de ALS (Acetolactate synthase) inhibitörü herbisitlere karşı dayanıklılık çıkmasıdır.

Herbisitlere karşı dayanıklılık ALS enzimlerde oluşan bir mutasyon sonucu meydana gelmektedir (Cobb, 1992). ALS inhibitörleri, hassas olan bitkilerde hücre bölünmesini çok hızlı bir şekilde inhibe etmektedirler. Bu etki direkt amino asit biyosentezinin engellemesinden kaynaklanmaktadır. Bitkide büyümenin durması hızlı bir şekilde meydana gelmesine rağmen, bitkilerin fiziksel belirtiler göstermesi günler sürebilmektedir. Ortam şartlarına göre de bitkinin ölmesi iki ile dört hafta arasında gerçekleşmektedir. Bu süreç sıcak hava koşullarında hızlı gerçekleşirken soğuk hava şartlarında daha uzun sürmektedir. Bunun nedeni enzim faaliyetinin durmasına rağmen, bitki içindeki amino asit havuzlarının metabolizmayı desteklemesi ve bitki ölümünün sadece bu havuzlar kritik seviyenin altına düştüğü zaman meydana gelmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (John vd. 2002).

ALS inhibitörleri herbisitlere karşı birçok yabancı ot türünde ve bazı kültür bitkilerinde dayanıklılık gelişimleri gözlemlenmiştir. Bildirilen vakaların çoğunda gelişen dayanıklılık, hedef ALS genindeki nokta mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Birçok ALS gen dayanıklılık mutasyonu, yüksek dayanıklılık geni frekansı, dominant genetik kalıtım ve dayanıklılık sağlayan allellerin büyük maliyetinin olmaması nedeniyle hızlı şekilde geliştirilmektedir. Bununla birlikte, bildirilen bu vakaların çoğunda, hedef nokta mutasyon dayanıklılığının varlığını belirlemeye çalışıldığına ve araştırmacıların hedef alan dışı dayanıklılık için inceleme çalışmalarının çok az yapıldığını bildirmişlerdir (Yu ve Powles 2014).

Herbisit seçiminde baskınlık derecesi bitki türleri allelleri arasında değişiklik gösterse de genelde R ALS allelleri S allellere baskındır. (Sebastian vd. 1989; Foes vd. 1999). Fakat dinitroanilines hedef bölge dayanıklılığında R alleli S alleleline resesiftir ve bu dayanıklılık mekanizmasında R allelinin sadece resesif homozigot olduğu durumda ortaya çıkmaktadır (Jasieniuk vd. 1994; Zeng ve Baird 1997). ALS plastidlerde işlev görmesine rağmen, ALS nükleer bir gendir ve normal Mendel kalıtımını takip etmektedir. Bu nedenle R ALS allelleri hem polen hem de tohum tarafından yayılmaktadır. Hedef noktayı kodlayan gen plastidik bir gen olduğu için direncin çoğu türde tohumla yayıldığını göstermektedir. ALS'yi inhibe edici herbisit direncinin genetiği nükleer olarak kodlanmış tek bir baskın gen tarafından sağlanmaktadır (Tranel ve Wright 2002).

Seleksiyon evrimi yönlendirir fakat genetik çeşitlilik ve yatkınlık seleksiyonda en önemli kıstaslardan biridir. Bu nedenle, bireysel yabancı otlar arasındaki ALS'nin doğal R biyotiplerinin ALS inhibitörleri tarafından seçilme olasılığını etkileyecektir. Alleller arasındaki değişkenlik rastgele oluşan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bir generasyondaki nükleotid baz çifti başına mutasyon oranlarının 10^8 ila 10^{10} aralığında olduğu tahmin edilmektedir (Gardner ve Snustad 1984). Fakat ALS'nin veya herhangi bir başka genin gerçek mutasyon oranı bilinmemekte ve ALS'nin yüksek oranda mutasyona uğradığına dair bir kanıt yoktur. Bununla birlikte ALS değişkenliğinin tüm yabancı ot türlerinde aynı değildir.

Bitki türleri arasında ALS'lerin yüksek oranda korunmuş gen bölgesi olmasına rağmen ALS'nin ilaveler ve silmeler nedeniyle her bitki türlerinde uzunlukları farklılık gösterebilmektedir (Chipman vd. 1998; Guttieri vd. 1996). Amino asitler genellikle başlangıç ALS proteininin başından başlayarak numaralandırılmaktadır. Fakat bazı araştırmacılar, olgun proteinin başlangıcından (yani kloroplastik geçiş peptidi çıkarılmış olarak) numaralandırarak amino asitleri belirlemişlerdir (Bernasconi vd. 1995; Kakefuda vd. 1996). Benzer ALS mutasyonlarının tanımlanmasında farklı ALS uzunlukları ve farklı amino asit numaralandırma şemaları yüzünden literatürde çok karışıklığa, hatalara neden olmuştur. Örneğin; Ala-122'nin *Arabidopsis* eşdeğeri çeşitli şekillerde Ala-56, Ala-57, Ala-90, Ala-100 ve Ala-113 olarak adlandırılmıştır (Bernasconi vd. 1995, 1996; Wright vd. 1998). Bu karışıklıktan kaçınmaya yardımcı olmak için, araştırmacıların ALS amino asit değişikliklerinin *Arabidopsis*'te bulunan ALS'deki amino asit sıralamasının refans alınmasını önermişlerdir (Tranel ve Wright 2002). Ayrıca *Arabidopsis*, bitki genetiği araştırması için model organizmadır ve yüksek bitkilerde dâhil bugüne kadar bildirilen en uzun ALS'ye sahiptir.

ALS hedef bölge dayanıklılığının aksine, diğer hedef bölge dayanıklılık sağlayan mekanizmalarda çok az mutasyon tespit edilmiştir. Örneğin, triazin dirençli bir DI proteini veren psbA genindeki çeşitli mutasyonlar deneysel olarak tanımlanmış olsa da, Ser-264 noktadaki glisin değişikliği herbisitlere dayanıklılık sağlamıştır (Gronwald 1994). Daha sonraki bir çalışmada triazin dirençli bir yabancı ot biyotipinde DI proteininde ikinci bir Val-219 izolösün değişikliği bulunmuştur. (Mengistu vd. 2000). Monsanto ve diğer bazı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, normal EPSPS işlevini korurken önemli glifosat direnci sağlayacak olan enolpiruvilshikimate-3-fosfat sentez (EPSPS) genindeki mutasyonları belirlenmemiştir (Bradshaw vd. 1997). Daha sonrasında sadece kaz tüyü (*Eleusine indica* L.) ve at otu (*Conyza canadensis* L.) her birinde EPSPS geninde aynı amino asit noktasında aynı amino asit değişikliği mutasyonu olduğu belirlenmiştir (Dill vd. 2000). Bu karşılaştırmalardan da anlaşılacağı üzere, bitkiler arasındaki ALS değişkenliği diğer herbisit hedef bölge genlerininle benzer olsa da, R ALS allellerinin diğer hedef bölge genlerine göre daha fazla noktada mutasyonların olduğunu göstermektedir.

2.3.1. Hedef bölge dayanıklılığı

Herbisit direnci araştırmasının önemli bir odağı, dünyanın dört bir yanında bilimsel dergilerde yayınlanmış binlerce araştırma makalesi ve derlemesiyle yabancı otlarda herbisit direncinin moleküler mekanizmalarını ve genetiğini anlamak olmuştur. Yabancı ot türlerinde herbisitlere dayanıklılık, hedef bölge dayanıklılığı ve/veya hedef bölge dışı dayanıklılık mekanizmalarından kaynaklanabilmektedir. Hedef bölge dayanıklılık mekanizmaları ya herbisit hedefindeki yapısal modifikasyonlarından (Devine ve Shukla 2000) ya da hedef bölge proteininin aşırı ekspresyonundan kaynaklanabilmektedir (Sammons ve Gaines 2014). Hedef bölge dışı dayanıklılık mekanizmaları genellikle herbisitlerin toksik olmayan metabolitlere dönüştürülmesi veya hedef bölgeye ulaşan aktif herbisit miktarını azaltan bitki hücrelerinin işlemleri sonucunda oluşmaktadır (Delye 2013; Ghanizadeh ve Harrington 2017b).

Bitkilerde herbisite karşı dayanıklı bireylerin yayılımını ve dinamiklerini, gen akışı, seçim baskısı ve kalıtım paterni ve allellerin başlangıç sıklığı gibi çeşitli faktörler tarafından etkilemektedir (Jasieniuk vd. 1995). Bu faktörlerden kalıtım paterni, yani

birbirini takip eden nesillere aktarılabilecek herbisit dayanıklılık özelliklerinin başarısında önemli bir rol oynamaktadır (Preston ve Mallory-Smith 2001). Dayanıklılık mekanizmasına bağlı olarak, bugüne kadar incelenen herbisite dayanıklı yabancı ot türlerinde farklı kalıtım mekanizmaları bildirilmiştir (Ghanizadeh vd. 2019).

Herbisit dayanıklılığının genetik temelini anlamak, dayanıklılığı tahmin etmek, takip etmek ve yönetmek için modeller geliştirmek için önemli bir anahtardır (Preston ve Mallory-Smith 2001). Kalıtım bilgisi, herbisitlere karşı dayanıklılık mekanizmalarındaki farklılıkları hakkındaki anlayışımızı geliştirmiştir. Bazı büyük tarımsal yabancı ot türleri için herbisit direncinin genetik kalıtım çalışmaları yapılmıştır. Bitkilerde, herbisit dayanıklılık özellikleri hem polen hem de ovül yoluyla bir sonraki nesle aktarılabilmektedir (Jasieniuk vd. 1996). Nükleer genlerin kalıtımı hem polen hem de ovül yoluyla meydana gelirken, sitoplazmik (veya plastid) kalıtım durumunda, direnç allelleri sadece ovül yoluyla bir sonraki kuşağa aktarılabilmektedir (Jasieniuk vd. 1996). Bugüne kadar incelenen vakalarda, dayanıklı allellerinin yaklaşık %95'i, herbisite dayanıklı yabancı otlarda nükleer genler ile aktarılmış ve sadece %5'inde sitoplazmik kalıtım söz konusu olmuştur (Ghanizadeh vd. 2019).

ALS bitkiler için hayati olan amino asitlerinin biyosentezinin başlangıç enzimidir. ALS'nin inhibasyonu, bitkide bu amino asitlerin eksiliğine yol açar ve böylece herbisitlerin bitki ölümüne neden olduğu birincil mekanizmanın bu olduğu düşünülmektedir. Ancak ALS inhibasyonunun, 2-ketobutiratın birikmesi, protein sentezinin bozulması ve fotosentez ürünlerinin taşınmasının bozulması gibi diğer ikincil etkiler olduğu düşünülmektedir (Shaner 1991).

Bir herbisit direnci alleli rekabetçi bir ortamda çoğaltma ve hayatta kalma yeteneği kazandırması için en az üç teori vardır. Birincisi, herbisit hedefindeki enzimlerde (hedef bölge direnci) yeni dayanıklılık kazandıran mutasyonların meydana gelmesi ve mutasyon sonucu enzimin normal hayatsal döngüdeki yaşamsal faaliyetleri etkilememesidir (Cohan vd. 1994; Groeters vd. 1994; Chevillon vd. 1995). Örneğin, tek bir amino asit değişikliği herbisit hedef enzime bağlanmasını engellemektedir aynı zamanda enzim fonksiyonu ve kinetiğinde yaşamsal döngüyü tehlikeye atacak bir değişikliğe neden olmamaktadır (Delye 2005; Powles ve Preston 2006).

İkinci teori bitkinin üreme, büyüme ve savunma fonksiyonlarından kaynaklanan dayanıklılıktır (Coley vd. 1985; Chapin vd. 1993; Herms ve Mattson 1994). Herbisit dayanıklılığı bitki savunma mekanizmalarından kaynaklanmakta ve bitki metabolizmasını artırarak büyüme ve gelişmesine devam etmeye çalışmaktadır. Artırılmış metabolizma temelli herbisit dayanıklılığına örnek sitokrom P450 enzimlerinin yeni ve daha fazla üreterek herbisite dayanıklılık sağlaması verilmektedir (Werck-Reichhart vd. 2000). Artırılmış ya da yoğunlaştırılmış metabolizma temelli herbisit dayanıklılığı, herbisit uygulandığı zaman, bitki daha fazla enzim üretmek ve bu enzimleri sentezlemek için ilave enerji ve kaynak yaratmaktadır. Daha fazla ürettiği enzimlerle bir taraftan herbisitle savaşarak dayanıklılık ya da tolerans sağlamaya çalışmakta ve böylece bitki büyüme ve gelişmesine devam ettirmeye çalışmaktadır.

Üçüncüsü, bitkinin hayatta kalması ve rekabet gücü değişen ekolojik etkileşimlerin bir sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir (Purrrington 2000; Strauss vd. 2002). Bir direnç allelinden kaynaklı tozlaştırıcılar için daha az çekici veya hastalıklara

daha duyarlı hale gelecek şekilde pleiotropik etkileri ortaya çıkabilmektedir. Bundan dolayı bitkinin yaşamsal faaliyeti ve normal metabolizmanın değiştirilmesinden dolayı ortaya çıkabilmektedir (Salzmann vd. 2008).

Yabancı otlar için tespit edilen herbisit dayanıklılık özelliklerinin baskınlığı, dayanıklılık mekanizmasına bağlı olarak değişmektedir. Baskın bir allelde dayanıklılık homolog kromozomların herhangi birinde bulunması dayanıklılık sağlamaktadır. (Ghanizadeh vd. 2019).

Dayanıklılık mekanizmasının yapısına bağlı olarak, dayanıklılık özelliği bir (monogenik) veya birkaç gen (poligenik) tarafından kontrol edilmektedir. Birinde mevcut olduğunda fenotipik olarak temsil edilmekte ve allelin zigotitesini etkilememektedir (hem homozigot hem de heterozigot koşullarda tamamen dayanıklılık sağlanır). Dayanıklılık resesif ise her iki resesif allelin homolog kromozomda bir arada bulunduğu durumda dayanıklılık ortaya çıkmaktadır. Bir herbisit dayanıklılık allelinin ekspresyonu, heterozigot durumda resesif allelin etkilerini tamamen maskeleyemezse, herbisit dayanıklılığı semi-dominanttır. Bugüne kadar yabancı otlarla yayınlanmış çalışmalarda herbisite dayanıklı allellerin yaklaşık %31 baskın, %37 yarı baskın ve %12'si resesif dayanıklılık olarak belirtilmiştir (Jasieniuk vd. 1996). Monogenik kalıtım, bugüne kadar incelenen herbisit direnci vakalarının %86'sını oluşturmuştur. Monogenik kalıtım vakalarının neredeyse %68'i hedef bölge dayanıklılık mekanizmalarıyla ilişkiliyken, hedef bölge herbisit dayanıklılığı mekanizması içeren diğer vakalar monogenik kalıtım paterniyle uyumlu çıkmamıştır. Poligenik kalıtım, herbisit direnci vakalarının %14'ü ile ilişkilendirilmiştir ve poligenik özellikleri içeren bu vakaların %81'inde bir hedef bölge dışı dayanıklılık mekanizması bulunmuştur (Ghanizadeh vd. 2019).

Monogenik Mendel ayrılma yasaları genel olarak hedef bölge herbisit dayanıklılığı mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, klorsülfürona dayanıklı *Brassica napus*'ta normal monogenik Mendel ayrılma yasalarına aykırı bir kalıtım sistemi tespit edilmiştir (Conner ve Jacobs 2019). Gen belirli bir allelin her zaman kalıtımını garanti etmekte ve böylece sonraki nesillerdeki spesifik allelin frekansı hızla artmakta ve bir popülasyondan beklenenden daha hızlı yayılmaktadır (Hayirli ve Martelli 2019). Conner ve Jacobs (2019), *B. napus*'ta klorsülfürona karşı dayanıklılığın tek bir genle ilişkili olduğunu belirtmişler ve kendileme ve geri melezlemede sırasıyla 3:1 ve 1:1 segregasyon oranlarını kaydetmişlerdir. Dayanıklı ana bitkilere tozlaşmadan önce herbisit uygulaması, beklenmeyen ayrışma oranlarıyla sonuçlanmıştır. Beklenmeyen segregasyon oranlarının, klorsülfüronun uygulanmasından sonra herbisite duyarlı gametlerin ve embriyoların ortadan kaldırılmasından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Bu durumda, herbisit seleksiyon baskısı hem gametofitik hem de sporofitik nesiller üzerinde çalışmaktadır. Herbisit uygulayarak dayanıklılık allellerine sahip polen seçimi daha önce bildirilmiştir (Gorla vd. 1989), ancak Conner ve Jacobs (2019), herbisit çiçeklenmeden önce uygulanmışlar ve dirençli gametler seçilmiştir.

Hedef bölge dayanıklılık mutasyonları ve herbisitlerden dolayı gelişmiş bitki metabolizması ALS inhibitörlerine karşı iki temel dayanıklılık mekanizmasıdır (Yu ve Powles 2014). Hedef bölge dayanıklılık mekanizmaları için, ALS genindeki sekiz farklı pozisyondaki mutasyondan dolayı, bir veya daha fazla ALS sınıfına ait herbisitlere dayanıklılık oluşturduğu bilinmektedir (Yu ve Powles 2014). Bazı dayanıklılık vakaları

için kalıtım şekli araştırılmıştır ve hedef bölge dayanıklılık mekanizmasının değişken dominantlık derecelerine sahip tek bir gen kalıtımı olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, P450 enziminin sebebiyle ALS-inhibitörlerine karşı hedef bölge dışı dayanıklılık mekanizmasının kalıtım daha karmaşık olduğu görülmektedir. Avustralya *Lolium rigidum* popülasyonunda (VLR69), klorsülfüron dayanıklılık metabolizmasının başlangıçta yarı-dominant bir gen olduğu görülmüştür (Preston 2003). Bununla birlikte, VLR69 popülasyonu üzerinde daha fazla araştırma yapılması, klorsülfüron direncinin bu metabolik bazlı mekanizmasının kalıtımının birden fazla lokus (poligenik kalıtım) ile ilişkili olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Bu dayanıklılık kalıtımının herbisit oranları ve çevresel varyasyonlar (sıcaklık) ile değişebileceğini ortaya koymuşlardır (Han vd. 2014). Benzer şekilde, *L. rigidum* popülasyonu (Busi vd. 2011), *Alopecurus myosuroides* (Petit vd. 2010) ve *Papaver rhoeas* (Scarabel vd. 2015) gibi yabancı otlarda ALS dayanıklılık vakalarında poligenik kalıtım olduğunu bildirmişlerdir.

Hem hedef bölge mutasyonları hem de geliştirilmiş herbisit metabolizma mekanizmaları aynı anda ALS'ye dirençli bir fenotipte mevcut olabilmektedir (Yu ve Powles 2014). Klorsülfürona dirençli *Sisymbrium orientale* üzerine yapılan bir çalışma, iki dominant genin bu dayanıklılıkla ilişkili olabileceğini göstermiştir (Preston ve Malone 2015). Pro-197 pozisyonunda dominant bir hedef bölge mutasyonu ile ilişkili bir gen F₂ popülasyonunda 2 g ha⁻¹'de klorsülfürona direnç sağlarken, diğer gen sadece 0.5 g ha⁻¹'den düşük oranlarda dirençli çıkmıştır (Preston ve Malone 2015).

Hedef bölge direnci genel olarak herbisit hedef enzimini kodlayan gendeki tek veya birkaç mutasyon sonucu meydana gelmekte ve bu da herbisit enzimle bağlanma etkisini azaltmakta veya tamamen ortadan kaldırmaktadır. Buradaki dayanıklılık, mutasyon sebebiyle hedef enzimdeki amino asit değişikliğine sebep olmakta ve böylece herbisit bağlanmasını engellemektedir (Powles ve Yu 2010). İki tip hedef bölge dayanıklılığı vardır. Bunlar; herbisit hedef bölgesinin mutasyona uğraması (Yuan vd. 2006) ve hedef bölgenin gen amplifikasyonudur (Devine ve Shimabukuro 1994). ALS herbisit inhibitörleri, ACCase, triazin, dinitroanilin vb.'ye karşı tüm dayanıklılık mekanizmalarının çoğu herbisit etki yerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bazı durumlarda aşırı gen üretimi (amplifikasyon) en son tanımlanan herbisit direnç mekanizmasıdır. *Amaranthus palmeri* ve *Kochia scoparia*'daki glifosat direnci EPSPS gen amplifikasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Gaines vd. 2010; Godar vd. 2015). Bu mekanizmada hedef enzimin üretimini artırarak, hedef bölgeye göre herbisit seyreltilerek etkili bir şekilde dayanıklılık sağladığını bildirmişlerdir.

Bitkiler tarafından geliştirilen hedef bölge dayanıklılığı, nokta gen mutasyonları ile hedef enzimdeki amino asit değişikliklerine sebep olarak herbisit bağlanmasını önleyen veya azaltan mekanizmadır. Birçok araştırmada, ALS inhibitörü herbisitlerine karşı geliştirilen yabancı ot direncinde hedef bölge ALS gen mutasyonları tespit edilmiştir. İlk olarak *Kochia scoparia* ve *Lactuca serriola* bitkilerinde ALS bölgesi dayanıklılığı tespit edilmiştir. *Arabidopsis thaliana* ALS sekansına göre amino asit numaralandırması yapılmış ve nokta mutasyondan kaynaklı *Kochia scoparia*'da Pro-197-Thr (prolin Treonin değişikliği) ve *Lactuca serriola* 'da Pro-197-His (Prolin histinin değişikliği) amino asit değişiklikleri tespit edilmiştir (Guttieri vd. 1992). Şimdiye kadar 50 bitki türünde, ALS geninin sekiz farklı bölgesinde meydana gelen mutasyon sebebiyle değişen amino asit diziliminden dolayı 26 dayanıklılık tespit edilmiştir (Yu ve Powles 2014; Tranel vd. 2014; Beckie ve Tardif 2012). Bu dayanıklı bitki türü sayısının

diğer herbisit gruplarına göre beklenilenden hızlı artması, bu bölgenin nokta mutasyonlarına daha eğilimli olduğunu göstermektedir.

Yabancı otların ALS inhibitörlerine karşı dayanıklılık geliştirmeleri genellikle hedef bölge mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (Tranel ve Wright 2002). ALS dayanıklılığı kazanmış bitkilerde sekiz farklı amino asidin mutasyona uğraması sonucu ortaya çıkmış ve bu noktalar; Ala-122, Pro-197, Ala-205, Asp-376, Arg-377, Trp-574, Ser-653 ve Gly- 654. En yaygın olarak ALS bölgesi dayanıklılık çalışmalarında Pro-197 ve Trp-574-Leu amino asit değişiklikleri tespit edilmiştir. SU grubu herbisitlere dayanıklılığı çoğunlukla Pro-197'deki amino asit mutasyonu sağlarken, Trp-574-Leu amino asit değişikliği hem SU hem de IMI grubu herbisitlerin ikisine birden dayanıklılık sağlamaktadır. Ala-122 ve Ser-653 noktalarındaki amino asit değişikliği IMI grubu herbisitlere dayanıklılık sağlamaktadır. Bazı durumlarda Pro-197 değişikliği olan biyotiplerde düşük veya orta seviyelerde IMI dayanıklılığı gözlenmiştir ancak çeşitli IMI herbisitleri arasında tutarlılık sağlanmamıştır (Saari vd. 1994). Ala-205 ALS değişikliğinin neden olduğu dayanıklılık bir yabancı ot biyotipi geniş çapraz dayanıklılık göstermiştir fakat dayanıklılık seviyesi Trp574 değişikliği olan biyotiplerden yaklaşık 10 kat daha az olduğu belirtilmiştir (Tranel ve Wright 2002). Rapor edilen yaklaşık 21 yabancı ot türünde Pro-197 bölgesinde tespit edilen 12 amino asit değişimleri içerisinde Pro-197-Ser değişikliğinin frekansı diğerlerinin frekansından çok daha yüksektir. Bir nükleotid değişikliği gerektiren mutasyonların frekansı, birden çok nükleotid değişikliği gerektiren mutasyonların frekansından fazladır (Yu ve Powles 2014). Yapılan çalışmalarda *Kochia scoparia*'da Trp-574-Arg (Warwick vd. 2008), *Galium aparine*'da Trp-574-Gly (Sun vd. 2011) ve *Apera spica-venti*'de Trp-574-Met (Hamouzova vd. 2013) amino asit değişiklikleri tespit edilmiştir. Fakat Trp-574 bölgesinde tespit edilen bu amino asit değişiklikleri herbisit dayanıklılığı göstermemiştir. Fakat *Digitaria sanguinalis* bitkisinde 2013 yılında edilen raporda Trp-574-Arg değişikliği hem IMI hemde SU grubu herbisitlere dayanıklılık sağlamıştır.

Belirli bir ALS engelleyici herbisit sınıfına sahip bir bileşiğe dayanıklılık, bu kimyasal ailenin tüm üyelerine çapraz direnci garanti etmemektedir Bu durum çeşitli SU grubu herbisitlerin bazı biyotiplerde diferansiyel dayanıklılık (veya eksikliği) olarak rapor edilmiştir. (Devine vd. 1991; Saari vd. 1992; Hart vd. 1993; Sibony vd. 2001). Tütünde (*Nicotiana tabacum* L.) Pro-197-Serin değişikliğinden kaynaklı SU grubu herbisitlere karşı dayanıklılık çalışmasında, primisülfürona karşı yaklaşık üç kat direnç sağlarken, klorsülfürona direnç 30 katın üzerinde bulunmuştur (Harms vd. 1992).

2.3.2. ALS hedef bölge çapraz dayanıklılık

Hedef bölge çapraz dayanıklılık, bir herbisit biyokimyasal etki sahasındaki bir değişiklik, bitkide aynı etki alanını inhibe eden farklı bir veya birden fazla kimyasal sınıfa ait herbisitlere dayanıklılık sağlaması olarak tanımlanmaktadır. Hedef bölge çapraz dayanıklılık, benzer bir etki bölgesine sahip tüm herbisit sınıflarına veya belirli bir herbisit sınıfındaki tüm herbisitlere karşı dayanıklılık sağlamayı garanti etmemektedir.

Çeşitli ALS inhibe edici herbisit grupları arasında ve içinde farklı dayanıklılık seviyeleri gözlemlenmiştir. Bu farklı dayanıklılık seviyelerinin ALS enzimi ve ALS'nin farklı noktalarındaki mutasyonlardan dolayı herbisitler tarafından farklı bağlanması

kaynaklandığı düşünülmektedir. Herbisitlerin bağlanma noktaları çalışmalarında elde edilen bulgular, ALS'yi inhibe eden herbisit sınıfının ALS üzerindeki aynı veya üst üste binen bölgelere bağlandığını göstermiştir (Durner vd. 1991; Landstein vd. 1993). Dayanıklı ALS enzimi olan biyotipler arasında hedef bölge çapraz direncinde geniş varyasyon bulunmaktadır. ALS geninin birçok farklı fonksiyonel mutasyonunun olduğu tespit edilmiştir.

Genellikle çapraz dayanıklılık ALS geni içerisindeki farklı noktalardan meydana gelen mutasyonlar sebebiyle olmaktadır. Örneğin, ALS geninin Ala-122 bölgesinde meydana gelen mutasyonlar sadece IMI grubu herbisitlere dayanıklılık sağlarken, Pro-197 bölgesinde meydana gelen mutasyonlar ise sadece SU grubu herbisitlere dayanıklılık sağlamaktadır. ALS bölgesinde çoklu mutasyonların keşfiyle, çapraz direncin spesifik mutasyonlara bağlı olduğuna ve bununda ALS inhibitör olan kimyasal herbisit gruplarına veya belirli bir gruptaki spesifik herbisitlere dayanıklılık sağladığı anlaşılmıştır. Yapılan bir çalışmada, ALS geninde meydana gelen Ala-122-Thr amino asit değişikliği IMI grubu herbisitlere 10 kattan fazla dayanıklılık sağlarken SU ve TP grubu herbisitlere dayanıklılık sağlamamıştır (Tranel vd. 2014). Başka bir çalışmada ise Ala-122-Tyr amino asit değişikliği SU grubu herbisitlere 1000 kattan fazla, TP grubu herbisitlere 500 kattan fazla, IMI grubu herbisitlere 16 kattan fazla dayanıklılık sağlamıştır (Han vd. 2012). ALS geninin sülfonilüre ve imidazolin etken maddeli herbisitlere dayanıklılık kazandıracak ve aynı zamanda enzim fonksiyonunu koruyacak birkaç mutasyon olduğu açıkça belirtilmiştir. Henüz tamamının belirlenmemesine rağmen, ALS genindeki bu farklı mutasyonların ALS inhibe edici herbisit kimyaları içinde ve arasında farklı seviyelerde hedef bölge çapraz direnci sağladığı aşikârdır.

ALS'yi inhibe edici herbisit duyarlılığını ortadan kaldıran mutasyonlar bitki sağlığını ve verimi nasıl etkiler sorusu ortaya çıkmıştır. Holt ve Thill (1994), ALS'de dayanıklılık kazandıran mutasyonların bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde ince etkileri olduğu, ancak bitki sağlığını ve gelişimini sürekli olarak azaltmadıkları sonucuna varmışlardır. Yapılan bir çalışmada R ve S kochia biyotiplerinin karşılaştırılması biyokütle üretiminde, üretilen tohumların sayısında veya rekabet edebilme güçlerinde önemli bir fark bulamamışlardır (Christoffoleti vd. 1997; Thompson vd. 1994b). Başka bir çalışmada ise, bir dikenli marul S biyotipi, hedef bölge dayanıklı bir marul çeşidine karşı %31 daha fazla biyokütle üretmiş, ancak iki biyotip hala birbirine çok yakın rekabet gücüne sahip bulunmuştur (Alcocer-Ruthling vd. 1992).

Dayanıklı ve hassas bitki karşılaştırma çalışmalarının yorumlanmasına özen gösterilmelidir, çünkü genellikle kullanılan R ve S biyotipleri genetik olarak benzer değildir (izogenik) ve bu nedenle gözlemlenen farklılıklar direnç mutasyonu dışındaki genetik polimorfizmlerden kaynaklanabilmektedir. Bir araştırmacı beş nesil geri melezleme sonrasında elde edilen marulun R ve S biyotiplerini (*Lactuca sativa* L.) karşılaştırarak bu genetik farklılık etkisini en aza indirmiştir. R ALS alleli bu durumda dikenli maruldan gelmesine ve geriye dönük melezlemeden muhtemel ek dikenli marul genlerinin taşınmasına rağmen, iki marul hattının %96'dan fazla benzer olması beklenmiştir (Eberlein vd. 1999). Bu iki hattın karşılaştırılmasından elde edilen ALS'nin spesifik aktivitesinin R biyotipinde S biyotipinden daha düşük olduğu ve R biyotipinden ALS'nin dallanmış zincirli amino asitlerin geri besleme inhibisyonuna daha az duyarlı olduğu sonuçlarını elde etmişlerdir. Bununla birlikte, bazı çevresel koşullarında bu fizyolojik farklılıklarda etkisinin olabileceği fikri ortaya atılmıştır. Bu karşılaştırmaların

yanında bazı çalışmalarda R biyotipinin soğuk hava şartlarında S biyotipinden çok daha hızlı çimlenme kabiliyeti göstermiştir (Dyer vd. 1993; Eberlein vd. 1999; Thompson vd. 1994a).

ALS inhibitörlerine karşı hedef bölge dayanıklılığına sahip bazı bitki türlerinde ticarileştirilmiştir. İlk raporlarda genetik mutasyonlar sonucu elde edilen dayanıklı hatlarla hassas hatlar arasında büyüme gelişme ve verim açısından fark olmadığı bildirilmiştir (McHughen ve Holm 1991; Blackshaw vd. 1994). Bu ticarileştirilen herbisit dayanıklı çeşitlerde bitki büyüme ve gelişmesinde gerileme veya verim potansiyelinde düşüklük rapor edilmemiştir. Brandle ve Miki (1993), *Arabidopsis* kaynaklı dayanıklılık veren ALS gen aktarılması sonucunda tütün veriminin azaldığını bildirmiştir. Bu raporda araştırmacılar transgenik hatların verim potansiyelinin azalması, spesifik olarak R ALS genindeki değişiklikten dolayı değil, gen aktarımdaki dönüşüm-rejenerasyon prosedürü sırasında ortaya çıkan ikincil etkilerden kaynaklanmış olabileceği fikrini savunmuşlardır.

ALS dayanıklılık geninin bitki üzerindeki pleiotropik etkisi üzerine çalışmalar kısıtlı ve net olarak ortaya konamamıştır. Fakat triazin herbisitlerine karşı hedef bölge direncinin bitki büyüme ve gelişme etkileri üzerine birçok net çalışmalar vardır (Holt 1990; Warwick 1991; Gronwald 1994; Holt ve Thill 1994; Bergelson ve Purrington 1996). Triazin herbisitine dayanıklılık vakalarının çoğunda, foto-sistem-II (PSII) D1 proteininde bir serin-264 glisin (Ser-264-Gly) amino asit değişikliğinden kaynaklanan bir kloroplastik psbA gen mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu mutasyon, triazin herbisitlerinin bağlanmasını azaltır (Trebst 1996), fakat aynı zamanda PSII kompleksi içindeki elektron transferinin yetersizliğinin bir sonucu olarak fotosentetik kapasitenin azalmasına neden olur (Jansen ve Pfister 1990). Sonuç olarak, Ser-264-Gly mutasyonuna sahip triazine dayanıklı birçok yabancı otlarda fotosentetik potansiyelde, büyüme oranlarında, rekabet kabiliyetinde ve üreme yeteneklerinde önemli azalmalar görülmüştür (Holt ve Thill 1994). Triazin dayanıklı mutasyona sahip bitkilerin fotosentezin ışık etkinliğinin azaldığı bildirilmiştir. Bu olumsuz yansımalar sonucunda ışık ve sıcaklık kombinasyonları, fotosentez ve bitki büyümesi üzerindeki olumsuz etkiler artabilmektedir (Ducruet ve Ort 1988; Hart ve Stemler 1990; Dekker ve Sharkey 1992; Arntz vd. 1998; Jordan vd. 1999; Plowman vd.1999). Benzer şekilde, triazin dayanıklı bitkiler fungus enfeksiyonlarına ve böcek beslenmesine daha duyarlı hale gelmektedir (Gassmann ve Futuyma 2005). Triazin dirençli bitkilerin yaprak dokularında daha yüksek azot konsantrasyonlarına sahip olduğu bildirilmiştir. Yaprak seviyesi azottaki artışın potansiyel olarak fotosentetik bir telafi edici özellik olduğu fakat bunun da otoburlara karşı daha büyük bir duyarlılık oluşturduğu belirtilmiştir (Gassmann 2005).

Çok sayıda farklı mutasyonlardan dolayı oluşan dayanıklı bitkilerin çokluğu düşünüldüğü zaman hepsinin pleiotropik etkilerinin araştırılması beklenmemektedir. Yapılan bazı çalışmalardan yola çıkarak, ALS inhibitörlerine karşı hedef alan direnci en azından bazı koşullar altında pleiotropik etkileri olabileceği ve bitki büyüme ve gelişimini etkilenebileceği belirtilmiştir. Fakat ALS bölgesinde oluşan dayanıklılıktan kaynaklanan pleiotropik etkiler triazin direncinin oluşturduğu pleiotropik etki kadar büyük değildir. Bu farkında ALS inhibitörlerine dirençli bireylerin başlangıç frekansının yani herbisit seçiminden önce nispeten yüksek olmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Tranel ve Wright 2002).

2.3.3. Hedef bölge dışı dayanıklılık

Hedef bölge dışı dayanıklılık, temelde herbisit bitki bünyesinde aktif olduğu etki bölgesine ulaşması engellenerek dayanıklılığın meydana gelmesi şeklinde olmaktadır. Bitkilerdeki herbisitlere karşı hedef bölge dışı dayanıklılık, herbisit emilimi, translokasyon, parçalanması ve metabolizma gibi bir veya birden çok fizyolojik işlem sayesinde gerçekleşmektedir (Devine 1997). Herbisit bitki bünyesine girişinin azaltılması, herbisit taşıma miktarının azaltılması ve herbisit tutulma/metabolize olma oranının artırılması olarak bildirilmiştir (Powles ve Yu 2010). Hedef bölge dışı dayanıklılığın üç tipi vardır; metabolik deaktivasyon, düşük absorpsiyon/translokasyon ve herbisit vakuolde tutulmasıdır (Saari vd. 1994; Nandula 2010). NTSR'nin mekanizmaları genellikle hedef bölge direncinden daha karmaşık ve farklı etki modları ile herbisitlere çapraz dayanıklılık verebilmektedir. Metabolizma temelli NTSR, tarımsal açıdan önemli birçok yabancı otta rapor edilmiştir. Ancak bazı yabancı otlarda azaltılmış translokasyon ve herbisitlerin parçalanması da bulunmuştur.

Genel olarak ALS etkili herbisitler, bunlar buğday ve soya gibi çeşitli mahsullerde yabancı otları kontrol etmek için kullanılan geniş spektrumlu, çıkış sonrası kullanılan herbisitlerdir. Bununla birlikte, trifloksisülfuron gibi az sayıda ALS inhibitörü, yabancı otları kontrol etmek için çıkış öncesi seçenek olarak da kullanılmaktadır. ALS-inhibitörüne dirençli yabancı otların çoğunda mutasyon kaynaklı amino asit değişikliklerinin neden olduğu hedef bölge dayanıklılık (TSR) rapor edilmiştir. Yakın zamana kadar bu mutasyonların saptanması, aynı popülasyonda bulunsalarda hedef bölge dayanıklılık mekanizmalarına hedef bölge dışı dayanıklılık mekanizmalarına kıyasla daha fazla önem verilmiştir (Bai vd. 2019; Chen vd. 2020). ALS mutasyonları olmayan ve herbisit uygulaması sonrasında hayatta kalan bitkiler, araştırmacıların hedef bölge dışı dayanıklılık mekanizmalarına odaklanmasına neden olmuştur.

ALS inhibitörlerine dayanıklılık sağlayan artırılmış metabolizma, darıcan (*Echinochloa crus-galli*) (Riar vd. 2012), kaba meyveli su keneviri (*Amaranthus tuberculatus*) (Shergill vd. 2018), *Amaranthus palmeri* (Nakka vd. 2017), geçici akdarı (*Echinochloa phyllopogon*) (Iwakami vd. 2014; 2019) sert brom otu (*Bromus rigidus*) (Owen vd. 2012), kısa tüylü tilkikuyruğu (*Alopecurus aequalis*) (Zhao vd. 2017; 2019), vergelotu (*Myosoton aquaticum*) (Bai vd. 2019) gibi çeşitli çim ve geniş yapraklı yabancı otlarda tespit edilmiştir. Çok sayıda çalışma, ALS inhibitörlerine karşı metabolik direncin moleküler temelini de açıklamıştır. Metabolik dayanıklılığa sahip genler, yabancı ot türlerine ve herbisit uygulamasına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Yu ve Powles 2014). Bu çalışmaların çoğu, ALS inhibitörü herbisit uygulamasını takiben yapısal olarak ifade edilen veya yukarı regüle edilen çoklu CYP450 genlerini tanımlanmıştır (Iwakami vd. 2014; Liu vd. 2018; Zhao vd. 2019). Yapılan bir çalışmada, kısa tüylü tilkikuyruğu mezosülfuron-metil dayanıklılık mekanizması incelenmiş ve dayanıklı bitkilerde iki CYP450 geni, (CYP94A1 ve CYP71A4) yapısal olarak fazla sentezlendiği belirlenmiştir (Zhao vd. 2019). Benzer bir çalışmada, iki CYP450 geni (CYP81A12 ve CYP81A21) çeltik barnyard çiminde bensülfuron-metil ve penoxsulam'a dayanıklılık sağlayan aday genler olarak tanımlanmıştır (Iwakami vd. 2014). Hedef bölge dışı dayanıklılık ALS inhibitörlerine aracılık eden birkaç CYP450 geni, vergelotu (Liu vd. 2018), İtalyan çimi (Duhoux vd. 2015), solucan otu (Yang vd. 2016) ve siyah seğirme otu (Delye vd. 2011; Gardin vd.

2015) bitkilerinde de tespit edilmiştir. ALS inhibitörlerine karşı CYP450 destekli metabolik dayanıklılığı test etmek için yaygın olarak kullanılan bir uygulama olmuştur.

Herbisitlere karşı dayanıklı hedef bölge dışı mekanizmaları, hedef bölge mekanizmalarından daha karmaşık olma eğiliminde ve genellikle zaman içinde gelişen bitki stres tepkilerinin bir parçası olarak ortaya çıkmaktadır (Délye 2013). Önceki çalışmalar, herbisit direncinin hedef bölge dışı mekanizmaları bitkilerin fizyolojisine (Metabolizma hızı) ve fizyolojik ekolojisine (Termoregülatör performans) odaklanmıştır (Dayan vd. 2014; Sammons ve Gaines 2014). Herbisit direncinin bu hedef bölge dışı mekanizmaları tarihsel modelleri ve fizyolojik evrim süreci tam olarak çözülmemiştir.

Evrimsel fizyoloji, bir organizmanın işleyişinin nasıl ve neden geliştiğini incelemek için fizyoloji ve evrimsel biyolojinin kombine edilerek yapılan çalışmadır (Feder vd. 2000). Evrimsel fizyologlar, bir organizmanın fizyolojik özelliklerinin bir süre boyunca çok çeşitli biyotik ve abiyotik ortamlara nasıl uyum sağladığını anlamak için fonksiyonel yaklaşımlar kullanmaktadırlar (Garland ve Carter 1994). Herbisite dayanıklı yabancı ot biyotipleri üzerine yapılan önemli araştırmalara rağmen, bu biyotiplerin herbisitlere fizyolojik adaptasyonunun birçok yönü tam olarak anlaşılamamıştır. Herbisite dirençli biyotiplerin evrimsel biyolojisi üzerine bir dizi çalışma vardır (Busi vd. 2013). Bununla birlikte, kalıcı herbisit kullanımı ile seçilen genlerin kodladığı fizyolojik süreçler ve bu işlemlerin herbisit direncinin gelişimi üzerindeki etkileri konusunda net bilgiler henüz elde edilememiştir (Ghanizadeh ve Harrington 2017). Herbisit direnci mekanizmalarında yer alan fizyolojik fonksiyonları daha iyi anlamak için bitkilerin kökenleri ve gelişimleri hakkında daha fazla şey bilinmelidir (Feder vd. 2000). Evrimsel fizyoloji; insan, hayvan ve bitki biliminde başarılı bir şekilde kullanılmasına rağmen (Natochin ve Chernigovskaya 1997; Feder vd. 2000) herbisitlere karşı direncin evrimini incelemek için bu biyolojik yaklaşım pek fayda sağlamamıştır.

Bitki popülasyonlarının olumsuz çevresel koşullara maruz kalmasının ardından, sıklıkla yaşadıkları çevreye ve stres koşullarına uyum sağlamaları için karmaşık tepki sistemleri geliştirmektedirler (Cramer vd. 2011). Popülasyonlar çevreden gelen yeni tehditlerle karşı karşıya olduğu zaman çeşitli sistemler değişikliklere uğrayabilmektedir (Yoshida 2005). Popülasyon içerisinde uygun kalıtsal allellere sahip bireyler çevresel stresten kurtulmakta ve sonraki nesillere aktarabilmektedir. Yapılan çalışmalar başlangıçta bir herbisite duyarlı olan popülasyonları 3-4 kuşak tekrarlayan herbisit uygulamaları sonrası herbisitlere karşı direnç geliştirebildiğini göstermiştir (Busi vd. 2013). Herbisitlerin uygulayarak oluşan seleksiyon, her nesil içinde bazı fizyolojik modifikasyonlara neden olan birkaç allelin birikmesine yol açabilmektedir (Yoshida 2005) ve bunlarda herbisitlerin daha yüksek konsantrasyonlarına dirençle sonuçlanmaktadır (Délye 2013).

Allel istifleme teorisine (Délye 2013) göre, birkaç nesil boyunca herbisit uygulanmasından sonra ayakta kalan bitkiler, ebeveynlerine kıyasla uygulanan herbisitlere karşı daha az duyarlı olmalarını sağlayan farklı alleller biriktirmektedir. Tekrarlayan herbisitler seçim baskısı sırasında tek tek bitkilerde birkaç allelin birikmesi daha genetik ve fizyolojik varyasyonlara yol açabilmekte, böylece türlerin fizyolojisini nesiller boyunca herbisitlere adaptasyon sağlama şeklinde değiştirebilmektedir. Yu vd. (2013), *Lolium rigidum* popülasyonuna öldürücü olmayan düşük diklofopmetil dozları

uygulayarak tekrarlı seleksiyon yapmışlar ve bunun sonucunda artmış diklofopmetil metabolizmasının değişikliği ile sonuçlandığını bulmuşlardır. Bu gelişmiş metabolizma sitokrom P450 enzimlerinin artan aktivitesinden kaynaklanmaktadır (Gaines vd. 2014). Sitokrom P450 metabolizmasının kalıtım modeli araştırma çalışmaları, bu mekanizmanın iki katkı geni tarafından yönetildiğini göstermiştir (Busi vd. 2011). Allel istifleme teorisine göre, bu iki gen seçim sürecinde birikmektedir. Birkaç nesil boyunca biriken bu iki genin daha sonra her nesil içinde, herbisit direncine neden olacak kadar sitokrom P450 metabolizmasını arttırmak için bitkilerin fizyolojisini değiştirmek için nasıl etkileştikleri bilinmemektedir. Bu iki genin her biri, aynı anda tek bir bitkide bulunmadığında herbisit metabolizmasına nasıl katkıda bulunduğu bilinmemektedir. Aynı zamanda bu iki genden hangisi, herbisitlere karşı direnç geliştirmenin ilk aşamasında en çok katkıda bulunduğu da net değildir.

Birçok çalışma, küçük genlerin herbisitlere karşı direnç mekanizmalarında rol oynayabileceğini göstermiştir (Lorraine-Colwill vd. 2001; Busi ve Powles 2009; Busi vd. 2013; Ghanizadeh vd. 2016). Herbisit direncinin gelişiminin ilk aşamalarında bu küçük genlerin katkısı ve direnç özelliğinin gelişmesine izin veren bu genler arasındaki etkileşimin doğası hakkında bilgiler henüz yetersizdir.

Bir organizmanın epigenetik yapısı çevresel faktörler tarafından değiştirilebilmektedir (Richards vd. 2010). İyi bilinen epigenetik düzenleyici mekanizmalar arasında DNA'daki sitozin nükleotitlerine bir metil grubunun eklenmesi gibi DNA metilasyonu (Goll ve Bestor 2005), histon modifikasyonu ve RNA aracılı modifikasyonlar (Rapp ve Wendel 2005) bulunmaktadır. Stres nedeniyle gen regülasyonunda epigenetik süreçlerin etkisi iyi bilinmesine (Boyko ve Kovalchuk 2008) ve insektisit direncinde epigenetik mekanizmaların rolü tespit edilmesine rağmen (Bass ve Field 2011), herbisite dayanıklı yabancı ot bitkilerinde epigenetik süreçlerin rolü hala bilinmemektedir.

Epigenetik mekanizmalar, biyotik ve abiyotik ajanların neden olduğu stresin bir sonucu olarak gen ekspresyonu kalıplarında değişikliğe sebep olabilmektedir. Herbisitler söz konusu olduğunda (abiyotik stres ajanları olarak), epigenetik mekanizmaların, herbisit dozlarının kademeli artışlarına maruz kalan popülasyonlardan tekrarlayan seleksiyon sonucu gen ekspresyonu modelini nasıl etkilediği bilinmemektedir. Epigenetik faktörler, herbisit direncinin evrimi ile ilgili nesiller boyunca kalıtsal bir şekilde gen ekspresyonu seviyesini etkileyerek direnç mekanizmasında yer alan enzimlerin aktivitesini etkileyebileceği düşünülmektedir (Lee vd. 2010). RNA sekanslama teknikleri kullanılarak hedef bölge dışı dayanıklılık mekanizmalarının araştırılması, dirençli ve duyarlı fenotipler arasındaki gen ekspresyon paternlerinde önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir (Gaines vd. 2014; Pan vd. 2016). Gen ekspresyonundaki fark, dayanıklı yabancı ot biyotipleri nesillerinden geçen epigenetik mekanizmalar tarafından uygulanan protein aktivitesinin değiştirilmesi sonucu olabileceği düşünülmektedir (Ho ve Burggren 2010). Epigenetik faktörler stres yaşayan bireylerde proteinin translasyonu sonrası modifikasyonunu değiştirebilmektedir (Sadakierska-Chudy ve Filip 2015). Bu modifiye edilmiş protein daha sonra bireylerin strese duyarlılığını azaltan bir enzimin ekspresyonunu veya aktivitesini değiştirebilmektedir (Guerra vd. 2015).

Bitkilerde fizyolojik fonksiyonları kontrol eden alleller bir fenotipi etkileyebilmektedir (Orr 2003). Bu allellerin sıklığı, seçici bir ajanın etkisiyle nesiller boyunca değişebilmekte (Orr 2009) ve bu da daha fazla kaynağı etkileyen belirli organlara veya işlevlere dönüştüren bazı fizyolojik fenotiplere neden olabilmektedir (Tian vd. 2003). Bir popülasyondaki bireylerin biriktirebileceği maksimum direnç allel sayısı, o popülasyonun bireysel bitkileri arasında mevcut olan direnç allellerinin sayısına ve bu direnç allellerinin bireylerin yaşamsal faaliyetini nasıl etkilediğine bağlıdır (Délye 2013). Bununla birlikte, herbisit direnci için seleksiyon sırasında direnç frekansındaki allelin zaman içinde nasıl değiştiğinin, bireysel bitkilerin yaşamsal faaliyetini nasıl etkilediğine dair bilgiler çok azdır. Bir fenotipin nispi durumunu etkileyen özelliklerin çoğu, belirli gelişim zamanlarında veya geçerli hakim çevresel koşullar altında spesifik genlerin ekspresyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan bireylerin fizyolojik tepkileri sonucu ortaya çıkmıştır.

Hedef bölge dışı çapraz dayanıklılık, hedef yerleri dışındaki dayanıklılık enzim mekanizmaları tarafından verilen farklı herbisit sınıflarına gösterilen dayanıklılık olarak tanımlanmaktadır. Herbisite dayanıklı yabancı otlarda hedef alan dışı çapraz dayanıklılık *L. rigidum* ve *A. myosuroides* için yakın zamanda tespit edilene kadar tam olarak bilinmemekteydi, fakat insektisit direnci literatüründe bu mekanizmalar iyi bilinmekteydi (Brattsten vd. 1986; Georghiou 1986).

Heap ve Knight (1986), Avustralya'daki yaygın çiftçi deneyimi üzerine yaptıkları bir araştırmada, ACCase inhibitörü olan diklofop-metil etken maddeli herbisite maruz kalan *L. rigidum* popülasyonunun dayanıklılık gösterenlerinin seleksiyonunu yapmışlardır. Daha sonra bu popülasyonlardan bazıları ALS herbisitlerine karşı direnç göstererek hedef bölge dışı çapraz dayanıklılık sağlamıştır. Benzer şekilde, bir laboratuvar deneyinde Matthews ve Powles (yayınlanmamış veriler), diklofop-metil karşı dayanıklılık gösteren *L. rigidum* popülasyonunu üç kuşak boyunca seçildiğinde başlangıçta duyarlı bir popülasyonunun diklofop-metile karşı dayanıklılık geliştirdiğini belirtmişlerdir. Aynı zamanda bu popülasyonlar klorosülfürona maruz kalmadan ALS inhibiting herbisit klorosülfürona direnç gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışma ve saha gözlemleri kesin olarak bir ACCase inhibitör herbisite dayanıklı seleksiyonu ile ALS inhibe edici herbisitlere maruz kalmadan hedef bölge dışı çapraz dayanıklılık sergileyen dirençli popülasyonlar oluşabileceğini tespit etmişlerdir.

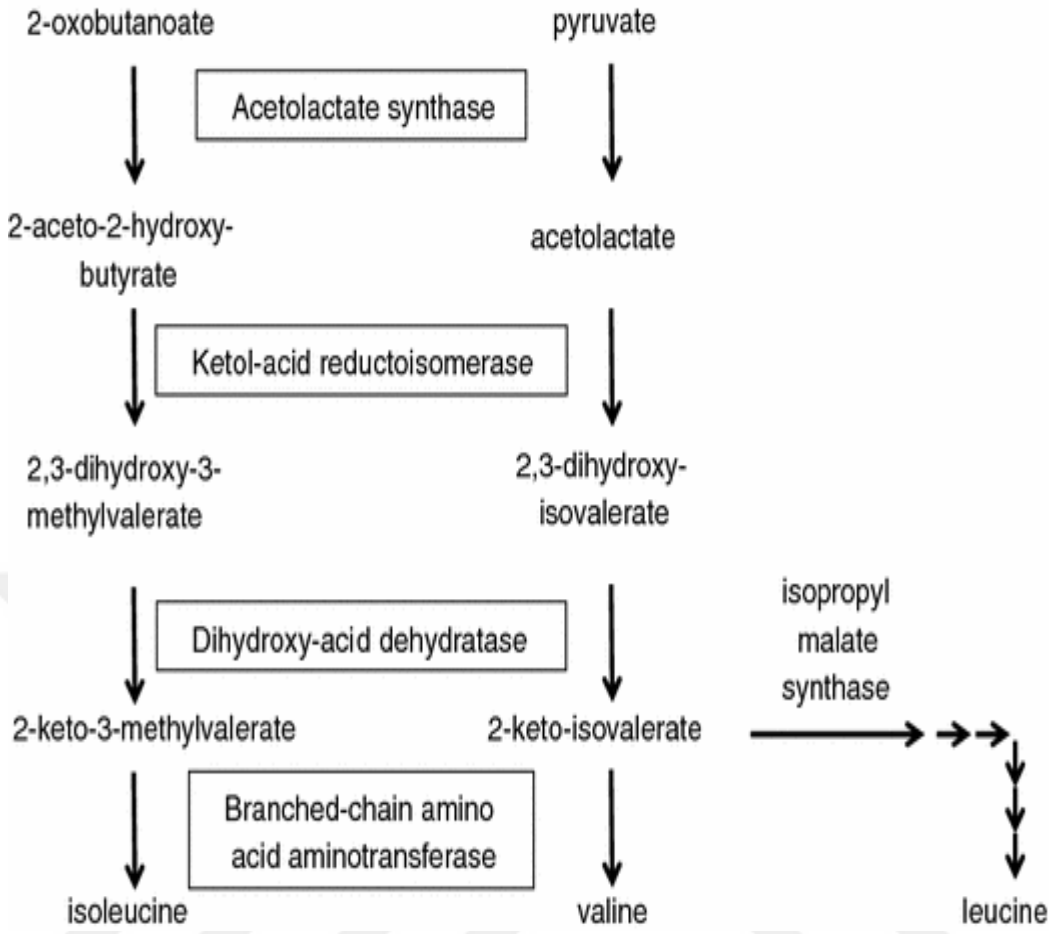
ALS herbisitlerine karşı hedef bölge dışı çapraz dayanıklılığın mekanik temeli *L. rigidum*'da ayrıntılı olarak araştırılmıştır. ACCase herbisitleriyle seçimden ALS herbisitlerine karşı çapraz direnç, ALS hedef enzimindeki mutasyonlardan kaynaklanan dayanıklılığa bağlı olmayan bir mekanizmadan kaynaklandığını bildirmişlerdir (Matthews vd. 1990). Bunun yerine *L. rigidum*'un biyotipleri, bazı ALS'yi inhibe edici herbisitlere karşı dayanıklılık sağlayan gelişmiş bir herbisit metabolizması sonucunda oluşmuştur. Bu *L. rigidum* biyotiplerindeki artan metabolizmayı Cyt P450 enzim bazlı mekanizma tarafından dayanıklılık sağladığı düşünülmektedir (Christopher vd. 1991; 1992). Buğdayda aril-hidroksilasyon etken maddeli herbisit bir Cyt P450 mono-oksijenaz tarafından katalize edilmekte (Sweetser vd. 1992) ve bu sayede bitkinin hızlı metabolizmasının bir sonucu olarak birçok ALS inhibe edici herbisite karşı dayanıklı olmaktadır. Bazı klorosülfüron dirençli *L. rigidum* biyotipleri hassas ALS'ye sahip biyotiplere göre klorosülfüronu daha hızlı oksidatif olarak metabolize edebilmektedir (Christopher vd. 1991; Cotterman ve Saari, 1992; Burnet vd. 1994a). *L. rigidum* ve

buğdaydaki klorsülfüronu katalize eden mekanizma ve metabolizma ürünleri benzerdir (Christopher vd. 1991; Cotterman ve Saari, 1992). Birlikte ele alındığında, bu çalışmalar, metabolizmanın *L. rigidum*'un ALS herbisitlerine karşı hedef bölge dışı çapraz dayanıklılığın temelini oluşturduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Cyt P450'ler, dayanıklı *L. rigidum*'da klorsülfüronun gelişmiş metabolizmasında açıkça rol oynamaktadır, ancak izole edilen mikrozomlarda Cyt P450'ye bağlı klorsülfüron metabolizmasının rol aldığı bugüne kadar kanıtlanmamıştır (Preston ve Powles basılmamış).

2.4. ALS Sentezi

ALS'nin iki farklı metabolik rolü bulunmaktadır. Bulunduğu organizmaların çoğunda, dallı zincirli amino asitlerin biyosentezinde önemli işlevi bulunmaktadır. Bununla birlikte, bazı mikroorganizmalarda, bütanediol ve ilgili bileşikler oluşturan fermentasyon işlemlerinde başka bir işlevi bulunmaktadır. Bu enzimin iki farklı işlevinden dolayı kafa karıştırıcı bazı isimlendirmelere sebep olmuştur; çünkü bütanediol fermentasyonda yıkım (katabolik) tepkimelerinde görev alırken, dallı zincirli amino asit biyosentezinde yapım (anabolik) tepkimelerde görev almaktadır. Bu nedenle, bazı araştırmacılar enzimleri farklı isimlerle ifade etmektedirler. Gollop vd. (1989), anabolik enzimin, asetohidroksiasit sentez (veya asetohidroksit asit sentez AHAS) olarak bilinmesi gerektiğini, katabolik enzim içinde asetolaktat sentez (ALS) ismi ile bilinmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Fakat bu isimlendirme yaygın olarak benimsenmemiştir ve birçok yayında araştırmacılar anabolik enzim için as ALS adını kullanmaya devam etmişlerdir.

Dallanmış zincirli aminoasitlerden valin, lösin ve izolösin, mikroorganizmalar ve bitkilerde ortak bir yolla sentezlenirler (Şekil 1.2). Bu sentez yolunun olağandışı bir özelliği, valin ve izolösin oluşumunda paralel adımların benzer olmasıdır. Bu paralel adımlar dört enzimden oluşurlar; anabolik AHAS, ketol-asit redüktoizomeras, dihidroksiasit dehidrataz ve iki reaksiyonu katalize edebilen her birinin transaminazı (bir amino asidin amino grubunu, bir keto asite aktarımını katalize eden bir grup enzim). Bu amino asitler için ortak başlangıç merkezi metabolik piruvattır ve dolayısıyla bunlar piruvat türevli amino asitlerin bir alt kümesini oluşturur (Duggleby ve Pang 2000). Asetohidroksiasit sentez, üç amino asitte ortak olan ilk enzimdir (Schmitt ve Singh 1991).



Şekil 2.2. Dallanmış zincirli amino asitleri valin, lösin ve isolösin'in sentez şeması.

Katabolik ve anabolik ALS reaksiyonlarının benzer olmasından dolayı bu enzimler kolayca ayırt edilememektedir. Katabolik ALS, doğal kaynaktan saflaştırma yolu ile genler klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Saflaştırılmış katabolik enzim, yaklaşık 60 kDa'lık tek bir alt birimden oluşmuştur. Katabolik ALS, yaklaşık 6.0 olan bir pH'a sahip olmakla, asetat ile uyarılmakla özelliği, FAD gerektirmeme, dallı zincirli amino asitler tarafından inhibe edilmeme ve düzenleyici bir alt üniteye sahip olmama yönleri ile anabolik ALS'den ayrılmaktadır (Störmer 1968a; Störmer 1968b; Holtzclaw ve Chapman 1975; Snoep vd. 1992; Phalip vd. 1995). Bu farklılaşma ayrıca genetik karakterizasyon ile desteklenmektedir (Duggleby ve Pang 2000).

Anabolik ALS, bakteri, fungus, alg ve bitkilerde bulunmaktadır ve bu nedenle bu organizmalar dallanmış zincirli aminoasitler için gerekli olan karbonu inorganik bileşiklerden kendileri elde etmektedir (Duggleby ve Pang 2000).

Bakteriler arasında, *Salmonella* ve *Escherichia coli* gibi ünlü hastalık etkenlerini de içeren büyük bir bakteri familyası olan enterobakterilerden alınan enzimler hem genetik hem de biyokimyasal olarak en kapsamlı çalışılanlardır. Farklı araştırmacılar tarafından *E. coli* ve *S. typhimurium* bakterilerden kodlanan ALS I (Wek vd. 1985), ALS II (Lawther vd. 1987) ve ALS III (Squires vd. 1983a) isimli 3 tane ALS enzimleri keşfedilmiştir. ALS II gen ekspresyonu, tüm dallı zincirli amino asitlerin varlığı ile

kontrol edilmektedir. (Harms vd. 1985). *E. coli* bakterisinde ALS III üretimi, lösine duyarlı düzenleyici protein aracılığıyla oluşan aşırı lösine ile sınırlandırılmaktadır. (Wang ve Calvo 1993). ALS genleri, ALS eksik bakterilerin tamamlanması veya heterolog ALS problemlerinin kullanılmasıyla birçok bakteriden izole edilmiştir. (Tarleton ve Ely 1991; Godon vd. 1992; Milano vd. 1992; Bowen vd. 1997).

Funguslarda ise *ILV2* olarak adlandırılan ALS geni, *Saccharomyces cerevisiae* isimli mayanın mutantının genetik tamamlayıcısı ile elde edilmiş ve klonlanmıştır (Polaina 1984). Bu gen konukçu hücrelerde sülfometuron metile düşük seviyede dayanıklılık göstererek gelişimine ve çoğalmasına devam etmiştir (Falco ve Dumas 1985). *ILV2* geni XIII kromozomunun (YMR108w) sağ kolundan kopyalanmıştır (Petersen vd. 1983). Bakteriyel enzimlerin katalitik alt birimine karşılık gelen diğer mantar ALS genleri de keşfedilmiştir (Jarai vd. 1990; Bekkaoui vd. 1993). *E. coli* bakterisinin aksine, funguslarda sadece bir ALS enzimi bulunmuş ve klonlanmıştır. Maya genom dizileme projesinde düzenleyici alt birim gen keşfedilmiş ve *S. cerevisiae* (YCL009c) III kromozomundan klonlanmıştır (Oliver vd. 1992). Yapılan bu tanımlamalar, önemli amino asit dizisi benzerliğine (Bork vd. 1992; Duggleby 1997) ve fonksiyonel metabolik analiz çalışmalarına (Cullin vd. 1996) dayanılarak yapılmıştır. ALS'nin mayadaki gen ifadesi iki mekanizma tarafından kontrol edilir, birincisi GCN4'e bağımlı genel amino asit kontrolü (Xiao ve Rank, 1988) ve ikincisi üç dallı zincirli amino asidin hepsinin yüksek konsantrasyonunda meydana gelen spesifik düzenleme ile kontrol edilmektedir (Magee vd.1969).

Bitkilerde ALS'nin sülfonilüre (Chaleff ve Mauvais 1984; LaRossa ve Schloss 1984; Ray 1984) ve imidazolin (Shaner vd.1984) etken maddeli herbisitlerin etki bölgesi olarak tanımlanmış, bitkilerde bu bölgede etkinliği olan enzim ve biyosentez yollarının anlaşılmasını büyük ölçüde geliştirilmiştir. İlk iki bitki ALS geni *Arabidopsis thaliana* ve *Nicotiana tabacum*'dan izole edilmiştir (Mazur vd. 1987). Daha sonraki dönemlerde kanolada (Rutledge vd. 1991), mısırdan (Fang vd. 1992), pamukta (Gruha vd. 1995) ve pıtlak türlerinde (*Xanthium sp.*) (Bernasconi vd. 1995) ALS geni klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu organizmalar, tek bir ALS alleleline sahip olma (*A. thaliana* ve *Xanthium sp.*), iki kopya ALS alleleline sahip olma (*N. tabacum* ve *Z. mays*) ve çoklu kompleks ALS allellerine sahip olma (beş gene sahip kanola ve altı gen içeren pamuk) bakımından farklılık göstermektedir. Bitkilerden elde edilen ALS amino asit sekansı, bakteri ve maya ALS amino asit sekansı benzerdir. Araştırılan tüm bitki türlerinde, ALS geni dokularda ve gelişim aşamalarında değişiklik gösterse de en az bir geni yapıcı bir şekilde eksprese edilmektedir. ALS transkripsiyon ve aktivitesinin en yüksek seviyesi meristematik dokularda metabolik aktivite esnasında tespit edilmiştir (Schmitt ve Singh 1990; Ouellet vd. 1992; Keeler vd. 1993).

2.5. EMS Mutageni ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Pratik ıslahın ve bitkilerin çeşitliği genetik varyasyona bağlı olduğu iyi bilinmektedir. Zaman içerisinde insanoğlunun nüfusunun artmasıyla birlikte, daha büyük ve daha güvenli gıda kaynakları arayışına girilmiştir. İlk dönemlerde bitkilerin kültüre alınmasına dayalı üretim sistemleri geliştirilmiştir. Bitkilerin kültüre alınmasıyla birlikte zaman içerisinde birçok bitki çeşitliği ve genetik havuzlar oluşturulmuştur. İlk başlarda bitkiler mutasyonlarının kendiliğinden ortaya çıkması sonucu ortaya çıkan

özelliklerin insan yararı için ve isteklerine göre basit seleksiyon yöntemi ile ıslah edilmektedir.

Gregor Johann Mendel'in 19. yüzyılda kalıtım kanunlarını keşfetmesinden sonra genetik, bitki ıslahı için temel bir bilim haline gelmiştir. Bununla birlikte, melezleme yöntemi geliştirildiğinde bitki ıslahında hızlı ilerlemeler kaydedilmiştir. Daha sonra farklı genotiplerin melezlenmesi ve ardından istenilen özellik seçimine dayanan melezleme ıslahı yaygın bir uygulama haline gelmiştir. İlerleyen süreçte 1920'lerin sonunda ve 1930'ların başında Lewis John Stadler tarafından X-ışınları yoluyla genetik değişikliklerin indüklenmesi üzerine yapılan çalışmalar, mutasyon ıslahı olarak bilinen başka bir bitki ıslahı yönteminin temelini atmıştır (Shu vd. 2012). Mutasyonlar, bitkiler de dâhil olmak üzere herhangi bir organizmada var olan tüm genetik varyasyonların birincil kaynağıdır (Kharkwal vd. 2012). Ortaya çıkan varyasyonlar doğal seleksiyon için iyi bir kaynak sağlamaktadır. Spontane mutasyonlar ortaya çıkma zamanı açısından çok yavaş ve rastgele olmaktadır ve bu da onları bitki melezleme programlarında kullanmayı zor hale getirmektedir (Lönnig 2005). Mutasyon ıslahı, kimyasal ve fiziksel mutagenizasyon yoluyla genetik değişkenlik meydana getirerek ve kullanarak yeni çeşitlerin geliştirilmesini amaçlamaktadır. Farklı mutagenlerle oluşturulan mutasyonlar bitki melezlemesinde en geniş genetik varyasyon kaynaklarını oluşturmaktadır.

Geçmişte ışınların mutasyon meydana getirdiği belirlendikten sonra kimyasal maddelerin de mutasyon meydana getirebilme ihtimali uzun bir süre boyunca birçok araştırmacı tarafından denenmiş, ancak Thom ve Steinberger'in azot asidinin *Aspergillus*'ta mutasyonlara neden olmada etkili olduğunu buldukları 1939 yılına kadar net ve ikna edici olumlu sonuçlar elde edilememiştir. Auerbach (1941), hardal gazının (1,5-dikloro-3-tiyapentan) meyve sineğinde bitkiler üzerindeki X-ışınlarınınkine benzer bir mutagenik etkiye sahip olduğunu bildiren ilk kişi olmuştur. Auerbach ve Robson (1946) daha sonra hardal gazının mutagenik olduğunu gösteren açık kanıtlar elde etmişlerdir. Kimyasal mutagenlerin gen mutasyonları meydana getirmede oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, kimyasal mutagenlerin gerçekten fiziksel mutagenlerle (iyonlaştırıcı radyasyonlar gibi) aynı frekansta mutasyon üretip üretmediği sorusu Auerbach ve Robson (1946) tarafından yayınlanan makaleden sonra anlaşılmıştır. Yapılan çalışmada sineklerin önceden belirlenmiş bir gaz dozuna maruz kalmasının ardından *Drosophila*'daki resesif ve görünür gen mutasyonlarını takip ederek skorlamışlardır. Çalışma sonuçları hardal gazının mutagenik olması ve X-ışınlarının karşılaştırılabilir oranlarda öldürücü ve görünür mutasyonlar olduğunu ortaya koymuştur. Gen mutasyonlarının yanı sıra, kromozom üzerinde silinmeler, ters dönme ve yer değiştirmeler de tespit edilmiştir. Bu kapsamlı araştırmalar yoluyla hardal gazının *Drosophila*'da çok güçlü bir mutagen olduğu bulunmuştur ve kimyasal mutagenlerinde ışın mutasyonları kadar etkili olduğu açıkça ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra Rapoport (1946, 1948) hardal gazının yanında formaldehit, dietilsülfat, diazometan ve diğer bileşikler gibi diğer kimyasalların mutagenik etkilerini keşfetmiş ve alkilleyici ajanların en önemli kimyasal mutagen grubu olduğunu belirlemiştir. O zamandan beri alkilleyici ajanlar, nitrozo bileşikler, baz analogları, azid, akridin boyaları vb. gibi çeşitli gruplara ait yüzlerce kimyasal ajanın çeşitli organizmalarda mutagenik aktivite ürettiği bulunmuştur.

1950'lerde kurulan alkilleyici ajanların mutagenik etkisiyle kimyasal mutagenler üzerinde çalışmanın gelecekteki yönü, esas olarak DNA'nın genetik materyal olarak

gösterilmesinin ardından gen yapısının ve fonksiyonunun anlaşılmasından sonra hızlı ilerlemelerle olmuştur. Watson ve Crick, 1953'te yayımlanan ünlü makalelerinde DNA'nın yapısına yönelik modellerini önerirken, genlerin hem çoğalmasının hem de mutasyonunun yeni yapı açısından daha anlaşılabilirliğine dikkat çekmiştir. DNA bazları ile reaksiyona girdiği ve spesifik yollarla modifiye edildiği bulunan bileşiklerle çalışmaların planlanması artık mümkün hale gelmiştir. Bu nedenle, kimyasal çalışmalara dayanan azot asidinin, sitokinin, nükleik asit bazlarının bilinen analoglarından ikisi olan urasil ve adenini hipoksantin'e dönüştürmesi beklenmekteydi. Moleküler düzeydeki mutasyonlar arasında en önemlisi DNA replikasyonu sırasında düşük oranlarda purin veya pirimidin bazlarında meydana gelen değişikliklerden kaynaklanan mutasyondur. Çoğu DNA tamir mekanizmaları bu değişiklikler düzeltilmeye çalışılmaktadır. Bu düzeltmeler sırasında DNA'daki baz analogunda yanlış eşleştirilmeler olabilmektedir. Pürin (A - G) arasında veya pirimidinler (T - C) arasında değişimler olduğunda geçişler yoluyla mutasyona yol açmaktadır. Mutasyon DNA tamir mekanizmasındaki yetmezlik sonucu tamir olamayanlar DNA baz değişikliğinden kaynaklanmaktadır.

Mutasyon; kimyasal, fiziksel veya biyolojik etmenler sebebiyle organizmanın genetik bilgisinde ani kalıtsal değişikliklerin meydana geldiği süreçtir (Roychowdhur vd. 2013). Mutasyon ıslahında genellikle ışınlama ve kimyasal mutagen olmak üzere iki tip mutagen kullanılmaktadır. Günümüzde iyonlaştırıcı radyasyonun yanı sıra, kimyasal mutagenler mahsulün iyileştirilmesinde de kullanılmaktadır ve etilmetansülfonat (EMS) bitki ıslahı alanında en yaygın kullanılan kimyasal mutagenlerden biridir.

İndüklenmiş mutasyonlar bitkilerdeki genetik kaynakların başında gelmektedir. Bitki türlerinde hızlı şekilde yeni çeşitler elde etmek için yapay mutasyonların uygulanmasının çok faydalı bir yol olduğu belirtilmiştir (Maluszynski vd. 1995). Genellikle mutagen etmenler fiziksel (radyasyon) ve kimyasallar olmak üzere iki ana kategoriye ayrılırlar. Mutagen etmenlerin etkilerine karşı bitkinin nükleer, kloroplast ve mitokondriyal genomları çok hassastır. Gamma ışınları ve X-ışınları (elektromanyetik radyasyon) ve hızlı nötron ya da protonlar (parçacık radyasyonu) gibi mutagenler yüksek enerji seviyesine sahiptirler. Genellikle gamma ışını ve X-ışını radyasyonu kromozomal bir kırılmadan kaynaklanan yapısal kromozom mutasyonlarına yol açmaktadırlar (van Harten 1998). Delesyonlar, duplikasyonlar, inversiyonlar ve translokasyonlar olmak üzere dört tip yapısal mutasyon belirlenmiştir. Yapısal mutasyonların yoğunluğu radyasyon tipi, uygulanan doz miktarı ve süresi gibi özelliklere bağlıdır (van Harten 1998).

Tohumun ışınlanması veya kimyasal bir mutagene maruz bırakılması sonucunda kromozomlarda değişimler veya bazı genlerin diğer allel forma dönüşmesine sebep verebilmektedir (Walter vd. 1987). Meydana gelen mutasyonların %99'u resesif özellik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple meydana gelen mutasyonların çoğu M₁ bitkilerinde ortaya çıkmadığından seleksiyona M₂ generasyonunda başlanmaktadır (Gottschalk ve Wolff 1983). Mutasyon ıslahında uygun mutagen ve uygulama yöntemleri çok önemlidir (Wellensiek 1965). Bitkilerin mutagenlere karşı hassasiyeti çok farklıdır. Türler arasında hatta tür içindeki genotipler arasında bile mutagen hassasiyeti çok farklı olabilmektedir (Tavcar 1965; Walter vd. 1987).

Herbisit toleranslı mutantlar geliştirmek için bir bitkinin tohumlarını, polenini veya mikrosporlarını, etil metan sülfonat (EMS), etil nitrosourea, N-nitrozo-N-metilüre veya sodyum azit gibi çeşitli kimyasallarla muamele edilmektedir. Gamma ışınlaması da herbisite dayanıklı mutant gelişimde gen mutasyon sıklığını arttırmada kullanılmaktadır. Örneğin, imidazolin toleranslı çeltiğin gelişmesinde mutasyon sıklığını arttırmak için çeltik tohumları gama ışını ile muamele edilmiştir. Gama ışınlaması, sülfonilüre (SU) toleranslı mercimek oluşturulmasında da kullanılmıştır. Bununla birlikte, herbisite toleranslı mutantların gelişiminde gama ışınlaması ile yapılan mutasyonlar, kimyasal mutagenler kadar popöler ve başarılı olamamaktadır. Gama ışınlamasını, kimyasal mutagen uygulamasına kıyasla daha pahalı ekipmana ihtiyaç duymakta ve daha zor gerçekleştirilmektedir. Bu zorlukların yanında gama ışınlamasında başarı şansı da kimyasal mutageneze göre çok düşüktür. Bugüne kadar, gama ışınlaması ile elde edilen veya geliştirilen herbisite toleranslı hiçbir bitki bulunmamaktadır.

Yararlı özelliklerin genetik varyasyonunu arttırmak bitki ıslahı için çok önemlidir. Mutasyon ıslahında en önemli nokta mutasyon oluşturduktan sonra aranılan özelliklerin taranması ve bu özelliklerin doğruluğunun teyit edilmesidir. Mutasyon kriterlerini karşılayan mutasyona uğramış geniş bir popölasyondan bireylerin seçilmesi en önemli basamaklardan birisidir. İstenilen özelliği meydana getiren mutasyonların seçilmesi ve tekrar edilerek kalıtsal olup olmadığı teyit edilmelidir. Varsayılan mutantların büyük örnekler kullanılarak kontrollü ve oğaltılmış bir ortamda yeniden değerlendirilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu işlem sayesinde birçok varsayılan mutantın sahte mutant olup olmadığı ortaya çıkmaktadır. Genel olarak, bitkinin iyileştirilmesinde önemli olan mutasyonlar genellikle tek baz değişikliği içeren mutasyonlardır. Bu nokta mutasyonlar protein sentezini etkileyebilir ama bitki içerisinde büyük olumsuz etkilere yol açma şansı oldukça düşüktür.

Kimyasal mutagenler de dahil olmak üzere bütün mutasyonlar istenilen özelliklerin yanında istenmeyen özellikleri de meydana getirebilmektedir. Aynı bitkide istenilen mutasyonla birlikte istenmeyen özelliklere sahip mutasyonlar da ortaya çıkabilmektedir. Bu istenmeyen agronomik özellikler ile dayanıklılık sağlayan gen birbirine yakın değilse elit hatlarla melezlenerek dayanıklılık kolaylıkla aktarılabilmektedir. Bu melezleme çalışmalarında mutasyonun dominant bir genle taşınması ıslah açısından büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Soyanın genetik gen fonksiyonunun araştırılması ve bitkinin agronomik ve fenotipik özelliklerini geliştirmek zor olmaktadır. Soyada *Agrobacterium tumefaciens* veya *A. rhizogenes* ile gen aktarım yöntemleri kullanılsa da soya için ideal bir sistem değildir. *A. tumefaciens* bakterisi ile aktarım başarışı çok düşüktür (Ko vd. 1996; Olhoft vd. 1996). *A. rhizogenes* kök dönüşüm yöntemi nispeten yüksek etkinliğe sahip olmasına rağmen kalıtsal değildir (Cho vd. 2000; Subramanian vd. 2005). Partikül bombardımanı, değişken başarı oranlarına sahip değişimler elde etmek için kullanılan bir yöntemdir (Aragoa vd. 2000; El-Shemy vd. 2006), fakat aynı zamanda rekombinasyona neden olabilen çoklu kopyalar oluşturmaktadır. Ek olarak, bu yöntemlerin tümü doku költürü gerektirmekte ve bir sonraki kuşağa aktarılmayan kimerik değişimler meydana getirmektedir (Cooper vd. 2008). Transgenik yöntemlerin aksine, kimyasal mutasyonlar, iyi gelişmiş genetik araçlardan yoksun olmalarına rağmen çoğu bitki türüne rahatlıkla uygulanabilmektedir. Kimyasal mutagenlerin birçok

yararı bulunmaktadır. Doku kültürü gerektirmez, indüklenen değişiklikler stabil ve kalıtsaldır. Böylece sonraki nesiller kimerik olmazlar. Kimyasal mutagen tek nükleotid değişikliklerine neden olduğu için bir gen hedefinde allelik bir seri de sağlayabilmektedirler. İndüklenmiş mutasyon taşıyan hatlar transgenik değildir ve bu nedenle herhangi bir düzenleyici kısıtlama gerektirmez. Kimyasal mutasyonlar, soyada birçok fenotipik özellikler, hastalık dayanıklılık ve nodülasyon gibi birçok özellik için başarıyla kullanılmıştır (Carroll vd. 1985; Hoffman vd. 1999).

Geçmişten günümüze kadar birçok mutasyon çalışması yapılmıştır. En çok kullanılan yöntem EMS yöntemi olup birçok bitkide başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Mısır bitkisinde yapılan bir çalışmada mısırın polen taneleri %1 EMS solüsyonunda 40 dk. bekletilmiş ve sonrasında aynı bitkinin çiçeklerine verilmiştir. Daha sonra elde edilen tohumlar ekilmiş ve üzerine imidazolin içerikli herbisitler uygulanmıştır. Ayakta kalan hatlar seçilmiş ardından ticarileştirilmiştir. Yine benzer çalışmalarda EMS mutasyon çalışmasında pirinçte, mısırdaki, ayçiçeğinde, buğdayda ve kanola bitkilerinde imidazolin dayanıklı hatlar geliştirilmiştir.

Ayçiçeğinde sülfonilüre (SU) grubu herbisitlere dayanıklılığın birincisi, Amerika Birleşik Devletlerinde Kansas Eyaleti'nde tesadüf olarak yabancı bir çeşitte gözlemlenmiş ve seleksiyon yapılarak melezleme yoluyla elit hatlara aktarılmıştır. İkincisi ise tohumla EMS uygulaması sonucu elde edilmiştir. Tolerans ALS1 geninde meydana gelen bir nokta mutasyonu tarafından sağlanmıştır. 197 numaralı kodundaki meydana gelen bir bazlık değişim CCC'den CTC'ye dönüşmüş ve prolin yerine lösin sentezlenmesi sonucu herbisit dayanıklılığı ortaya çıkmıştır.

Soyadaki mutasyon ıslahı diğer ekonomik öneme sahip bitkilerin gerisinde kalmıştır. Micke vd. (1985) çeşitli mutagenler kullanılarak elde edilen soyları derlemiştir. Onlar çeşitli mutagenler tarafından geliştirilmiş 17 soya çeşidini listelemiştir. 10 çeşit Çin'den, 3 çeşit Japonya'dan, Bulgaristan Cezayir, Kore ve eski Sovyetler birliğinden birer çeşit olmak üzere toplamış ve değerlendirmiştir. Japonya'dan gelen tüm çeşitler nematodlara dayanıklı olduklarından dolayı yüksek verime sahip çıkmıştır. Kore'den gelen çeşidin daha erken hasada gelerek (11 gün), yüksek verim (%16) ve daha geniş tohum oluşturduğu bildirilmiştir.

Karmakar ve Bhatnagar (1996) Hindistan'da 1969'dan 1993'e kadar piyasaya sürülmüş 43 soya çeşidini kaydetmiştir. Üç çeşit mutasyonla geliştirilmiştir, beş çeşit A.B.D.'den direk introduksiyonla getirilmiş ve geri kalanları ise getirilenlerden seçilmiş ve tekli melezle elde edilmiştir.

Buss (1983) bir çekinik genli erkek kısır (gms) hattını nötronlarla ışınlar uygulayarak mutasyon oluşturmuş ve 'Essex' soya çeşidinin M₃ generasyonundan izole etmiştir. Allelizim testleri gms hattının *ms1*, *ms2*, *ms3*, ve *ms4*'den bağımsız olarak kalıtım gösterdiğini bildirmiştir. Bu yüzden, yeni tanımlanmış 'Essex' gms geni *ms5* sembolü ile isimlendirilmiştir.

Carroll vd. (1985) Bragg çeşidi soya tohumlarını EMS kullanarak mutasyona uğratmışlardır. 15 bağımsız nitrata toleranslı simbiyotik (*nts*) mutantlarını 2500 M₂ popülasyonundan izole etmişlerdir. Yoğun olarak mutant *nts382* çalışılmıştır. KNO₃ olması durumunda, *nts382* aynı ortam şartları altında yetiştirilen Bragg çeşidinden altı

kat daha fazla nodül bağlamıştır. Song vd. (1995), mutantlardan köken alan ‘Bragg’ genotipleri ve ticari çeşitlerin verim, N₂ fiksasyonu, ve ortalama süpernodülasyon oluşumu (iki kez), aşırı süpernodülasyon (altı kez), ve nodülasyon göstermeyen mutantların hasat sonrasında yetiştirilecek olan hububat bitkileri üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırma 6 yıl boyunca iki bölgede yürütülmüştür. Azotla gübrelenen parsellerde süper nodül bağlayanlar ticari çeşitlerden daha yüksek aktivite göstermiştir. Süper nodül bağlayanların dane verimi ticari çeşitlerle ya aynı seviyede ya da %25’e varan düzeyde daha fazla bulunmuştur. Ticari soya çeşitlerinin sonrasında hemen ekilen yulaf ve arpa önemli ölçüde yüksek verime sahip bulunmuştur.

Mutagenesis soyada yağ asidi içeriği bakımından varyasyon yaratmak için çok iyi bir araç olmuştur. Hammond ve Fehr (1983a), soya tohumlarına EMS uyguladıktan sonra M₄ generasyonunda %4.1 linolenik asit içeren bir hat belirlemişlerdir. Ebeveyninde ise (FA9525) linolenik asit %6.3 içermekteydi ve diğer yağ asitleri oranını sabit kalarak sadece linolenik asit oranını mutasyon yolu ile değiştirmişlerdir. Hammond ve Fehr (1983b), FA8077 isimli çeşide sodyum azit uygulamışlar ve mutasyon meydana getirmişlerdir. Bir M₂ popülasyonundan gelen bir hattı izole etmişlerdir. Mutasyon sonucunda stearik asit içeriği (%28.1) yükseltilmiş ve oleik asidi (%19.8) belirgin olarak azaltılmış olan A6 hattını belirlemişlerdir.

Wilcox vd. (1984) Century soya çeşidine EMS uygulamışlardır. EMS ile muamele edilen 15.000 M₂ bitkisinden genetik olarak durulmuş düşük linolenik aside (%3.4) sahip bir mutantı tanımlamışlardır. Linolenik asit içeriği M₂ popülasyonlarındaki tohumlarda %3.4-11.1 arasında değişiklik gösterirken, mutasyon uygulanmayan Century çeşidinde bu oran %6.6-9.4 arasında değişiklik göstermiştir.

Takagi vd. (1989) Bay çeşidinin tohumlarına X-ray ışınlayarak yüksek linolenik asit içeriğine (%18.4) bir hat geliştirmişlerdir. Mutasyon materyali Bay çeşidi %9.4 linolenik asit içermekteydi. Linolenik asit memelilerin beslenmesinde gerekli bir yağ asididir. Bazı memelilerde, linolenik asit eksikliği deri lezyonlarına, düşük öğrenme kabiliyetine, büyüme geriliğine ve zeka geriliğine sebep olmaktadır (Coscina vd. 1986).

Palmitik (C16:0) ve stearik (C18:0) asitler soyada iki ana doymuş yağ asididir. Fehr vd. (1991) soya çeşidi A1937’ye NMU uygulayarak mutasyon meydana getirmişlerdir. NMU ile muamele ederek indirgenmiş palmitik asit içeriğine sahip bir mutant üretmişlerdir. Düşük palmitik asit içeriği iki farklı lokusta iki farklı allel tarafından yönetilmekte olduğunu bildirmişlerdir. *fap1 fap1* ve *fapx fapx* genotiplerini tanımlamışlardır. Bu hat soyada bilinen en düşük içerik olan 44 g kg⁻¹ palmitik asit içeriğine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Wilcox ve Cavins (1990) Century çeşidine EMS uygulayarak mutasyon oluşturmuşlardır. EMS ile muamele ederek C1726 (tescil GP-116; PI532833) ve C1727 (tescil GP-117; PI532834) adlı iki adet mutantı izole etmişlerdir. Century %11.2 palmitik asit içermekte iken, C1726 mutantı %8.5 palmitik asit ve C1727 mutantı %17.2 palmitik asit içermektedir. Genetik çalışmalar palmitik asit yüzdesindeki değişime iki bağımsız lokusta bulunan allelerin etki ettiğini ve gen faaliyetinin eklemeli olduğunu belirtmişlerdir. *fap1* gen sembolü C1726’da soya yağında palmitik asit seviyesini düşüren bir alleli, *fap2* gen sembolü ise C1727’de palmitik asit seviyesini arttıran bir alleli göstermektedir (Erickson vd. 1988). Palmitik asit seviyesindeki bir düşüş yağ

kalitesini arttırmaktadır. Palmitik asit seviyesindeki artış, una katılan yağ ve margarin gibi gıda katkı maddesi üretiminde kullanımını sağlamaktadır (Schnebly vd. 1994).

Greene vd. (2003) EMS mutasyon yöntemiyle elde edilmiş 192 *Arabidopsis thaliana* genine ait yaklaşık 1900 mutasyon noktasını TILLING ters genetik yöntemiyle analiz etmişlerdir. Kimyasal mutagenlerin çok popüler olduğunu belirtmişler ve özellikle EMS kimyasalının çok etkin olduğunu bildirmişlerdir. EMS, DNA replikasyon sonrasında nükleotid değişikliği ve DNA eşlenirken yanlış eşleşmeye sebep olarak nükleotid değişiklikleri meydana getirerek bitkide nokta mutasyonlara sebep olmaktadır (Haughn ve Somerville 1987; Ashburner 1990). EMS mutageni yüksek oranda nokta mutasyonları meydana getirmekte sadece çok az oranda kromozom kırılmalarına sebep olmaktadır. Bu nedenle anöploidi, verimlilik ve öldürücülük daha az olmaktadır. EMS guanin kalıntılarını alkile ederek, O⁶-etilguanin üretmektedir ve bunun sonucunda da Sitozin (C) yerine Timin (T) ile eşleşmektedir (Ashburner 1990). Bunun sonucunda, onarılmamış alkilleme hasarının replikasyonunda, Guanin/ sitozin (G/C) olan bölge Adenin/Timin (A/T) ile değiştirecektir. Bu mekanizma, çok sayıda mutagenез çalışmasında gözlemlenmiş ve EMS ile muamele edilmiş mutasyonlarda güçlü bir Guanin/sitozin (G/C) yerine Adenin/Timin (A/T) değişikliği öngörülmüştür (Vidal vd.1995). 1906 nokta mutasyonun 1890 tanesinde Guanin/sitozin (G/C) yerine Adenin/Timin (A/T) değişikliği tespit etmişler ve bunun %53 oranında Guanin, %47 oranında Sitozin değişikliği olduğu belirlemişlerdir. EMS ile yapılan mutasyonlarda Guanin/sitozin (G/C) yerine Adenin/Timin (A/T) değişikliğinin %99'dan fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Tespit ettikleri 1890 nokta mutasyonun 1276 tanesi heterozigot 614 tanesinin homozigot olduğunu ve 2/1 oranında heterozigot/homozigot olduğunu belirtmişlerdir. Yine bu 1890 mutasyonun 851 tanesi sessiz mutasyon, 946 tanesinin yanlış eşleşme mutasyonu ve 93 tanesinin kesme (kısaltma) mutasyonu olduğunu bildirmişlerdir.

Cooper vd. (2008) önemli azot bağlayıcı ve yağ bitkisi olan soyada TILLING çalışması yapmışlardır. Üçü EMS biri de NMU (N-nitrozo -N-metil üre) kullanılarak dört mutasyon popülasyonu oluşturulmuş ve hedeflenen mutasyonları TILLING metodu ile taramışlardır. Yedi hedef gen bölgesi için her bir mutasyonda tarama yapılmış ve 116 adet indüklenmiş mutant bulmuşlardır. NMU ile muamele edilmiş popülasyon ile EMS ile muamele edilmiş bir popülasyondaki mutasyon frekansları yoğunluklarının benzer olduğunu bildirmişlerdir (~ 1/250 kb). Buna karşın diğer iki EMS ile muamele edilmiş popülasyonlarda ~1/550 kb mutasyon frekansı bulunmuştur. Toplam yaptıkları mutasyon uygulamaları sonucunda 1.8-7.1/Mb arasında mutasyon frekansı elde etmişlerdir. Soyanın poliploid atasından kaynaklı olarak bazı primerlerin çok iyi çalışmadığı ortaya konmuş ve bunun neticesinde düşük kaliteli veriler elde edilmiştir. Bu sorunu çözmek için genomik DNA'ları restriksiyon enzimi ile bir ön işleminden geçirip hedef dışı bölgeleri uzaklaştırmışlardır. Kesim işlemi sonrası kesilmemiş PCR ürününe kıyasla fazladan dört mutant allel elde etmişlerdir. Oluşturdukları dört mutasyon popülasyonu ve elde ettikleri önemli derecede mutasyon yoğunluğu, soyanın yeni nesil mutasyon taraması için oldukça elverişli bir bitki olduğunu ortaya koymuşlardır.

Gady vd. (2009) yeni bir popülasyonu oluşturmak için domates (*Solanum lycopersicum*) bitkisine %1 oranında EMS uygulamıştır. EMS uygulamasından sonra birçok fenotipik özellikler için gözlemler almışlardır. Daha sonra moleküler analizler

yaparak mutasyonları belirlemişlerdir. Yaptıkları sekans analizlerinde mutasyon noktalarında iki farklı nükleotide ait eğrilerin aynı noktada pik verdiklerini tespit etmişlerdir. Bu iki pik veren noktaların mutasyon noktaları olduklarını belirtmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda mutasyon etkinliğini 1.36/1000 bp olarak bulmuşlardır.

Dierking ve Bilyeu (2009) yaptıkları çalışmalarında Williams 82 çeşidine EMS uygulayarak mutasyon meydana getirerek M_2 popülasyonu oluşturmuşlardır. Oluşturulan bu popülasyonda rafino sentez ve omega-6 yağ asit desaturaz genleri için yeni allel taraması gerçekleştirmişlerdir. Rafino sentez geni *RS2*'de dört mutasyon tespit etmişlerdir. Bunlar iki mutasyon amino asit değişikliği ile ve bir tanesi de tohumdaki oligosakkarit yapısının değişimi ile sonuçlandığını belirtmişlerdir. *FAD2-1A* omega-6 yağ asit desaturaz geninde üç mutasyon tespit etmişlerdir. Bu üç mutasyon, amino asit mutasyonlarında missense ile sonuçlandığını ifade etmişlerdir ve bunlardan bir tanesinin tohumda oleik asit miktarını artırdığını ve linoleik asit miktarını düşürdüğünü belirtmişlerdir. *RS2* allenindeki mutasyonla, rafinoz ve stakyoze seviyelerinin düştüğünün ve bunların da besin değerleri olmadığını için bu mutantlarda görülen oligosakkarit değişikliklerinin pozitif olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmacılar bu fenotipler için geliştirdikleri moleküler markerler ile mutant allellerin aktarımlarının güvenli bir şekilde tespit edilebileceğini, dolayısıyla da ıslah çalışmalarında kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Pavadai vd. (2009) fiziksel ve kimyasal mutagenlerin soyanın biyokimyasal içeriği üzerine etkinliği ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada CO-1 isimli soya çeşidi mutasyon materyali olarak kullanılmıştır. Bu çeşide fiziksel ve kimyasal mutagenlerden, gama ışınlarının, etil metan sülfonatın (EMS), dietil sülfatın (DES) ve Kolkisin (COH) uygulanarak etkinliği incelenmiştir. Soya tohumlarına; 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 KR dozlarında gama, %0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 oranlarında EMS, %0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 ve 0.06 oranında dietil sülfatın (DES) ve Kolkisin (COH) uygulanmıştır. Bu çalışmada M_2 generasyonunda klorofil-II ve fenotipik olarak gözlem alınabilecek özellikler çalışılmıştır. Albino, anormal pigment gelişimi ve değişik bir yeşil tonunda (xantha) olmak üzere üç tip klorofil mutan, uzun, cüce, bodur bitki yapısı, erken ve geç çiçeklenme, erken ve geç olgunluk, yeşil renkli tohum, buruşuk tohum, tek tohumlanmış kapsül, uzun kapsül, tetra yaprak yapısı ve erkek kısırlığı gibi özellikler gözlemlenmiştir. Mutagenik etkinliği, Klorofil-II, diğer fenotipik özellikleri, yaralanma ve hayatta kalma özellikleri esas alınarak hesaplanmıştır. M_2 mutantlarda yapılan incelemede klorofil-II ve diğer fenotipik özellikler bakımından mutagen etkinliği en fazla 10 KR gama ışını ve ardından %0.1 EMS bulunmuştur. Fakat en yüksek protein ve yağ içeriği ise 50 KR gama ışın uygulamasında kaydedilmiştir.

Khan ve Tyagi (2009) soyada mutasyon uygulamaları ile klorofil-II değişkenliği üzerine bir çalışma yapmışlardır. İki soya çeşidine kimyasal mutagen etil metan sülfonat (EMS), fiziksel mutagen (gama ışınları) ve bunların farklı kombinasyonlarının M_1 ve M_2 popülasyonlarında klorofil-II mutasyonları oluşturma ve sıklığını araştırmışlardır. Çalışma da 15 30 45 KR gama ışını, %0.1, 0.2, 0.3 EMS ve 15KR+%0.2 EMS, 30KR+%0.2 EMS ve 45KR+%0.2 şeklinde kombinasyonlarını denemişlerdir. İkili mutagen kombinasyon uygulamaları diğer tekli mutagen uygulamalarına göre daha etkili olmuştur. İki genotipte de 45KR gama ve %0.2 EMS kombinasyonu klorofil-II mutasyonu bakımından en faydalı bulunmuştur. Mutasyon bitkide komozomal anormallikler, öldürücü etkisi ve kısırlık gibi istenmeyen birçok özellikte meydana

getirdiğini bildirmişlerdir. Mutasyonların bitki ıslahındaki yararlılığı bitkideki mutagenik etkiye bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Bolon vd. (2011) soyada hızlı nötron (FN) yöntemi kullanarak mutant popülasyonu oluşturarak fenotipik ve genomik analizleri üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Mutasyona uğramış popülasyonlar, bitki genomik araştırmalarında varyasyonu tanıtmak ve gen fonksiyonunu incelemek için vazgeçilmez kaynaklar haline geldiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, soya genomunda delesyon mutasyonlarını indüklemek için hızlı nötron (FN) radyasyonu kullanılmıştır. Yaklaşık 120.000 soya tohumu 32 Gray birimine kadar FN radyasyon dozlarına maruz bırakılmış ve 23.000'den fazla M₂ popülasyonu oluşturulmuştur. Bu çalışmada popülasyonun fenotipik farklılıkları taranmış ve agronomik açıdan önemli özelliklerin genomik karakterizasyonu ile ilişkisi gösterilmiştir. Bitki varyasyonu tohum kompozisyonu, olgunluk durumu, morfoloji, pigmentasyonu ve nodülasyon özellikleri bakımından ayrılarak kategorize edilmiştir. Farklı çevre koşullarında ve farklı genotiplerde tohum proteini ve yağ içeriğinde önemli artışlar veya azalmalar gösteren mutantlar elde edilmiştir. Silme eşlemesi için lezyona bağlı mutantlara karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) uygulanması, bilinen bir *FAD2-1A* (yağ asidi desatüraz için) gen delesyonu M23 ile doğrulandı. CGH kullanılarak fenotiplerle ilişkili silme bölgeleri ve aday genleri ortaya çıkaran bir mutant alt kümesi karakterize edilmiştir. PCR ürünlerinde sekanslama yöntemiyle CGH tarafından tespit edilen FN kaynaklı delesyonların konfirmasyonu yapılmıştır. Soya FN mutantlarının karakterizasyonunun ötesinde, bu çalışma, mutant bitki genomlarının analizleri için CGH, ekzon sekansı yakalama ve yeni nesil sekanslama yaklaşımlarının faydasını ortaya koyduğunu belirtmişlerdir. Bu FN mutant soya popülasyonunun gelecekteki genetik taramalar ve fonksiyonel genomik araştırmaları için değerli bir genetik havuz oluşturacağını belirtmişlerdir.

Anai (2012) soyada TILLING çalışması için X-ray ışını, EMS ve ikisinin kombinasyonlarının uygulamışlardır. Mutasyon uygulamaları ile 40.000'den fazla mutant hat oluşturulmuş ve 0.1 ile 1.3/Mb arasında mutasyon frekansı tespit edilmiştir. Mutasyon yoğunluğunu artırarak popülasyonunu düşürmek iyi bir fikir gibi düşünülmektedir fakat çok fazla mutasyon içeren bir mutantın fenotipik açısından analiz edilmesi ve ıslah materyali olarak kullanılmasının zor olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenlerden dolayı, uygulanacak mutasyon oranı, elde edilecek mutantların amacına uygun olacak şekilde düşünülerek hesaplanmalıdır.

Hoshino vd. (2014) soyada linoleik asit içeriği düşürmek amacıyla mutasyon çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmalarında soya genomunda 4 adet *FAD3* homologu (*Glyma02g39230*, *Glyma11g27190*, *Glyma14g37350* ve *Glyma18g06950*) tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bunlardan *Glyma02g39230* (*GmFAD3-1a*) ve *Glyma14g37350* (*GmFAD3-1b*)'de fonksiyonel olmayan alleller; *Glyma18g06950* (*GmFAD3-2a*)'de küçük varyasyonlar bulunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında, *GmFAD3-2a* allellinden 7 adet mutantı izole etmişler ve 7 hattın her birinin tek nükleotid değişikliği içerdiğini bildirmişlerdir.

Tsuda vd. (2015) Japon soya elit hattı Enrei çeşidine EMS uygulayarak melezleme çalışmalarında kullanmak üzere mutant kütüphanesi oluşturmak için bir çalışma yapmışlardır. İlk yıl 10.000 tohuma %0.35 EMS uygulamışlar ve yaklaşık 2000

tohum elde etmişlerdir. İkinci yıl her bitkiden 4 tohum alınarak yaklaşık 8000 tohuma tekrar %0.35 EMS uygulamışlardır. Albino, yaprak tüylülük yoğunluğu, çiçeklenme zamanı, çiçek rengi, boğum arası uzunluğu, nodül sayısı, olgunlaşma tarihi, bakla büyüklüğü, tohum büyüklüğü ve tohum rengi gibi özelliklerde fenotipik değişiklikler gözlemlenmiştir. 1536 M₂ ve 1437 M₃ bitkilerinden oluşan bir DNA Kütüphanesi oluşturulmuştur.

Li vd. (2017) yüksek mutasyon yoğunluğuna sahip kimyasal kullanarak yeni bir soya kütüphanesinin geliştirilmesi ve kullanılması üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Zhongpin661 (Zp661) isimli soya çeşidinden 80.000 tohum hazırlanmış ve 50 mmol L⁻¹ EMS solüsyonunda 9 saat boyunca hafifçe çalkalanarak bekletilmiştir. Tohumlar 2 saat boyunca akan musluk suyu ile durulandıktan sonra naylon torbalarda gece boyunca hava ile kurutulmuştur. 21.600'den fazla M₂ bitkisi elde edilmiştir. Oluşturdukları M₂ popülasyonunda fenotipik olarak farklı mutantları ve her tohumun içerik kompozisyonunun taramışlardır. Yine aynı çalışmada klorofil eksikliği olan mutantlarda bu özelliğin kalıtımına bakmışlardır. EMS mutasyonu ile elde edilen popülasyonundan seçilen dört mutant hat ve Zhongpin661 tüm genom dizilemesi için seçilmiştir. Bunlar; toplam klorofil içeriğinde büyük bir azalma olan bir sarı yapraklı mutant (M4, ZDD25362), bir cüce mutant (M4, ZDD25366), erkek kısırlığa sahip bir mutant (M5, ZDD25365) ve fenotipik olarak vahşi tipte görünen bir M₄ birey olarak seçilmiştir. EMS çözeltisine maruz kalan tohumlar beklediği gibi, ana sapın büyüme inhibisyonu ve canlı tohum üretiminin azaltılması dâhil olmak üzere birçok fizyolojik hasar görülmüştür. 50 mmol L⁻¹ EMS çözeltisi ile işleme tabi tutulan soya tohumlarında %50 çimlenme oranı göstermiştir. Ayrıca, M₁ neslinde bitki canlılığında azalma sebebiyle verimlilikte azalmıştır. Yine oluşturan 21.600 M₂ hattının 1.887'si, tohumlardaki protein veya yağ içeriğindeki değişikliklere sahip hatları belirlemek ve kapsamlı değişiklikler gösterenleri belirlemek için analiz edilmiştir. Protein analizi için 141 M₂ tohumu seçilmiş, bunların 115 hattı yüksek protein içeriğine sahip çıkarken (%46.1-65.0), dört mutant marjinal (%35.0-35.7) protein seviyelerine sahip çıkmıştır. İlginç bir şekilde, tohum yağı içeriğinde belirgin farklılıklar ile tespit edilen 22 mutanttan sadece biri yüksek tohum yağı içeriği sahip iken (%23.1) diğerlerinde azalma görülmüştür (%13.3-15.7). Tohum şekli, 100 dane ağırlığı, tohum hilumu, tohum kaplama şekli ve diğer tohum özellikleri bakımından farklı mutant fenotipleri incelenmiştir. Bu özellikler bakımından 323 tohumda mutasyon tespit etmişlerdir. Arazide yaprak fenotipi, ana dal karakterleri, bitki boyu, dal sayısı, kısırlık, tüylenme yoğunluğu, kapsül rengi ve olgunluğu gibi fenotipik özellikler bakımından incelenmiştir. Erken olgunlaşma, erkek kısırlığı, çoklu bileşik yaprak, sarı yaprak pigmentli bitkiler, aşırı dallı bitkiler, kısa internodlu bitkiler, buruşuk yapraklı bitkiler ve kapsüllerde kısa tüylülük gibi birçok özellik gözlemlenmiştir. Anormal fenotiplere sahip olan bitkiler M₂ popülasyonunun yaklaşık %38.6'sını oluşturmuştur.

Sagel vd. (2017) Kimyasal mutagen EMS'nin TAEK A-3 ve TAEK C-10 mutant soya çeşitleri üzerine etkisinin belirlenmesi üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada kimyasal mutagen EMS'nin fide yüksekliği üzerindeki etkisini belirlemek için araştırmalar yapılmıştır. Test bitkileri olarak TAEK A-3 ve TAEK C-10 soya çeşitleri kullanılmıştır ve ön-ıslatma süresinin etkisi belirlenmiştir. Sera ve tarla deneylerinde beş farklı EMS dozu; 0 (Kontrol), 0.025, 0.050, 0.075 ve 1.0 M ve serada 3 farklı ön ıslatma süresi (0, 6 ve 18 saat), tarlada 2 farklı ön ısınma süresi (0 ve 6 saat)

uygulanmıştır. Serada kimyasal mutagen uygulaması sonrası çimlenme yüzdesi ve fide yüksekliği bazında EMS dozu ve ön ıslatma süresi etkisi belirlenmiştir. EMS'nin soya M_1 çimlenmesindeki farklı özellikler (bitki sayısı, bitki boyu, bakla sayısı ve tohum kaynağı) bakımından etkileri belirlemişlerdir. Sonuç olarak her iki soya çeşidinde EMS konsantrasyonu arttıkça fide yüksekliğinin azaldığı belirtilmiştir. Ancak her iki soyada da önceden ıslatma süresinin fide yüksekliği üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Kimyasal mutagenlerin özellikle EMS'nin tohumlar üzerinde yüksek mutagenik etkiye sahip, ancak büyük fizyolojik hasarı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırma sonuçlarına dayanarak, 6 ön ıslatmanın EMS'nin zararlı fizyolojik etkisinin azaltılabileceği sonucuna varılmışlardır.

Espina vd. (2018) soya bitkisindeki varyasyonu kaynaklarını artırmak için EMS kimyasalını kullanarak yeni mutant hatlar geliştirme üzerine bir çalışma yapmışlardır. EMS uygulamadan önce 12, 18 ve 24 saat suda bekletmişler ve çimlenme oranlarına bakıldığı zaman bu 3 farklı saat arasında istatistiksel olarak fark bulunmamış ve 18 saat suda bekletmeyi tercih etmişlerdir. Yaptıkları ön çalışmada 0 (kontrol), 30, 60, 90, 150 mM EMS dozlarını denemişlerdir. Kontrol ile 30 mM arasında önemli bir fark çıkmamıştır. 60 mM dozunda ise kontrol ve 30 nM arasında önemli fark çıkmıştır ve çimlenme yaklaşık %50 seviyesine kadar düşmüştür. 90 mM ve 150mM arasında da fark önemli görülmemiş ve çimlenme %10 seviyesinin altında kalmıştır. Daha yüksek mutagen konsantrasyonları daha yüksek mutasyon frekansı üretirken (Shah vd. 2015) 90 ila 150 mM, genom için çok zararlı bulunmuştur ve çimlenme oranı çok düşük olmuştur. Mutasyon dozu düştükçe bitkilerin yaşama oranı daha yüksek olmakta ancak mutasyon frekansı düşük olmaktadır (Porch vd. 2009). Bu ön çalışmalardan sonra JTN-5203 (olgunlaşma grubu V) genotipe ait 15.000 tohuma 60 mM oranında EMS uygulamışlar ve ilk yıl toplam 1820 M_1 bitkisinden tohum elde etmişlerdir. Elde edilen bu 1820 tohum bir sonraki yıl fenotipik gözlem almak amacıyla tekrar ekilmiştir. Hasattan sonra toplam yağ içeriği, protein oranı, nişasta miktarı, nem içeriği, yağ asitlerine miktarı ve amino asit kompozisyonu gibi tohum özellikleri bakımından incelenmiştir. Elde edilen popülasyonda yaprak morfolojisi, bitki yapısı, tohum içerik kompozisyonu ve verim bakımından varyasyonlar gözlemlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda kontrol çeşidinde protein oranı %41 iken bazı mutantlarda bu oran %50 seviyelerine çıkmıştır. Yine kontrol çeşidinde toplam yağ içeriği %21.2 iken bazı mutantlarda bu oran %25 seviyelerinde bulunmuştur. Yapılan yağ asitleri analizlerinde oleik asidin yükseldiği, linoleik ve linolenik asit içeriklerinin düştüğü mutantlarda elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada EMS yöntemi kullanılarak elde edilen bu mutant popülasyonu, amino asit kompozisyonu, yağ asidi içeriği, alerji çalışmaları ve diğer agronomik özellikler bakımından ileriki çalışmalarda kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu mutant popülasyonu ileriki melezleme programlarında fayda sağlayabileceğini, yeni mutant allellerin keşfedilmesi ve aynı zamanda TILLING gibi moleküler analiz çalışmalarında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Mutasyon ıslah programının başarısı, her şeyden önce kullanılan mutagenin etkinliğine ve verimliliğine bağlı olmaktadır (Arisha vd. 2015). Bununla birlikte, farklı mutagenlerin, farklı dozları ve uygulanan bitkiye bağlı olarak farklı etkileri vardır. Cooper vd. (2008), mutasyon sıklığında bir artış tohumun yaşamını büyük ölçüde düşürmektedir.

Karaman (2019) yüksek lisans tezinde yer fıstığına (*Arachis hypogaea* L.) farklı iki doz (%0.4 ve 1.2) EMS uygulayarak tek nokta mutasyonlarını (SNP) belirlemek için

bir TILLING araştırması yapmıştır. Yapılan bu tezde sekans sonucunda yapılan analizlerde nokta mutasyonlarının sekans analizlerinde aynı noktada iki farklı nükleotid piki verdiğini belirlemişlerdir. Çalışmada %0.4 EMS M₂ popülasyonunda *ah FAD2A* geni için 1/317 kb, %1.2 EMS M₂ popülasyonunda *ah FAD2B* geni için 1/466 kb mutasyon frekansı bulunmuştur.

2.6. ALS Dayanıklılık Çalışmaları

Asetohidroksiasit sentez (AHAS) ya da asetolaktat sentez (ALS) olarak bilinen enzim, bitkiler için esansiyel amino asitlerden olan valin, lösin ve izolösinin biyosentezinde kritik rol oynamaktadır (Duggleby ve Pang 2000; Lee vd. 2011; Yu ve powles 2013; Yaqoob vd. 2016). B grubu herbisitler olarak bilinen, sülfonilüre (SU), imidazolin (IMI), triazolopirimidin (TP), pirimidinil-tiyobenzoatlar (PTB) ve sülfonil-aminokarbonil-triazolinon (SCT) olarak isimlendirilen herbisitler, valin, lösin ve izolösinin amino asitlerinin sentezini inhibe ederek bitkinin ölümüne sebep olmaktadır.

Soya bitkisinin 1.1-gigabaz tüm genomu shotgun metoduyla haritalanmıştır. 46.430 protein kodlayan gen olduğunu belirtmişler ve bu *Arabidopsis*'den %70 daha fazla olduğunu ve eski poliploid (palaeopolyploid) soya genomuna benzer olduğunu belirtmişlerdir. Tahmin edilen genlerin yaklaşık %78'i, genomun yarısından daha azını içermektedir. Fakat genetik rekombinasyonun neredeyse tamamının kromozom uçlarında olduğu düşünülmektedir. Genom duplikasyonun iki kez olduğu ve yaklaşık 59 ve 13 milyon yıl önce meydana geldiği düşünülmektedir. Genlerin yaklaşık %75'i birden fazla kopyası bulunmaktadır. İki duplikasyon olayı sonucu yıllar içerisinde gen kaybolması, gen değişikliği ve birçok kromozomun yeniden düzenlendiği düşünülmektedir. Soya genom dizisi, birçok soyanın özelliğinin genetik temelini tanımlanmasını kolaylaştıracak ve geliştirilmiş soya çeşitlerinin oluşturulmasını hızlandıracaklarını belirtmişlerdir (Schmutz vd. 2010).

Bitkiler ve birçok mikroorganizma, hayatta kalmak için gereken tüm metabolitleri inorganik öncülerden sentezlemektedir. Buna karşılık, hayvanlar beslenmelerinde vitaminler, esansiyel yağ asitleri ve bazı aminoasitleri dışardan almak zorundadır. Bunun nedeni, hayvanlarda bunları sentezleyecek enzim aktivitelerin bulunmamasından kaynaklanmaktadır (Duggleby ve Pang 2000).

Mazur vd. (1987) sülfonilüre ve imidazolin sınıfı herbisitler için hedef enzim olan asetolaktat sentez için bitki genlerinin kodlanması ve izolasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. ALS'yi kodlayan genomik klonlar, heterolog hibridizasyon probu olarak bir maya ALS geni kullanılarak *Arabidopsis thaliana* ve *Nicotiana tabacum* bitkilerinden izole edilmiştir. Klonlar, çıkarılan amino asit sekanslarının maya ve bakteriyel ALS izozimleri ile benzer çıkmıştır. Tütün ve *Arabidopsis* ALS genleri yaklaşık %70 nükleotid benzerliğine sahiptir ve bu nükleotidlerden sentezlenen amino asit benzerliği ise yaklaşık %85 çıkmıştır. ALS geni üzerindeki bir değişiklikten dolayı sülfonilüre dayanıklı tütün hattından izole edilmiştir. Klorosulforon ve sülfometuron metil etken maddeli herbisitlere dayanıklı mutantlar doku kültüründe haploid hücre hatları seleksiyonu şeklinde olmuştur. Daha sonra yapılan melezler sonucunda dayanıklılığın tek yarı dominant mutasyondan meydana geldiğini bildirmişlerdir. Tütün ve *Arabidopsis*'den izole edilen ALS genleri kesim enzimleri ve maya ALS gen probu hibridizasyonu ile karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyon çalışması hem tütün hem

de *Arabidopsis* ALS genlerinin yaklaşık 2 kb uzunluğunda bir bölgeyi kapsadığını göstermiştir. *Arabidopsis* ALS geninin kodlama bölgesi, 670 amino aside karşılık gelen 2013 nükleotidlere sahipken, tütün geninin kodlama segmenti, 667 amino aside karşılık gelen 2004 nükleotide sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Swanson vd. (1988) Kanola (*Brassica napus*) bitkisinde Topas çeşidine in vitro kültüründe mikrospor ve protoplast seçimi ile klorosulforona karşı toleranslı bitki seçimi ve karakterizasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Klorosulforona toleranslı *Brassica napus* L. bitkileri, mikrosporlar ve haploid protoplastlar kullanılarak seçim yapılmış ve sonrasında izole edilmiştir. İlk klorosulforona toleranslı mikrospor bitki (M-37,) haploid ve steril olarak in vitro kültüründe elde edilmiştir. Daha sonra Kolhisin kullanılarak kromozom sayısı ikiye katlanmış ve normal bitki morfolojisi ve fertillliği restore edilmiştir. Klorosulforona toleranslı bir başka bitkide embriyo dokusundan izole edilen protoplastlardan (P-26) seçilmiş ve klorosulforona içeren ortamda büyütülmüştür. P-26 klorosulforona toleranslı fakat çok düşük fertiliteye sahiptir. Seçilen iki hat kendilendikten sonra standart çeşit olan Topas'tan 10-100 kat aralığında klorosulforona karşı tolerans göstermiştir. M-37 ve Topas'ın karşılıklı olarak melezlemesi sonucunda dayanıklılığın yarı-dominant olarak taşındığını bildirmişlerdir. İki mutantın biyokimyasal analizi sonucunda F₁ melezlerin değiştirilmiş bir asetohidroksiasit sentez enzimi içerdiğini belirtmişlerdir. M-37 bitkilerinden seçilen tohumlar, hem serada hem de tarla testlerinde klorosulforona tolerans sağlamıştır. İkinci bir mikro-spordan seçilmiş mutant (M-42) S1 bitkileri, sera testlerinde 30 g ha⁻¹ klorosulforona tolerans sağlamıştır.

Mchugen (1989) ticari keten (*Linum usitatissimum*) bitkilerine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile klorosulforon dayanıklılığı aktarma çalışması yapmıştır. Klorosulforona dayanıklılığı daha önceden kimyasal olarak indüklenmiş bir mutantın genomik klonundan izole edilmiştir. Asetolaktat sentez enzimi içindeki 870. nükleotidinde T bazının C bazı ile değişmesi prolin aminoasiti serin'e dönüşmekte ve bu değişikliğin dayanıklılık sağladığını bildirmişlerdir. Bu değişiklik ALS enziminin yapı ve işlevini değiştirmedikini belirtmişlerdir. Ketene bir mutant asetolaktat sentez geni (klorosulforona direnç veren) içeren Ti-plazmid vektörü taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* kullanılarak aktarılmıştır. Daha sonra bitkiler klorosulforon herbisit testleri yapılmıştır. İki ana ticari çeşitten elde edilen yeni hatlar klorosulforon dayanıklılığı kazandırılmıştır.

Anderson ve Georgeson (1989) mutant mısırlarda herbisit toleransı üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. İn vitro hücre kültüründe sekiz imidazolin herbisit dayanıklı hat elde etmişlerdir. Bu sekiz hattın beş hattı rejenere edilmiş ve bunlardan dördünden herbisite dayanıklı hatlar elde edilmiştir. Elde edilen dört hattın biri hem imidazoline hem de gulfonilüre herbisite (sınıf A) karşı çapraz direnç gösterirken, üç hat sadece imidazoline (sınıf B) dayanıklılık göstermiştir. A sınıfı hat ve bir B sınıfı hat ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir. XA17 hattı, tek bir yarı-dominant genine sahipti ve bu hattın homozigot bitkileri imazaquine 300 kat dayanıklılık ve klorosülfürona 100 kat dayanıklılık göstermiştir. Dayanıklılığın imidazolin ve sülfonilüre herbisitlerin ortak etki bölgesi olan asetolaktat sentezinin herbisit duyarlılığının azalmasına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Daha sonra Mısır inbred hatlarına dört ila altı geri melezlemeden sonra dayanıklılık stabil hale geldiğini bildirmişlerdir. Homozigot QJ22 (B sınıfından) hattından gelen bitkiler imazetapire karşı 30 kat tolerans göstermiş fakat imazetapire ve

klorsülfürona karşı dayanıklılık göstermemiştir. QJ22 hattı için biyokimyasal dayanıklılık mekanizmasının net olmadığını bildirmişlerdir. Yine çalışmada yaptıkları gözlemlerde dayanıklılık geni taşıyan hatlar ile hassas olan hatlar arasında bitki boyu, çiçeklenme tarihi ve verim gibi agronomik özellikler bakımından bir fark gözlemlenmemiştir.

Sebastian vd. (1989) sülfonilüre herbisitlere dayanıklılık kazandırmak için yarı-dominant soya mutasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Spesifik SU herbisitlerinin dayanıklılığı diferansiyel metabolizmasına dayanmasına rağmen (Beyer vd. 1988), SU grubu herbisit dayanıklılığındaki artışlar, hedef enzim olan asetolaktat sentezin SU grubu herbisitlere duyarlılığını değiştiren yarı dominant mutasyonlardan olduğunu bildirmişlerdir (Chaleff ve Mauvais 1984). Dayanıklılık, ALS amino asit sekansındaki ALS enziminin normal katalitik aktivitesini bozmadan SU herbisitlerine karşı duyarsız hale getiren spesifik bir amino asit değişikliğinden kaynaklanmaktadır (Yadav vd. 1986). Bu tip mutasyon çok nadirdir ve sadece hücre kültürü gibi yüksek verimli seleksiyon sistemleri kullanılarak izole edilmiştir (Chaleff ve Ray 1984). Bu çalışmada üç ebeveyn çeşit kullanılmıştır. Bunların tümü (Williams, Williams 82 ve A3205) agronomik özellikler bakımından kabul edilebilir ancak SU'ya duyarlı ALS aktivitelerine sahip çeşitler kullanılmıştır. Mutagenik ajanlar olarak etil metan sülfonat (EMS) ve N-nitrozo-N-metilüre (NMU) kullanılmıştır. Bu 3 çeşide farklı dozlarda ve farklı yıkama süreleri ile oluşturulan 8 farklı M₂ popülasyonu oluşturulmuştur. Toplam 8 farklı M₂ soya popülasyonundan toplam yaklaşık 400.000 tohum klorsülfüron direnci bakımından taranmıştır. M₂ popülasyonunu değerlendirmek için bir hidroponik sistem oluşturulmuş ve tohumlar bu sistemde testlenmiştir. Karşılaştırma için bir standart olarak mutant 1-184A kullanılarak, varsayılan mutant M₂ fideleri, klorsülfürona maruz kaldıktan yaklaşık 8 gün sonra sağlıklı ve deforme olmayanların seleksiyonu yapılmıştır. Daha sonra elde edilen mutantlar toprağa aktarılmış ve M₃ popülasyonu oluşturulmuştur. Transplantasyondan sonraki 1 hafta içinde, seçilen bitkilerin bazılarının normal olarak büyüdüğü, diğerlerinin (1-184A kontrolleri dahil) ciddi şekilde bodur olduğu ve klorsülfüron uygulamasından sonra iyileşmesi yavaş olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra elde ettikleri 30 adet M₃ tohumunu tekrar 100 mg.L⁻¹ klorsülfüron vererek testlemişlerdir. M₃ herbisit testlemesi sürecunda Williams'tan (W4, W17, W19, W20, W23 ve W28) elde edilen altı mutant hat fenotipik olarak klorsülfüron dayanıklı seçilmiştir. Altı mutantın tümü oldukça küçük (55.000 M₂ tohum) popülasyondan (Williams NMU-A) seçildiğinden, çoğunun veya hepsinin aynı M₁ bitkisinden geldiğinden şüphelenilmiştir. Bu şüpheyi doğrulamak için W20 ile diğer beş mutantın her biri ile karşılıklı olarak melezlenerek F₁ ve F₂ popülasyonu oluşturulmuştur. Bu melezlerin her birinden en az 3 F₁ ve en az 60 F₂ klorsülfürona karşı (hidroponik sistem kullanılarak) test edilmiş ve hepsinin eşit olarak dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler altı mutantın hepsinin allelik veya yakından bağlantılı mutasyonlar içerdiği hipotezini desteklemiştir. Ortak kökenleri göz önüne alındığında, altı hattın hepsinin aynı hattan geldiği oldukça olası olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle, aşağıdaki fenotipik karakterizasyonlarda soya mutantlarının bu yeni sınıfını temsil etmek için mutant hattı W20 kullanılmıştır. Mutant W20 bitkileri, yabani Williams 82'ye aşırı derecede zarar veren klorimuron etil ve klorsülfüronun etken maddeli çıkış öncesi herbisit uygulamalarına karşı dayanıklı bulunmuştur. Williams 82 ile karşılaştırıldığında, W20'nin %50 bodurluğuna neden olmak için yaklaşık 100 kat daha fazla klorsülfüron uygulaması gerekmiştir. Klorimuron etil ise

W20'nin bodurlaşması test edilen en yüksek oranda (1000 g.ha^{-1}) bile asla %50 bodurluk seviyesine ulaşmamıştır. Williams 82'nin %50 bodurluğa yaklaşık 100 g.ha^{-1} klorimuron etil uygulananca ulaşmıştır. Çıkış öncesi herbisit uygulamalarında W20, Williams 82'ye 100 katı klorsülfüron ve en az 10 katı klorimuron etile dayanıklı olduğu bildirilmiştir. W20 hattı içeren melezlerden elde edilen F_1 , F_2 ve F_3 döller ve ebeveynler 100 mg.L^{-1} klorsülfüron içeren hidroponik sistemde büyüme yetenekleri açısından değerlendirilmiştir. Tüm W20 bitkileri normal unifoliolat ve trifoliolat yaprakları oluşturabilirken Williams 82 herhangi bir yaprak dokusu oluşturamamıştır. W20 ebeveyne benzeyen (dirençli) ve Williams 82 ebeveyne benzeyen (duyarlı) olmak üzere sadece iki ayrı F_2 segregasyon sınıfı gözlenmiştir. Test edilen klorsülfüron konsantrasyonunda ara reaksiyonlar gözlenmedi. $W20 \times$ Williams 82 çaprazından F_2 3 dirençli: 1 duyarlı segregasyonu gözlenmiştir. Klorsülfüron uygulamasından sonra W20 bitkilerinin yapraklarındaki ALS aktivitesi, Williams 82 yapraklarından ALS aktivitesinden daha az duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Test edilen en yüksek klorsülfüron konsantrasyonunda, W20 bitkisindeki ALS aktivitesi yüzdesi, Williams 82 bitkisindeki ALS yüzdesinden üç kat daha fazla bulunmuştur.

Sebastian vd. (1989) yaptıkları bu çalışmada Als'i SU herbisitlerine dayanıklılık sağlayan ilk yarı-dominant soya mutasyonu olduğunu bildirmişlerdir. Tohum mutasyonu, soya genomuna böyle bir mutasyon eklemek için soya hücre kültürü ve transformasyon sistemlerine uygun bir alternatif olduğunu belirtmişlerdir. Her ne kadar daha kapsamlı saha değerlendirmeleri gerekli olsa da, ön fenotipik karakterizasyonlar Als allelinin çeşitli çıkış öncesi ve çıkış sonrası SU herbisitlerine karşı agronomik olarak faydalı bir direnç seviyesi sağladığını bildirmişlerdir. Als agronomik performans üzerinde herhangi bir pleiotropik etkisi olup olmadığını belirlemek için alan testi gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Ticari hale getirilirse, SU herbisitlerine karşı dirençli soya çeşitlerinin geliştirilmesi, SU herbisitlerinin kullanımını büyük ölçüde genişletecek ve çiftçiye yabancı ot kontrolü için daha fazla seçenek sunacaktır. Als heterozigot durumda bile dayanıklılık sağladığından dolayı genetik çalışmalarda, üreme ve tohum üretiminde de yararlı bir belirteç olarak hizmet edebileceğini söylemişlerdir. SU grubu herbisitlere dayanıklı bir erkek ebeveyn ile hassas bir dişi ebeveyn melezlemesi sonucunda elde edilen F_1 melezleri dayanıklılık özelliğini taşıyacaktır. Hassas bitkilerle melezleme yaparken istenmeyen kendileme hatlarının oluşmasını SU muamele edilince hassasların ölmesi sonucunda hibrid popülasyondan kolaylıkla temizlenebileceğini bildirmişlerdir. Yarı-dominant herbisit dayanıklılığı ile büyük tohum üretim alanları, tüm alana sadece seçici bir herbisit püskürtülerek hassas olanların ölmesiyle, sadece dayanıklıların seçilmesine imkânı tanıyacaktır. Böylece kendi kendine melezlenmiş hassas hatların ticari ölçekte saflaştırılması veya karışan hassas dişi ebeveyninden arınmış dayanıklı F_2 tohumlarının üretimi yararlı olacağını bildirmişlerdir. Daha sonra yapılan kalıtım çalışmalarında W20'nin tek bir yarı baskın mutasyon SU direncinin, soyadaki ALS geninde bir prolin-serin değişikliği sonucu olduğunu bildirmiştir (Falco yayınlanmamış). ALS enzimidaki bu mutasyon *Arabidopsis thaliana*'daki ALS geninin 197. (P197S) noktasındaki amino asitte denk geldiğini bildirmişlerdir.

Mallory-Smith vd. (1990) yılında yabancı marul (*Lactuca serriola*) bitkisinde SU grubu herbisitlere karşı dayanıklılık çalışması yapmışlardır. Araştırmacılar kışlık buğday tarlalarının kenarında klorosulforana karşı dayanıklı yabancı marul biyotipleri gözlemlemişlerdir. Daha sonra tarla ve sera denemeleri kurarak sülfonilürelere

imidazolinlere karşı herbisitlere dayanıklılığını değerlendirmişlerdir. Dayanıklı biyotipler, sekiz sülfonilüre grubu herbisite dayanıklılık gösterdi, imidazolin grubu herbisitlerden, imazapir ve imazetipire karşı dayanıklılık göstermiş fakat imazaquin ve çalışmalara dahil edilen 2-4 D gibi herbisitlere direnç göstermemiştir.

Brown vd. (1990) soyada tifensülfuron metil etken maddeli herbisite karşı tolerans çalışması yapmıştır. Tifensülfuron metil eski adıyla DPX-M6316, buğday, arpa ve soyada geniş yapraklı yabancı ot kontrolünde çıkış sonrası kullanılabilen bir SU grubu herbisittir. Soya, Kırmızı köklü tilki kuyruğu (*Amaranthus retroflexus* L.), Kazağı (*Chenopodium album* L.) İmam Pamuğu (*Abutilon theophrasti* Medik) ve Kahka çiçeği (*Ipomea purpurea*) bitkilerinin bu herbisite karşı tepkilerini ölçmüşlerdir. Soya bu yabancı otlara göre tifensülfuron metile önemli ölçüde tolerans göstermiştir. Örneğin, bu dört yabancı ot türünün %50'sini öldürmek için $0.5-1.2 \text{ g ha}^{-1}$ yeterli iken, bu oran soyada 41 g ha^{-1} olarak ölçülmüştür. Tolerans çalışmalarında ilk etapta yapraktan alınan herbisit miktarını hesaplamışlardır. Toleranslı ve hassas soyanın yapraktan herbisit alımı bakımından bir fark çıkmamıştır. Hatta imam pamuğu bitkisinde diğer yabancı otlara ve soyaya göre oldukça az herbisit almasına rağmen bitki hassas çıkmıştır. Bu veriler ışığında SU grubu herbisitlerden klorosulforona karşı toleransın, toleranslı ve hassas bitki türleri arasındaki yapraktan alınan herbisit farklılığından kaynaklanmadığı sonucuna varmışlardır. Bu sonuçlara dayanarak sülfonilüre herbisit alımının ve taşınmasının bir asit yakalama mekanizmasına bağlı olduğunu ve bu mekanizmanın fiziksel bileşiklerle kontrol edildiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, soyadan alınan ALS'nin tifensülfuron metile daha az duyarlı olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, ALS duyarlılığındaki 1.5 kat fark bitki dayanıklılığında 10-100 kat dayanıklılık sağladığını bildirmişler fakat bunu açıklamak için bilgilerin yetersiz olduğunu belirtmişlerdir. Yine bu çalışmada soya ve yukarıda belirtilen yabancı bitkiler arasında metabolizma çalışmaları da yürütmüşlerdir. Toleranslı soyada bitki içerisine alınan thifensulfuron methyl 4-6 saat gibi bir sürede yarılanma ömrüne ulaşırken, hassas yabancı otlarda bu süre daha uzun olmakta ve 36 saate kadar uzamıştır. Soya fidelerinde tifensülfuron metilin esterleşmesi sonucu birincil metabolit olarak thifensülfuron asit oluşmaktadır ve bu da bitkilerde ALS genine karşı inaktif olarak hareket etmektedir. Soya fidelerinde tifensülfuron metil, klorimuron etil ve metsulfuron metilin metabolizma hızları ve yolları karşılaştırılmış ve tartışılmıştır. Tifensülfuron metile soya toleransının hızlı metabolik esterleşmeye dayandığını ve bu esterleşme reaksiyonunun sülfonilüre herbisitlere özgü tolerans sağladığı sonucuna ulaşmışlardır.

Newhouse vd. (1992) buğdayda (*Triticum aestivum* L.) mutasyon yardımıyla IMI grubu herbisitlere karşı dayanıklılık geliştirmeye çalışmışlardır. Çalışmada mutasyon materyali olarak kışlık buğday çeşidi olan Fidel kullanılmıştır. Daha sonra mutanti tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. 5000 tohum sodyum azit içeren sulu bir çözelti ile mutasyon meydana getirerek bir popülasyondan oluşturulmuştur. Tarlaya ekilen 5.000 tohumdan yaklaşık 120.000 M₂ tohum hasat edilmiş ve yaklaşık %100'e yakın çimlenme elde etmişlerdir. İmidazolin toleranslı buğday fideleri, imazetapir herbisit uygulayarak M₂ popülasyonun seçilmiş ve herbisite toleranslı dört mutant buğday hattını belirlenmiştir. Bu özellik tek bir yarı-dominant gen olarak kalıtsal olarak aktarıldığını ve imazetapire karşı yüksek düzeyde tolerans sağladığını bildirmişlerdir. Bitkinin tümünde enzim seviyesinde sülfonilüreye çapraz dayanıklılık görülmemiştir. Genetik çalışmalar dört hattın her birindeki dayanıklılık genlerinin allelik olduğunu

göstermiştir. imazetapir etken maddeli herbisit uygulanınca imidazolin tolerant bitkilerden elde edilen asetohidroksiasit sentez enzim aktivitesi, yabani tiptekine göre daha az inhibe edilmiştir. Bu bulgular ışığında, araştırmacılar ekmeklik buğdayda katalitik alt birimlerin çoklu kopyalarının olduğu sonucuna varmışlardır. Ekmeklik buğday bir heksaploid olduğundan, üç gen bulunması ihtimalinin normal olacağını öne sürmüşlerdir. Herbisite toleranslı bitkiler ile hassas bitkiler kıyaslanınca, tamamen normal bir fenotipe sahip ve imazetapirin uygulandığında büyüme ve verim yönünden olumsuz bir etki göstermemiştir.

Dewaele vd. (1997) karahindi bitkisinin (*Cichorium intybus* L.) Klorosülfüron dayanıklılığının Biyokimyasal karakterizasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Dayanıklılığın biyokimyasal temelini anlamak için, daha önce klorosülfüron etki maddeli herbisite dayanıklılığı in vitro ortamında belirlenmiş ve normal hatlardan 1500 ila 2000 kat dayanıklılık gösteren hat seçilmiştir. ALS'nin transkripsiyonu, spesifik aktivite seviyesi ve özellikleri bitki dokularında değerlendirilerek hassas kontrol ile karşılaştırılmıştır. Northern blot analizi ile yapılan ALS mRNA testlerinde ALS'ye özgü aktivitede dayanıklı ve hassas hat arasında önemli bir fark bulmuşlardır. Klorosülfüron konsantrasyonları artırıldığında hassas ve dayanıklı bitkilerde ALS aktivitesi ölçüldüğünde, enzim duyarlılığı bakımından çarpıcı bir varyasyon bulunmuştur. Hassas hatta enzim aktivitesi $0.021 \mu\text{mol L}^{-1}$ hesaplanırken, dayanıklı hatta $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ bulunmuş ve yaklaşık 570 kat fazla bulunmuştur. Aynı zamanda klorosülfürona dayanıklı hat İMİ grubu herbisitlerden olan imazamethabenz'e karşı çapraz tolerans göstermiştir.

Wright ve Penner (1998) şeker pancarında (*Beta vulgaris*) somatik hücre seleksiyonu yöntemiyle IMI dayanıklılığının geliştirilmesi ve kalıtsal analizi üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Şeker pancarları, kendinden önceki yıl rotasyonel ürünlere uygulanan imidazolin herbisit kalıntılarına oldukça duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Rotasyon bitkilerine uygulanan imidazolinlerin üstesinden gelmek amacıyla şeker pancarında somatik hücre seçimi ile iki imidazolin-dayanıklı (IMI-R) hat geliştirilmiştir. Sir-13 İmidazolin dayanıklı, sülfonilüre hassas (IMI-R/SU-S) bir hattır ve imidazoline duyarlı (IMI-S) REL-1'den şeker pancarı klonundan seçilmiştir. İmidazolin ve sülfonilüre herbisitlere dayanıklı (IMI-R/SU-R) 93R30B adında ikinci bir çeşit seçilmiştir. IMI-R allellerinin (Sir-13 ve 93R30B) aynı ALS lokasyonunda karşılık gelen allelik olduğu belirlenmiştir. Her dayanıklı allel, hassas tip alleleline baskındır. Bununla birlikte, dayanıklılık alleleri arasında eş-baskınlık olduğunu belirtmişlerdir. Diploid şeker pancarı bitkisinde bir tane ALS geni olduğunu belirtmişlerdir.

Kolkman vd. (2004) ayçiçeği bitkisinde (*Helianthus annuus* L.) ALS gen bölgesinden kaynaklı imidazolin ya da klorosulforon dayanıklılığı araştırması yapmışlardır. Kuzey Amerika'da ayçiçeği, mısır ve soya ürün gruplarında yabancı ot kontrolü için ALS inhibitörü herbisitlerin sık kullanmakta olduğunu belirtmişlerdir. Yabani ayçiçeği genotipleri arasından iki genotip (ANN-PUR ve ANN-KAN) ALS inhibe edici herbisite imidazolinler (IMI) veya sülfonilüreler (SU) grubu herbisitlere dayanıklı biyotipler olarak keşfedilmiştir. Araştırmacılar, ALS genlerini ayçiçeğinden izole ederek, ANN-PUR ve ANN-KAN'da herbisit dayanıklılığı kazandıran ALS genlerindeki mutasyonları tanımlamak ve ayçiçeği herbisit direnci genlerinin marker destekli seleksiyon (MAS) geliştirmeyi amaçlamışlardır. Dayanıklı ve hassas genotipte Üç ALS geni (ALS1, ALS2 ve ALS3) tanımlanmış ve klonlanmıştır. ALS1'de 48 tek nükleotid polimorfizm, ALS2'de tek bir altı bazlı çift ekleme-silinme ve ALS3'te tek bir

SNP belirlemişlerdir. İmmazetire dirençli inbredlerden ALS1, kodon 205'te (*Arabidopsis thaliana* sekansına göre) C-T mutasyonu bulunmuş ve bu mutasyon IMI herbisitlerine direnç kazandırmıştır. Klorosülfürona dirençli inbredlerde 197 kodonunda C-T mutasyonu bulunmuş ve bu da SU herbisitlerine karşı dayanıklılık kazandırmıştır. ALS1, ALS2 ve ALS3 için SNP markerleri geliştirilmiş ve genetik olarak haritalanmıştır. İki mutant x yabani tip popülasyonlarında yapılan çalışma sonucunda ALS1 geninde 205. kodonunda bulunan SNP (C/T), IMI herbisitlerine dayanıklılığı için kısmen baskın bir genle taşındığını bildirmişlerdir. Bu çalışmanın ALS'de yeni mutasyonları hızlı bir şekilde tanımlamak ve ayçiçeği içindeki herbisit direnç genleri için MAS gerçekleştirmek için temel oluşturduğunu ifade etmişlerdir.

Yu vd. (2008) Avustralya'da *Lolium rigidum* herbisit dayanıklılığı üzerine bir çalışma yapmışlardır. Önemli bir çim bitkisi olan *Lolium rigidum*'da, ALS'yi inhibe edici herbisitlere karşı Avustralya'da büyük ölçüde dayanıklılık kazandığını bildirmişlerdir. Daha önce bir dizi *L. rigidum* biyotipinde ALS herbisit direncinin biyokimyasal temellerini karakterize edilmiş ve dayanıklılığın ALS ve/veya geliştirilmiş herbisit metabolizmasına bağlı olabileceğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar, dört dayanıklı popülasyonda spesifik dayanıklılık kazandıran ALS gen mutasyon veya mutasyonlarını belirlemek ve PCR bazlı moleküler markörler geliştirmek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada altı dayanıklılık kazandıran ALS mutasyonu Pro-197-Ala, Pro-197-Arg, Pro-197-Gln, Pro-197-Leu, Pro-197-Ser ve Trp-574-Leu olarak belirlemişlerdir. Bu altı mutasyonun hepsi bir popülasyonda (WLR1) bulunmuştur. Her Pro197 mutasyonu, sülfonilüre (SU) grubu herbisitlerden sülfometurona dayanıklılık kazandırırken, Trp-574-Leu mutasyonu, hem sülfometuron hem de imidazolin (IMI) grubu herbisitlerden imazapirine dayanıklılık kazandırmıştır. Pro-197'de dayanıklılık mutasyonlarını saptamak için kesilip çoğaltılmış polimorfik diziler (CAPS) markeri geliştirilmiştir. Ayrıca, altı mutant dayanıklılık allelin her birinin saptanması için (CAPS) markörleri geliştirilmiştir. Araştırmacılar, bu markerleri kullanarak, bu popülasyonlardaki çeşitli ALS-dayanıklılık allelleri ve genotipleri ortaya çıkarmış ve bunları doğrudan ALS-inhibitör herbisitlere karşı dayanıklılığı fenotipik olarakta ispatlamışlardır.

Sala vd. (2008) ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkisinde imidazolin direnci sağlayan bir mutasyonun moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonu üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Tohum mutasyonu sonucunda elde edilen ve imidazolin grubu herbisitlere dayanıklılık sağlayan CLHA-Plus genotipi üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Bu doğrultuda bu dayanıklılık sağlayan genin fenotipik, biyokimyasal ve moleküler düzeylerde karakterize etmeyi amaçlamışlardır. CLHA-Plus, SU grubu herbisitler (metsülfuron, tribenuron ve klorosülfuron) karşı tam bir hassasiyet gösterirken, imidazolin grubu herbisitlere (imazamoks, imazapir ve imazapik) iki katı dayanıklılık göstermiştir. Dayanıklı ve hassas hatların arasındaki nükleotid ve amino asit dizisi karşılaştırmaları yapılmıştır. CLHA-Plus'ın imidazolinona dirençli ALS'nin 122. pozisyonunda (*Arabidopsis thaliana* ALS dizisine göre) bir treonin kodonuna (ACG) sahip olduğunu gösterdi. Hassas olan BTK47' genotipinin bu pozisyonunda bir alanin (GCG) amino asidi bulunmuştur. İmidazolin grubu herbisitlere karşı yüksek tolerans seviyesi sahip ALS1-3 bölgesi diğer ALS inhibe edici herbisitlerine karşı çapraz dayanıklılığa sahip değildir. Bu elde edilen mutasyonun ticari çeşitlerle melezlenerek yeni herbisit dayanıklı hibritlerin geliştirilebileceğini bildirmişlerdir.

Lamego vd. (2009) Brezilya’da soya tarlalarında büyük sorun oluşturan yaprak sukteni yabancı otlarının ALS dayanıklı biyotiplerinin moleküler analizini üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Yaprak sukteni ALS inhibitörlerine dayanıklılığını teyit etmek ve karakterize etmek için tüm bitki biyo-tahlilleri ve enzim deneyleri yapılmıştır. Bu yabancı ot türlerinde dayanıklılık temelinin moleküler analizini yapmak için dayanıklı ve hassas tiplerin ALS gen bölgesi sekanslanmıştır. Yapılan sekans analizinde 3 farklı noktada mutasyon tespit ettiklerini söylemişlerdir. Bunlardan birisi daha önceki çalışmalarda da rapor edilen 574. noktadaki amino asidin tek bir baz (G/T) değişiminden dolayı triptofan olan amino asidin Lösin amino asidine dönüşmesi (Trp-574-Leu) olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun dışında ise 116. ve 149. bölgelerdeki Fenilalanin amino asidinin sırayla Lösin ve Serin amino asidine (Phe-116-Leu ve Phe-149-Ser) dönüştüğünü belirlemişlerdir. 116 ve 149 noktalarındaki amino asit değişikliklerinin daha önceki herbisite dayanıklı ALS genlerinde henüz rapor edilmemiş olduğunu bu nedenle, herbisit direnci sağlamadaki rolleri henüz belirlenmediklerini bildirmişlerdir.

Krysiak vd. 2011 yılında ipek çiminde (*Apera spica-venti* L.) herbisitlere karşı ALS geni mutasyonları üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Polonya'daki çeşitli ipek çimi biyotiplerinin ALS inhibitörlerine karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Bu yabancı otları klorsülfuron, sülfosülfuron, propoksikarbazon-sodyum ve mezosülfuron-metil+iyodosülfuron-metil-sodyum karışımı dört farklı herbisite karşı farklı dozlarda dayanıklılıklarını test etmişlerdir. Dayanıklılık gösteren 10 biyotip farklı seviyelerde dayanıklılık göstermiştir ve bu biyotipler moleküler testlere tabi tutulmuştur. PCR amplifikasyonu ile ALS gen bölgesi çoğaltılmış ve sekansı yapılmıştır. Yapılan sekansa göre çok sayıda tek nükleotid polimorfizmi görülmüştür. Dokuz biyotip, kodon Prolin-197 Serin veya Treonin amino asit değişikliği olduğunu bildirmişlerdir. Pro-197'deki mutasyon, test edilen herbisitlere yüksek düzeyde dayanıklılık göstermiştir. Dört biyotipin analizinde ise, Ala-122 noktasındaki Alanin amino asitinin Valin olarak değiştiğini ve bununla herbisitlere karşı dayanıklılık sağladığını bildirmişlerdir. Bazı biyotiplerde ise Ala-157 noktasında Alanin yerine Serin amino asiti sentezlenmiş fakat bu mutasyonun hem dayanıklı hem de hassas biyotiplerde meydana geldiği için bu nokta mutasyonunun bir belirteç olmadığını bildirmişlerdir. Bir biyotipte ise hiçbir mutasyon gözlemlenmedi ama buna rağmen klorsülfuron ve mezosülfuron+iyodosülfuron dayanıklılık sağlarken, sülfosülfuron veya propoksikarbazon-sodyum etken maddeli herbisitlere dayanıklılık sağlamadığını belirtmişlerdir. Burada da nokta mutasyonu dışında bir mekanizma tarafından dayanıklılığın sağlanabileceğini bildirmişlerdir.

Adamczewski ve Matysiak (2012) Polonya’da yaptıkları bir çalışmada ipek çimi (*Apera spica-venti* L.) biyotiplerinde ALS'yi inhibe edici herbisitlere karşı Çapraz ve çoklu dayanıklılık mekanizması üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Çifti koşullarında dayanıklı gözlemlenen biyotiplerden tohum almışlar ve sera koşullarında yetiştirmişler. Daha sonra klorsülfuron (Glean 75 WG), isoproturon (Arelon Dyspersyjny 500 SC), mesosulfuron + iodosulfuron (Atlantis 04 WG) ve fenoxaprop-P-ethyl (Puma Universal 069 EW) isimli dört herbisiti etiket üzerinde önerilen dozda kullanılmıştır. Uygulamadan sonra ALS bölgesini etkileyen sülfonilüre herbisitlere çapraz dayanıklılık gösteren biyotiplerin ve asetilCoA karboksilaz (ACCCase) inhibitörlerine çoklu dayanıklılık gösteren biyotiplerin seçilmiştir. ALS herbisitlerine (R1, R2, R3) çapraz

dayanıklı üç biyotip ve ALS ve ACCase herbisitlerine (R4, R5, R6) çoklu dayanıklılık gösteren 3 biyotip seçilmiştir. Dayanıklı olan R1, R2 ve R3 üç biyotipine birkaç doz klorsülfüronun uygulanmasından sonra test edilen 3 biyotip, bu herbisite karşı yüksek derecede dayanıklılık göstermiştir. Biyotip R3'teki dayanıklılık mekanizmasının mutasyon (hedef bölge) tipinde olduğu ve Pro-197-Ser mutasyonundan kaynaklandığı belirtmişlerdir. Fakat R1 ve R2 popülasyonlarındaki mutasyon bulunmamış ve dayanıklılık mekanizması bilinmemektedir. Fakat bu herbisit yüksek dozlarının uygulanmasından sonra ($150-225 \text{ g ha}^{-1}$) bu biyotiplerde etkili kontrol sağlanmıştır. Daha sonra yine SU grubu herbisitlerden olan sülfometuronun uygulanmasından sonra ALS'yi inhibe edici herbisitlere (R1, R2, R3) dayanıklı biyotiplerin tepkisi farklı olmuştur. Sadece 2 biyotipin, yani R2 ve R3'ün, uygulanan sülfometuron tarafından zayıf bir şekilde kontrol edildiği ortaya çıktı. Biyotip R2'deki dayanıklılık mekanizması, biyotip R3'teki gibi, Pro-197 konumundaki bir mutasyondan kaynaklandığını düşündüklerini bildirmişlerdir. Fakat R1 popülasyonu, sülfometurona duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır. Bu veriler ışığında R1 dayanıklılık mekanizmasının hedef bölge tipinde olmadığını, muhtemelen sülfonilürelere direncin metabolizmanın etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Sala vd. (2012) ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkisinde *Ahas11* lokusundaki mutasyondan kaynaklı iki imidazolin grubu herbisitlere toleranslı iki hattın allellerinin baskınlık ilişkileri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Imisun ve CLPlus çeşitleri ayçiçeğinde aynı lokusta sırasıyla *Ahas11-1* ve *Ahas11-3*'te farklı allellerin sağladığı iki imidazolin (IMI) toleranslı bitkilerdir. Bu makale, her iki alleli homozigot, heterozigot ve heterozigot yığın halinde bulunması durumunda bitkilerin oluşturduğu tolerans seviyelerini araştırmayı amaçlamıştır. *Ahas11* geninin altı genotipi üç farklı genetik backgrounda birbiriyle karşılaştırılmıştır. Bu materyaller V2–V4 aşamasında artan imazapir dozları (0 ila 480 g ha^{-1}) ile muamele edildikten sonra biyokütle ve herbisit fitotoksitesitesi değerlendirilmiştir. Homozigot CLPlus (*Ahas11-3/Ahas11-3*) genotipleri ve her iki alleli de taşıyan genotipler (Imisun/CLPlus heterozigot, *Ahas11-1 / Ahas11-3*) duyarlı genotiplerden 300 kat daha ve homozigot Imisun dayanıklılık genlerinden (*Ahas11-1 / Ahas11-1*) 2.5 kat daha fazla dayanıklılık göstermiştir. Yaptıkları testler sonucunda *Ahas11-1* alleli için hesaplanan biyokütle ve tolerans analizlerinde eş baskın (co-dominant) olduğunu belirtmişlerdir. *Ahas11-3* alleli ise uygulanan doz seviyesine göre dominat-yarı dominant arasında baskınlık göstermiştir. *Ahas11-3* alleli *Ahas11-1* alleleline baskın olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte enzimatik aktivite seviyesinde ve her iki allel de kullanılan herbisit oranları bakımından *Ahas11-3* alleli *Ahas11-1* üzerinde baskın olmasına rağmen, yabani tip genotipinin alleleline göre yarı resesif-özellik göstermiştir.

Ghio vd. (2013) soyada sülfonilüre (SU) grubu herbisitlere dayanıklılık sağlayan *Als1* geninin moleküler karakterizasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Daha önceki bir çalışmada Williams 82 isimli çeşide EMS uygulanarak herbisite dayanıklı BTK323STS (W20) mutant hattı elde edilmiştir (Sebastian vd. 1989). SU grubu herbisite dayanıklı BTK323STS genotipi ile NA4613RG isimli herbisite hassas hat melezlenmiştir. Melezleme programında hassas hat anne, dayanıklı hat baba olarak kullanılmıştır. Daha sonra elde edilen bu F_1 bitkilerine 10 g ha^{-1} oranında sülfonilüre etken maddeli herbisit uygulanmıştır. Yaşamını devam ettiren bitkiler saksıya alınarak serada yetiştirilmiş ve 160 tek bitkiden tohum alınmıştır. NCBI gen bankasında

Arabidopsis thaliana ALS (Accession NM_114714.2) sekans dizilimi çıkarılmış ve *Glycine max* genomunda blast yapılmıştır. Dört farklı kromozomda (sırasıyla 4, 6, 13 ve 15 Kromozomunda) dört nükleotid dizilimi GmAhas1- 4 (Accession No. Glyma04g37270, Glyma06g17790, Glyma13g31470 ve Glyma15g07860) *Arabidopsis thaliana* asetohidroksiasit sentez (AHAS, EC 4.1.3.18) ile yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Bu kromozondaki bölgeleri çoğaltmak için spesifik primerler dizayn etmişlerdir. Yukarıdaki ebeveynler ile yapılan melezlemeden elde edilen bitkiler V3-V4 büyüklüğüne gelince ilaçlamışlar ve gözlemler alarak dayanıklı bitkileri seçmişlerdir. Bitki içerisinde bulunan 4 GmAHAS gen bölgeleri %78-94 arasında benzerlik göstermiştir. GmAHAS1 ile GmAHAS2 %93 oranında, GmAHAS3 ile GmAHAS4 %94 oranında benzerlik göstermiştir. GmAHAS1 ile GmAHAS3, GmAHAS4 sırasıyla %79 ve %78 benzerlik göstermiştir. GmAHAS1-4 genleri ise *A. thaliana* (CSR1) çoğaltılan ALS geni arasında %74-76 arsında benzerlik göstermiştir. Yapılan çalışma sonucunda SU grubu herbisitlere dayanıklı soya genotipleri ALS1 gen bölgesinde bir mutasyon taşınması gerektiğini bildirmişlerdir. SU grubu herbisitlerine karşı dayanıklılığın, soya bitkilerinin gerçek yapraklarında alınan DNA sekans sonuçlarına göre soyanın 4. kromozomunun üzerinde bulunan ALS1 gen bölgesinde olduğunu bildirmişlerdir. Dayanıklılığa sahip olan BTK323STS ve hassas olan Williams 82 genotiplerinin GmAHAS1 gen bölgesi sekansları karşılaştırılmıştır. Her iki sekansın karşılaştırılmasında, tek bir DNA polimorfizminin varlığını ortaya çıkmış ve 532. sıradaki sitozinin timine dönüştüğünü belirtmişler. Bu nükleotid değişimi de hassas olan Williams 82 genotipinin 197. sıradaki prolin (CCC) amino asidinin, serin (TCC) amino asidine dönüşmesine sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Walter vd. (2014) soyada asetolaktat sentez herbisitlerine tolerans sağlayan *Als1* ve *Als2* mutasyonlarının moleküler ve fenotipik karakterizasyonu üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Sebastian vd. (1987) W20 isimli hattın geliştirilmesinden *Als1* alleli bakımından homozigot hat, sadece *Als1* alleli tarafından sağlanan dayanıklılıktan daha yüksek SU direnci seviyeleri elde etmek amacıyla ikinci bir mutajenez uygulamasına tabi tutulmuştur. İkinci mutajenez uygulaması sonrasında bir W4-4 hattı seçilmiştir. Bu hat hem in vitro ALS enzimi hem de tam bitki deneyleri yoluyla yapılan dayanıklılık testlerinde orijinal W20 hattından daha fazla SU'ya karşı dayanıklı olduğu bildirmişlerdir. W4-4×yabani tip melezlerden elde edilen popülasyonlarda SU direnci için W4-4'ün *Als1* alleli bakımından homozigot olduğu ve burada "*Als2*" adı verilen bağımsız olarak ayrılan ikinci bir mutasyon olduğunu belirtmişlerdir (Sebastian yayınlanmamış). Yapılan ilave çalışmalar *Als1* ve *Als2* kombinasyonunun geniş spektrumlu SU grubu herbisitler dâhil olmak üzere test edilen hemen hemen her SU grubu herbisitler için daha yüksek dayanıklılık sağladığını göstermiştir. Bu çalışmada yabani tip *als1* ve *als2* genlerine (hassas), *Als1* mutasyonuna, *Als2* mutasyonuna ve hem *Als1* hem de *Als2* mutasyonlarına sahip olan soya hatları ALS enzimini inhibe eden beş kimyasal maddeyi temsil eden on bir herbisite karşı testlenmiştir. Temsil edilen beş kimyasal aileler şunlardır; (1) imidazolinonlar, (2) pirimidiniltiyobenzoatlar, (3) sülfonilaminokarboniltiazolinonlar (triazolinonlar olarak da bilinir), (4) sülfonilüreler, (5) triazolopirimidinlerdir. Herbisit uygulamasından 14 gün sonra fenotipik gözlemler alınmış ve kaydedilmiştir. 0-100 skalası kullanılmış ve hiçbir belirti lezyon göstermeyen bitkilere 0, bitki ölümü gerçekleşenlere 100 notu verilmiştir. Her hattın herbisit uygulaması yapılmayan kontrollerde yetiştirilmiştir. Her uygulamadan 2 tekrarlı olacak şekilde çalışma yapılmıştır. *Als1* katalitik alt birimi için blastn programı ile bir tescilli

soya dizisi veri tabanında cDNA dizisi taraması yapılmıştır. Yabani tip Williams 82 genomunda asetolaktat sentez olarak tarif edilen dokuz dizi bulunmuştur. JGI / DOE soya genomik dizi düzeneği Bu dokuz sekans kromozom 1, 4, 6, 13 ve 15 olmak üzere 5 kromozom üzerinde tespit edilmiştir. İntronlar ile kromozom-1 üzerindeki genin açık okuma çerçevesi uzunluğu 278 amino asit tespit edilmiştir. Kromozom-4 üzerindeki 641 amino asit uzunluğunda olan bir sonraki en küçük ALS geni uzunluğu bulunmuştur. Bu kromozom-1 üzerinde bulunan gen, kromozom-4 üzerindeki gen uzunluğunun yarısından daha az bulunmuştur. Kromozom-1 geninin fonksiyonel bir ALS geni olup olmadığının belirsiz olduğunu bildirmişlerdir. Yinede bu gen sekanslama analizine dâhil edilmiştir. Bu 5 kromozondaki gen bölgelerini çoğaltmak için 5 farklı primer çifti dizayn edilmiştir. Sekans sonuçlarına göre kromozom-4 (Glyma04g37270.1) ve kromozom-6 (Glyma06g17790.1) iki mutasyon tespit etmişlerdir. Glyma04g37270.1'deki mutant allel *Als1* olduğunu ve Glyma06g17790.1'deki mutant allel *Als2* olduğunu bildirmişlerdir. Tam sekans uzunlukları aligment edilmiştir. W4-4'ün *Als1* alleli daha önce W20'de (Falco yayınlanmamış) bulunan sekans ile aynı uzunlukta ve soya proteininin (*A. thaliana*'da P197S) 178. pozisyonunda prolin-serin değişikliği ile aynı olduğunu bildirmişlerdir. W4-4'ün *Als2* alleli, soya proteininin 560 pozisyonunda (*A. thaliana*'da W574L) bir triptofan-lösin mutasyonu olduğunu tespit etmişlerdir. Bu mutasyonlar, soyada ALS geninde (*A.thaliana*'da P197A ve W574L) P178A ve W555L mutasyonlarına sahip HRA olarak bilinen yüksek derecede herbisite dayanıklı ALS mutasyonları ile benzer olduğunu bildirmişlerdir. 555 pozisyonundaki *Als1*'deki amino asit 560 pozisyonundaki *Als2*'deki amino asitin benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Walter vd. (2014) yaptıkları aynı çalışmada *Als1*, *Als2* ve *Als1+Als2* kombinasyonun herbisite karşı tepkilerini ölçmüşlerdir. *Als1*, *Als2* ve *Als1+Als2* kombinasyonu, asetolaktat sentez enzimini inhibe eden herbisitlerin çıkış sonrası uygulamalarında soya dayanıklılığını önemli ölçüde artırmıştır. Doz-tepki eğrilerinin görsel analizine dayanarak, hassas tipler *Als1* taşıyan genotip karşılaştırıldığında; klorimuron, nikosülfuron, rimsülfuron, sülfometuron, thifensülfuron, tribenuron ve flucarbazona karşı soya toleransını önemli ölçüde artırmıştır. Hassas tip ile *Als2* taşıyan hat karşılaştırıldığında, imazapir, klorimuron, nikosülfuron, rimsülfuron, sülfometuron, thifensülfuron, tribenuron ve flucarbazona soya toleransını artırmıştır. Yine hassas ile *Als1+Als2* kombinasyonunun taşıyan genotip karşılaştırıldığında imazapir, pirithiobac sodyum, klorimuron, nikosülfuron, rimsülfuron, sülfometuron, thifensülfuron, tribenuron ve flucarbazona karşı soya toleransını artırmıştır. Sadece *Als1* veya sadece *Als2* içeren soya ile *Als1+Als2* kombinasyonunu içeren genotip karşılaştırıldığında imazapir, pirithiobac sodyum, nikosülfuron, rimsülfuron, sülfometuron ve flucarbazona toleransının arttığını bildirmişlerdir. Bu test sonuçları, *Als1*, *Als2* ve *Als1+Als2* kombinasyonunun soyanın ALS üzerinde aktif olan beş kimyasal grubun en az dördüne toleransını arttırdığını teyit etmişlerdir.

Brosnan vd. (2016) tek yıllık salkım otlarında ALS inhibitörü herbisitlere karşı dayanıklılık gözlemlemişler ve bunun üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Tennessee'deki golf sahasındaki tek yıllık allotetraploid Salkım otlarında (*Poa annua* L.) ALS ve fotosistem-II'ye etki eden herbisitlere karşı dayanıklılık gözlemlemişlerdir. Genetik sekanslama sonucuna göre, sekiz POAAN-R3 isimli bitkinin yedisinin psbA geninde bir nokta mutasyonu olduğunu ve bunun D1 proteini üzerinde bilinen bir Ser-264-Gly amino asit değişikliği meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Bütün bitki testi,

POAAN-R3 isimli genotiplerde simazin etki maddeli herbisite karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. ALS geninin iki homolog formu (ALSa ve ALSb) tespit edilmiş ve sekanslanan tüm POAAN-R3 bitkileri ile kıyaslanmıştır. Simazin dayanıklılığı veren yedi bitkide ALSb üzerinde Ser-264-Gly değişikliği sağlayan mutasyona ve sahip olduklarını aynı zamanda homozigotu olan ALSb üzerinde de iki nükleotid değişikliğinden kaynaklanan Ala-205-Phe amino asit değişikliği olduğunu belirtmişlerdir. Rekombinant protein ve tam bitki testi ile in vitro ALS aktivite analizleri, bu Ala-205-Phe değişikliğinin imidazolin, sülfonilüre, triazolopirimidinler, sülfonilamino-karboniltriasolinonlar ve pirimidinil benzoat herbisitlerine dayanıklılık sağladığını doğruladıklarını bildirmişlerdir. Daha önceki birçok raporda ALS engelleyici herbisitlere karşı geniş spektrum direnci sağlayan farklı bölgelerdeki nokta mutasyonların dayanıklılık sağladığını belirtmişler fakat bu Ala-205-Phe mutasyonunun ilk kez rapor edildiğini bildirmişlerdir.

Jimenez vd. (2016) buğdayda imidazolin dayanıklılığı sağlayan genotipin fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada imazamoks dayanıklı çeşit Pantera (Clearfield) hassas bir çeşitle (Gazul) karşılaştırılmıştır. Pantera'nın dayanıklılığını karakterize etmek ve bu dayanıklılıkta yer alan hedef nokta dayanıklılığı ve hedef olmayan dayanıklılık mekanizmalarının önemini belirlemek için bir analizler yapmışlardır. Moleküler çalışma, buğdayda sırasıyla 6B ve 6D kromozomlarında bulunan üç ALS geninden (*imi1* ve *imi2*) ikisinde imazamoks dayanıklılığı veren bir mutasyon Ser-627-Asn taşıdığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, 6A kromozomu üzerinde bulunan son ALS geni (*imi3*) dayanıklılık sağlayan herhangi bir mutasyon taşımadığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak, imazamoks uyguladıktan sonra bitkide fotosentetik aktivite ve klorofil-II içeriği azalmıştır. Metabolik çalışmalarda ise detoksikasyon yani, toksik maddelerin atılması dayanıklı genotipte yüksek iken, imazamoks taşınması hassas genotipte daha yüksek çıkmıştır. Pantera IMI herbisitlerine karşı iyi bir dayanıklılık seviyesi gösterse de, bitki büyümesi, klorofil içeriğindeki ve fotosentetik aktivitelerinde azalmalar gözlemlenmiştir. İlginç bir şekilde doz arttıkça, imazamoks metabolizmasının da arttığını bildirmişlerdir. Bu, detoksikasyon işleminin çok önemli olduğunu ve detoksikasyon enzimlerini kodlayan kilit genlerin önemli rol oynayabileceği bir mekanizma olduğunu düşünmektedirler.

Kaya Altop vd. (2017) Türkiye’de buğday ekim alanlarında sorun olan Kokar otun (*Bifora radians*) ALS inhibitörü herbisitlere dayanıklılığının PCR temelli olarak belirlenmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu doğrultuda buğday ekim alanlarında da sorun olan *Bifora radians* yabancı otuna ruhsatlı ve mücadelede geniş kullanım alanı olan ALS inhibitörü herbisitlerle çalışılmıştır. Çalışmada Türkiye’de buğday yetiştirilen ve bu yabancı otun sorun olduğu İç Anadolu ve Orta Karadeniz Bölgelerinin önemli illerinden toplam 1371 tarladan tohumlar toplanmıştır. Serada saksı koşullarında bioassay yöntemleriyle dayanıklı biyotipler ile bunların dayanıklılık dereceleri belirlenmiştir. Bazı popülasyonların herbisit uygulamasından etkilenmedikleri ve hayatta kaldığı saptanmıştır. Bu popülasyonlar doz-etki çalışmaların alınmış ve ED₅₀ değerlerinin elde edilmesi için Weibull modeli ile R paket programında analiz edilmiştir. *Bifora radians*’ın 22 popülasyonunun ALS inhibitörü herbisitlerle etkilenmediği ve dayanıklı olduğu saptanmıştır. Ayrıca dayanıklılık gösteren biyotiplerde, universal primerler kullanılarak dayanıklılığa sebep olan gen bölgesini

çoğaltarak sekans analizi yapılmıştır. Sekans analizi sonucuna göre dayanıklı olarak gözlemlenen biyotiplerde mutasyon varlığına rastlanılmamıştır. Dayanıklı popülasyonlardaki dayanıklılığın sebebinin hedef bölge dayanıklılığı olarak ifade edilen genetik dayanıklılıktan kaynaklanmadığı, metabolik dayanıklılıktan kaynakladığını düşündüklerini bildirmişlerdir.

Kaya Altop vd. (2017) Türkiye’de buğday tarlalarında sorun olan dilkanatan (*Galium aparine* L.) yabancı otunun ALS inhibitörü herbisitlere karşı dayanıklılığı üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Ülkemiz buğday ekim alanlarında sorun olan yabancı otlarla mücadelede yoğun olarak herbisit kullanımı söz konusu olup, buğday ekim alanlarında gözlenen geniş yapraklı tek yıllık rekabetçi önemli yabancı otlardan biri de *Galium aparine* olduğunu bildirmişlerdir. Türün mücadelesinde yoğun olarak kullanılan ALS inhibitörü herbisitlere karşı etkisizlik durumunun olduğuna dair gözlemler ve çiftçi şikâyetleri doğrultusunda, buğday alanlarında *G. aparine*’ye ruhsatlı ALS inhibitörü herbisitlerden özellikle sülfonilüre grubu etken maddeli herbisitler ile çalışmışlardır. Bu doğrultuda Türkiye’de bu yabancı İç Anadolu ve Orta Karadeniz Bölgeleri buğday ekim alanlarından toplam 1359 popülasyonun dayanıklı biyotipleri ve dayanıklılık dereceleri bioassay yöntemleri ile fenotipik olarak belirlenmiş. 23 tane *G. aparine* popülasyonunun ALS inhibitörü herbisitler tarafından etkilenmediğini bildirmişlerdir. Daha sonra bu dayanıklı tiplerde DNA örneği alınarak moleküler analizler yapılmıştır. Fakat bu ALS dayanıklılığı sağlayan gen bölgesinde herhangi bir mutasyon varlığı belirleyememişlerdir. Dayanıklılığın hedef bölge dayanıklılığından kaynaklanmadığını ve metabolik dayanıklılıktan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Zhang vd. (2017) Çin’de kış buğdayını tarlalarında istila eden en sorunlu ot türlerinden biri olan *D. Sophia*’nın tribenuron-metile karşı yüksek dayanıklılık geliştirdiğini belirtmişlerdir. ALS Pro-197, Asp-376 ve Trp-574’teki amino asit değişikliklerinden dolayı *D. sophia*’nın tribenuron-metil direnci oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada spesifik ALS mutasyonu (Pro-197-Leu, Pro-197-His, Pro-197-Ser, Pro-197-Thr, Asp-376-Glu ve Trp-574-Leu için ayrı ayrı homozigot olan *D. sophia* bitkisi üretilmiştir. Bu bitkilerin dayanıklılık mutasyonlarının *D. sophia*’nın duyarlı (S) ve dayanıklı (R) bitkilerinin pigmentleri, büyümeleri ve rekabet gücü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Dayanıklılık mutasyonu taşıyan genotipler (R) (Pro-197-Leu, Pro-197-His, Asp-376-Glu, Trp-574-Leu) Hassas bitkilerden (S) daha güçlü bir rekabet gücü sergilediğini belirtmişlerdir. Uygulanan herbisitten dolayı hassas genotiplerin ölmesi dayanıklı (R) bitkilerin oranının artması ile bitki örtüsündeki oranın artmasına; zamanla da kullanılan herbisitinin etkinliğinin azalmasına sebep olduğunu bildirmişlerdir. Yine bu çalışma da kullanılan herbisit, dayanıklı mutasyonunu taşıyan (R) bitkilerinin pigmentleri (klorofil a, klorofil b ve karotenoid), nispi büyüme oranları, yaprak alanı oranı ve net asimilasyon oranı üzerinde belirgin bir olumsuz etkisi olmadığını belirtmişlerdir.

Çizelge 2.2. Şimdiye kadar ALS gen bölgesindeki mutasyonlardan kaynaklı rapor edilen herbisit dayanıklı bitkiler (Tranel vd. 2020)

Amino asit	Değişiklik	Tür	TP	SU	PTB	IMI	SCT	Rapor yılı
Ala 122	Thr	<i>Xanthium strumarium</i>	ND	S	S	R	ND	1995
	Thr	<i>Solanum ptycanthum</i>	ND	S	ND	R	ND	2000
	Thr	<i>Amaranthus retroflexus</i>	ND	ND	ND	R	ND	2005
	Thr	<i>Amaranthus powellii</i>	ND	S	ND	R	ND	2005
	Thr	<i>Amaranthus hybridus</i> (syn: <i>quitensis</i>)	S	S	S	R	ND	2006
	Val	<i>Apera spica-venti</i>	ND	R	ND	ND	S	2011
	Tyr	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	R	ND	R	ND	2012
	Val	<i>Echinochloa crus-galli</i> var. <i>crus-galli</i>	S	ND	S	R	ND	2013
	Thr	<i>Echinochloa crus-galli</i> var. <i>crus-galli</i>	R	ND	S	R	ND	2013
	Ser	<i>Amaranthus palmeri</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2017
	Asn	<i>Echinochloa crus-galli</i> var. <i>crus-galli</i>	R	R	R	R	ND	2017
	Thr	<i>Amaranthus palmeri</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2019
Pro 197	Thr	<i>Kochia scoparia</i>	R	R	ND	S	ND	1990
	His	<i>Lactuca serriola</i>	r	R	S	r	ND	1992
	Arg	<i>Kochia scoparia</i>	ND	R	ND	ND	ND	1995
	Leu	<i>Kochia scoparia</i>	ND	R	ND	ND	ND	1995
	Gln	<i>Kochia scoparia</i>	ND	R	ND	ND	ND	1995
	Ser	<i>Kochia scoparia</i>	ND	R	ND	ND	ND	1995
	Ala	<i>Kochia scoparia</i>	ND	R	ND	ND	ND	1995
	Ala	<i>Brassica tournefortii</i>	R	R	ND	S	ND	1999
	Ile	<i>Sisymbrium orientale</i>	R	R	ND	r	ND	1999
	Leu	<i>Amaranthus retroflexus</i>	R	R	R	R	ND	2001
	Ala	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	R	ND	S	ND	2002
	Thr	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	R	ND	S	ND	2002
	Ala	<i>Lindernia dubia</i> (=Lindernia dubia var. major)	ND	R	ND	ND	ND	2002
	Ser	<i>Lindernia dubia</i> (=Lindernia dubia var. major)	ND	R	ND	ND	ND	2002

Çizelge 2.2.'nin devamı

Pro 197	Gln	<i>Lindernia micrantha</i>	ND	R	ND	ND	ND	2002
	Ser	<i>Lindernia micrantha</i>	ND	R	ND	ND	ND	2002
	Gln	<i>Lindernia procumbens</i>	ND	R	ND	ND	ND	2002
	Ser	<i>Lindernia procumbens</i>	ND	R	ND	ND	ND	2002
	Ser	<i>Amaranthus blitoides</i>	r	R	r	S	ND	2003
	His	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	R	ND	S	ND	2003
	Ser	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	R	ND	S	ND	2003
	His	<i>Papaver rhoeas</i>	S	R	ND	r	ND	2004
	Thr	<i>Papaver rhoeas</i>	r	R	r	r	ND	2004
	Ser	<i>Papaver rhoeas</i>	r	R	r	r	ND	2004
	Ser	<i>Bromus tectorum</i>	ND	R	ND	S	R	2004
	Thr	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	r	R	R	r	R	2004
	Ser	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2004
	Ser	<i>Monochoria vaginalis</i>	ND	R	ND	ND	ND	2004
	Leu	<i>Helianthus annuus</i>	ND	R	ND	ND	ND	2004
	Ser	<i>Sinapis arvensis</i>	ND	R	ND	S	ND	2005
	Thr	<i>Lactuca serriola</i>	r	R	ND	r	ND	2006
	His	<i>Schoenoplectus juncooides</i>	ND	R	S	S	ND	2007
	Ser	<i>Schoenoplectus juncooides</i>	ND	R	S	S	ND	2007
	Leu	<i>Schoenoplectus juncooides</i>	ND	R	S	S	ND	2007
	Ser	<i>Hordeum murinum ssp. leporinum</i>	ND	R	ND	S	ND	2007
	Leu	<i>Thlaspi arvense</i>	S	R	ND	r	ND	2007
	Ser	<i>Lolium rigidum</i>	ND	R	ND	S	ND	2007
	Thr	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ND	R	ND	ND	ND	2008
	Arg	<i>Lolium rigidum</i>	ND	R	ND	S	ND	2008
	Ala	<i>Lolium rigidum</i>	ND	R	ND	S	ND	2008
	Leu	<i>Lolium rigidum</i>	ND	R	ND	S	ND	2008
	Gln	<i>Lolium rigidum</i>	ND	R	ND	S	ND	2008
	Leu	<i>Descurainia sophia</i>	ND	R	ND	ND	ND	2008
	Thr	<i>Descurainia sophia</i>	ND	R	ND	ND	ND	2008
	Arg	<i>Papaver rhoeas</i>	r	R	r	r	ND	2009

Çizelge 2.2.'nin devamı

Pro 197	Leu	<i>Papaver rhoeas</i>	S	R	ND	R	ND	2009
	Ala	<i>Papaver rhoeas</i>	r	R	r	r	ND	2009
	Gln	<i>Stellaria media</i>	S	R	ND	ND	ND	2010
	His	<i>Schoenoplectus mucronatus</i> (= <i>Scirpus mucronatus</i>)	R	R	S	S	ND	2010
	Gln	<i>Salsola tragus</i>	ND	R	ND	ND	ND	2010
	Thr	<i>Apera spica-venti</i>	r	R	ND	ND	r	2011
	Asn	<i>Apera spica-venti</i>	r	R	ND	ND	r	2011
	Ser	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ND	R	ND	ND	ND	2011
	Ala	<i>Descurainia sophia</i>	ND	R	ND	ND	ND	2011
	Ser	<i>Descurainia sophia</i>	ND	R	ND	ND	ND	2011
	Leu	<i>Anthemis cotula</i>	r	R	ND	r	ND	2011
	Gln	<i>Anthemis cotula</i>	R	R	ND	r	ND	2011
	Thr	<i>Anthemis cotula</i>	r	R	ND	r	ND	2011
	Ser	<i>Anthemis cotula</i>	R	R	ND	r	ND	2011
	Ala	<i>Conyza canadensis</i>	R	R	R	S	ND	2011
	Ser	<i>Conyza canadensis</i>	R	R	R	S	ND	2011
	Ser	<i>Apera spica-venti</i>	ND	R	ND	ND	r	2011
	Leu	<i>Sonchus asper</i>	ND	R	ND	R	ND	2012
	Thr	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ND	R	ND	ND	ND	2012
	His	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ND	R	ND	ND	ND	2012
	Leu	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ND	R	ND	ND	ND	2012
	Thr	<i>Hordeum murinum ssp.</i> <i>leporinum</i>	ND	R	ND	r	ND	2012
	Ser	<i>Myosoton aquaticum</i>	r	R	R	S	R	2013
	Ala	<i>Apera spica-venti</i>	ND	R	ND	ND	ND	2013
	Arg	<i>Schoenoplectus juncooides</i>	ND	R	ND	S	ND	2013
	Ala	<i>Schoenoplectus juncooides</i>	ND	R	ND	S	ND	2013
	Thr	<i>Schoenoplectus juncooides</i>	ND	R	ND	S	ND	2013
	Ser	<i>Sagittaria trifolia</i>	ND	R	ND	ND	ND	2014
	Glu	<i>Myosoton aquaticum</i>	R	R	R	R	ND	2015
	His	<i>Descurainia sophia</i>	ND	R	ND	ND	ND	2015

Çizelge 2.2.'nin devamı

Pro 197	Tyr	<i>Descurainia sophia</i>	ND	R	ND	ND	ND	2015
	Thr	<i>Alopecurus aequalis</i>	r	r	ND	r	ND	2015
	His	<i>Cyperus difformis</i>	R	R	R	R	ND	2015
	Leu	<i>Senecio vulgaris</i>	S	R	ND	r	r	2016
	Ser	<i>Senecio vulgaris</i>	R	R	ND	S	r	2016
	Ser	<i>Cyperus compressus</i>	ND	R	ND	r	ND	2016
	Ala	<i>Cyperus difformis</i>	ND	R	ND	ND	ND	2016
	Ser	<i>Cyperus difformis</i>	ND	R	ND	ND	ND	2016
	Ser	<i>Rapistrum rugosum</i>	r	r	r	S	r	2016
	Arg	<i>Lamium amplexicaule</i>	ND	R	ND	S	R	2016
	Leu	<i>Galium aparine</i>	r	R	r	r	r	2016
	Thr	<i>Galium aparine</i>	ND	R	ND	ND	ND	2016
	Ser	<i>Amaranthus palmeri</i>	ND	R	ND	ND	ND	2017
	Ala	<i>Amaranthus palmeri</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2019
	Ser	<i>Galium aparine</i>	r	r	r	r	r	2019
Ala 205	His	<i>Galium aparine</i>	r	r	r	r	r	2019
	Val	<i>Xanthium strumarium</i>	r	r	r	r	ND	1996
	Val	<i>Helianthus annuus</i>	ND	r	ND	R	ND	2003
	Val	<i>Amaranthus retroflexus</i>	ND	S	ND	R	ND	2005
	Val	<i>Solanum ptycanthum</i>	S	r	ND	R	ND	2007
	Val	<i>Conyza canadensis</i>	ND	R	R	R	ND	2015
Asp 376	Phe	<i>Poa annua</i>	R	R	R	R	R	2016
	Glu	<i>Amaranthus hybridus (syn: quitensis)</i>	R	R	R	R	R	2004
	Glu	<i>Kochia scoparia</i>	ND	R	ND	ND	ND	2008
	Glu	<i>Monochoria vaginalis</i>	ND	R	ND	ND	ND	2008
	Glu	<i>Amaranthus powellii</i>	R	R	R	R	R	2009
	Glu	<i>Conyza canadensis</i>	R	R	R	r	ND	2011
	Glu	<i>Galium spurium</i>	R	ND	ND	ND	ND	2012
	Glu	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	R	ND	r	ND	2012
	Glu	<i>Schoenoplectus juncooides</i>	ND	R	R	r	ND	2013
	Glu	<i>Sinapis arvensis</i>	ND	r	ND	ND	ND	2015

Çizelge 2.2.'nin devamı

Asp 376	Glu	<i>Descurainia sophia</i>	r	R	ND	ND	ND	2015
	Glu	<i>Amaranthus retroflexus</i>	ND	ND	ND	R	ND	2016
	Glu	<i>Lolium perenne</i>	R	R	ND	r	R	2016
	Glu	<i>Galium aparine</i>	r	r	r	r	r	2019
Arg 377	His	<i>Apera spica-venti</i>	R	R	ND	ND	R	2011
Trp 574	Leu	<i>Xanthium strumarium</i>	R	R	R	R	ND	1995
	Leu	<i>Amaranthus tuberculatus</i> (=A. rudis)	R	R	ND	R	ND	1996
	Leu	<i>Amaranthus hybridus</i> (syn: quitensis)	R	R	ND	R	ND	1997
	Leu	<i>Kochia scoparia</i>	ND	R	ND	R	ND	1999
	Leu	<i>Sisymbrium orientale</i>	R	R	ND	R	ND	1999
	Leu	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	R	R	ND	R	ND	2001
	Leu	<i>Ambrosia trifida</i>	R	R	ND	R	ND	2002
	Leu	<i>Raphanus raphanistrum</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2002
	Leu	<i>Amaranthus blitoides</i>	R	R	R	R	ND	2003
	Leu	<i>Camelina microcarpa</i>	R	R	ND	R	R	2004
	Leu	<i>Amaranthus retroflexus</i>	ND	R	ND	R	ND	2005
	Leu	<i>Amaranthus powellii</i>	ND	R	ND	R	ND	2005
	Leu	<i>Sinapis arvensis</i>	R	R	ND	R	R	2005
	Leu	<i>Schoenoplectus juncooides</i>	ND	R	R	R	ND	2007
	Leu	<i>Lolium rigidum</i>	ND	R	ND	R	ND	2007
	Leu	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ND	R	ND	ND	ND	2008
	Leu	<i>Bidens subalternans</i>	R	R	R	R	ND	2009
	Leu	<i>Stellaria media</i>	R	R	ND	ND	ND	2010
	Leu	<i>Schoenoplectus mucronatus</i> (=Scirpus mucronatus)	R	R	R	R	ND	2010
	Leu	<i>Salsola tragus</i>	ND	R	ND	ND	ND	2010
	Leu	<i>Apera spica-venti</i>	R	R	ND	ND	R	2011
	Leu	<i>Papaver rhoeas</i>	ND	R	ND	ND	ND	2011
	Gly	<i>Galium aparine</i>	ND	R	ND	ND	ND	2011
	Leu	<i>Galium spurium</i>	R	ND	ND	R	ND	2012
	Leu	<i>Polygonum convolvulus</i> (=Fallopia convolvulus)	R	R	ND	ND	ND	2012

Çizelge 2.2.'nin devamı

Trp 574	Leu	<i>Echinochloa phyllopogon</i> (=E. oryzicola)	R	R	R	R	ND	2013
	Leu	<i>Poa annua</i>	ND	R	R	R	ND	2013
	Leu	<i>Echinochloa crus-galli</i> var. <i>crus-galli</i>	R	R	R	R	ND	2013
	Met	<i>Apera spica-venti</i>	ND	R	ND	ND	ND	2013
	Leu	<i>Alopecurus aequalis</i>	R	R	ND	R	ND	2015
	Leu	<i>Conyza canadensis</i>	ND	R	R	R	ND	2015
	Leu	<i>Cyperus esculentus</i>	R	R	R	R	ND	2015
	Leu	<i>Cyperus iria</i>	R	R	R	R	ND	2015
	Leu	<i>Sorghum halepense</i>	ND	R	ND	ND	ND	2015
	Leu	<i>Raphanus sativus</i>	R	R	R	R	R	2016
	Leu	<i>Amaranthus palmeri</i>	R	R	R	R	ND	2016
	Leu	<i>Chamaesyce maculata</i>	ND	R	ND	ND	ND	2016
	Leu	<i>Descurainia sophia</i>	R	R	R	R	R	2016
	Arg	<i>Digitaria sanguinalis</i>	R	R	ND	R	ND	2017
	Leu	<i>Galium aparine</i>	r	r	r	r	r	2019
	Leu	<i>Lithospermum arvense</i>	R	R	R	R	R	2019
Ser 653	Thr	<i>Amaranthus powellii</i>	ND	S	ND	R	ND	2001
	Asn	<i>Amaranthus tuberculatus</i> (=A. rudis)	S	S	ND	R	ND	2001
	Thr	<i>Amaranthus tuberculatus</i> (=A. rudis)	S	S	ND	R	ND	2001
	Asn	<i>Amaranthus hybridus</i> (syn: <i>quitensis</i>)	r	r	R	R	ND	2006
	Ile	<i>Setaria viridis</i>	ND	r	R	R	r	2009
	Asn	<i>Setaria viridis</i>	ND	r	R	R	r	2009
	Thr	<i>Setaria viridis</i>	ND	r	S	R	r	2009
	Asn	<i>Galium spurium</i>	S	ND	ND	R	ND	2012
	Thr	<i>Avena fatua</i>	ND	ND	ND	R	ND	2012
	Asn	<i>Avena fatua</i>	ND	ND	ND	R	ND	2012
	Thr	<i>Amaranthus retroflexus</i>	ND	ND	ND	R	ND	2015
	Asn	<i>Amaranthus palmeri</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2016

Çizelge 2.2.'nin devamı

Ser 653	Thr	<i>Sorghum bicolor</i>	ND	S	ND	R	ND	2017
	Asn	<i>Bromus tectorum</i>	r	S	ND	R	R	2017
Gly 654	Glu	<i>Oryza sativa var. sylvatica</i>	ND	ND	r	R	ND	2008
	Asp	<i>Setaria viridis</i>	ND	r	S	R	r	2009

***Amino asit sıralaması** *Arabidopsis thaliana* sekansına göre yapılmıştır.

***S** = Hassas biyotip (Susceptible)

***r** = Kısmen dayanıklı biyotip (hassastan 10 kata kadar dayanıklı) (Moderate resistance)

***R** = Yüksek dayanıklı biyotip (hassastan 10 kattan fazla dayanıklı)

***ND** = Belirlenemeyen (Not Determined)

****TP** = Triazolopirimidin grubu herbisitler

****SU** = Sülfonilüre grubu herbisitler

****PTB** = Pirimidiniltiyobenzoat grubu herbisitler

****IMI** = İmidazolin grubu herbisitler

****SCT** = Sülfonilaminokarboniltiazolin grubu herbisitler

2.7. Hidroponik Sistem Çalışmaları

Hidroponik tarım bitkileri toprak kullanmadan yetiştirme anlamına gelmektedir. Neredeyse her ortamda tercih edilebilecek hidroponik tarım, özellikle küçük bahçeler ve seralar için idealdir. Günümüzde hidroponik tarım, avantajları ve kolay kullanımı nedeniyle modern tarımın en hızlı büyüyen alanlarından biridir. Hidroponik tarımda bitkiler, geleneksel tarım yöntemlerinde olduğu gibi toprağın içerisinde değil; perlit, vermikülit, hidroton, iri kum, kaya yünü veya sadece su ve hava içerisinde yetiştirilmektedir. Hidroponik tarım yapılırken suyun ısısı, suyun pH oranı ve suyun EC (elektro-kondüktivite) dikkat edilmesi gereken en önemli üç unsurdur.

Su kültürü (hidroponik) durgun veya akan besin solüsyonu içerisinde bitkilerin yetiştirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Winsor ve Schwarz, 1990). Hidroponik yetiştirme ortamının topraklı yetiştirme sistemine göre çok önemli avantajları bulunmaktadır. Hidroponik sistemlerde yetiştirilen bitkiler optimum seviyede besin ve neme sahiptirler. Bu nedenle de daha hızlı ve sağlıklı yetişmektedirler. Bir diğer avantajı ise kök sistemlerinin hidroponik olarak yetiştirilen bitkilerde daha küçük olmasıdır ve bu bitkinin büyüme enerjisini köklerden daha çok bitkinin büyümesine yoğunlaştırması demektir. Bu karşın toprak ortamında yetiştiricilikte, topraklı kültürde yer alan zayıf toprak yapısı, kısıtlı drenaj, heterojen doku, yabancı ot ve toprak kaynaklı patojen risklerini taşıması yer almaktadır. Ayrıca otomatize edilmiş hidroponik sistemde sulama ve ortama besin girişi bilgisayar kontrollü gerçekleştirilebildiği için işçilik maliyetleri de düşmektedir. (Marr 1994).

Durgun su kültürü tekniği en eski topraksız yetiştirme ortamlarından biridir. Durgun su kültürü sisteminde bitkiler kökleri suda olacak şekilde su yüzeyinde strafor yardımıyla sabit bir şekilde yüzdürülmektedir. Kullanılan solüsyona hava motoru yardımıyla oksijen vermek gerekmektedir. Bitki türüne ve yetiştirme süresine bağlı olarak belli aralıklarla solüsyon değiştirmek gerekebilmektedir. Genelde su havuzunun derinliğinin 16–17 cm olması tavsiye edilmektedir (Fowlkes 2001). Miceli vd. (2003)

İtalya'da yaptıkları bir araştırmada, yapraklı sebzelerde topraklı yetiştiricilikten daha kısa sürede uygulanabilecek kolay ve az masraflı bir yöntem olan yüzen su kültürü tekniğinin kullanılmasının avantajlı olduğunu bildirmişlerdir.

Topraksız tarımda kullanılan besin maddeleri, bitkisel atıklar, balık atıkları veya sıvı kimyasalların gübre karışımları olmaktadır (Santos vd. 2013). Topraksız sistem toprak ortamı kullanılmadan bitki büyümesini içermektedir ve dolayısıyla topraksız kültür olarak da bilinmektedir. Bu teknik etkin şekilde kullanılarak daha az su tüketimi, bitki büyümesi için daha az alan, hastalıklar, zararlılar ve toprak kökenli sorunlarının üstesinden gelebilmektedir (Shalini vd. 2018).

Araştırmacılar Hidroponik yetiştirme, su ve besin isteğinin daha iyi kontrol edilmesini sağlayan, bitki verimliliğini artıran, bitki rotasyonuna ihtiyaç duymayan ve pestisit kullanımını azaltan gelişmekte olan bir teknoloji olduğunu belirtmişlerdir (Sheikh vd. 2006). Topraksız bitki yetiştirme sistemleri özellikle toprağın veya iklim şartlarının uygun olmadığı bölgelerde bitki yetiştiriciliği için çok uygundur. Nüfus artmasıyla birlikte ve ekilebilir arazi azaldıkça, hidroponik yetiştirme sistemleri geleneksel tarımın yerini alabileceğini belirtmişlerdir (Palermo vd. 2012). Bilim dünyasında üçüncü dünya alanlarında hidroponiklerin potansiyel kullanımı için çok fazla seminer ve konuşmalar yapılmıştır. Bu teknik, Mars'ın veya ayın uzun süreli kolonizasyonu için uzay programlarında taze yiyeceklerin sağlanmasında önemli bir sistem olacağı düşünülmektedir (Silverstone vd. 2003).

Izaguirre-Mayoral ve Sinclair (2005) farklı manganez ve nitrat konsantrasyonlarının hidroponik sistemde yetiştirilen soya genotipleri arasında manganez ve demir birikimi değişimi üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Bir serada hidroponik besin çözeltisinde yetiştirilen farklı soya genotiplerinin farklı Mn ve nitrat konsantrasyonlarına bitki tepkileri test edilmiştir.

Lee vd. (2010) silisyumun hidroponik sistemde yetiştirilen soya bitkisinin büyüme ve tuzluluk stresi üzerine etkisi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada dört farklı besin ortamı içeren su kültürü sistemi kurulmuştur. Bunlar; birincisi kontrol sadece Hoagland çözeltisi, ikincisi Hoagland çözeltisi ve Si (2.5 mM), üçüncüsü Hoagland çözeltisi, Si (2.5 mM) ve NaCl (80 mM), dördüncüsü Hoagland çözümü ve NaCl (80 mM) benin ortamları kurulmuş ve test edilmişlerdir. 20 günlük fide halinde su kültürüne alınan bitkiler 14 gün boyunca bu ortamlarda yetiştirilmiş ve sonrasında analiz edilmiştir.

Hidroponik sistemler düzgün yönetildiğinde toprakta yetiştirmeye göre, köklere optimum su ve besin beslenmesini sağlayarak bitki büyümesini, verimini ve kaynak kullanım etkinliğini artırmaktadır (Savvas vd. 2013; Paradiso vd. 2014b). Uzaydaki CELSS'de (kontrollü ekolojik yaşam destek sistemi) kullanımlarını düşünerek, bitki üretimini kontrollü ortam altında karakterize etmeyi amaçlayan çalışmaların çoğunda devir-daimli hidroponik sistemler kullanılmaktadır (Wheeler ve Sager 2003). Makarnalık buğday, ekmeklik buğday, patates ve soya tohumlarının yüksek besin değeri nedeniyle CELSS için aday ürünler olarak seçilmiştir (Palermo vd. 2012). Bitki performansını en üst düzeye çıkarmak seçilen kritik bitkiler için, CELSS için en uygun çeşit, en uygun sistem kısa büyüme döngüsü, yüksek hasat indeksi, bitki başına toplam

biyokütle, biyotik ve abiyotik streslere iyi tolerans göstermek gibi kriterlere göre seleksiyon yapmıştır (De Micco vd. 2012).

Palermo vd. (2012) hidroponik kültürde soya üretimi, besin içeriği ve kalitesi üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Hidroponik yetiştirme ortamı soya büyük ve verimli topraklarda uygulanmasının uygun olmadığını fakat hidroponik soya yetiştiriciliği olumsuz çevre koşullarında protein ve yağ içeriğinin etkilenmemesi için uygulanabilir bir sistemdir. Bu çalışmada hidroponik sistemde yetiştirilen ve normal açık alanda toprakta yetiştirilen dört çeşit soya tohumu, soya sütü ve küspesi bileşimleri arasındaki farkları araştırmışlardır. Su kültüründe yetiştirilen bitki tohumlarının yağ içeriği (17.37'den 21.94 g/100 g kuru madde), toplam besinsel lif (21.67'den 28.46 g/100 g kuru madde) artmış fakat soya izoflavonların (17.04'den 7.66 mg/kg) miktarı düşmüştür. Protein miktarı açısından bir fark bulunmamıştır. Tohum bileşiminde bulunan farklılıklar ilgili soya küspesi ürünlerinde doğrulanmıştır. Yetiştirme sisteminin farklılığı soya sütü bileşimi bakımından bir fark tespit edilememiştir. Yapılan çalışma hidroponik yetiştiriciliğin, soya tohumlarının yağ ve diyet lifi açısından beslenme kalitesini iyileştirdiğini göstermiştir.

Paradiso vd. (2014) soyanın biyolojik yaşam destek sistemlerinde (BLSS) hidroponik yetiştirme için avrupa uzay ajansı (ESA) mikro-ekolojik yaşam destek sistemi alternatifi (MELİSSA) projesinde seçilen bitki türlerinden biri olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmanın amacı, iki hidroponik sistemde Besin Film Tekniği (NFT) ve kayayünü üzerine ekiminde besin çözeltisi nitrat ve üre etkilerini değerlendirmektir. Hidroponik sistemde taş yünü üzerinde yetiştirme NFT'ye kıyasla tohumların besin içeriğini etkilemeden kök nodülasyonunu, bitki büyümesini ve verimini pozitif olarak etkilemiştir.

Tripathi vd. (2015) hidroponik sistem kullanarak soyada su stresini anlamak üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Su stresi gibi çevresel koşullardaki zararlı değişiklikler, bitkilere fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler getirerek ürün kaybına neden olduğunu belirtmişlerdir. Hidroponik sistemde büyüyen bitkilerin, bazı tarla koşullarını temsil etmediği için bazı araştırmacılar için sorgulanabilmektedir. Bitkiler tarafından su stres toleransı için potansiyel adayları belirlemek amacıyla sistem analizlerimiz için karmaşıklığı ve değişkenleri azaltan sistem olan hidroponik sistem kullanılmıştır. Açık alan koşullarının ve büyüme odalarının karmaşıklığının ve değişkenlerin çok olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle, hidroponik gibi karmaşıklığı azaltan bir sistem kullanmak, sorunu çözmelerine tamamen yardımcı olmasa bile, bizi doğru adaylara yönlendirebileceğini belirtmişlerdir. Hidroponik sistemle değişken sayılarının oldukça azaltılmışlar ve denemenin doğrulunu artırdıklarını söylemişlerdir.

Suematsu vd. (2017) 162 soya genotipinde fide aşamasında hipoksi durumu altında kök gelişiminde fenotipik varyasyon üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Soya fide aşamasında su basmasının neden olduğu hipoksi yani köklerde yetersiz oksijen olması nedeniyle sıklıkla zarar görmektedir. Hipoksi kök gelişimini ciddi şekilde engeller ve bitki büyümesini yavaşlatır. 162 genotip kök gelişimi hidroponik kültürde hızlı ve homojen şekilde testlenerek seleksiyonu yapılmıştır.

Lebreton vd. (2018) soyada *phytophthora sojae* karşı dikey ve yatay direnci testlemek amacıyla için basit bir hidroponik sistem geliştirmek üzerine bir çalışma yapmışlardır. Soya çeşitlerinde kısmi veya yatay direnç testi yapılırken, bir çeşidin tam direnç modelini oluşturmak için ek fenotipleme yöntemleri gerekmekte olduğunu belirtmişlerdir. Bazı araştırmacılar bu fikri tarla testleri ile desteklemektedir (McBlain vd. 1991), ancak daha yaygın bir yöntem bir serada yapılan aşı katmanı testi olarak olmaktadır (Dorrance vd. 2008). Açık tarla testleri oldukça değişkendir ve aynı koşullarla testleme yapılması oldukça zordur, fakat sera kşullarında daha fazla parametre kontrol edilebilmektedir. Çalışmada bitkiler su kültüründe yetiştirilmiş ve patojen su kültürü aracılığıyla verilmiştir. Bu sayede tüm bitkiler homojen şekilde patojene maruz kalarak daha doğru ve net bir testleme yaptıklarını belirtmişlerdir.

Sankhalkar vd. (2019), son yıllarda hidroponik bitki yetiştirmek için yeni bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır. Daha az yer gerektirmekte, etrafa yeşillik eklemekte, iç mekânlarda ve açık alanlarda kolayca uygulanabilmektedir. Hidroponik sistemlerin başarılı şekilde uygulanmasına rağmen, yetiştirilen bitkinin fizyolojisi ve biyokimyası üzerinde çok fazla çalışma yapılmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada toprak ortamında ve topraksız ortamda yetiştirilen sebze bitkilerinde (bezelye, bamya ve maş fasulyesi) bağıl su içeriği (RWC), kök filiz oranı, klorofil içeriği, şeker ve protein miktarı gibi fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalar yapmışlardır. Hidroponik sistemde yetiştirilen bitkilerde toprağa göre daha yüksek kök oranı bulunmuştur. Bağıl su içeriğinde (RWC) küçük bir varyasyon gözlemlenmiştir. Topraksız kültürde yetiştirilen bamya ve maş fasulyesi bitkilerinde klorofil içeriği daha yüksek bulunmuştur. Toprakta yetiştirilen bamya ve maş fasulyesi fidelerinde toplam şeker ve protein içeriği topraksız olarak yetiştirilenlere göre biraz daha yüksek bulunmuştur. Topraksız yetiştirilen bitkilerin fizyolojisi, toprakların verimli olmadığı alanlarda veya tarımın kısıtlandığı topraklarda bitki yetiştirmek için alternatif bir teknoloji olduğu belirtmişler ve daha fazla araştırma çalışması gerektiğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Mutasyon uygulanan Arısoy çeşidinin özellikleri

EMS uygulayarak herbisitlere dayanıklı çeşit geliştirmek için ülkemizde en çok ekim alanına sahip olan tohumlardan biri olan Arısoy çeşidi seçilmiştir. Yüksek verime sahip olan bu çeşit yetiştirme periyodu olarak orta erkenci grupta yer almaktadır. Çukurova, Ege ve Güneydoğu Anadolu'da ana ürün ve ikinci ürün ekimlerine, Karadeniz ve İç Anadolu Bölgeleri'nde ana ürün ekimlerine uygundur. Kuvvetli yeşil aksâmı ile stres koşullarına dayanıklıdır. Bu çeşit 3-6 olgunlaşma grubunda yer almaktadır. Çiçek rengi beyaz, açık kahverengi dane ve kıvrıl hilum rengine sahiptir. Bitki boyu ortalama 95-120 cm arasında, bitkide bakla sayısı yaklaşık ortalama 66 adet olmaktadır. Bin dane ağırlığı 140-160 g, birinci üründe 450-550 kg da⁻¹, ikinci üründe 350-450 kg da⁻¹ verim potansiyeline sahiptir. %28-39 protein oranına ve %19-23 yağ oranına sahiptir. Yağ asitleri kompozisyonu ise; %55 linoleik asit, %5.7 linolenik asit, %23.9 oleik asit, %10.9 palmitik asit ve %3.4 stearik asit şeklindedir (Karagül vd. 2011).

3.1.2. Deneme yerinin toprak yapısı ve iklim değerleri

M₁ ve M₂ popülasyonu Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümüne ait deneme alanında açık tarla koşullarında 2018 ve 2019 yılı yaz sezonunda yetiştirilmiştir. Deneme arazisi denizden yüksekliği yaklaşık 51 m olup, 36° 52' Kuzey enlemi ve 30° 44' Doğu boylamında yer almaktadır.

Deneme arazisi toprağının fiziksel ve kimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.1). Toprak analiz sonuçlarından anlaşılabileceği üzere toprağın pH'sı 7.96 ile alkali toprak sınıfına girmektedir. Kireç değeri %26.5 olup oldukça yüksek kireç içermektedir. Arazinin toprak yapısı kumlu killi tınlı yapıdadır. Organik madde ve tuzluluk bakımından düşük olup soya yetiştiriciliği için elverişlidir.

Akdeniz Üniversitesi 18955 numaralı Meteoroloji İstasyonundan alınan 2018 ve 2019 yetiştirme sezonu meteorolojik verileri Çizelge 3.2.'de verilmiştir. 2018 yetiştirme periyoduna baktığımız zaman en yüksek ortalama sıcaklık temmuz ayında gözlemlenmiş, ağustos ve eylül ayları da temmuza yakın sıcaklıklarda seyretmiştir. En düşük sıcaklıkta mayıs ayında kaydedilmiş ve haziranda bu değerlere yakın ortalamada geçmiştir. Ortalama nispi nem miktarı en yüksek haziran ayında görülmüş ve bunu sırasıyla mayıs ağustos ayları takip etmiştir. 2019 yılında ise iklim değerlerinde çok aşırı bir farklılık görülmemiştir. 2019 yılında en yüksek sıcaklık ağustos ayında görülmüş ve temmuz ayı bu sıcaklık değerine çok yakın seyretmiştir. En düşük sıcaklık ise mayıs ayında kaydedilmiştir. Ortalama nispi nem bu yetiştirme periyodunda en yüksek değer haziran ayında ölçülürken, en düşük nispi nem ise ağustos ayında görülmüştür. 2018 yılında en fazla toplam yağış mayıs ayında olurken, en düşük ağustos ayında gerçekleşmiştir. 2019 yılında en fazla yağış haziran ayında olurken, en düşük yağışta temmuz ayında gerçekleşmiştir.

Çizelge 3.1. Deneme arazisinin toprak analiz sonuçları

Ölçülen Parametreler	Bulunan değerler	Değerlendirme
pH	7.96	Alkali
E.C (mS/cm)	0.93	Tuzluluk tehlikesi yok
CaCO ₃ (%)	26.5	Aşırı kireçli
Kum (%)	45.08	
Kil (%)	31.28	
Silt (%)	23.64	
Bünye		Kumlu-Killi-Tınlı
Organik Madde (%)	1.87	Düşük
Toplam N (%)	0.106	Orta
P (ppm)	9.37	Yeterli
K (meq / 100 g)	0.61	İyi
Na (meq / 100 g)	0.15	Düşük
Ca (meq / 100 g)	37.71	İyi
Mg (meq / 100 g)	7.12	İyi
Fe (ppm)	3.56	Noksanlık gösterebilir
Zn (ppm)	0.746	Noksanlık gösterebilir
Mn (ppm)	23.156	Yeterli
Cu (ppm)	1.368	Yeterli

Çizelge 3.2. 2018 ve 2019 yılı yetiştirme sezonu meteorolojik verileri

Aylar	Ortalama Sıcaklık (°C)		Ortalama Nispi Nem (%)		Toplam yağış (mm)	
	2018	2019	2018	2019	2018	2019
Mayıs	23.4	21.4	64.5	67.6	49.5	8.7
Haziran	25.8	25.8	70.7	67.7	25.4	22.2
Temmuz	29.8	29.1	58.8	53.8	0.2	0.0
Ağustos	29.3	30.2	61.6	51.2	0.0	0.2
Eylül	27.4	26.3	52.4	60.3	15.8	3.5
Ort./ Toplam	27.1	26.6	61.6	60.1	90.9	34.6

3.1.3. Uygulanan herbisitın etken maddesi ve özellikleri

Doğal kimya firmasına ait klorosulforon etken maddeli Hammer10 WP isimli herbisit kullanılmıştır. Etki mekanizmasına göre Grup B,2 olarak sınıflandırılmış bir herbisittir. Ruhsatlı olduğu ürün grubu, etki ettiği yabancı otlar, uygulama dozu ve dönemi Çizelge 3.3.'de verilmiştir. Herbisit kökler ve yeşil aksam yoluyla yabancı otlar tarafından bünyelerine alınmaktadır. Hassas yabancı otların büyümesi uygulamadan kısa bir süre sonra durmaktadır. Ancak ölüm belirtileri, büyüme şartlarına, yabancı otların hassasiyetlerine bağlı olarak uygulamadan 1-3 hafta sonra görülmektedir. Uygulamadan sonraki sıcak ve nemli şartlar bitki koruma ürününün etkisini hızlandırmakta, soğuk ve kurak şartlar ise etkisini geciktirmektedir.

Çizelge 3.3. Klorosulforon etken maddeli herbisitın kullanılabileceği ürün grubu ve etki ettiği yabancı ot grubu uygulama dozu ve dönemi

Bitki adı	Yabancı ot adı	Latince ismi	Uygulama dozu ve dönemi
Buğday	Tilkikuyruğu	<i>Alopecurus myosuroides</i>	7.5 g da ⁻¹
	Tarla köpek papatyası	<i>Anthemis arvensis</i>	
	Püsküllü çayır	<i>Bromus tectorum</i>	Çıkış öncesi
	İnce delice	<i>Lolium rigidum</i>	
	Kısa başaklı kuşyemi	<i>Phalaris brachystachys</i>	
	Tavşanbıyığı	<i>Poa annua</i>	
	Süpürge otu	<i>Sisymbrium altissimum</i>	
	Kokar ot	<i>Bifora radians</i>	
	Yavşan otu	<i>Veronica arvensis</i>	
Arpa	Kanarya otu	<i>Senecio vulgaris</i>	7.5 g da ⁻¹
	Yabani hardal	<i>Sinapis arvensis</i>	
	Kokar ot	<i>Bifora radians</i>	
Yulaf	Köy göçüren	<i>Cirsium arvense</i>	Çıkış sonrası
	Süpürge otu	<i>Sisymbrium altissimum</i>	
Çavdar	Yapışkan otu	<i>Galium tricornutum</i>	
	Yabani hardal	<i>Sinapis arvensis</i>	7.5 g da ⁻¹
Tritikale	Yavşan otu	<i>Veronica arvensis</i>	
	Yabani tere	<i>Cardaria draba</i>	
Tritikale	Papatya	<i>Matricaria chamomilla</i>	7.5 g da ⁻¹
	Sarmaşık çobandeğneği	<i>Polygonum convolvulus</i>	
	Yumrulu jeranyum	<i>Geranium tuberosum</i>	

Bu SU grubu herbisit stres altındaki bitkiye uygulanması tavsiye edilmemektedir. Tavsiye edildiği şekilde kullanıldığında tek yıllık pek çok geniş yapraklı otu kontrol etmektedir. Birçok iki yıllık ve bazı çok yıllık yabancı otlar da kontrol edilmekte veya baskı altında tutulmaktadır. Hububat-nadas-hububat veya hububat-hububat ekim nöbetlerinin uygulandığı alanlarda tavsiye edilir. Münavebe bitkilerinde özellikle Brassica türleri ve şekerpancarında fitotoksik olabilir (Doğal kimya 2019).

Çıkış Öncesi Uygulama: Tatbikat üniform olarak buğday ekiminden sonra 3-4 gün içinde yapılmalıdır. Genel olarak ilkbaharda çıkış yapan geniş yapraklı yabancı otları kontrol etmek için ikinci bir tatbikata gerek yoktur.

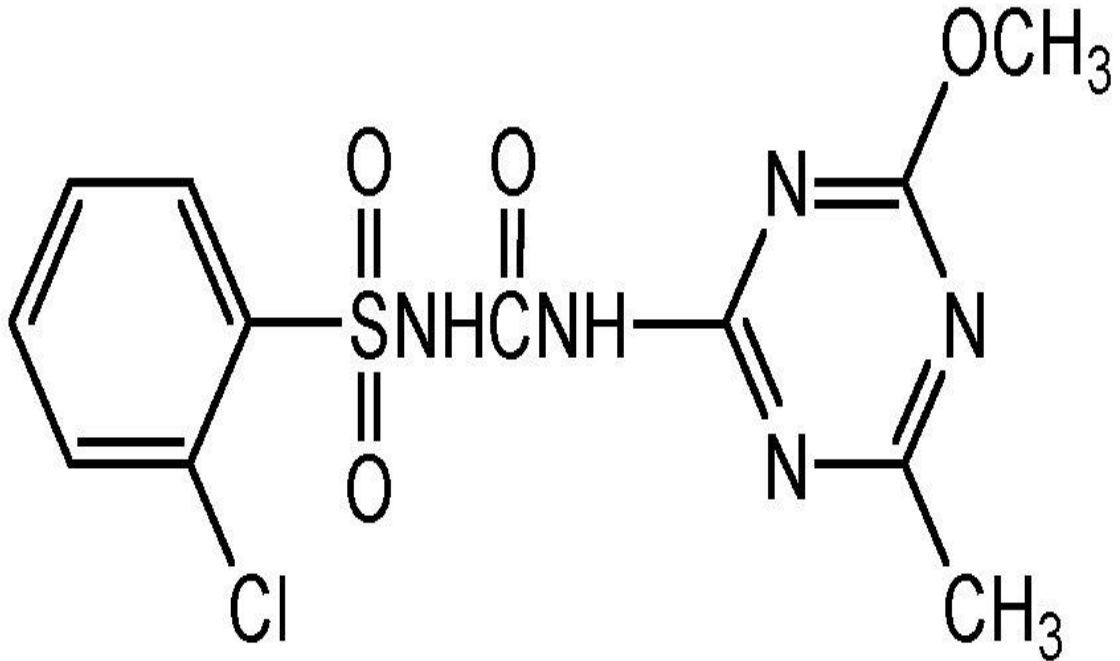
Çıkış Sonrası Uygulama: Tatbikat hububatın 2-3 yapraklı devresinden kın devresine kadar olan dönem içinde herhangi bir zamanda yapılabilir. Genç (5 cm çap veya yüksekliğe erişmemiş) ve aktif olarak büyümekte olan yabancı otlara tatbik edildiğinde daha iyi netice alınmaktadır (Doğal Kimya 2019).

Aktif madde: %10 klorsülfuron

Formülasyon: Islanabilir Toz (WP)

Kimyasal formülü: C₁₂H₁₂ClN₅O₄S

Açık formülü: 2-Chloro-N-[[[4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)amino]carbonyl] benzenesulfonamide



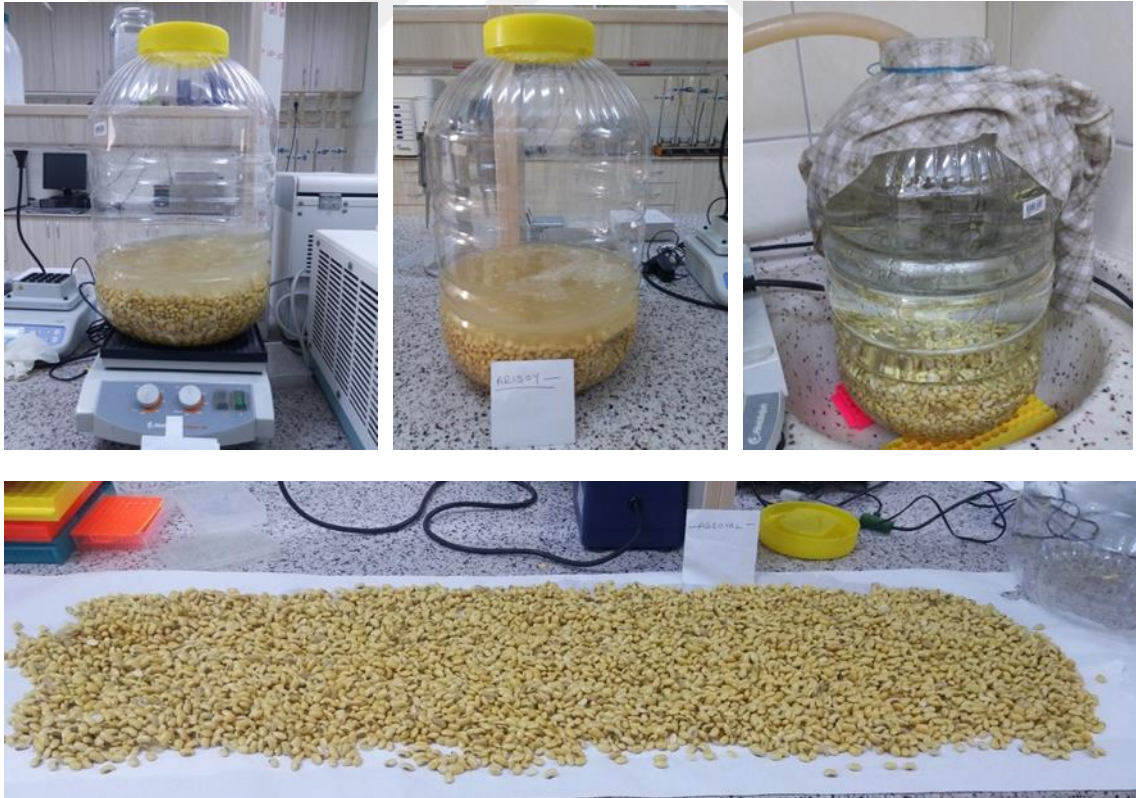
Şekil 3.1. Klorosulforon kimyasal yapısı

3.2. Metot

3.2.1. EMS uygulaması ve M₁ bitkilerinin ekimi

Bu doktora tez çalışmasında 2017 yılında bir defa, 2018 yılında üç defa olmak üzere toplamda dört defa mutasyon uygulaması yapılmıştır. Mutagen olarak Sigma Aldrich kimyadan M0880-25 ürün koduyla temin edilen Etil Metan Sülfanat (EMS - moleküler formülü: $C_3H_8O_3S$, Cas Numarası: 62-50-0) kullanılmıştır. Gelen EMS paketleri 25 g ve kimyasal yoğunluğu 20°C’de 1.206 g ml^{-1} ’dir. 25 g sıvı olarak 20.0 ml’dir. %0.5 EMS solüsyonu için 40 ml EMS ve 7960 ml su konarak hazırlanmıştır. %0.1 EMS solüsyonu için ise 10 ml EMS solüsyonu 9990 ml su konarak hazırlanmıştır.

Agroyal ve Arısoy çeşitlerinden çimlenme kabiliyeti iyi olan 10.000’er adet tohum sayılarak hazırlanmıştır. Daha önceki yapılan çalışmalar doğrultusunda aşağıdaki EMS oranı ve prosedür uygulanmıştır. Daha sonra Etil Metan Sülfonat (EMS) uygulanmadan önce 2 saat normal suda bekletilerek tohumlar doymun hale getirilmiştir. Ardından 9 saat boyunca her iki çeşitte %0.5 oranında EMS solüsyonunda tohumların eşit kimyasala maruz kalması amacıyla otomatik ayarlı karıştırıcı üzerinde bekletilmiştir. Ardından akan suda 3 saat yıkanarak kâğıt havlu üzerine serilerek biraz suyunun gitmesi sağlanmıştır (Şekil 3.2). Daha sonra ekim için hazır hale getirilen tohumlar 22 Mayıs 2017 tarihinde Muğla ilinin Fethiye ilçesinin Bekçiler köyüne ekimi yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. 2017 yılına ait EMS uygulaması çalışmaları



Şekil 3.3. 2017 yılına ait EMS uygulanmış tohumların ekimi

2017 yılında Fethiye yöresine ekilen EMS uygulanmış tohumlardan ve ekilen kontrol gruplarından beklenilenin altında bitki çıkışı ve çok az tohum elde edilmiştir. Rakımın yüksek olması ve iklimsel değerlerin Antalya yöresine kıyasla farklı olması sebebiyle istenilen oranda tohum alınamamıştır.

Bunun üzerine 2018 yılında tekrar Agroyal ve Arısoy çeşitlerinden çimlenme kabiliyeti iyi olan 10.000'er adet tohum sayılarak hazırlanmıştır. Daha sonra geçtiğimiz yıldaki gibi Etil Metan Sülfonat (EMS) uygulanmadan önce 2 saat normal suda bekletilerek tohumlar doygun hale getirilmiştir. Daha sonra 9 saat boyunca her iki çeşitte %0.5 oranında EMS solüsyonunda belirli bir hızda çalkalan bir cihaz üzerinde tutulmuştur. Ardından akan suda 3 saat yıkanarak ekim için hazır hale getirilen tohumlar 24 Mayıs 2018 tarihinde Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (BATEM) Aksu deneme arazisine ekilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. 2018 yılı ilk EMS uygulaması ve tohumların araziye ekimi

2018 yılının birinci ekiminden sonra bitki çıkışları gözlemlenmiş ve çimlenme oranı çok az seviyelerde kalmıştır. Pozitif kontrol olarak EMS uygulanmamış olan soya tohumlarında da çimlenme oranı %10 seviyesinin altında kalmıştır. Bu yüzden ikinci bir ekim yapılması için aynı şekilde hazırlıklar yapılmıştır. Bu kez Umut ve Arısoy çeşitlerine aynı aşamalardan geçirilerek doz düşürülerek %0.1 oranında EMS ile muamele edilmiştir. 4 Temmuz 2018 tarihinde ikinci kez aynı yere ekim yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. 2018 yılına ait 2. EMS uygulaması, tarlaya ekilerek ardından damlama sulama sistemi kurulması

2018 yılının ikinci ekiminden 10 gün sonra hem pozitif kontroller hem de EMS uygulanmış soya tohumlarının çıkışları gözlemlenmiş ve çimlenme oranı düşük seviyelerde kalmıştır. Daha sonra hem tohumların azalmasından kaynaklı hem de EMS kimyasalının azalmasından dolayı Arısoy çeşidine ait yaklaşık 10.000 tohuma %0,1 üçüncü bir EMS uygulaması yapılmıştır. 2018 yılında üçüncü kez EMS uygulaması yapılmasının ardından deneme arazisi değiştirilerek Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Deneme arazisine 14 Temmuz 2018 de ekim yapılmıştır. Ekimden 7 gün sonra çimlenmeler görülmüştür (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. 2018 yılına ait 3. EMS uygulaması ve tohumların çimlenmesi

3.2.2. M₁ bitkilerinin yetiştirilmesi ve tek bitki hasadı

EMS uygulanmış tohumlar ve yanında pozitif kontrol amacıyla uygulama yapılmayan tohumlar açık tarlaya ekilmeden önce Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Deneme arazisi hazırlığı yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda yabancı ot çıkışını azaltmak için derin şekilde pullukla sürülmüştür. Daha sonra diskaro çekilerek tarla ekim için hazır hale getirilmiştir. 5'er metrelik uzunluktan ve 24 sıradan oluşan 4 blok oluşturulmuştur. Kenar ikişer sıraya pozitif kontrol amacıyla kimyasal uygulanmamış tohumlar ekilmiştir. EMS uygulanan yaklaşık 10.000 adet tohum ise orta 20'şer sıraya, sıra arası 70 cm ve sıra üzeri 3 cm olacak şekilde ekilmiştir. Ekim işleminden sonra damlama sistemi kurulmuş ve bitki su stresine sokulmadan düzenli aralıklarla sulanmıştır (Şekil 3.6). Bitkilerin çıkışından itibaren yabancı ot mücadelesi kültürel olarak yapılmıştır. EMS uygulaması sonrasında çimlenen bitkiler ideal koşullarda ve hastalıklardan arı şekilde yetiştirilmiş ve hasat olgunluğuna getirilmiştir.



Şekil 3.7. M₁ bitkilerin deneme arazisine ekilmesi ve yetiştirilmesi

Bitkilerin farklı zamanlarda olgunlaşması sebebiyle Eylül – Ekim 2018 aralığında 4150 bitki tek tek hasad edilmiş ve ayrı ayrı zarflara konmuştur. Daha sonra Her zarf ayrı ayrı kabukları kırılmış aynı şekilde zarflara konup paketlenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. M₁ bitkilerin tek tek hasat edilmesi ve ayrı ayrı zarflara konulması

3.2.3. Herbisit etkili dozunun belirlenmesi

Herbisit için en etkin dozu belirlemek için Arısoy çeşidinin 3 adet (5x9=45) viyole ekimi yapılmıştır. Daha sonra her viyolden 3'er sıraya farklı dozda herbisit uygulanmıştır. Sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 100 ppm dozlar ayarlanarak bitkilere uygulanmış ve uygulama sonucunda en uygun doz belirlenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Herbisit dozunun belirlenmesi

3.2.4. Hidroponik (durgun su kültürü) sistemin oluşturulması

Hidroponik (su kültürü) çalışmaları Akdeniz Üniversitesi Tohumculuk ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezine ait cam serada gerçekleştirilmiştir. Bitkileri yetiştirmek için 80x50x40 (boy x en x yükseklik) cm ölçülerinde 120 litre hacme sahip 6 adet şeffaf plastik kaplar hazırlanmıştır. Bitkileri su yüzünde tutmak amacıyla 70x50cm, 65mm kalınlığında hazır olarak bulunan 216'lık ve 117'lik fide yetiştirme straforları kullanılmıştır. Geliştirilen bu sistemle 4 adet 216'lık ve 2 adet 117'lik fide viyolleri konularak tek seferde 1098 ($216 \times 4 = 864$; $117 \times 2 = 234$) ayrı genotipi testleyebilecek bir sistem oluşturulmuştur (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Hidroponik sistemin ve besin solüsyonun hazırlanışı

Denemede kullanılan besin solüsyonu birçok bitki içinde uygun olan Hoagland ve Arnon (1950) tarafından hazırlanan besin solüsyonu kullanılmış ve araştırmacıların belirttiği şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.4).

Su kültüründe besi yerinin oksijeni sağlanması için hava motoru ve hava taşı kullanılmıştır. Bu amaçla besin solüsyonlarına oksijen kazandırmak için akvaryum hava motoruna bağlanan hortumların ucuna hava taşı bağlanarak solüsyon tanklarının içerisinde bırakılmıştır. Hava taşlarının ağırlığı ile tankın dibine inmekte oradan bitki besin solüsyonuna sürekli olarak O_2 verilmiştir. Böylece bitkilerin besi ortamında yeterli bulunması ve bitkinin kolaylıkla O_2 alması sağlanmıştır. Solüsyonun hazırlandıktan sonra pH'sı 6.0–6.5 ve EC'si $1.5-1.7 \text{ mScm}^{-1}$ civarında ayarlanmıştır. Yetiştirme periyodu boyunca haftalık pH ve EC değerleri kontrol edilmiştir. Artış veya azalışlarda gerekli işlemler yapılarak bitkinin her hangi bir strese girmeden büyüme ve gelişimi sağlanmıştır.

Çizelge 3.4. Hoagland Besin solüsyonu içeriği

Element	Konsantrasyon(mg/l)
Azot (N)	210
Fosfor (P)	31
Potasyum (K)	234
Magnezyum (Mg)	48
Kalsiyum (Ca)	200
Kükürt (S)	64
Demir (Fe)	2,5
Mangan (Mn)	0,5
Bor (B)	0,5
Bakır (Cu)	0,02
Çinko (Zn)	0,05
Molibden (Mo)	0,01

Tohum çimlenmesi için uygun nemli ortamı sağlamak amacıyla tohumlar kaya yününe sarılarak viyollere konulmuştur. Yetiştirme ortamında uygun besin elementlerini solüsyonu hazırlanarak ve optimum oksijen, pH, EC değerleri sağlanarak bitkinin ideal olarak yetişmesi sağlanmıştır. Hidroponik sistemde bitkiler toprak koşullarına göre çok daha hızlı gelişmektedir. Aynı zamanda az bir alandan birçok bitkiyi testleme imkânı sunmaktadır. Herbisitin su kültürüne ilave edilmesinden dolayı her bitki eşit oranda herbisite maruz kalmakta ve daha homojen ve sağlıklı bir testleme yapılmaktadır (Şekil 3.11). Böyle arazi koşullarında homojen olmayan ilaçlama problemlerinin etkisini en aza indirmektedir.

M₂ generasyonuna ait farklı bitkilerin tohumları su kültüründe ekimden sonra yaklaşık 14 gün sonra ilaçlama için uygun büyüklüğe ulaşmaktadır. Kış dönemi olduğu için herbisit ilaçlaması için ideal şartların oluşması beklenmiştir. Herbisit ilaçlamaları güneşli günlerde ve ikindi vakitlerinde atılmıştır. Böylece herbisit etkinliğinin maksimum olduğu şartlar sağlanmaya çalışılmıştır. Uygun şartlar oluşunca daha önce belirlenen 30 ppm dozda klorosulforon etken maddeli herbisit ile ilaçlanmıştır (Şekil 3.12). İlaçlamadan sonra iklim koşullarına bağlı olarak yaklaşık 14-21 gün arasında herbisit zararı ortaya çıkmaya başlamaktadır.



Şekil 3.11. Hidroponik sistemde bitkilerin yetiştirilmesi



Şekil 3.12. Su kültüründe bitkilere herbisit uygulaması

Su kültüründe testleme sonucunda dayanıklı ve toleranslı gözlemlenen bitkiler daha sonra saksılara şaşırtılarak tohum alınması yoluna gidilmiştir. Saksılarda yetiştirme ortamı için perlit ve torf karışımı hazırlanmış ve bitkilerin yetişmesi için uygun ortam hazırlanmıştır. Yine bu saksıların yetişmesi için sera içerisinde küçük bir sera daha kurulmuş ve elektrikli ısıtıcı ile soğuk geçen dönemler ısıtma sağlanarak bitkilerin gelişimini tamamlaması sağlanmıştır (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Su kültüründen saksıya aktarılan bitkilerin yetiştirilmesi

3.2.5. M₂ bitkilerin tarlaya ekilmesi ve herbisit uygulaması

2018 yılında eylül ekim döneminde 4150 adet M₁ bitkisi tek bitki yöntemine göre hasat edilmiştir. Bitkilerden elde edilen soya baklaları tek tek hasat edilmiş. Daha sonra öğrenciler yardımıyla tüm zarflar çıkarılmış ve tek tek kapsülleri kırılarak harman edilmiştir. 2019 bahar döneminde 4150 bitkiden elde edilen yaklaşık 300.000 adet tohum bulk edilmiş ve ekim için hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan M₂ tohumları 15 Mayıs 2019 tarihinde Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Deneme Arazisine ekilmiştir. Ekimden sonra damlama sistemi kurulmuş ve belli aralıklar bitkiler sulanmıştır. Yaklaşık 40 gün sonra bitkiler herbisit uygulama dönemine gelmiştir (Şekil 3.14).

Herbisit üzerinde tavsiye edilen doz 7.5 g da⁻¹ olarak belirtilmiştir. 1200 m² alan için (7.5x1.2 =9) 9 g tavsiye edilirken ilaçlama için 400 litre olan su tankına 12 g herbisit konulmuştur. Tavsiye edilen dozun %25 fazlası atılmıştır. 24 Haziran 2019 tarihinde konsatrasyonu 30 ppm olacak şekilde ayarlanmış ve traktörlü pülverizatör yardımıyla ilaçlanmıştır (Şekil 3.15).



Şekil 3.14. M₂ bitkilerinin ekilmesi ve yetiştirilmesi



Şekil 3.15. M₂ bitkilerine herbisit uygulaması

3.3.1. Dayanıklı bitkilerin DNA analizi

Araziye ekimi yapılan M₂ bitkilerinde dayanıklı gözlemlenen hatlar hidroponik sistemde konfirmasyon testlemelerine alınmıştır. Bu testlemede dayanıklı olduğu belirlenen bitkilerden DNA izolasyonu için yaprak örneği alınmıştır. DNA izolasyonu için Doyle ve Doyle (1990) tarafından geliştirilen CTAB metodu kullanılmıştır

CTAB metoduna göre (Doyle ve Doyle 1990);

1. DNA analizi için örnekler hidroponik sistemde yetiştirilen ve ilaçlama sonrası ayakta kalan bitkilerin genç yapraklarından alınmıştır. 1.5 ml'lik eppendorf tüplere yaklaşık 0.1 g genç yapraklardan alınarak tüplerin içerisine konmuştur. Yaprak örneğinin alındığı her bir tüp üzerine bitkinin sıra numarası ve EMS dozu asetat kalem ile yazılmıştır. Laboratuvarda tüp içerisindeki yaprak örneğinin üstüne 0.5 ml içerisinde binde 5 oranında merkapetanol bulunan CTAB (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, %2 CTAB) tampon çözeltisi ilave edilmiştir.

2. Hazırlanan çözelti içerisindeki yaprak örnekleri plastik pistiller yardımıyla iyice ezilmiştir. DNA kontaminasyonu önleme amacıyla her örnek için farklı pistil çubuk kullanılmıştır.

3. İyice ezilen örnekler daha sonra önceden sıcaklığı 65 °C'ye ayarlanmış olan su banyosunda 3 saat inkübasyona bırakılmış ve her 15 dakikada bir çökmesini engellemek amacıyla hafifçe çalkalanmıştır.

4. 3 saat inkübasyonda kaldıktan sonra çözeltinin içerisinde bulunan proteinlerinin uzaklaştırılması amacıyla 600 µl kloroform-izoamil alkol (24:1) çözeltisi eppendorf tüplere ilave edilmiştir. Ardından tüplerin ağızları kapatılarak oda koşullarında 5 dakika boyunca hassas ve dikkatli şekilde çalkalanmıştır.

5. Çalkalama işleminin ardından eppendorf tüp içerisindeki örnekler 20 dakika boyunca 14.000 rpm devrinde santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası eppendorf tüplerin içerisinde alt ve üst faz gözlemlenmiştir. Alt kısmındaki fazda kloroform ve proteinler üst kısımdaki fazda ise DNA'nın bulunduğu sıvı bulunmaktadır. Eppendorf tüpün içerisindeki üst kısımdan alt faza dokunmadan alabildiğimiz kadar sıvı alınıp yeni steril 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarılmıştır (yaklaşık 300 µl). Daha temiz DNA elde

etmek için aldığımız üst faz kadar kloroform-izoamil alkol (24:1) konularak bu basamak tekrarlanmıştır. İkinci tekrardan sonra yeni steril eppendorf tüplere 200 µl üst faz çekilip konmuştur.

6. Örneklerin alınan üst fazı kadar -20 °C’de bekletilen soğuk izoproponal ilave edilmiştir. Eppendorf tüplerinin ağızları iyice kapatılarak hassas şekilde çalkalanmıştır. DNA’nın daha iyi çökmesi amacıyla hazırlanan izoproponalli çözelti 1 gece -20 °C’de bekletilmiştir.

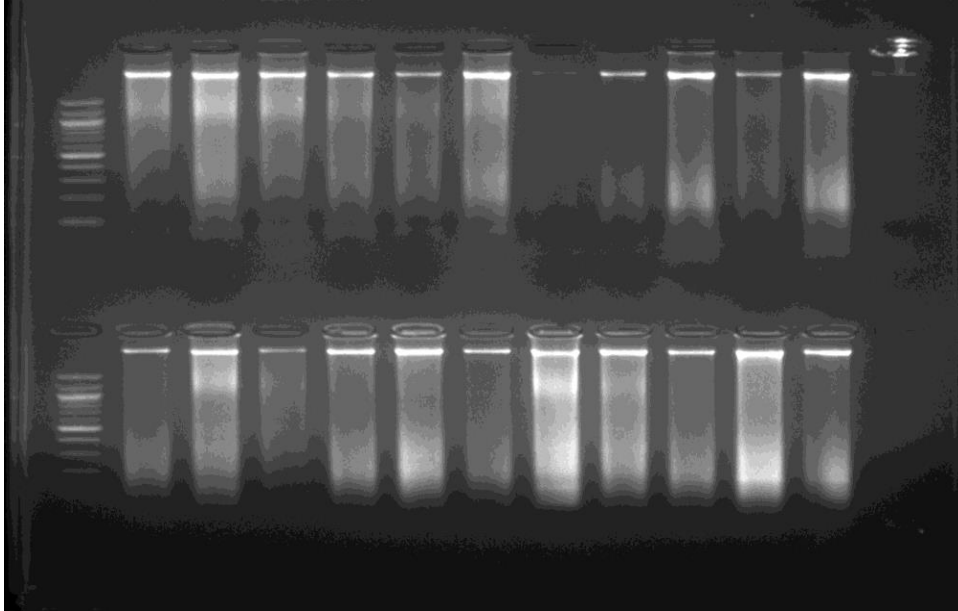
7. Bir gece bekletilen örnekler -20 °C’den alınmış ve 14.000 rpm devirde 20 dakika boyunca santrifüj edilerek DNA’nın tüpün dibine çökmesi sağlanmıştır.

8. Santrifüj işlemi sonrasında eppendorf tüplerin dibinde pelet oluşumu gözlemlenmiştir. Pelet yerinden oynatılmayarak tüpün içerisindeki sıvı dikkatli şekilde boşaltılmıştır ve pelet üzerine -20 °C’de bulunan %70’lik etanolden 300 µl konulmuştur. Eppendorf tüpünün ağzı iyice kapatılarak 14.000 rpm devirde 15 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Daha temiz ve kaliteli DNA elde etmek için bu aşama bir kez daha tekrarlandıktan sonra santrifüj edilen tüplerin dibindeki pelete zarar vermeden sıvılar dikkatlice boşaltılmıştır.

9. Sıvısı boşaltılmış tüpler, içerisindeki etanol damlacıklarının uzaklaştırılması amacıyla ağızları açık ters çevrilmiş vaziyette kurumaya bırakılmıştır.

10. Kuruma aşamasından sonra eppendorf tüp içerisindeki pelet üzerine 150 µl saf su ilave edilmiş ve örnekler +4 °C’de bir gece bekletilmiştir. Daha sonrasında ise DNA’ların bozulmamaları için -20 °C’de saklanmıştır.

DNA izolasyonu yapılan örneklerin DNA kalitelerine bakmak amacı ile her bir bitkiden çıkartılan DNA’lardan 7 µl hacminde alınmış ve 2 µl yükleme boyası ile karıştırılarak %1’lik agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez cihazında 15 dakika boyunca 65 voltta koşturulan örnekler daha sonra ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Dayanıklı bitkiler ait DNA izolasyonu ve agaroz jel görüntüsü

3.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri

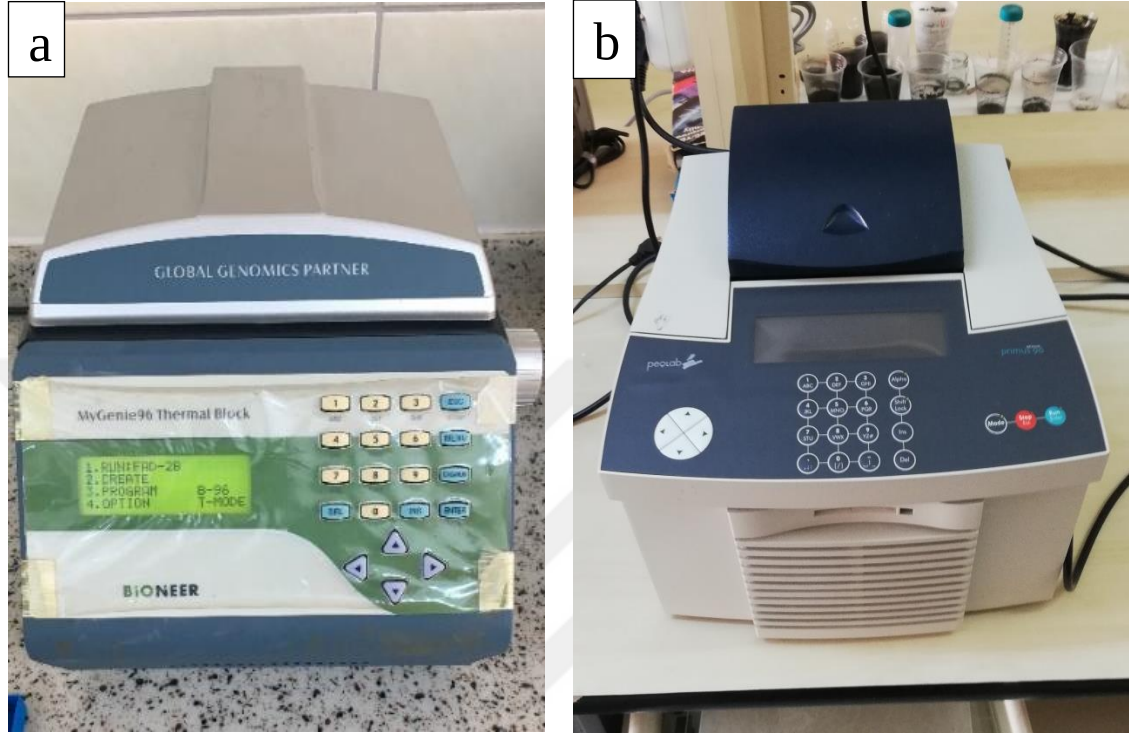
Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR), herhangi bir organizmaya ait DNA'daki istenen bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denaturation, 94–98°C), Sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (annealing, 37–65°C) ve DNA'ya yapışan primerin ile Taq polimeraz yardımıyla DNA zincirinin uzatılması (extention, 72°C) sıcaklık farklılığına dayanan 3 aşamadan oluşmaktadır. PCR koşulları, miktarları ve oranları çalışmadan çalışmaya farklılık göstermektedir.

Şimdiye kadar yapılan birçok çalışmada SU grubu herbisit dayanıklılığını ALS gen bölgesindeki farklı noktalarda meydana gelen nokta mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan primer setleri daha önceden soya bitkisinde yapılan ve ALS gen bölgesini çoğaltan farklı iki çalışmadan alınmış ve optimize edilmiştir. Ghio vd. (2013) ve Walter vd. (2014) tarafından dizayn edilen primer isimleri, baz uzunlukları ve çoğaltıkları ürün büyüklükleri Çizelge 3.5'de verilmiştir

Çizelge 3.5. Tez çalışmasında kullanılan primerler, dizilimi ve ürün büyüklükleri

Ghio vd. (2013) dizayn edilen ALS gen bölgesi primerleri		
Primer	Dizilim (5'-3')	Amplikon (bp)
GmAHAS1-F	ATGGCGGCCACCGCTTC	2041
GmAHAS1-R	ACAGGCCAAATCCTGCAACTAGGAC	2041
GmAHAS4-F	ACCTTTTGGTGCTATTTGAAAATG	2122
GmAHAS4-R	ACATATAATTAACAAAAATAACCAACATTG	2122
Walter vd. (2014) dizayn edilen ALS gen bölgesi primerleri		
Primer	Dizilim (5'-3')	Amplikon (bp)
GM01F	GAAACTCTCCACCGCCTC	2000-2200
GM01R	GATCACTAAGTAACCATTAAGAC	2000-2200
GM13F	ACCTAAGTTAATTCATGAAATGTTTG	2000-2200
GM13R	GCTATATTAGCTTACTATTTTACAAAAC	2000-2200
GM15F	GATCATTAACGTTTTAACGCG	2000-2200
GM15R	TATCTTAGTTGCCAACATGAATAC	2000-2200

PCR uygulamalarında MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler marka PCR cihaz ve PeQlab Primus 25 advanced Thermocycler gradient PCR makinası kullanılmıştır (Şekil 3.17.). ALS gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılacak PCR protokolü için Ghio vd. (2013) ve Walter vd. (2014) tarafından geliştirilen protokoller optimize edilerek en uygun solüsyon miktarları ve PCR koşulları uygulanmıştır (Çizelge 3.6.).



Şekil 3.17. Kullanılan PCR cihazları; **a)** MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler; **b)** PeQlab Primus 25 advanced Thermocycler

Çizelge 3.6. Tez çalışmasında yürütülen PCR protokolü ve solüsyon oranları

GmAHAS1 ve GM01 için PCR şartları			PCR programı		
PCR mix	Miktar	Oran			
10X buffer	4 µl	1/10	95°C	2 dakika	
Forward primer	2,5 µl	10 pmol	95°C	1 dakika	40 Döngü
Reverse primer	2,5 µl	10 pmol	65°C	20 saniye	
Taq DNA polimeraz	0,5 µl	5 Unite	72°C	2 dakika	
dNTP	4 µl	0.5 mM	72°C	5 dakika	
MgCl ₂	5 µl	2.5 mM	4°C	Saklama (∞)	
DNA	5 µl	50 ng			
ddH ₂ O	26,5 µl				
Toplam	50 µl				

Çizelge 3.6.'nın devamı

GmAHAS4 primerleri için PCR şartları			PCR programı		
PCR mix	Miktar	Oran			
10X buffer	5 µl	1/10	95°C	2 dakika	
Forward primer	4 µl	10 pmol	95°C	1 dakika	40 Döngü
Reverse primer	4 µl	10 pmol	63°C	20 saniye	
Taq DNA polimeraz	0,5 µl	5 Unite	72°C	2 dakika	
dNTP	5 µl	0.5 mM	72°C	5 dakika	
MgCl ₂	6 µl	2.5 mM	4°C	Saklama (∞)	
DNA	5 µl	50 ng			
ddH ₂ O	20,5 µl				
Toplam	50 µl				
GM13 ve GM15 primerleri için PCR şartları			PCR programı		
PCR mix	Miktar	Oran			
10X buffer	4 µl	1/10	95°C	2 dakika	
Forward primer	3 µl	10 pmol	95°C	1 dakika	40 Döngü
Reverse primer	3 µl	10 pmol	65°C	20 saniye	
Taq DNA polimeraz	0,5 µl	5 Ünite	72°C	2 dakika	
dNTP	4 µl	0.5 mM	72°C	5 dakika	
MgCl ₂	5 µl	2.5 mM	4°C	Saklama (∞)	
DNA	5 µl	50 ng			
ddH ₂ O	25,5 µl				
Toplam	50 µl				

Elde edilen PCR ürünlerinin görsel olarak incelenmesinde agaroz jel elektroforezinden yararlanılmıştır. Elektroforez işleminde tampon çözeltisi olarak Tris/Borate/EDTA (TBE) kullanılmıştır. Çözelti için 54 g Tris base, 27.5 g borik asit, 40 ml EDTA (0.5 M) kimyasalları kullanılmıştır. Çözeltinin pH 8.3'sı olacak şekilde ve 10x yoğunluğunda hazırlanarak 1.000 ml suda çözdürülmüştür. Bu stok çözeltiden 50 ml alıp saf su ile 1.000 ml'ye tamamlanmış ve böylece elektroforez için 0.5x'lik TBE tamponu hazırlanmıştır.

PCR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenmiş, 1 saat 60 voltta koşturulmuş ve ultraviyole ışık altında görüntülenerek analizleri yapılmıştır. 100ml 0.5X Tris/Borate/EDTA (Tris-Borate-EDTA) buffer ve 2 g agaroz bir beher içerisine ilave edilerek mikrodalga fırında agaroz tamamen çözülünceye kadar ısıtılmıştır. Soğutulduktan sonra 100 ml jel için UV ışık altında görülebilmesini sağlayan 3.5 µl Ethidium Bromide (10 mg/ml) eklenmiş ve homojen bir şekilde jelin içinde karışması

için hafifçe çalkanmıştır. Hazırlanan agaroz jel kalıbına yavaşta dökülmüş ve hava kabarcıkları oluşmuş ise dikkatli şekilde yok edilmiştir. Bu işlemin ardından taraklar konmuş ve jelin donması beklenmiştir.

PCR ürünlerine 2 µl yükleme boyası eklenerek (bromophenylblue) toplamda 10 µl'lik PCR ürün+yükleme boyası jele yüklenmiştir. Elde edilen bantların molekül ağırlıklarının belirlenmesinde üretilen PCR büyüklüğüne göre, marker olarak GeneRuler 1 kb DNA Ladder Plus (MBI Fermentas) kullanılmıştır. Toplam 50 µl olan ürünün geri kalan kısmı sekans için ayrılarak dolaba kaldırılmıştır.



Şekil 3.18. Tezde kullanılan jel görüntüleme sistemleri; **a)** i-MyRun marka elektroforez cihazı; **b)** INGENIUS marka jel görüntüleme cihazı

Elde edilen PCR ürünleri temizlenmiş ve sekans hizmeti BM laboratuvar sistemleri isimli firmaya gönderilmiştir. Daha sonra gelen sekans bilgileri Chromas programı ile açılmış ve analiz edilmiştir. Ardından sekans bilgileri Mega-X programı ile aligment yapılmış ve protein dizilerine dönüştürülmüştür. Protein dizileri analizi de Clustal Omega programı ile yapılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. EMS Uygulamaları ve M₂ Popülasyonu Oluşturma

İlk uygulama 2017 yılında Agroyal ve Arısoy çeşitlerine ait 10.000 %0.5 oranında uygulanmış ve ekimi yapılmıştır. 2017 yılında uygulama yapılan tohumlarda yaklaşık 220 bitkiden tohum alınmış ve ayrı ayrı zarflara konulmuştur (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. 2017 yılı EMS uygulanmış tohumların hasadı

2018 yılında ilk uygulama Agroyal ve Arısoy çeşitlerinden çimlenme kabiliyeti iyi olan 10.000'er adet tohuma uygulanmıştır. Daha sonra uygulama yapılan tohumlar 24 Mayıs 2018 tarihinde Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (BATEM) Aksu deneme arazisine ekilmiştir. Tohumların ekilmesinden sonra damla sistemi kurulmuş ve düzenli aralıklarla sulanmıştır. Ekimden sonra yaklaşık 40 gün bitki çıkışları düzenli aralıklarla gözlemlenmiştir. Sıra kenarlara ekilen EMS uygulaması yapılmayan kontrol grubu dahil, uygulama yapılan Arısoy ve Agroyal çeşitlerinde çıkış oranı çok az seviyelerde kalmıştır. Bunun üzerine vakit kaybetmeden tekrar tohumlar hazırlanmış ve tekrar uygulama yapılmıştır.

2018 yılında ikinci uygulama olarak Umut ve Arısoy çeşitlerine aynı EMS prosedürü uygulanarak ve bu kez doz düşürülerek %0.1 oranında EMS ile muamele edilmiştir. 4 Temmuz 2018 tarihinde ikinci kez aynı deneme yerine ekim yapılmıştır. Yaklaşık düzenli aralıklar gözlemler yapılmış ve çimlenme oranları takip edilmiştir. 10 gün sonunda uygulama yapılmayan tohumlar ve uygulama yapılan çeşitlerin çıkış oranları çok düşük kalmıştır. Her iki uygulamada da kontrol grubu tohumların çıkmaması sıkıntının uygulama kaynaklı olmadığını göstermiştir. Bu iki deneme sonucunda ekimi yapılan araziye bir önceki yılda farklı kimyasal uygulamaları yapıldığı fikrini ortaya çıkarmış ve bu kimyasallarında soya çimlenmesini sınırlandırdığı görülmüştür.

2018 yılında yapılan ve BATEM uygulama arazisine ekilen iki uygulamada çimlenme oranı çok düşük seviyelerde kalmıştır. Bu uygulamalar sonrasında Arısoy çeşidine %0.1 üçüncü bir EMS uygulaması yapılmış ve bu kez Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Deneme arazisine 14 Temmuz 2018 de ekim yapılmıştır. Ekimin ardından sıra arası 70 cm olacak şekilde damlama sistemi kurulmuş ve düzenli aralıklarla sulanmıştır. Ekimden yaklaşık 7 gün sonra çimlenmeler görülmüş ve ilerleyen zamanda istenilen düzeyde çimlenme gerçekleşmiştir. EMS uygulaması sonrasında çimlenen bitkiler uygun koşullarda ve hastalıklardan arı şekilde yetiştirilmiş ve hasat olgunluğuna getirilmiştir (Şekil 4.2).



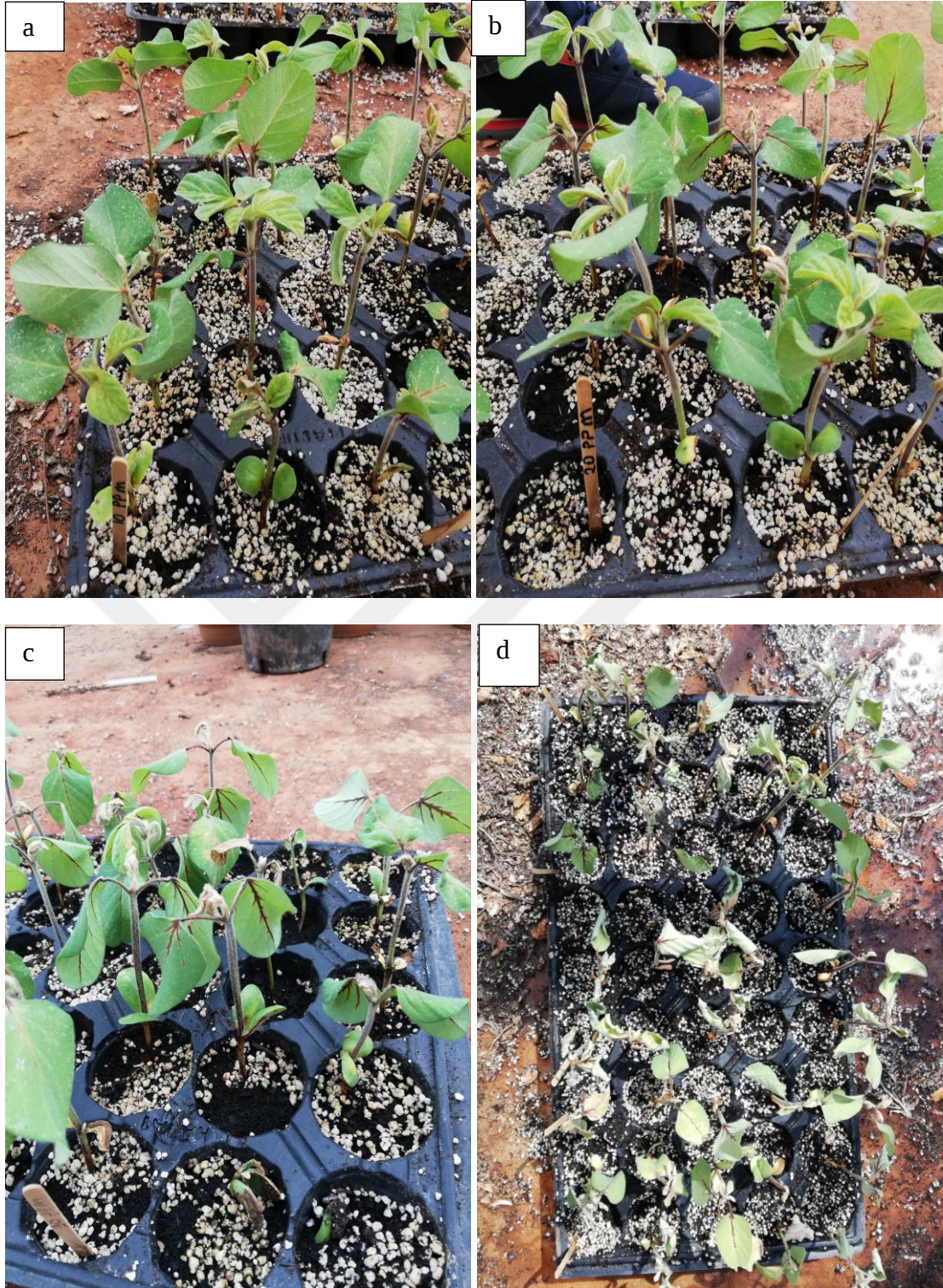
Şekil 4.2. 2018 yılında M₁ bitkilerinin yetiştirilmesi ve hasat edilmesi

EMS uygulaması sonucunda bitkilerde farklı olgunlaşma grupları oluşmuştur. Bu sebeple Eylül-Ekim 2018 döneminde farklı zamanlarda toplam 4150 bitki tek tek hasad edilmiş ve ayrı ayrı zarflara konmuştur. Uygulama yapılan 10.000 adet tohumdan 4150 adet tek bitki elde edilerek yaklaşık %42 oranında başarı sağlanmıştır. Çimlenme sağlayıp fakat farklı etkenlerden dolayı tohum vermeyen bitkilerde düşünüldüğü zaman çimlenme oranı %50'leri bulmuştur. Kimyasal mutagenleri kullanarak mutasyon oluşturma için yapılan çalışmalarda istenilen ve ideal çimlenme %50 oranında istenmektedir. Bu çalışmada EMS uygulama oranı ve uygulama şeklinin başarılı olduğunu göstermektedir.

Daha sonra her zarf karıştırılmadan tohumları kapsüllerden ayrılmış ve tekrar zarflara konularak paketlenmiştir. Herbisit denemesi için oluşturulan bu popülasyonun ilk etapta her zarfın ayrı bir sıra olarak ekilmesi planlanmıştır. Fakat daha sonra hem yerin kısıtlı olması hemde iş yükünün çok fazla olacağı hesaplanarak bulk yaparak ekilmesi uygun görülmüştür. Tohum sayısı 20 adetten fazla olan genotiplerden 10'ar tohum ayrılarak zarflara konmuş ve geri kalan tohumlar çuvala konularak bulk yapılmıştır. Zarflara alınan tohumlar morfolojik ve agronomik özellikler bakımından incelenmek üzere başka çalışmalar için stoklanmıştır. Bulk yapılarak M₂ popülasyonu oluşturulmuş ve sonraki yıl ekilmek üzere paketlenmiştir.

4.2. Herbisit Etkili Dozu Belirleme Çalışmaları

Arazi ekim çalışmalarından önce bir takım serada ön çalışmalar yapılmıştır. Öncelikle herbisit için en etkin dozu bulmak için 45'lik viyollardan (5x9) oluşan 3 viyol ve 135 bitki ekilmiştir. Her viyolden 3 sraya farklı bir doz olmak üzere toplam 9 farklı doz herbisit uygulanmıştır. Sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 100 ppm dozlarında herbisit ayarlanarak bitkilere uygulanmıştır. Klorosulforon etken maddeli bu herbisit öncelikle bitki bünyesine alınmakta ve bitki içerisinde taşınmaktadır. ALS enziminin valin, lösin ve izolösin gibi hayati aminoasitlerinin sentezini inhibe ederek bitkinin yavaş yavaş ölümüne sebep olmaktadır. Herbisit uygulandıktan sonra ilk olarak bitkilerin büyüme hızı yavaşlamakta ve zamanla büyüme tamamen durmaktadır. Daha sonraki aşamalarda bitkinin ana gövdesinden yukarıya doğru morarmalar, kahverengileşmeler ve kararmalar başlamaktadır. İlacın etkisi ilerledikçe bu kararmalar yapraklara doğru hareket etmekte damarları tıkamaktadır. Son aşama olarakta yapraklar ve bitki kuruyarak ölmektedir. Bu aşamada yapılan herbisit dozu belirleme çalışmasında, uygulama yapılan Arısoy çeşidinin tüm bitkileri öldürdüğü en alt doz belirlenmiştir. 10 ve 20 ppm dozlarında bitkiler biraz etkilenmiş ve bitkilerin tamamı ölmemiştir. Fakat 30 ppm ve üzeri yapılan uygulamalarda tüm bitkiler ölmüştür. Bu gözlemler sonucunda en alt öldürücü dozun 30 ppm olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Herbisit doz belirleme çalışması **a)** 10 ppm; **b)** 20 ppm; **c)** 30 ppm; **d)** 70-80-90 ppm dozlarında yapılan uygulamalar

4.3. Su Kültürü Testleme Çalışmaları

Herbisit için etkin doz belirlendikten sonra sera koşullarında hidroponik bitki yetiştirme ortamı oluşturulmuştur. İlk etapta ön deneme olarak 2 su tankında bitkiler yetiştirilme olanakları araştırılmıştır. Hatta yapılan gözlemlerde su kültüründe yetiştirilen bitkiler, normal saksıda yetiştirilen bitkilere göre oldukça hızlı gelişim ve büyüme göstermiştir. Yapılan ön çalışma sonrasında hem daha hızlı hem de daha çok testleme yapmak amacıyla 4 tane daha su tank alınmıştır. Geliştirilen bu sistemle 4 adet 216'lık ve 2 adet 117'lik fide viyolleri konularak tek seferde 1098 ($216 \times 4 = 864$; $117 \times 2 = 234$) ayrı genotipi testleyebilecek bir sistem oluşturulmuştur. Tohum çimlenmesi için uygun nemli ortamı sağlamak amacıyla tohumlar kaya yününe sarılarak viyollere konulmuştur. Burada dikkat edilmesi gerek nokta ise tohumun sarıldığı kaya yünü miktarıdır. Bazı tohumlara fazla kaya yünü konulmuş ve oradaki tohumlar çimlenmiş fakat kotiledon yapraklar kaya yününden çıkmayı başaramamıştır. Yetiştirme ortamındaki oksijeni sağlamak amacıyla da dışarıdan elektrikli bir hava pompası yardımıyla sürekli olarak ortama hava verilmiştir. Bu hava pompası düzenli aralıklarla kontrol edilmiştir.

Hidroponik sistem hızlı ve az bir alandan birçok bitkiyi testleme imkânı sunmaktadır. Aynı zamanda herbisit su kültürüne ilave edilmesinden dolayı her bitki eşit oranda herbisite maruz kalmakta ve daha homojen ve sağlıklı bir testleme yapılmaktadır. M_2 generasyonuna ait farklı bitkilerin tohumları su kültürüne ekimden sonra yaklaşık 14 gün sonra ilaçlama için uygun büyüklüğe ulaşmıştır. Daha önce belirlenen 30 ppm dozda klorsülfüron etken maddeli herbisit ile ilaçlanmıştır. Sistemik etkili olan bu klorosulforan etken maddeli herbisit yaklaşık 14 gün sonra bitkilerin gövdesinde, floemde ve yaprak damarlarında kahverengileşmeler gözlenmiştir (Şekil 4.4). İlerleyen aşamalarda kahverengileşme daha da koyulaşarak bitkilerin kuruyarak öldüğü görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Herbisit uygulaması sonrası bitkilerde oluşan kahverengileşme semptomları



Şekil 4.5. Herbisit uygulaması sonrası bitkilerin kuruması

Su kültüründe herbisit uygulamasında 1100 farklı M_2 bitkisi testlenmiştir. Herbisit uygulaması sonrasında 3 bitki ilaçtan hiç etkilenmeyerek büyüme ve gelişmelerine devam etmiştir. Bu 3 bitki su kültüründe elde edilen dayanıklı bitkiler anlamına gelen SU-1, SU-2, SU-3 olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra bu bitkiler saksılara şaşırtılmış ve sera ortamında strese sokulmadan yetiştirilmiştir. Bu bitkilerden yaklaşık 50'şer adet tohum olmak üzere toplamda yaklaşık 150 adet tohum alınmış ve dayanıklılığın konfirme edilmesi amacıyla saklanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Su kültüründe dayanıklı gözlemlenen hatların saksıya alınması, yetiştirilmesi ve tohum elde edilmesi

4.4.Tarla Şartlarında Herbisit Testleme Çalışmaları

M₂ generasyonunda 4150 bitkiden elde edilen yaklaşık 300.000 adet tohum bulk edilmiş ve ekimi 15 Mayıs 2019 tarihinde yapılmıştır. Daha sonra damla sistemi kurularak bitkiler sağlıklı bir şekilde yetiştirilmiştir. Yaklaşık 40 gün sonra bitkiler herbisit uygulama dönemine gelmiştir. 24 Haziran 2019 tarihinde konsatrasyonu 30 ppm olacak şekilde 400 litrelik traktörlü pülverizatör yardımıyla klorosulforon etken maddeli herbisit uygulanmıştır. Herbisit üretici firma tarafından tavsiye edilen doz 7.5 g da⁻¹ olarak belirtilmiştir. Bu deneme 1200 m² alana ekilmiş ve ilaç firması tarafından tavsiye edilen doz 9 gramdır. 30 ppm oranını elde etmek için 400 litre suya 12 g ilaç konulmuştur. Firma tarafından tavsiye edilen dozun %25 fazlası uygulanmıştır.



Şekil 4.7. Deneme arazisinin herbisit uygulama öncesi ve herbisit uygulandıktan 4 gün sonra görüntüsü

Bitkilere herbisit uygulamadan hemen önce ve herbisit uyguladıktan 4 gün sonra deneme arazisinin görüntüsü Şekil 4.7’de verilmiştir. Su kültürü ve saksı denemelerinde herbisit uyguladıktan yaklaşık 14-21 gün arasında belirtiler ortaya çıkarken, tarla denemesinde bu süre kısalmıştır. İlaç uygulaması yaz döneminde yapıldığı için sıcaklık etkisiyle bitkilerin büyümesi 3 gün içerisinde durmuş ve uç büyüme noktaları sararmaya başlamıştır. İlerleyen süreçte bitki gövdesinde morarmalar ve kararmalar gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). Daha sonra bu kararmalar yan dallara ve yapraklara doğru ilerlemiştir. Son aşama olarak yapraklar ve bitkiler tamamen kuruyarak ölmüştür.



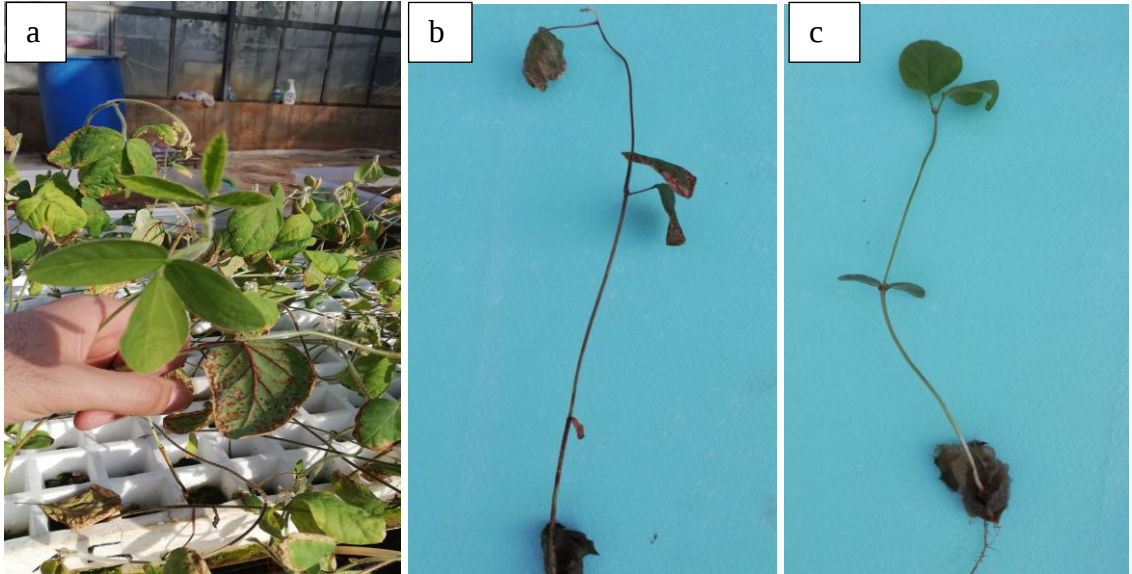
Şekil. 4.8. Tarlada herbisit uygulaması sonrası bitki semptomları

Herbisit uygulaması yapıldıktan 14 gün sonra dayanıklı seleksiyonu yapılmıştır. Bitki gövdesinde kararma, yaprak damarlarında morarma ve nekroz lekesi olan bitkiler elenmiştir. Hiçbir herbisit zararı göstermeyen tamamen sağlıklı bitkiler seçilmiş ve etiketlenmiştir. Yapılan gözlemlerde yaklaşık 300.000 tohumdan 7 bitkide hiçbir herbisit etkisi görülmemiştir. Bu bitkiler TAR1, TAR2, TAR3, TAR4, TAR5, TAR6, TAR7 olarak isimlendirilmiştir (Şekil 4.9). Bu 7 bitki haricinde, bazı bitkilerde ilk başlarda herbisit semptomları görünmüş fakat ilerleyen süreçte bu etkilenen bazı bitkiler herbisit zararını baskılayarak yan sürgünler vermiş (recovery) ve büyümelerine devam etmiştir. %100 dayanıklı bitkiler aradığımızdan dolayı sonradan toparlayan toleranslı diyebileceğimiz bitkiler gözardı edilmiştir. Arazi şartlarında dayanıklı gözlenen 7 bitkiden de ayrı ayrı yaklaşık 50’şer tohum elde edilmiştir.



Şekil 4.9. Herbisit uygulaması sonrası dayanıklı bitkilerin seleksiyonu ve etiketlenmesi

Arazi koşullarında potansiyel dayanıklı gözlemlenen 7 bitki (TAR1-7), sera koşullarında hidroponik sistemde potansiyel dayanıklı gözlemlenen 3 bitki (SU1-3) ve Arısoy kontrol çeşidiyle birlikte konfirmasyon testlemesi için hidroponik sisteme ekilmiştir. Her dayanıklı bitkiden 10'ar adet tohum ekilmiştir. Yeterli büyüklüğe gelince dozu 30 ppm olacak şekilde herbisit uygulanmıştır. Konfirmasyon testlemesi sonucunda da dayanıklı gözlemlenen TAR-1'den 6 bitki, TAR-3'den 1 ve TAR-7'den 1 bitki su kültüründen alınarak saksılara aktarılmıştır (Şekil 4.10). Konfirmasyon testlemesinde 10 farklı hatta ait toplamda 100 tohumdan 79 tanesi çimlenmiştir. Bunlardan 8 bitki potansiyel dayanıklı, 71 bitki ise hassas olarak gözlemlenmiştir. (Çizelge 4.1).



Şekil 4.10. a) Hidroponik sistemde dayanıklı seleksiyonu; b) hassas bitki; c) dayanıklı bitki

Hidroponik sistemde yapılan konfirmasyon testlemede potansiyel dayanıklı olarak gözlemlenen 8 bitki saksılara şaşırtılmıştır. Bu testlemede potansiyel dayanıklı gözlemlenen TAR1 ana hattından gelen 6 bitkiye, TAR3 ve TAR7 ana hattından gelen 1'er bitkiye tekrar 30 ppm herbisit uygulanarak ikinci kez konfirmasyon testi yapılmıştır (Çizelge 4.2). İkinci herbisit uygulamasından yaklaşık 14 gün sonra alınan gözlemlerde TAR3 ve TAR7 ana hatlarından gelen bitkilerin gövdesinde ve yaprak damarlarında herbisit semptomları gözlemlenmiştir. TAR1 ebeveyninden gelen 6 dayanıklı bitki ikinci kez herbisit uygulamasında da hiçbir belirti vermemiştir. Konfirmasyon testlemeleri kış döneminde yapılmıştır. Bu yüzden sera içinde küçük bir sera sistemi daha kurularak ısıtma yardımıyla bitkinin yetişmesi için uygun ortam oluşturulmuştur. Bitkiler saksıya şaşırtmadan kaynaklı ve kış döneminde olmasından dolayı biraz strese girmiştir. Daha sonra uygun gübreleme yapılarak bitkinin stresi ortadan kaldırılarak, tohumlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. Potansiyel dayanıklı gözlemlenen bitkilerin ilk konfirmasyon testlemedeki çimlenme, dayanıklı ve hassas bitki sayıları

Hat ismi	Ekilen tohum sayısı	Çimlenen tohum sayısı	testleme	
			Dayanıklı sayısı	Hassas sayısı
TAR1	10	8	6	2
TAR2	10	9	0	9
TAR3	10	8	1	7
TAR4	10	7	0	7
TAR5	10	9	0	9
TAR6	10	6	0	6
TAR7	10	9	1	8
SU1	10	8	0	8
SU2	10	6	0	6
SU3	10	9	0	9
Toplam	100	79	8	71
Arisoy (kontrol)	20	20	0	20

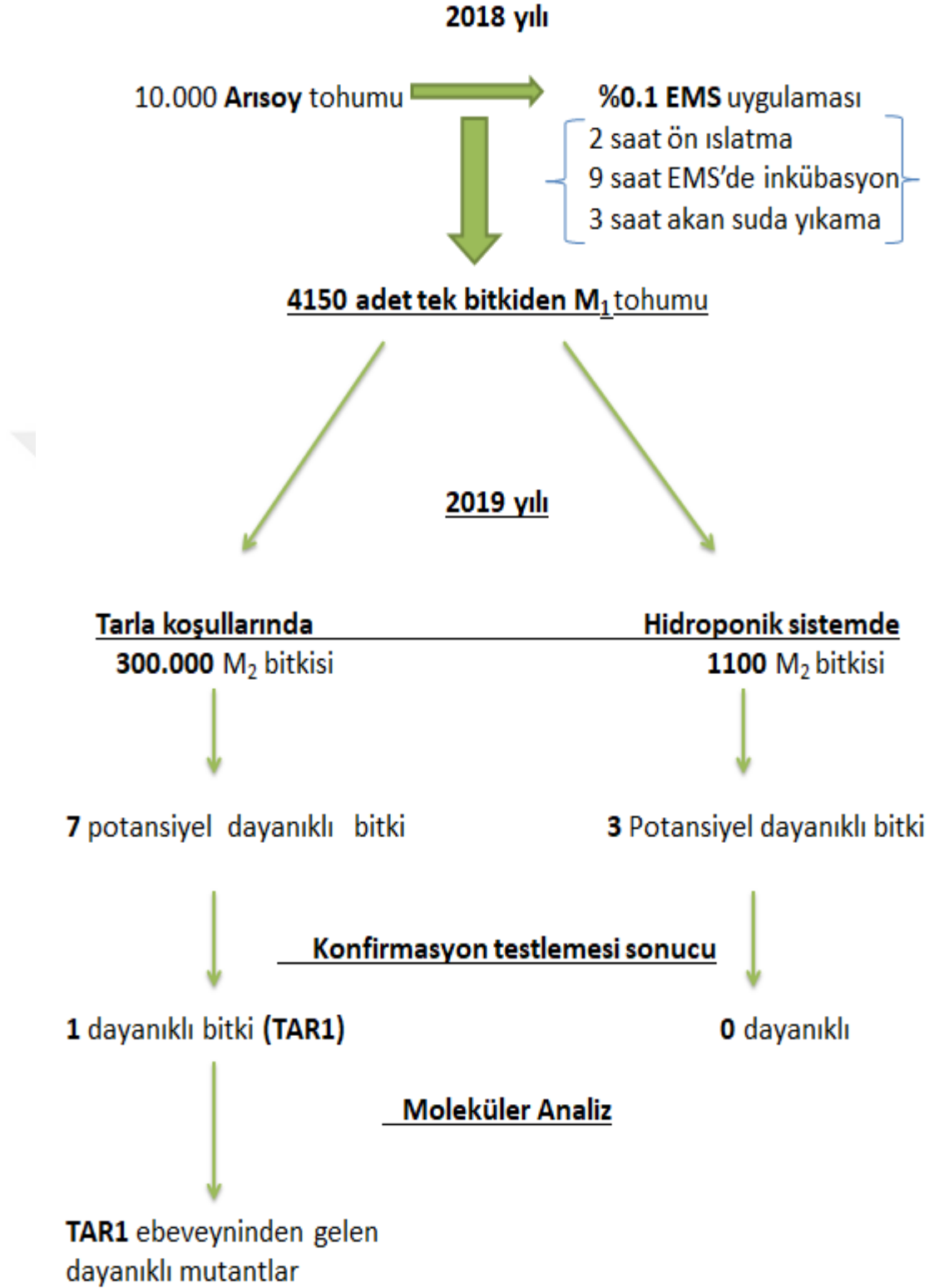
Çizelge 4.2. İlk konfirmasyon testlemesinde potansiyel dayanıklı gözlemlenen bitkilerin ikinci kez testleme sonuçları

Hat ismi	Testlenen bitki sayısı	Dayanıklı sayısı	Hassas sayısı
TAR1	6	6	0
TAR3	1	0	1
TAR7	1	0	1

Tarla denemlerinde ve konfirmasyon testlemelerinde dayanıklı olarak belirlenen TAR1 genotipinden ve Arısoy kontrol çeşidinden 8'er bitki 2X ve 3X herbisit dozları denemek amacıyla saksılara ekilmiştir. Arısoy çeşidinin hepsi çimlenirken, TAR-1 genotipinden 5 tanesi çimlenmiştir. Bitkiler herbisit uygulama büyüklüğüne gelince TAR1 bitkilerinin hepsine ve Arısoy çeşidinin yarısına 30 ppm herbisit uygulanmıştır. Arısoy çeşidinden herbisit uygulanan tüm bitkilerde herbisit zararı görünmüştür. Genetik açılamdan dolayı TAR1 bitkisinden gelen 4 bitki dayanıklı ve 1 bitkide herbisit zararı gözlemlenmiştir. İlk herbisit uygulaması sonucunda TAR1 ana hattından gelen 4 dayanıklı bitki belirlendikten sonra 2 bitkiye 60 ppm ve diğer 2 bitkiye 90 ppm herbisit uygulanmıştır. Aynı şekilde kontrol olarak Arısoy çeşidinden 2 saksıya 60 ve diğer 2 saksıya 90 ppm herbisit uygulanmıştır. Herbisit dozu 2 ve 3 kat artmasına rağmen TAR1 ana bitkisinden gelen 4 bitki dayanıklılığını korumuştur. Arısoy çeşidin de ise herbisit zararının ortaya çıkma hızı ve yoğunluğu herbisit dozuna bağlı olarak artmıştır (Şekil 4.11).



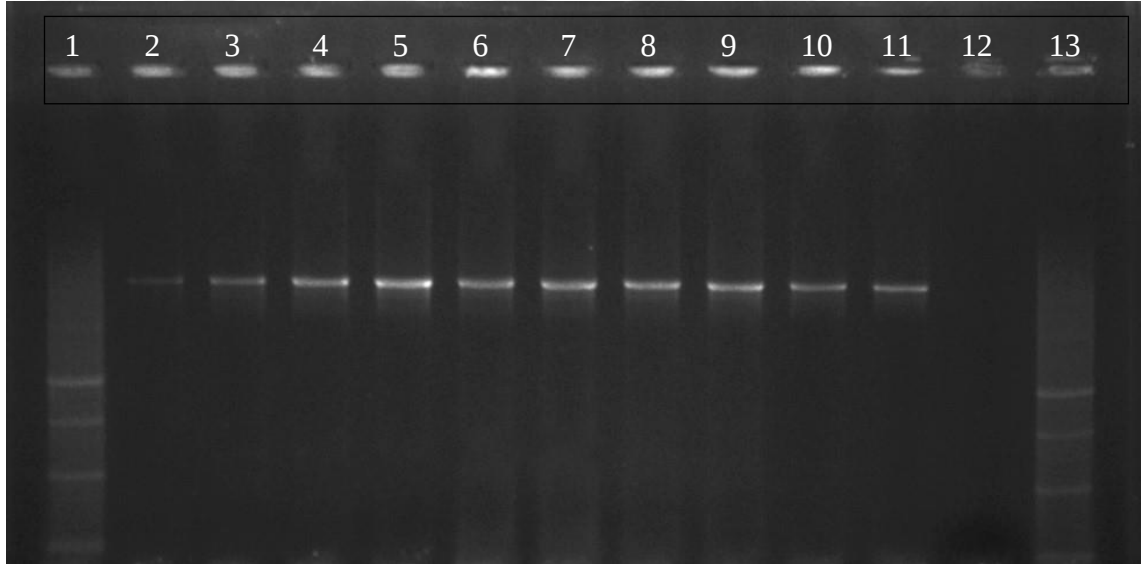
Şekil 4.11. Serada 60 ve 90 ppm konfirmasyon dayanıklılık testlemesi. (A hassas Arısoy çeşidi, B herbisit dayanıklı mutantlar)



Şekil 4.12. EMS mutagen uygulaması, iş akışı ve sonuç şeması

4.5. Moleküler Çalışmalar

Tarla denemelerinde potansiyel dayanıklılık gösteren hatlar dayanıklılık konfirmasyonu için hidroponik sisteme tekrar ekilmiştir. Burada çimlenen 79 bitkiden 8 tanesi dayanıklılık göstermiş ve tohum elde etmek amacıyla saksılara alınmıştır. TAR1 ebeveyninden gelen 6 bitkinin, TAR3 ve TAR7'den gelen 1'er bitkinin ve hassas kontrol Arısoy çeşidine ait 2 bitkinin yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan bu 10 bitkinin yaprak örnekleri CTAB metoduyla DNA izolasyonu yapılmıştır. Bitkilerde herbisit dayanıklılığı ile ilişkilendirilen ALS gen bölgesini çoğaltmak için GmAHAS1, GmAHAS4 (Ghio vd. 2013) ile GM01, GM13 ve GM15 (Walter vd. 2014) primerleri kullanılmıştır. Bu primerlerin çalışma koşulları ve miktarları gradiyent PCR ile belirlenmiştir. Tüm örneklerin PCR ürünleri çoğaltılmıştır (Şekil 4.13). Tarla koşullarında ve hidroponik sistemde birinci uygulamada potansiyel dayanıklılık gösterip fakat ikinci konfirmasyon testlemesinde herbisit zararı belirtileri gösteren TAR3 ve TAR7 bitkileri PCR ürünleri çoğaltılmış, fakat sekans analiz listesinden çıkarılmıştır.



Şekil 4.13. GmAHAS1 primeri ile çoğaltılan ve yaklaşık 2100 bp PCR ürünleri; 1 ve 13 nolu örnek 1 kb'lık ladder, 2-9 nolu örnekler dayanıklı bitki 10-11 nolu örnekler hassas bitki 12 nolu örnek negatif kontrol örnek (su)

GmAHAS1 ve GmAHAS4 primerleri ile TAR1 ebeveyninden gelen 6 hat ve 2 hassas Arısoy çeşidi PCR ürünleri çoğaltılmıştır. GM01 primeri ile TAR-1'den gelen 2, 4, 5, 6 nolu hatlar ve 2 tane hassas Arısoy hattından PCR ürünü elde edilmiştir. GM13 primeri ile TAR-1'den gelen 1, 2, 4, 6 nolu hatlar ve 2 tane hassas Arısoy hattı PCR ürünü vermiştir. GM15 isimli primer seti ile TAR1'den gelen dayanıklı hatlardan 5 nolu hat hariç tüm hatlar PCR ürünü vermiştir. Tüm primerlerden elde edilen toplam 35 PCR ürünü 30 ml hazırlanmış ve sekans hizmeti alımı için örnekler BM laboratuvar sistemleri isimli firmaya gönderilmiştir.

4.6. Sekans Analizleri

GmAHAS1, GmAHAS4 (Ghio vd. 2013) ile GM01, GM13 ve GM15 (Walter vd. 2014) primerleri kullanılarak çoğaltılan PCR ürünler Sanger dizileme yöntemiyle sekans dizileri çıkarılmıştır.

GmAHAS1 primer çifti 4. kromozom üzerinde bulunan ALS geni çoğaltmıştır. GmAHAS1 primeri tarafında çoğaltılan ALS geninin Chromas programı tarafından dizilimi çıkarılmıştır. Sekans analizlerine göre sırasıyla 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 nolu örnekler 1936, 1953, 1960, 1947, 1949, 1949 ve 1952 bp nükleotid dizisi elde edilmiştir. Tüm örneklerin sekans analizleri Ekler-1’de verilmiştir. Ürünler sanger sekanslama yöntemi ile çift yönlü sekanslanmış ve Chromas program yardımıyla görüntülenmiştir. Forward ve reverse okumaları yaklaşık 1000-1200 bp arasında kalmıştır. Bu karşılıklı diziler alignement edilerek okumalar tek yönlü yaklaşık 2000 bp sekanslar oluşturulmuştur. GmAHAS1 primeri ile gönderilen 8 üründen 5 nolu bitki örneği hariç diğer tüm örneklerin sekansı başarılı şekilde elde edilmiştir.

Ghio vd. (2013) analiz ettikleri dayanıklı bitkide tek bir nokta polimorfizminin varlığını ortaya koymuşlar ve 532. sıradaki sitozinin timine dönüştüğünü belirtmişler. GmAHAS1 primeri ile çoğaltılan ürünlerin hepsinin sekans okumaları farklı noktalardan başlamıştır ve karışıklık oluşturmamak adına mutasyon noktaları Ghio vd. (2013) sekansına göre numaralandırılmıştır.

TAR1-1 bitkisinden elde edilen PCR ürünün sekansında 8 nokta mutasyonu saptanmıştır. Sırasıyla 404 (A/C), 407 (C/T), 408 (G/A), 431 (T/A), 532 (C/T), 1768 (G/T), 1790 (C/T) ve 1875 (G/T) noktalarında nükleotid mutasyonları meydana gelmiştir. Dayanıklılık gösteren bitkilerin meydana getirdiği mutasyon noktaları ile hassas bitkilerin aynı noktasındaki nükleotid görüntüleri Şekil 4.14-21’de verilmiştir. Tespit edilen bu 8 nokta mutasyonu 7 amino asit değişikliğine sebep vermiştir. *Arabidopsis thaliana* model bitkisinin ALS gen protein sekans sıralamasına göre 154. amino asit tirozinden serine (Tyr/Ser), 155. amino asit alaninden valine (Ala/Val), 163. amino asit valinden aspartata (Val/Asp), 197. amino asit prolinden serine (Pro/Ser), 609. amino asit glisinden valine (Gly/Val), 616. amino asit treoninden metionine (Thr/Met) ve 644. amino asit glutaminden histidine (Gln/His) dönüşmüştür

Bu tezde EMS mutasyon yöntemiyle elde edilen herbisit dayanıklı 6 örnek, hassas Arısoy çeşidinden iki örnek ve KC254821.1 ve KC254825.1 (Ghio vd. 2013) referans örneklerin sekans analizleri MEGA-X programında alignement edilmiştir (Şekil 4.22). Alignement yapıldıktan sonra yine MEGA-X programı ile nükleotid dizilimleri protein dizisine çevrilmiştir. *Arabidopsis thaliana*, KC254821.1 (dayanıklı referans bitki), bu tezde elde edilen 6 bitki ve Arısoy hassas bitki protein dizilimleri CLUSTAL OMEGA programı yardımıyla alignement edilmiştir (Şekil 4.23).

GmAHAS1 primeri ile çoğaltılan TAR1-2 barkodlu bitkinin ALS gen bölgesi sekans analizleri yapıldığında 7 nokta mutasyonu ve 6 amino asit değişikliği tespit edilmiştir. Sırasıyla 404 (A/C), 407 (C/T), 408 (G/A), 431 (T/A), 532 (C/T), 1790 (C/T) ve 1875 (G/T) noktalarında nükleotid değişiklikleri ve bunun sonucunda 154 tirozinden serine (Tyr/Ser), 155 alaninden valine (Ala/Val), 163 valinden aspartata (Val/Asp), 197 prolinden serine (Pro/Ser), 616 treoninden metionin (Thr/Met) ve 644 glutaminden histidine (Gln/His) değişiklikleri görülmüştür (Şekil 4.23).

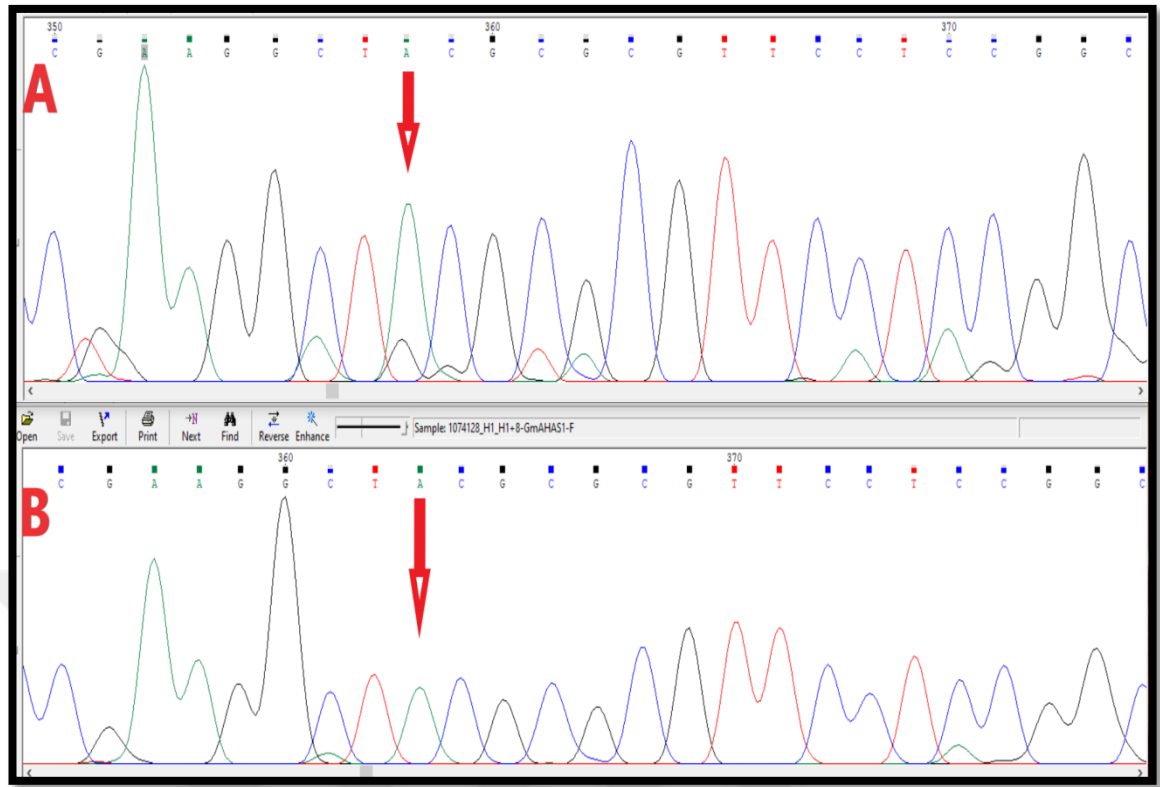
TAR1-3 bitkisinden gelen sekans örneği analiz edildiğinde sadece 1 noktada mutasyon görülmüştür. 532 (C/T) noktada meydana gelen nokta mutasyonu 197. noktadaki proline olan amino asidi serine çevrilmesine sebep olmuştur (Şekil 4.23).

TAR1-4 sekans analizlerinde 404, 407, 408, 431, 532, 1790 ve 1875 noktalarında mutasyon gözlemlenmiş ve 154, 155, 163, 197, 616 ve 644 konumundaki amino asitlerin değişmesine sebep olmuştur. Toplamda 7 nokta mutasyonu ve buna bağlı olarak 6 amino asit değişikliği gözlemlenmiştir (Şekil 4.23).

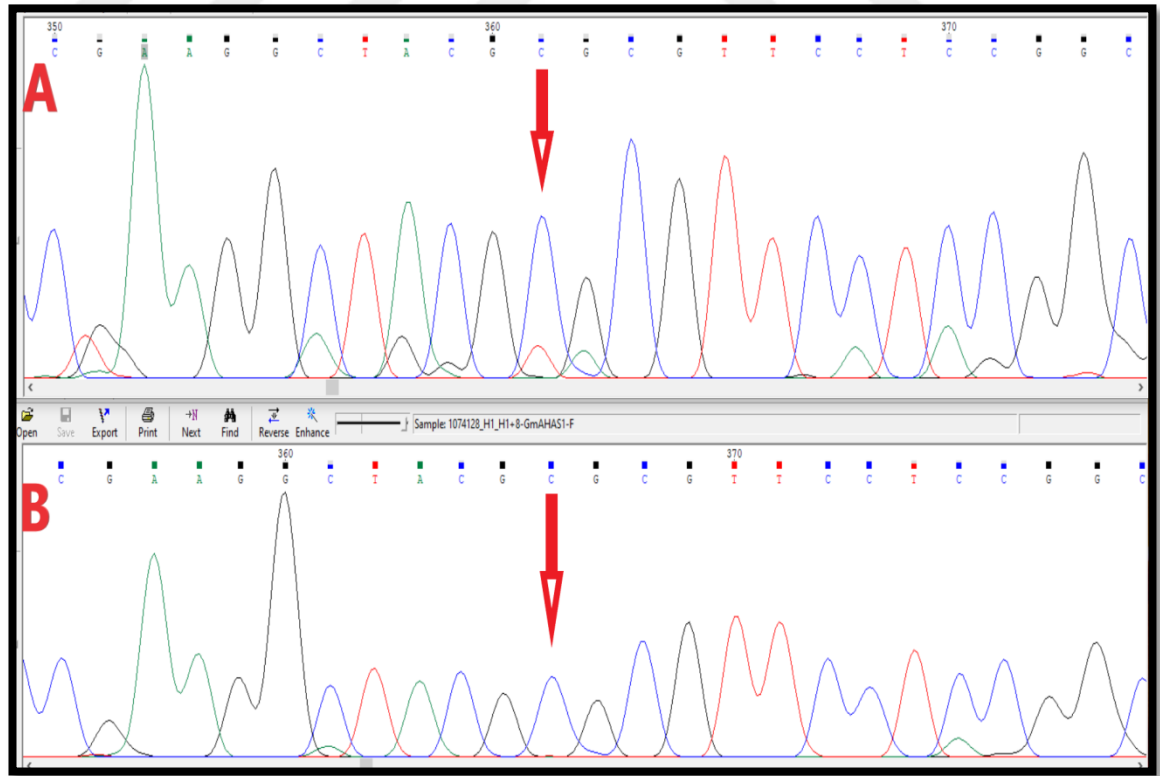
TAR1-6 numaralı bitki sekans analizlerinde 8 nokta mutasyonu ve bunun sonucunda da 7 amino asit değişikliği tespit edilmiştir. Sırasıyla 404, 407, 408, 431, 532, 1768, 1790 ve 1875 noktalarında mutasyon ve 154, 155, 163, 197, 609, 616 ve 644 noktalarında amino asit değişikliği tespit edilmiştir (Şekil 4.23).

GmAHAS1 primeri ile çoğaltılan ALS gen bölgesinde 5 bitkide toplam 31 nokta mutasyonu görülmüş ve 27 amino asit değişikliği bulunmuştur. TAR1-1 ve TAR1-6 aynı noktalarda ve sayılarda mutasyon meydana getirmiştir. TAR1-2 ile TAR1-4 benzer sayılarda mutasyon meydana getirmiştir. TAR1-3 ise sadece 197. amino asit noktasında tek nokta mutasyonu tespit edilmiştir. Protein sekansına göre yapılan filogenetik ağaçta TAR1-1 ile TAR1-6, TAR1-2 ile TAR1-4 ve TAR1-3 ile KC254821.1 (Ghio vd 2013) %100 benzer çıkmıştır (Şekil 4.24).

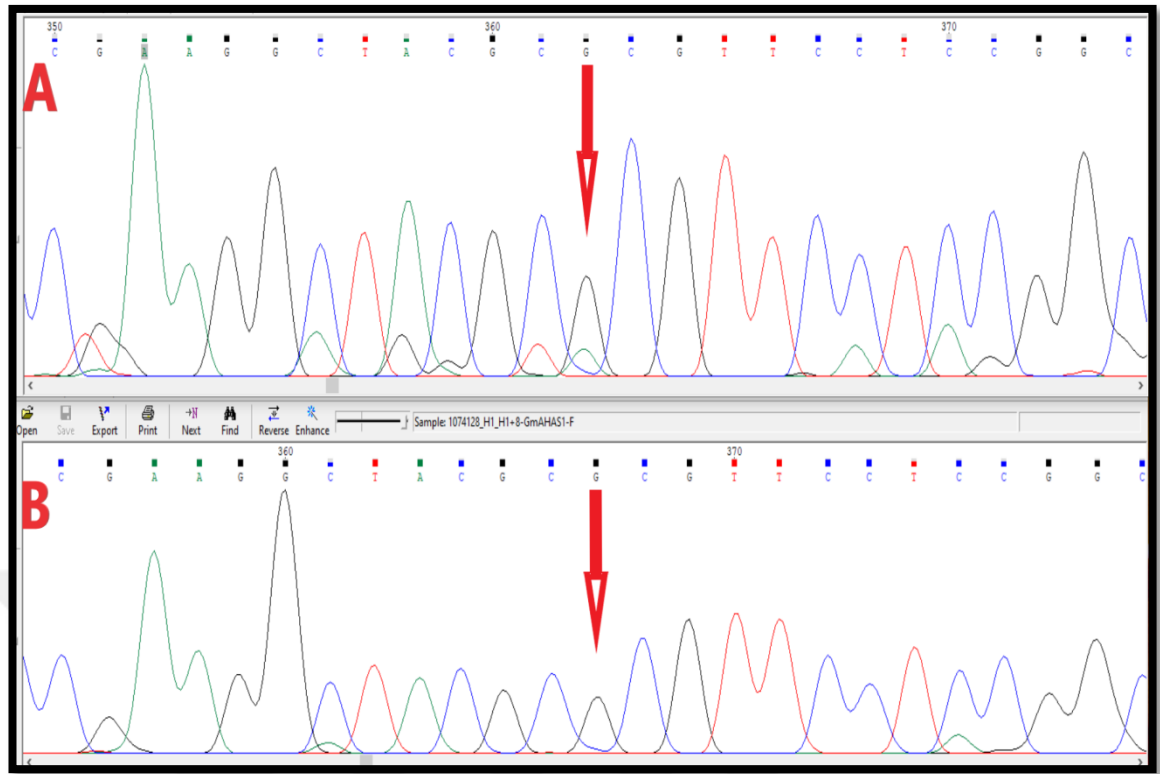
Tüm dayanıklı bitkilerde farklı sayı ve noktalarda mutasyon meydana gelmiştir. Dayanıklılık gösteren tüm bitkilerde *Arabidopsis thaliana* ALS gen sekansına göre 197. noktadaki CCC olan amino asit dizisi TCC dizilimine dönmüştür. Bu tek nükleotid değişikliği de prolin olan amino asidi serin amino asidine çevirmiştir. Hassas olan Arısoy çeşidinde ise dizilim CCC şeklinde kalmış ve amino asit prolin şeklinde kalmıştır. Herbisit dayanıklı mutant bitkilerin hepsinde ortak olan tek nokta mutasyonu 197. noktadaki amino asit değişikliğidir.



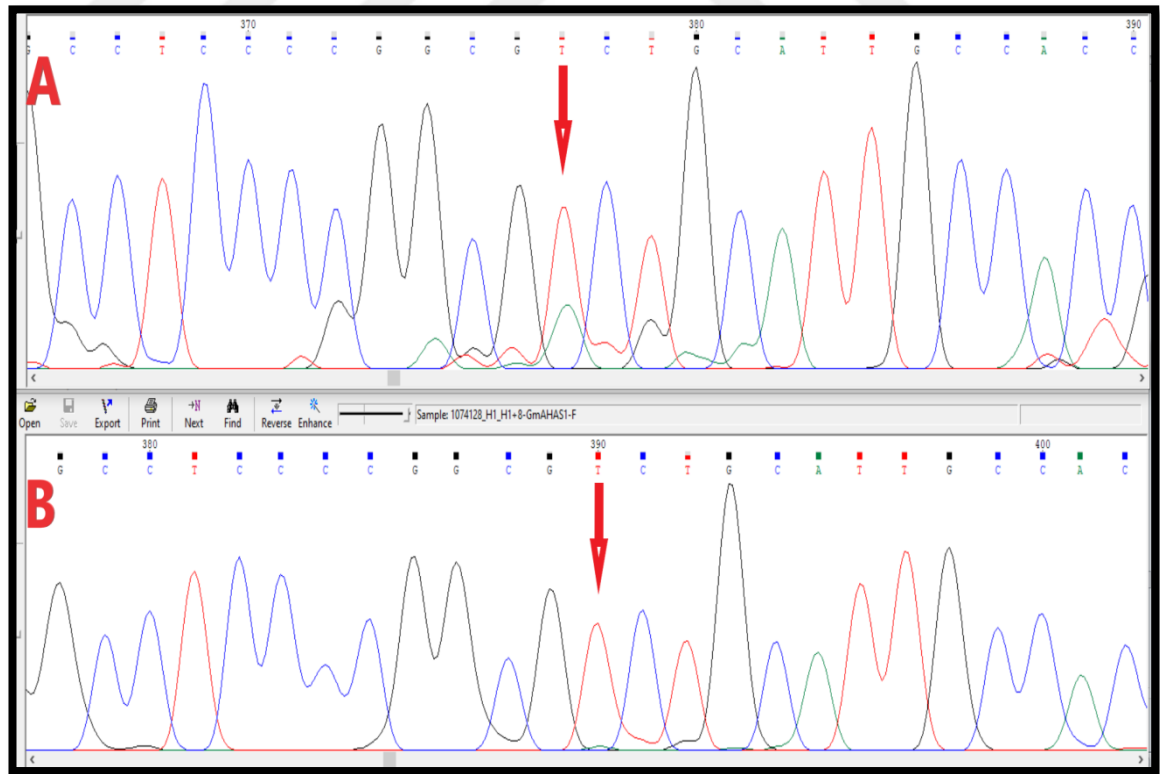
Şekil 4.14. 404. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; **a)** dayanıklı bitki; **b)** hassas bitki



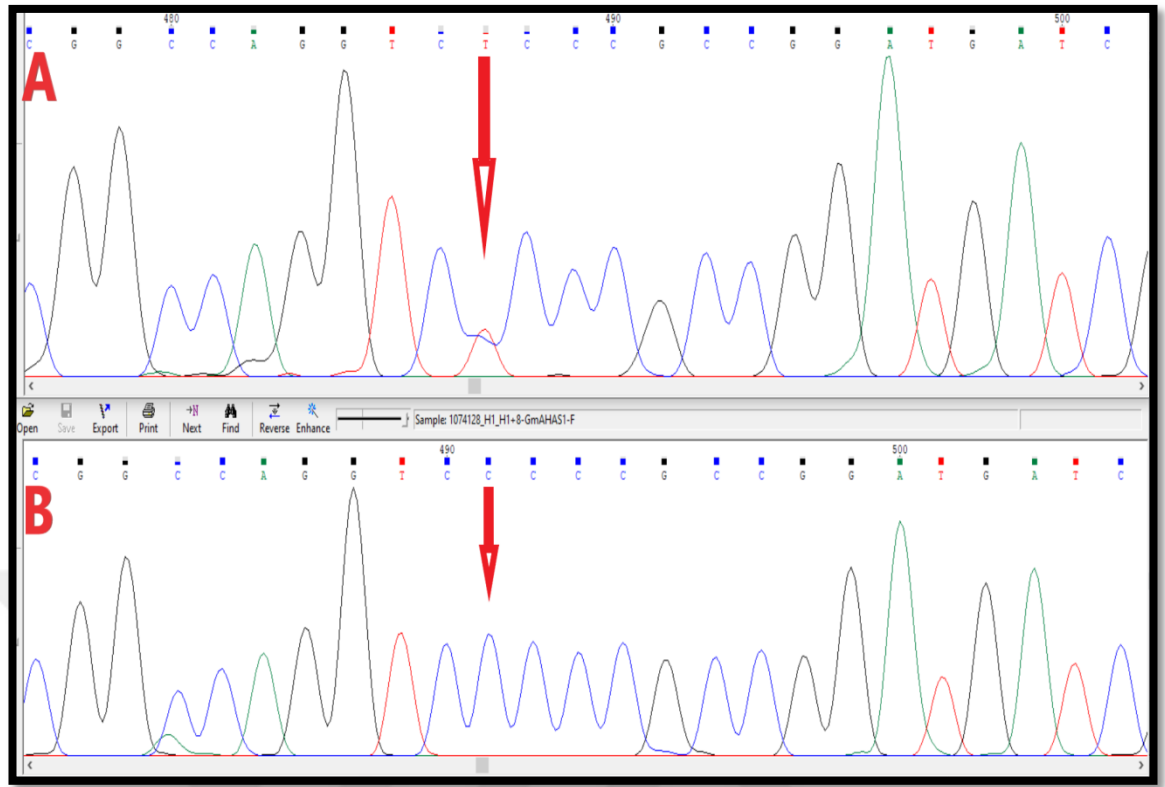
Şekil 4.15. 407. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; **a)** dayanıklı bitki; **b)** hassas bitki



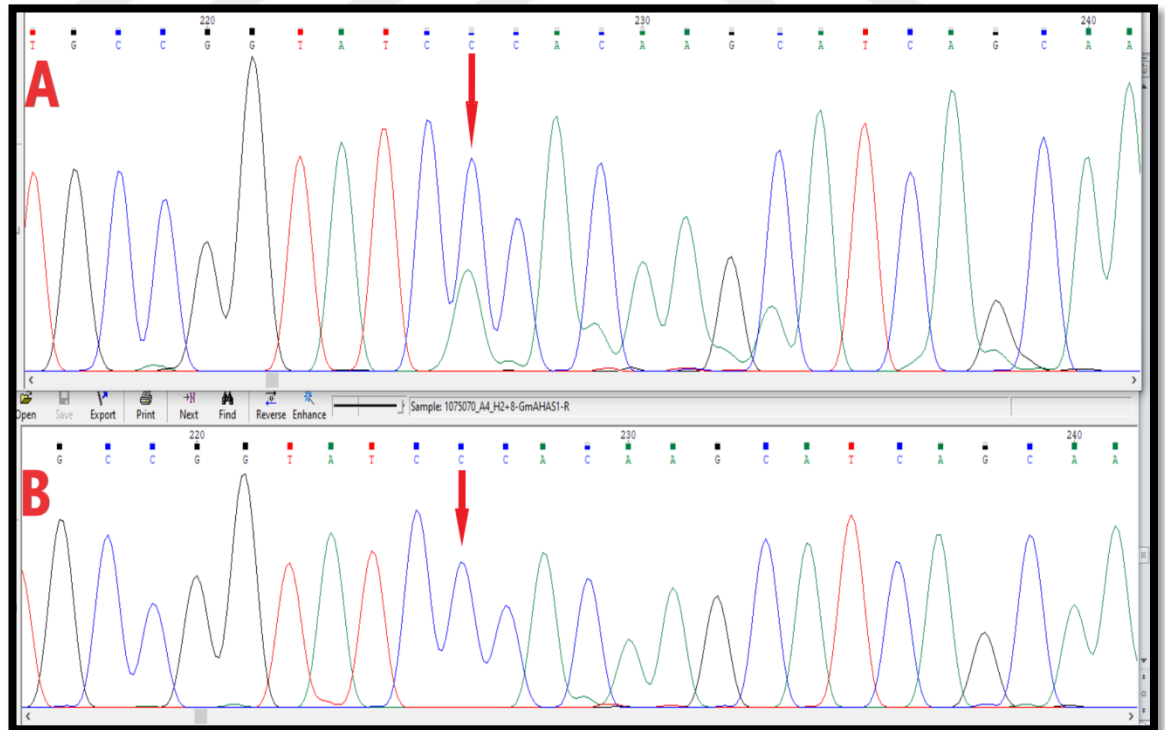
Şekil 4.16. 408. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; **a)** dayanıklı bitki; **b)** hassas bitki



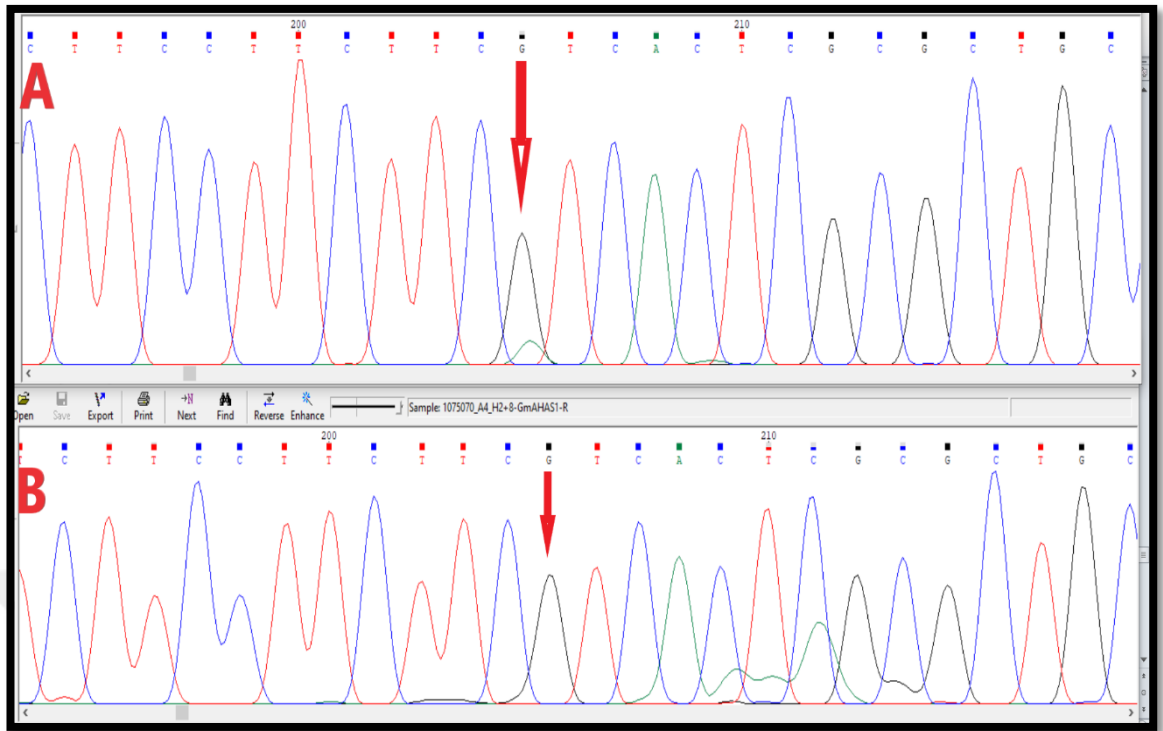
Şekil 4.17. 431. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; **a)** dayanıklı bitki; **b)** hassas bitki



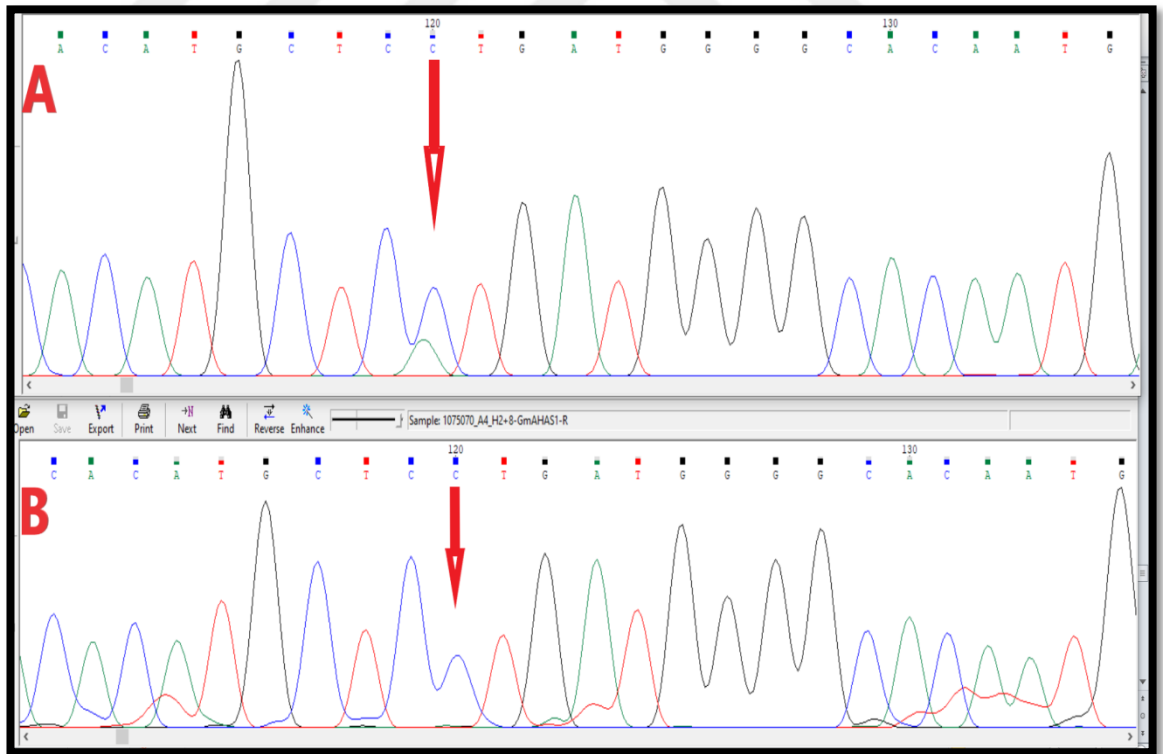
Şekil 4.18. 532. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; **a)** dayanıklı bitki; **b)** hassas bitki



Şekil 4.19. 1768. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; **a)** dayanıklı bitki; **b)** hassas bitki



Şekil 4.20. 1790. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; **a)** dayanıklı bitki; **b)** hassas bitki



Şekil 4.21. 1875. noktada oluşan mutasyon görüntüsü; **a)** dayanıklı bitki; **b)** hassas bitki

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrev	
1. KC254821.1_Glycine_max_i	C A G C G T C C C A G T C G T C G C C A T C A C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C T T C C A A G A A A C C C C G A
2. 1_nolu_GmAHAS1-F	C A G C G T C C C A G T C G T C G C C A T C A C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C T T C C A A G A A A C C C C G A
3. 2_nolu_ornek_GmAHAS1-F	C A G C G T C C C A G T C G T C G C C A T C A C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C T T C C A A G A A A C C C C G A
4. 3_nolu_ornek_GmAHAS1-F	C A G C G T C C C A G T C G T C G C C A T C A C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C T T C C A A G A A A C C C C G A
5. 4_nolu_ornek_GmAHAS1-F	C A G C G T C C C A G T C G T C G C C A T C A C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C T T C C A A G A A A C C C C G A
6. 6_nolu_ornek_GmAHAS1-F	C A G C G T C C C A G T C G T C G C C A T C A C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C T T C C A A G A A A C C C C G A
7. 7_nolu_ornek_GmAHAS1-F	C A G C G T C C C A G T C G T C G C C A T C A C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C T T C C A A G A A A C C C C G A
8. 8_nolu_ornek_GmAHAS1-F	C A G C G T C C C A G T C G T C G C C A T C A C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C T T C C A A G A A A C C C C G A
9. KC254825.1_Glycine_max_i	C A G C G T C C C A G T C G T C G C C A T C A C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C T T C C A A G A A A C C C C G A



DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrev	
1. KC254821.1_Glycine_max_i	A C C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C
2. 1_nolu_GmAHAS1-F	A C C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C
3. 2_nolu_ornek_GmAHAS1-F	A C C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C
4. 3_nolu_ornek_GmAHAS1-F	A C C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C
5. 4_nolu_ornek_GmAHAS1-F	A C C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C
6. 6_nolu_ornek_GmAHAS1-F	A C C G G C C A G G T C T C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C
7. 7_nolu_ornek_GmAHAS1-F	A C C G G C C A G G T C C C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C
8. 8_nolu_ornek_GmAHAS1-F	A C C G G C C A G G T C C C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C
9. KC254825.1_Glycine_max_i	A C C G G C C A G G T C C C C C G C C G G A T G A T C G G C A C C G A C G C C

Şekil 4.22. MEGA-X programı ile yapılan alignmant görüntüsü; KC254821.1 ve KC254825.1 Ghio vd (2013) sırasıyla dayanıklı ve hassas bitki referans sekans, 1-2-3-4-6 herbisit dayanıklı gözlemlenen soya mutantları, 7-8 herbisit hassas Arısoy çeşidi.

109

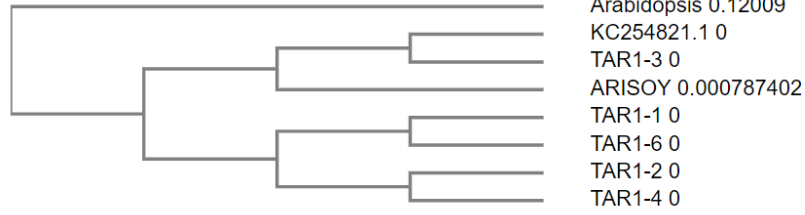
110

Arabidopsis	ISTGVGQHQMWAQFYNYKKPRQWLSSGGLGAMGFLPAAIGASVANPDIVVDIDGDGS	540
KC254821.1	VSTGVGQHQMWAQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGAAVANPGAVVVDIDGDGS	521
TAR1-3	VSTGVGQHQMWAQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGAAVANPGAVVVDIDGDGS	505
ARISOY	VSTGVGQHQMWAQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGAAVANPGAVVVDIDGDGS	505
TAR1-1	VSTGVGQHQMWAQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGAAVANPGAVVVDIDGDGS	505
TAR1-6	VSTGVGQHQMWAQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGAAVANPGAVVVDIDGDGS	505
TAR1-2	VSTGVGQHQMWAQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGAAVANPGAVVVDIDGDGS	505
TAR1-4	VSTGVGQHQMWAQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGAAVANPGAVVVDIDGDGS	505
	.*****.*.*.*****.*****.*****.*.*.*****	
Arabidopsis	FIMNVQELATIRVENLPVKVLLNNQHLGMVQWEDRFYKANRAHTFLGDPAQEDEIFPN	600
KC254821.1	FIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQWEDRFYKSNRAHTYLGPSSSEEIFPN	581
TAR1-3	FIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQWEDRFYKSNRAHTYLGPSSSEEIFPN	565
ARISOY	FIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQWEDRFYKSNRAHTYLGPSSSEEIFPN	565
TAR1-1	FIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQWEDRFYKSNRAHTYLGPSSSEEIFPN	565
TAR1-6	FIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQWEDRFYKSNRAHTYLGPSSSEEIFPN	565
TAR1-2	FIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQWEDRFYKSNRAHTYLGPSSSEEIFPN	565
TAR1-4	FIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQWEDRFYKSNRAHTYLGPSSSEEIFPN	565
	*****.*****.*****.*****.*****.*.*.*****	
	609 ↓ ↓ 616 644 ↓	
Arabidopsis	MLLFAAACGIPAARVTKKADLR EAIQTMLDTPGPYLLDVICPHQEHVLPIMPSSGGTFNDV	660
KC254821.1	MLKFADACGIPAARVTKKEELRAAIQRMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPIMPSSNGSFKDV	641
TAR1-3	MLKFADACGIPAARVTKKEELRAAIQRMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPIMPSSNGSFKDV	625
ARISOY	MLKFADACGIPAARVTKKEELRAAIQRMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPIMPSSNGSFKDV	625
TAR1-1	MLKFADACVIPAARVMKKEELRAAIQRMLDTPGPYLLDVIVPHHEHVLPIMPSSNGSFKDV	625
TAR1-6	MLKFADACVIPAARVMKKEELRAAIQRMLDTPGPYLLDVIVPHHEHVLPIMPSSNGSFKDV	625
TAR1-2	MLKFADACGIPAARVMKKEELRAAIQRMLDTPGPYLLDVIVPHHEHVLPIMPSSNGSFKDV	625
TAR1-4	MLKFADACGIPAARVMKKEELRAAIQRMLDTPGPYLLDVIVPHHEHVLPIMPSSNGSFKDV	625
	** ** * ***** ** .** ** * ***** ** .*****.*.*.**	
Arabidopsis	ITEGDGR I KY	670
KC254821.1	ITEGDGR T R Y	651
TAR1-3	ITEGDGR T R Y	635
ARISOY	ITEGDGR T R Y	635
TAR1-1	ITEGDGR T R Y	635
TAR1-6	ITEGDGR T R Y	635
TAR1-2	ITEGDGR T R Y	635
TAR1-4	ITEGDGR T R Y	635
	*****.*	

Şekil 4.23. GmAHAS1 primeri ile çoğaltılan ve CLUSTAL OMEGA programı ile yapılan Protein dizi analiz görüntüsü; *Arabidopsis thaliana* referans bitki; KC254821.1 Ghio vd (2013) dayanıklı soya bitkisi; Herbisit dayanıklı soya mutanları TAR1-1, TAR1-2, TAR1-3, TAR1-4, TAR1-6; Herbisit hassas Arısoy çeşidi (ok işaretleri amino asit değişikliği olan noktaları göstermektedir)

Phylogram

Branch length: ☒ Cladogram ☐ Real



Şekil. 4.24. Protein dizisine göre oluşturulan filogenetik ağaç

GmAHAS4 primer seti ile çoğaltılan örneklerden sadece 7 numaralı örnek hariç diğerleri başarılı olarak dizilenmiştir. Ghio vd. (2013) Aynı primerle çoğaltılan bölge (KC254824.1) referans olarak alınmış ve sekans edilen örnekler MEGA-X programı ile analiz edilmiştir.

Sekans analizlerine göre sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 nolu örnekler 2015, 2011, 2015, 2021, 2031, 2017, 2001 bp nükleotid dizisi elde edilmiştir. Bir dayanıklı ve bir hassas bitkinin sekansları MEGA-X programı ile protein dizisine çevrilmiş ve *Arabidopsis thaliana* protein dizisi ile CLUSTAL OMEGA programıyla üçlü karşılaştırma yapılmıştır. Soya bitkileri ile *Arabidopsis thaliana* protein dizileri arasında fark gözlemlenirken, Dayanıklı ve hassas bitki arasında amino asit düzeyinde bir fark çıkmamıştır. Protein dizisi bakımından hiçbir amino asit farklılığı bulunmamıştır (Şekil 4.25).

GM01, GM13 ve GM15 primerleri ile yine soyada bulunan farklı kromozomlardaki ALS geni çoğaltılmıştır. GM01 primer çifti ile yapılan sekanslardan tutarlı ve sağlıklı bir sonuç alınanmıştır bu nedenle, ilgili primer çifti değerlendirmeye alınmamıştır.

GM13 primer çifti ile 1, 2, 4, 6, 7, 8 nolu örneklerin sekansları başarılı şekilde çıkarılmış ve 2050 ile 2096 bp arasında dizilimler elde edilmiştir. MEGA-X programı ile yapılan alignment analizlerinde ne amino asit düzeyinde ne de nükleotid düzeyinde bir fark saptanmamıştır. Hassas bitkiler ile dayanıklı bitkiler arasında bu gen bölgesinde bir mutasyon saptanmamış ve ikisi arasındaki benzerlik tamamen aynı çıkmıştır (Şekil 4.26).

GM15 primer seti de yine soya bitkisinde farklı bir kromozomdaki ALS genini çoğaltmıştır. 5 numaralı örnek hariç tüm örneklerin sekansları elde edilmiş ve 1880 ile 2177 bp arasında nükleotid dizileri elde edilmiştir. MEGA-X programı ile alignment edilmiş ve protein dizilerine dönüştürülmüştür. Daha sonra CLUSTAL OMEGA programı ile *Arabidopsis thaliana*, bir dayanıklı hat ve bir hassas örnek protein dizileri analiz edilmiştir. Protein dizisi bakımından *Arabidopsis thaliana* ile soya bitkileri

arasında fark gözlemlenmiş fakat dayanıklı ve hassas hat arasında bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.27).

GmAHAS1 primeri ile çoğaltılan ALS gen bölgesi GmAHAS4, GM13, GM15 primerleri ile çoğaltılan ALS bölgeleriyle ve model bitki *Arabidopsis thaliana* ALS gen bölgesi ile sırasıyla, %78.8, %78.2, %78.5 ve %69.9 benzer çıkmıştır. GmAHAS4 primeri ile çoğaltılan bölge ile GM13, GM15 ve *Arabidopsis thaliana* bölgeleri sırasıyla %92.1, %99.0 ve %71.9 benzer çıkmıştır. Bu yüzdelerden anlaşılacağı üzere GmAHAS4 ile GM15 aynı kromozom üzerindeki ALS gen bölgesini çoğaltmıştır. GM13 primer gen bölgesi ile GM15 ve *Arabidopsis thaliana* gen bölgeleri %89.2 ve %69.2 olarak bulunmuştur. En son olarak GM15 ile *Arabidopsis thaliana* arasındaki benzerlik %69.1 olarak hesaplanmıştır.

GmAHAS 1 primeri ile çoğaltılan ve 4. kromozomda bulunan ALS geni için toplam 5 bitkide toplam 32 nokta mutasyonu tespit edilmiştir. Mutasyon frekansı bu bölge için 3.2/1000 bp olarak bulunmuştur.

Arabidopsis hassas dayanıklı	TMAAATTTTTSSSISFSTKPSPPSSSKSPLISRFSLPFSLNPNKSSSSSSRRRGIKSSSP ----- -----	60 0 0
Arabidopsis hassas dayanıklı	SSISAVLNTTTNVTTPSPKPTKPTFISRFAPDQPRKGADILVEALERQGVETVFAYP ----- -----	120 0 0
Arabidopsis hassas dayanıklı	GGASMEIHQALTRSSSIRNVLP RHEQGGVFAAEGYARSSGKPGICIAISGPGATNLVSGL ---MEIHQALTRASIRNVLP RHEQGGVFAAEGYARSSGIPGVCIAISGPGATNLVSGL ---MEIHQALTRASIRNVLP RHEQGGVFAAEGYARSSGIPGVCIAISGPGATNLVSGL *****:*****	180 56 56
Arabidopsis hassas dayanıklı	ADALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSVTKHNYLVLDVDDIPRIVNEAF ADAMLDVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSVTKHNYLVLDVDDIPRIVNEAF ADAMLDVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSVTKHNYLVLDVDDIPRIVNEAF ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	240 116 116
Arabidopsis hassas dayanıklı	FLATSGRPGPVLVDVPKDIQQQLAIPNWEQAMRLPGYMSRMPKPPEDSHLEQIVRLISES FLATSGRPGPVLIDIPKDIQQQFAIPNMDQPIRLPGYMSRLPKSPNENHLELIVRLVMES FLATSGRPGPVLIDIPKDIQQQFAIPNMDQPIRLPGYMSRLPKSPNENHLELIVRLVMES *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	300 176 176
Arabidopsis hassas dayanıklı	KKPVLVYGGGCLNSSDELGRFVELTGIPVASTLMGLGSYPCDELSLHMLGMHGTVYANY KKPVLVYGGGCLNSSDELRRFVELTGIPVASTLMGLGAYPIADENSLQMLGMHGTVYANY KKPVLVYGGGCLNSSDELRRFVELTGIPVASTLMGLGAYPIADENSLQMLGMHGTVYANY *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	360 236 236
Arabidopsis hassas dayanıklı	AVEHSDLLAFGVRFDORVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKTPHVSVCQDVKLAL AVDKADLLAFGVRFDORVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSVCADLKLAL AVDKADLLAFGVRFDORVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSVCADLKLAL ***:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	420 296 296
Arabidopsis hassas dayanıklı	QGMNKVLENRAEELKLDGFWRNELNVQKQKFPPLSFKTFGAIPQYAIKVLDDELTDGKA KGINHMLESRGVGGKLDGFWREELNEQKRRFPLSYKTFEDEISQYAIQVLDDELTDGKA KGINHMLESRGVGGKLDGFWREELNEQKRRFPLSYKTFEDEISQYAIQVLDDELTDGKA *:***:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	480 356 356
Arabidopsis hassas dayanıklı	IISTGVGQHQMMAAQFYNYKKPRQWLTSSGGLGAMGFGLPAAIGASVANPDIAIVVDIDGDG IVSTGVGQHQMMAAQFYKYKRPRQWLTSSGGLGAMGFGLPAAIGAAVANPGAVVVDIDGDG IVSTGVGQHQMMAAQFYKYKRPRQWLTSSGGLGAMGFGLPAAIGAAVANPGAVVVDIDGDG *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	540 416 416
Arabidopsis hassas dayanıklı	SFIMNVQELATIRVENLPVKVLLLNQHLGMVQWEDRFYKANRAHTFLGDPAQEDEFIFP SFIMNVQELATIKVEKLPVKILLNNQHLGMVQWEDRFYKSNRAHTYLGDPSENENAIFFP SFIMNVQELATIKVEKLPVKILLNNQHLGMVQWEDRFYKSNRAHTYLGDPSENENAIFFP *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	600 476 476
Arabidopsis hassas dayanıklı	NMLLFAAACGIPAARVTKKADLRAIQTMLDTPGPYLLDVICPHQEHVLPIMPISGGTFND DMLKFADACGIPAARVTKKEDLRAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPIMPISNGTFQD DMLKFADACGIPAARVTKKEDLRAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPIMPISNGTFQD *:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	660 536 536
Arabidopsis hassas dayanıklı	VITEGDGRICY VITEGDGRISY VITEGDGRISY ***** *	671 547 547

Şekil 4.25. GmAHAS4 primeri ile çoğaltılan ve CLUSTAL OMEGA programı ile yapılan Protein dizi analiz görüntüsü; *Arabidopsis thaliana* referans bitki; Dayanıklı, herbisit dayanıklı soya mutanı; Hassas, herbisit hassas Arısoy çeşidi

Arabidopsis	MAAATTTTTSSSISFSTKPSPSSSKSPLPISRFSLPFLNPNKSSSSRRRGKSSSPS	60
dayanıklı	MAA-----ITAPKAAFS--VLPSSSHSPNPFVRFAPYSPHHSQR-----RSLRISSA-	46
hassas	MAA-----ITAPKAAFS--VLPSSSHSPNPFVRFAPYSPHHSQR-----RSLRISSA-	46
	** * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Arabidopsis	SISAVLNTTTNVTTPSPKPTKPTFISRFAPDQPRKGADILVEALERQGVETVFAYPG	120
dayanıklı	-----LSDATTKSSTAAAEAFASRFGLDEPRKGADILVEALERQGVTDVFAYPG	95
hassas	-----LSDATTKSSTAAAEAFASRFGLDEPRKGADILVEALERQGVTDVFAYPG	95
	: : : : : : * : * : * : * : * : * : *	
Arabidopsis	GASMEIHQALTRSSSIRNVLPHEQGGVFAAEGYARSSSGKPGICATSGPGATNLVSGLA	180
dayanıklı	GASMEIHQALTRSSSIRNVLPHEQGGVFAAEGYARSSSGLPGVCIATSGPGATNLVSGLA	155
hassas	GASMEIHQALTRSSSIRNVLPHEQGGVFAAEGYARSSSGLPGVCIATSGPGATNLVSGLA	155
	***** * : *****	
Arabidopsis	DALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRISITKHNYLVMDVEDIPRIIEEAF	240
dayanıklı	DALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRISITKHNYLVLDVDDIPRIVNEAF	215
hassas	DALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRISITKHNYLVLDVDDIPRIVNEAF	215
	***** * : *****	
Arabidopsis	LATSGRPGPVLVDVDPKDIQQQLAIPNWEQAMRLPGYMRMPKPPEDSHLEQIVRLISESK	300
dayanıklı	LATSGRPGPVLIDIPKDIQQQLAIPNWDQPIRLPGYTSRLPKSPNEKHLLEIVRLVMSK	275
hassas	LATSGRPGPVLIDIPKDIQQQLAIPNWDQPIRLPGYTSRLPKSPNEKHLLEIVRLVMSK	275
	***** * : *****	
Arabidopsis	KPVLVYGGGCLNSSDELGRFVELTGIPVASTLMGLGSYPCDELSLHMLGMHGTVYANYA	360
dayanıklı	KPVLVYGGGCLNSSEELRRFVELTGVPVASTLMGLGAYPIADDNSLQMLGMHGTVYANYA	335
hassas	KPVLVYGGGCLNSSEELRRFVELTGVPVASTLMGLGAYPIADDNSLQMLGMHGTVYANYA	335
	***** * : *****	
Arabidopsis	VEHSDLLAFGVRFDORVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNTKPHVSVCGDVKLALQ	420
dayanıklı	VDRADLLAFGVRFDORVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNTKPHVSVCDLKLALQ	395
hassas	VDRADLLAFGVRFDORVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNTKPHVSVCDLKLALQ	395
	* : * : ***** * : *****	
Arabidopsis	GMNKVLENRAEELKLDGFWRNELNWKQKFLPSFKTFGEAIPPQYAIKVLDDELTDGKAI	480
dayanıklı	GINRVLESRGVAGKLDGFRGWEELNEQKRRFPLSYKTFEKEISPQYAIQVLDLDTNGEAI	455
hassas	GINRVLESRGVAGKLDGFRGWEELNEQKRRFPLSYKTFEKEISPQYAIQVLDLDTNGEAI	455
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Arabidopsis	ISTGVGQHQMWAQFYNYKKPRQWLSGGLGAMGFLPAAIGASVANPDAIVVDIDGDS	540
dayanıklı	VSTGVGQHQMWAQFYKYKPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGAAVANPGAVVVDIDGDS	515
hassas	VSTGVGQHQMWAQFYKYKPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGAAVANPGAVVVDIDGDS	515
	: ***** * : *****	
Arabidopsis	FIMMVQELATIRVENLPVKVLLNNQHLGMVQWEDRFYKANRAHTFLGDPQAEDEIFPN	600
dayanıklı	FMMNVQELATIKVEKLPVKILLNNQHLGMVQWEDRFYKSNRAHTYLGDPSNENAIYPN	575
hassas	FMMNVQELATIKVEKLPVKILLNNQHLGMVQWEDRFYKSNRAHTYLGDPSNENAIYPN	575
	* : ***** * : *****	
Arabidopsis	MLLFAAACGIPAARVTKKADLRAEIQTMLDTPGPYLLDVICPHQEHVLPIMPSSGGTFNDV	660
dayanıklı	MLKFADACGIPAARVTKKEDLRAAIQKMLETPGPYLLDVIVPHQEHVLPIMPSSNGTFQDV	635
hassas	MLKFADACGIPAARVTKKEDLRAAIQKMLETPGPYLLDVIVPHQEHVLPIMPSSNGTFQDV	635
	* * * ***** * : *****	
Arabidopsis	ITEGDGRIKY---	670
dayanıklı	ITEGDGRIMLL--	646
hassas	ITEGDGRIMLLDS	648

Şekil 4.26. GM13 primeri ile çoğaltılan ve CLUSTAL OMEGA programı ile yapılan Protein dizi analiz görüntüsü; *Arabidopsis thaliana* referans bitki; Dayanıklı, herbisit dayanıklı soya mutanlığı; Hassas, herbisit hassas Arıssoy çeşidi

Arabidopsis	MAAATTTTTTSSSISFSTKPSSSSSKSLPISRFSLPFLNPNKSSSSSRRRGIKSSSPS	60
dayanıklı	----MAATTAPKPAFTALPSSSSSSSQKPFLLRLALQFPPLNSSYHSQRP-SLKIS---	51
hassas	----MAATTAPKPAFTALPSSSSSSSQKPFLLRLALQFPPLNSSYHSQRP-SLKIS---	51
	::*: . :*: ** ***: * :*: * ** * * :*	
Arabidopsis	SISAVLNTTTNTTTSPSTKPTKPTFISRFAPDQPRKGADILVEALERQGVETVFAYPG	120
dayanıklı	---SALSD----ATAKTTTAAAAEDFVSFRGLEEPKRGADILVEALERQGVTDVFAYPG	103
hassas	---SALSD----ATAKTTTAAAAEDFVSFRGLEEPKRGADILVEALERQGVTDVFAYPG	103
	:* . :* . * : * :*: . :***** *****	
Arabidopsis	GASMEIHQALTRSSSIRNVLPHEQGGVFAAEGYARSSGKPGICIATSGPGATNLVSGLA	180
dayanıklı	GASMEIHQALTRSSSIRNVLPHEQGGVFAAEGYARSSGIPGVCATSGPGATNLVSGLA	163
hassas	GASMEIHQALTRSSSIRNVLPHEQGGVFAAEGYARSSGIPGVCATSGPGATNLVSGLA	163
	***** . ***** *	
Arabidopsis	DALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSVTKHNYLVMDVEDIPRIIEEAF	240
dayanıklı	DAMLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSVTKHNYLVLDVDDIPRIVNEAF	223
hassas	DAMLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSVTKHNYLVLDVDDIPRIVNEAF	223
	** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . *****	
Arabidopsis	LATSGRPGPVLVDVPKDIQQQLAIPNWEQAMRLPGYMSRMPKPPEDSHLEQIVRLISEK	300
dayanıklı	LATSGRPGPVLIDIPKDIQQQFAIPNWDQPIRLPGYMSRLPKSPNENHLEIVRLVMEK	283
hassas	LATSGRPGPVLIDIPKDIQQQFAIPNWDQPIRLPGYMSRLPKSPNENHLEIVRLVMEK	283
	***** . * . ***** . ***** . * . ***** . * . ***** . *	
Arabidopsis	KPVLVYGGGCLNSSDELGRFVEL--TGIPVASTLMGLGSPCDELSLHMLGMHGTVYA	357
dayanıklı	KTCFVCNWWLFEF--RIAACRAHNCSCG--YFEG--VWGLIPLLLKKNLSQMLGMPGNVLA	338
hassas	KTCFVCNWWLFEF--RIAACRAHNCSCG--YFEG--VWGLIPLLLKKNLSQMLGMPGNVLA	338
	* : : : . : . * . :* . * * . :* :***** *	
Arabidopsis	NYAVEHSDLLAFGVRFDDRVTKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKTPHVSVCADVCL	417
dayanıklı	NYAVEKAEILLAFGVRFDDRVTKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKTPHVSVCADVCL	398
hassas	NYAVEKAEILLAFGVRFDDRVTKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKTPHVSVCADVCL	398
	***** . : . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . *	
Arabidopsis	ALQGMNKVLENRAEELKLDGFWVRNELNVQKQKFLPSFKTFGEAIPPQYAIKVLDELTDG	477
dayanıklı	ALKGINHMLESRGVGGKLDGFRGWREELNEQKRRFPLSYKTFEDEISPQYAIQVDELTDG	458
hassas	ALKGINHMLESRGVGGKLDGFRGWREELNEQKRRFPLSYKTFEDEISPQYAIQVDELTDG	458
	* . :* :* . * :* * * :* :* * :* :* * :* :* :* :* :* :* :* :*	
Arabidopsis	KAIISTGVGQHQMMAAQFYNYKPRQWLSGGGLGAMGFLPAAIGASVANPDIVVDIDG	537
dayanıklı	DAIVSTGVGQHQMMAAQFYKYKPRQWLSGGGLGAMGFLPAAIGAANPAGAVVVDIDG	518
hassas	DAIVSTGVGQHQMMAAQFYKYKPRQWLSGGGLGAMGFLPAAIGAANPAGAVVVDIDG	518
	* . :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :*	
Arabidopsis	DGSFIMNVQELATIRVENLPVKVLLNNQHLGMVQWEDRFYKANRAHTFLGDPQDEDEI	597
dayanıklı	DGSFIMNVQELATIKVEKLPVKILLNNQHLGMVQWEDRFYKSNRAHTYLGDPSENENAI	578
hassas	DGSFIMNVQELATIKVEKLPVKILLNNQHLGMVQWEDRFYKSNRAHTYLGDPSENENAI	578
	***** . * :* * :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :*	
Arabidopsis	FPNMLLFAAACGIPAARVTKKADLRAIQTMLDTPGPYLLDVICPHQEHVLPMPISGGTF	657
dayanıklı	FPDMLKFADACGIPAARVTKKEDLRAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISNGTF	638
hassas	FPDMLKFADACGIPAARVTKKEDLRAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISNGTF	638
	* :* * * * :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :*	
Arabidopsis	NDVITEGDGRIKY	670
dayanıklı	QDVITEGDGRISY	651
hassas	QDVITEGDGRISY	651
	:***** *	

Şekil 4.27. GM15 primeri ile çoğaltılan ve CLUSTAL OMEGA programı ile yapılan Protein dizi analiz görüntüsü; *Arabidopsis thaliana* referans bitki; Dayanıklı, herbisit dayanıklı soya mutan; Hassas, herbisit hassas Arısoy çeşidi

5. TARTIŞMA

Zaman içerisinde insanoğlunun nüfusunun hızla artmasıyla birlikte, araştırmacılar daha büyük ve daha güvenli gıda kaynakları arayışına girmiştir. Bitkilerin kültüre alınmasıyla birlikte zaman içerisinde birçok bitki çeşitliliği ve genetik havuzlar oluştu. İlk başlarda bitkiler mutasyonlarının kendiliğinden ortaya çıkmasının sonucu ortaya çıkan özelliklerin insan yararlılığı ve isteklerine göre basit seleksiyon yöntemi ile ıslah edilmekteydi. Mutasyon, kimyasal, fiziksel veya biyolojik etmenler sebebiyle organizmanın genetik düzeyde ani kalıtsal değişikliklerin ortaya çıktığı bir olaydır (Roychowdhury vd. 2013). Spontane mutasyonlar oluşması açısından çok yavaş ve rastgele olmaktadır ve bu da onları bitki melezleme programlarında kullanma sürecini uzatmaktadır (Lönnig 2005). Bu süreci kısaltmak ve genetik kaynakları genişletmek için bilim insanları yapay mutasyon elde edecek araç ve yöntemleri araştırmışlardır (Auerbach ve Robson 1946; Rapoport 1946, 1948). Bitki türlerinde hızlı şekilde yeni çeşitler elde etmek için yapay mutasyonların uygulanmasının çok faydalı bir yol olduğu belirtilmiştir (Maluszynski vd. 1995). Mutasyon ıslahında genellikle fiziksel (ışınlama) ve kimyasal mutagen olmak üzere iki tip mutagen kullanılmaktadır. Genellikle Fiziksel mutagenler (gamma ışını ve X-ışını radyasyonu) kromozomal bir kırılmadan kaynaklanan yapısal kromozom mutasyonlarına yol açmaktadırlar (van Harten 1998). Bu sebepten dolayı fiziksel mutagenlerin olumsuz etkisi daha fazla olabilmektedir. Bitkilerde istenilen mutasyon elde edilse bile, bitkinin agronomik, kalite ve içerik gibi birçok özellik bakımından gerilemektedir. Fiziksel mutagenlerin, kimyasal mutagen uygulamasına kıyasla daha pahalı ekipman ve donanım ihtiyacı duyulmakta ve daha zor gerçekleştirilmektedir. Bu zorlukların yanında ışınlama mutasyonları başarı şansı da kimyasal mutagene göre çok düşüktür. Yukarıda sayılan birçok sebepten dolayı Kimyasal mutagenler daha cazip hale gelmiş ve daha sık kullanılmaktadır. Etil metan sülfonat (EMS) ve N-metil-N-nitrozoüre (NMU) gibi popüler kimyasal mutagen esas olarak yüksek oranda tek nükleotid değişikliği mutasyonlarını indüklemektedir (Greene vd. 2003; Satoh vd. 2010). Herbisit dayanıklılığı için ALS geninde nokta mutasyonlar oluşturmak gerekmektedir. Yürütülen bu tez çalışmasında soyada herbisit dayanıklılığı oluşturmak ve ALS geninde nokta mutasyonlar oluşturmak için EMS kimyasalı kullanılması çok doğru bir tercih olmuştur. Uygulama kolaylığı, doku kültürü gerektirmemesi, sonraki generasyonda kimerik olmaması ve elde edilen mutasyonların transgenik olmaması kimyasal mutagenlerin avantajlarının başında gelmektedir.

Soyada herbisit dayanıklı çeşit geliştirmek EMS uygulanmadan önce 2 saat normal suda bekletilerek tohumlar doygun hale getirilmiştir. Arkasından 9 saat boyunca Arısoy çeşidi %0,1 oranında EMS solüsyonunda bekletilmiştir Tohumlar ardından akan suda 3 saat yıkandıktan sonra tarla şartlarında ekimleri gerçekleştirilmiştir. EMS uygulanan 10.000 tohumdan 4150 adet tek bitki elde edilmiş ve yaklaşık %42 oranında verim alınmıştır. Pavadaı vd. (2009), Soya tohumlarına, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 KR dozlarında gama, %0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 oranlarında EMS, %0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 ve 0.06 oranında dietil sülfatın (DES) ve Kolkisin (COH) uygulanmışlardır. Mutagenik etkinliği, Klorofil-II, diğer fenotipik özellikleri, yaralanma ve hayatta kalma özellikleri esas alınarak hesaplanmıştır. M₂ mutantlarda yapılan incelemede klorofil-II ve diğer fenotipik özellikler bakımından mutagen etkinliği en fazla 10 KR gama ışınında ve ardından %0,1 EMS bulunmuştur. Bu çalışmada bulunan EMS mutagen etkinliği ile bu tez çalışmasında kullanılan EMS yüzdesi aynıdır. Espina vd.

(2018) soya tohumlarına EMS uygulamadan önce 12, 18 ve 24 saat suda bekletmişler ve çimlenme oranlarına bakıldığı zaman bu 3 farklı saat arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamış ve 18 saat suda bekletmeyi tercih etmişlerdir. Yaptıkları ön çalışmada 0 (kontrol), 30, 60, 90, 150 mM EMS dozlarını denemişlerdir. Kontrol ile 30 mM arasında önemli bir fark çıkmamıştır. 60 mM dozunda ise kontrol ve 30 mM uygulamalarına göre önemli fark çıkmıştır ve çimlenme yaklaşık %50 seviyesine kadar düşmüştür. 90 mM ve 150mM arasında da fark önemli görülmemiş ve çimlenme %10 seviyesinin altında kalmıştır. Bu ön çalışmalardan sonra JTN-5203 çeşidine ait 15.000 tohuma 60 mM oranında EMS uygulamışlar ve ilk yıl toplam 1820 M₁ bitkisinden tohum elde etmişlerdir. 60 mM EMS dozunda çimlenme oranı %50'lerde iken yaklaşık %12 oranında bitkiden tohum elde etmişlerdir. Yapılan bu tezde EMS uyguladıktan sonra tohum elde etme oranı %42 olarak bulunmuştur ve bu çalışmanın 3 katından daha fazla oran bulunmuştur.

Daha yüksek mutagen konsantrasyonları daha yüksek mutasyon frekansı üretmektedir (Shah vd. 2015). Fakat mutagen dozu artıkça genom için çok zarar artmakta ve çimlenme oranı çok düşmektedir. Mutasyon dozu düştükçe bitkilerin yaşama oranı daha yüksek olmakta ancak mutasyon frekansı düşük olmaktadır (Porch vd. 2009). Mutasyon ıslahı programının başarısı, her şeyden önce kullanılan mutajenin etkinliğine ve verimliliğine bağlı olmaktadır (Arisha vd. 2015). Bununla birlikte, farklı mutajenlerin, farklı dozları ve uygulanan bitkiye bağlı olarak farklı etkileri vardır. Cooper vd. (2008), mutasyon sıklığında bir artış tohumun recovery yapmasını büyük ölçüde düşürür. EMS konsantrasyondaki bir artış tohum çimlenme oranını önemli ölçüde azaltabilmektedir (Talebi vd. 2012).

Greene vd. (2003), EMS mutageni yüksek oranda nokta mutasyonları meydana getirmekte ve çok az oranda kromozom kırılmalarına sebep olmaktadır. Bu nedenle anöploidi, verimlilik ve öldürücülük daha az olmaktadır. EMS guanin kalıntılarını alkile ederek, O⁶-etilguanin üretmekte olduğunu ve bunun sonucunda da Sitozin (C) yerine Timin (T) ile eşleşmekte olduğunu belirtmişlerdir (Ashburner 1990). Bunun sonucunda, onarılmamış alkilleme hasarının replikasyonunda, Guanin/Sitozin (G/C) olan bölge Adenin/Timin (A/T) ile değişmesi beklenmektedir. EMS ile muamele edilen bitkilerde oluşan nokta mutasyonların Guanin/Sitozin (G/C) yerine Adenin/Timin (A/T) değişikliğinin %99'dan fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan bu tezde elde edilen herbisit dayanıklı mutantta tespit edilen nokta mutasyon değişikliği Sitozin (C) / Timin (T) şeklinde olmuştur ve literatür ile benzerlik göstermektedir.

Günümüzde hidroponik tarımın, avantajları ve kolay kullanımı nedeniyle modern tarımın en hızlı büyüyen alanlarından birisidir. Hidroponik yetiştirme ortamının topraklı yetiştirme sistemine göre birçok avantajları bulunmaktadır. Hidroponik yetiştirme, su ve besin isteğinin daha iyi kontrol edilmesini sağlayan, bitki verimliliğini artıran, bitki rotasyonuna ihtiyaç duymayan ve pestisit kullanımını azaltan gelişmekte olan bir teknoloji olduğunu belirtmişlerdir (Sheikh vd. 2006). Topraksız bitki yetiştirme sistemleri özellikle toprağın veya iklim şartlarının uygun olmadığı bölgelerde bitki yetiştiriciliği için çok uygun olduğunu belirtmişlerdir. Zamanla nüfusun artmasıyla birlikte ve ekilebilir arazi azaldıkça, hidroponik yetiştirme sistemleri geleneksel tarımın yerini alabileceğini belirtmişlerdir (Palermo vd. 2012). Hidroponik sistemlerde yetiştirilen bitkiler optimum seviyede besin içeriğine ve neme sahiptirler. Bu nedenle de daha hızlı ve sağlıklı yetişmektedirler. Bir diğer avantajı ise kök sistemlerinin

hidroponik olarak yetiştirilen bitkilerde daha küçük olmasıdır ve bu bitkinin büyüme enerjisini köklerden daha çok bitkinin büyümesine yoğunlaştırması demektir. Yukarıda sayılan birçok özelliğin dışında su kültürü denemelerinde dış etkenlere bağlı şartları minimize edilmektedir.

Su kültürü yetiştirme sistemleri araştırmaların hava, iklim ve toprak kaynaklı olumsuz etkenleri sıfıra düşürerek denemenin doğrulunu artırmaktadır. Bu amaç doğrultusunda farklı soya denemelerinde su kültürü çalışmaları yapılmıştır (Izaguirre-Mayoral ve Sinclair 2005; Lee vd. 2010; Palermo vd. 2012; De Micco vd. 2012; Paradiso vd. 2014; Tripathi vd. 2015; Suematsu vd. 2017; Lebreton vd. 2018; Sankhalkar vd. 2019). Bu tez çalışmasında da hidroponik sistemden faydalanılmıştır. Çok az bir alanda binlerce farklı genotip testleme imkânı vermiştir. Kış döneminde açık alanda yetiştiricilik yapılmayan dönemde su kültüründe yetiştiricilik yapılarak testleme süresini kısaltmıştır. Normal yetiştiriciliğe göre çok hızlı şekilde büyümekte ve böylece daha kısa zamanda herbisit uygulama büyüklüğüne gelmektedir. Açık tarlada uygulanan herbisitler homojen olarak atılamamaktadır. Bazen kültür bitkileri yabancı otların altında kalmakta ve böylece uygulanan herbisit kültür bitkisine ulaşamamakta veya etkinliği azalmaktadır. Bu sistemin en büyük avantajlarından birisi de bu açık tarlada ortaya çıkan problemleri ortadan kaldırmaktadır. Tarla koşullarında dayanıklı olarak gözlemlenen bitkiler tekrar su kültüründe konfirmasyon testlemesi yapılmıştır. Tarla koşullarında dayanıklı çıkan 7 bitki içerisinde su kültüründe sadece 1 bitkinin dayanıklı çıkması tarla koşullarında uygulanan herbisit homojen olmadığı fikrini ortaya çıkarmaktadır. Böyle hem tarla koşullarında testleme yapmak ardından da su kültüründe tekrar iki kez testleme yapmak hem bitkinin dayanıklılığının hem de tezin doğruluğunu ve güvenilirliğini artırmaktadır.

Soya bitkisinin tüm genomu haritalanmıştır (Schmutz vd. 2010). Bu birçok genetik ve moleküler çalışmaya faydası olmuş ve olmaya devam edecektir. Yapılan bu çalışmada soya bitkisinin iki defa genom katlanması gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Tespit ettikleri yaklaşık 46.000 protein kodlayan gen dizisinin olduğunu ve bunların %75'nin birden fazla kopyası olduğunu bildirmişlerdir. Ghio vd. (2013) NCBI gen bankasında *Arabidopsis thaliana* ALS (Accession NM_114714.2) sekans dizilimi çıkarılmış ve *Glycine max* genomunda blast yapılmıştır. Dört farklı kromozomda (sırasıyla 4, 6, 13 ve 15 kromozomda) dört nükleotid dizilimi GmAHAS1-4 (Accession No. Glyma04g37270, Glyma06g17790, Glyma13g31470 ve Glyma15g07860) *Arabidopsis thaliana* asetohidroksiasit sentez (AHAS, EC 4.1.3.18) ile yüksek oranda benzerlik göstermiştir. GmAHAS gen bölgeleri %78-94 arasında benzerlik göstermiştir. GmAHAS1 ile GmAHAS2 %93 oranında, GmAHAS3 ile GmAHAS4 %94 oranında benzerlik göstermiştir. GmAHAS1, GmAHAS2 ile GmAHAS3, GmAHAS4 sırasıyla %79 ve %78 benzerlik göstermiştir. Yapılan bu tez çalışmasında da GmAHAS1 ile GmAHAS4 %79 olarak bulunmuş ve bu çalışma ile benzerdir. GmAHAS4 ile GM15 primeri %99 benzer çıkmıştır ve ikiside 15. kromozomda olan ALS gen bölgesini çoğaltmıştır. GMAHAS4 ile GM13 primeri çoğaltan 13. kromozomda bulunan ALS genini ise %92 benzer çıkmıştır. Bu sonuçlarda Ghio vd. (2013) çalışması ile tamamen uyumludur. GmAHAS1-4 genleri ise *A. thaliana* (CSR1) çoğaltılan ALS geni arasında %74-76 arasında benzerlik göstermiştir (Ghio vd. 2013). Benzer başka bir çalışmada tütün ve *Arabidopsis* ALS genleri yaklaşık %70 nükleotid benzerliğine sahip bulunmuştur (Mazur vd. 1987). Yapılan tez çalışmasında çoğaltılan ALS gen bölgeleri

ile *Arabidopsis thaliana* model bitkisi arasındaki benzerlik %69-71 arasında çıkmıştır. Küçük farklar olsa da bu tez çalışması yukarıdaki çalışmalarla bu yönüyle de oldukça benzerdir.

Yabancı ot kontrolü birçok farklı yöntemlerle sağlanabilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde genellikle bu işlem insan gücüne dayanmakta ve giderek köyden şehre göçlerin artması ile yabancı ot kontrolü zorlaşmaktadır. Gelişmiş ülkelerde işçilik pahalıdır; bu nedenle mahsul üretimi büyük ölçüde kimyasal ot kontrol yöntemlerine dayanmaktadır. Herbisitler, kullanımdaki basitlikleri, daha fazla etkinliği ve daha da önemlisi, iş gücü ve zamandan tasarruf ederek kontrol maliyetlerini azaltması sebebiyle yabancı ot kontrolü için ana araçlar haline gelmiştir (McErlich ve Boydston 2013). Yabancı otların seçici kontrolü için herbisitlerin ortaya çıkması, mahsul üretimini, yabancı ot kaynaklı verim kayıplarını ve üreticilerin yüksek kaliteli ürünler elde etmesine büyük katkıda bulunmuştur. Soyada üretimini kısıtlayan en önemli faktörlerden birisi yabancı otlardır. Yabancı otlar soya üreten tüm ülkelerde bir numaralı sorun olarak kabul edilmektedir. İleri teknolojilerde bile, üreticiler yabancı otlar nedeniyle yüksek kayıplara sebep olduğunu belirtmektedirler. Soyanın çimlenme ve ilk gelişim dönemi çok kritiktir çünkü bu dönemde bitki gelişimini tamamlayamadan yabancı otlar ile nem, ışık ve besin maddeleri bakımından rekabet etmektedir. Soya büyümesinin erken aşamalarında ciddi ot rekabeti ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu dönem ot yoğunluğuna, doğasına, çevresel durumuna ve ot rekabetinin süresine bağlı olarak %40-60 oranında verim kayıplarına sebep olabildiği bildirilmiştir (Kachroo vd. 2003). Başka bir çalışmada, yabancı otlar tek başına soya veriminde ortalama %37'lik bir azalmaya neden olurken, diğer mantar hastalıkları ve tarımsal zararlılar kayıpların %22'sini oluşturmakta olduğunu bildirmişlerdir (Oerke ve Dehne 2004). Soya yetiştiriciliğinde, ekimden ilk 20 ila 45 gün arası yabancı ot rekabeti için en kritik dönem olarak kabul edilir ve bu dönemde optimum verim için yabancı otları kontrol altında tutmak gerekmektedir. (Sharma vd. 2007).

Yabancı ot kontrolü soyada yüksek verim elde etmek için büyük önem taşıyan bir uygulamadır. Ülkemizde zaman içerisinde tarım arazisinde çalışan kişi sayısının azalması ve artan işçilik maliyetleri sebebiyle kolay ve pratik tarım uygulamaları ön plana çıkmaktadır. Bu sebeple birçok bitkide bu yönde ıslah programları başlatılmıştır. Ülkemizde soya arazilerinde herbisit kullanılmakta fakat kullanılan soya çeşitlerinde genetik dayanıklılık bulunmamaktadır. O sebeple herbisit firmaları soya arazilerinde soya bitkisi biraz büyüdüktan sonra ve düşük dozlarda uygulama önermektedir. Fakat soyanın küçük olduğu dönemde veya tavsiye edilen büyüklüğe ulaştığında yüksek dozlarda kullanılması sonucunda büyük zarar oluşmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında V1 döneminden V5 dönemine kadar farklı vejetatif büyüme dönemlerinde herbisit uygulanmıştır. Bitkinin hassas olduğu küçük dönemlerde bile dayanıklı bitkilerde herbisit zararı görülmemiştir. Bu tez çalışması ile elde edilen genetik ALS dayanıklılığına sahip soya hattı ülkemiz çiftçileri için büyük fayda sağlayacağı düşünülmektedir. ALS'yi inhibe edici herbisitlerin kullanılması, yüksek yabancı ot kontrolü etkinliği, yüksek yabancı ot seçiciliği ve memelilerde düşük düzeylerde toksik etkilerinden (Sharner ve Singh 1997) dolayı ekolojik yönden faydalı olacağı aşıkardır. Aynı zamanda ALS herbisitlerinin parçalanma sürelerinin az olması sebebiyle toprakta kalıcılığı azdır. Bu yönüyle de soya ekiminden sonra da ekilen bitki için herbisit zararı minimum seviyede kalmaktadır.

Başarılı bir ot kontrolü için herbisit performansını etkileyen faktörleri bilmek çok önemlidir. Etkili bir ot kontrolü sadece bir herbisit kimyasal özelliklerine değil, aynı zamanda bitki ve çevre ile etkileşimine bağlıdır. Sıcaklık, nem, bağıl nem ve güneş radyasyonu gibi çeşitli çevresel faktörler bitkinin fizyolojik durumunu ve herbisitlere duyarlılığını etkilemektedir. Bu faktörler arasındaki etkileşimler, herbisit performansı üzerindeki etkilerinin kesin olarak belirlenmesini karmaşık hale getirmektedir (Varanasi vd. 2016). Bu faktörlerden ışık yoğunluklarındaki değişim, bitkilerin anatomisini, morfolojisini değiştirmekte ve böylece herbisit performansını etkilemektedir. Işık fotosentez için enerji kaynağıdır ve fotosentez oranı bitkinin floem taşınma hızını belirlemektedir (Devine 1989). Net fotosentez miktarı ışık yoğunluğu ile artmakta ve daha yüksek fotosentez sonucunda floem translokasyonu yapraklara uygulanan sistemik herbisitlerin hareketini artırmaktadır. Yüksek ışık yoğunluğunda stomalar açık kalır, böylece yapraklara uygulanan herbisitler için doku penetrasyonu artmaktadır. Tersine, düşük ışık yoğunluğunda, bitkiler, mevcut ışığı yakalamak ve fotosentez talebini karşılamak için daha spesifik yaprak alanı ve bitki yüksekliğine sahip daha ince yapraklar üretme eğilimindedir (Steinger vd. 2003). Bitki büyümesi ve yaprak anatomisindeki bu değişiklikler, bitki tarafından emilen ve tutulan herbisit miktarını etkilemektedir. Daha fazla bitki dallanması, yüzey kapsama alanını ve herbisitlerin emilimini arttırırken, daha kalın yapraklar herbisitlerin yayılmasını yavaşlatarak herbisit aktivitesini azaltmaktadır. (Riederer ve Schonherr 1985). Price (1983), herbisit difüzyonu, kütikula tabakasının viskozitesi ve sprey çözeltilerinin fizikokimyasal özelliklerinin sıcaklıktan dolayı herbisit etkinliğini değiştirebileceğini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada *Desmodium tortuosum*'da 14C-glifosatın 22°C'de alımının ve translokasyonunun, 16°C'ye göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Sharma ve Singh 2001). Benzer şekilde, soyada Roundup Ready 35°C'de 14C-glifosatın 15°C'ye göre daha fazla meristematik dokulara taşınmıştır ve yüksek sıcaklıklarda daha fazla glifosat hasarı ortaya çıkmıştır (Pline vd. 1999). Başka bir çalışmada, soyada sıcaklık 15°C'den 30°C'ye yükseltince dikamba uygulanmasına bağlı fenotipik zarar %0'dan %40'a yükselmiştir (Behrens ve Lueschen 1979). Flumiclorac etken maddeli herbisitte sıcaklık 10°C'den 40°C'ye yükselince lambsquarters ve redroot pigweed yabancı otlar türlerinde daha etkili olmuştur (Fausey ve Renner 2001). Her ne kadar yüksek hava sıcaklıkları herbisit hem emilimini hem de translokasyonunu hızlandırma eğiliminde olsa da, bazı durumlarda yüksek sıcaklıklar da hızlı metabolizmayı tetikleyebilmekte ve böylece hedef bitkiler üzerindeki herbisit aktivitesini azaltabilmektedir (Kells vd. 1984; Johnson ve Young 2002).

Yukarıda yapılan çalışmalardan da görüldüğü üzere ışık ve sıcaklık herbisit etkinliğinde çok önemlidir. Yapılan bu tezde de ışık ve sıcaklığa bağlı olarak herbisit etkinliğinde farklar ortaya çıkmıştır. Kış döneminde uygulanan herbisitler etkisinin ortaya çıkması 21 günü bulabilmekte iken, yaz döneminde araziye uygulanan herbisit çok daha kısa sürede etkisini göstermiştir. Yaz döneminde ışık ve sıcaklıkla birlikte fotosentez hızı ve bitki madde taşınması artmaktadır. Bitkiye uygulanan herbisit bu dönemde daha hızlı taşınarak hedef bölgelere ulaşmış ve böylece herbisit etkisinin daha kısa zamanda ortaya çıkmış olabilir. Yine yaz döneminde yüksek ışık yoğunluğunda stomaların açık olmasına bağlı olarak, herbisit bitkiye penetrasyonu kolay olabilmektedir. Buna bağlı olarak herbisit etkisini göstermesi daha kısa sürmüş olabileceği düşünülmektedir. Herbisit etkisinin ortaya çıkma süresinin yanında herbisit etkinliğinin de sıcaklık ve ışıkla arttığı düşünülmektedir. Bu herbisit etkinliği birçok

değişkenden etkilendiğinden dolayı kesin fikirler yürütmek pek mümkün olamamaktadır. Belki ilerleyen dönemde teknolojinin gelişmesi ile daha detaylı çalışmalar yaparak bunların etkisi daha net anlaşılabilir.

Bitkilerde herbisitlere karşı çapraz dayanıklılık (cross resistance) ve çoklu dayanıklılık (multiple resistance) diye iki terim kullanılmaktadır (Heap ve Lebaron 2001; Vencil vd. 2012). Bunlar da kendi içinde hedef bölge dayanıklılığı ve hedef bölge dışı dayanıklılık olarak ayrılmaktadır. Hedef bölge dayanıklılığı, herbisit bağlama bölgesinin mutasyon sebebiyle değişmesinden dolayı herbisit hedef enzime bağlanmasını önleyerek oluşan bir mekanizmadır. Hedef bölge dışı çapraz dayanıklılık ise, bitkiye herbisit girişini ve taşınmasını azaltan gelişmiş bitki metabolizması veya hedef bölgeye ulaşan herbisit miktarını azaltan mekanizmalar sayesinde oluşan dayanıklılık olarak tanımlanmaktadır (Yuan vd. 2007). Herbisitlere karşı hedef bölge dayanıklılığı ALS enzimlerde oluşan bir veya birden çok nokta mutasyonu sonucu meydana gelmektedir (Cobb, 1992). ALS inhibitörleri, hassas olan bitkilerde hedef enzime bağlanarak hücre bölünmesini çok hızlı bir şekilde inhibe ederek amino asit biyosentezini engellemektedir. Bitkide büyümenin durması hızlı bir şekilde meydana gelmesine rağmen, bitkilerin fiziksel nekroz ve zarar belirtileri günler sonrasında ortaya çıkabilmektedir. Ortam şartlarına göre de bitkinin ölmesi iki ile dört hafta arasında gerçekleşmektedir. Bu süreç sıcak hava koşullarında hızlı gerçekleşirken soğuk hava şartlarında daha uzun sürmektedir. Bunun nedeni enzim faaliyetinin durmasına rağmen, bitki içindeki amino asit havuzlarının metabolizmayı desteklemesi ve bitki ölümünün sadece bu havuzlar kritik seviyenin altına düştüğü zaman meydana gelmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (John vd. 2002). Bu tezde yapılan herbisit uygulamalarında da yaz ve kış dönemlerinde herbisit etkisinin ortaya çıkması farklı sürelerde olmuştur. Bu yönüyle daha önceki elde edilen veriler ve teoriler ile uyumludur. Yapılan 60 ve 90 ppm uygulamalarında herbisit etkisinin ortaya çıkış süresi 30 ppm uygulaması ile eş sürelerde ortaya çıkmıştır. Aynı dönemde atılan herbisitlerin dozu artmasına rağmen herbisit zararının ortaya çıkış süresi çok değişmemektedir. Buda herbisit uygulaması sebebiyle enzim faaliyetinin durmasına rağmen, herbisit zararı bitki içindeki amino asit havuzları bittikten sonra ortaya çıkma teorisini desteklemektedir. Elde edilen bu dayanıklı hatlar sadece klorosulforon etken maddeli herbisit ile muamele edilmiştir. O yüzden bu dayanıklı hatların çoklu veya çapraz dayanıklılık mekanizmalarının olup olmadığı henüz belirlenmemiştir. Daha sonraki farklı grup herbisit uygulamaları sonrasında bize daha net sonuçlar verecektir. Tarla koşullarında ve hidroponik sistemde herbisit etkisi görülen fakat sonradan herbisit etkisini ortadan kaldırıp büyüme ve gelişmeye devam eden bitkiler olmuştur. Bu tezde seleksiyon kriterimiz genetik dayanıklılık üzerine olduğu için hiçbir zarar göremeyen bitkiler seçilmiş ve diğer bitkiler göz ardı edilmiştir.

ALS dayanıklılık mutasyonunun bitki üzerindeki pleiotropik etkisi üzerine çalışmalar kısıtlı ve net olarak ortaya konamamıştır. Fakat triazin herbisitlerine karşı hedef bölge direncinin bitki büyüme ve gelişme etkileri üzerine birçok net çalışmalar vardır (Holt 1990; Warwick 1991; Gronwald 1994; Holt ve Thill 1994; Bergelson ve Purrington 1996). Triazin dayanıklılığı, D1 proteininde bir serin-264 glisin (Ser-264-Gly) amino asit değişikliğinden kaynaklanan bir kloroplastik psbA gen mutasyonu sonucu elde edilmiştir. Ser-264-Gly mutasyonuna sahip triazin dayanıklı birçok yabancı otlarda fotosentetik potansiyelde, büyüme oranlarında, rekabet kabiliyetinde ve üreme

yeteneklerinde önemli azalmalar görülmüştür (Holt ve Thill 1994). Triazin dayanıklı mutasyona sahip bitkilerin fotosentezin ışık etkinliğinin azaldığı bildirilmiştir. Bu olumsuz yansımalar sonucunda ışık ve sıcaklık kombinasyonları, fotosentez ve bitki büyümesi üzerindeki olumsuz etkiler artabilmektedir (Ducruet ve Ort 1988; Hart ve Stemler 1990; Dekker ve Sharkey 1992; Arntz vd. 1998; Jordan vd. 1999; Plowman vd.1999). Herbisit dayanıklı ve hassas bitki kıyaslama çalışmalarının yorumlanmasına dikkat gerekmektedir, çünkü genellikle yapılan bu çalışmalar yabancı otlarda olmuştur ve başlangıçtaki R ve S biyotipleri genetik olarak benzer (izogenik) değildir. Bu nedenle gözlemlenen farklılıklar direnç mutasyonu dışındaki başlangıçtaki genetik polimorfizmlerden kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte, bazı çevresel koşullarında bu fizyolojik farklılıklarda etkisinin olabileceği fikri ortaya atılmıştır. Bu karşılaştırmaların yanında bazı çalışmalarda R biyotipi soğuk hava şartlarında S biyotipinden çok daha hızlı çimlenme kabiliyeti göstermiştir (Dyer vd. 1993; Eberlein vd. 1999; Thompson vd. 1994a).

ALS herbisitlerine karşı hedef bölge dayanıklılığına sahip bazı bitki türlerinde ticari çeşitler geliştirilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda genetik mutasyonlar sonucu elde edilen dayanıklı hatların büyüme gelişme ve verim açısından hassas hatlar arasında bir fark olmadığı bildirilmiştir (McHughen ve Holm 1991; Blackshaw vd. 1994). Bu geliştirilen ticari herbisit dayanıklı çeşitlerde bitki büyüme ve gelişmesinde gerileme veya verim potansiyelinde düşüklük gözlemlenmemiştir. Bunun sebebinin mutasyon meydana getirmek için kimyasal mutagenlerin kullanılmış olabileceğidir. Kimyasal mutagenlerin daha çok tek nükleotid değişikliklerine neden olduğu için hedef gende allelik bir seri de oluşturabilmektedir. Genel olarak, bitkinin bir özelliğinin geliştirilmesinde önemli olan genellikle tek baz değişikliği içeren nokta mutasyonlardır. Bu nokta mutasyonlar protein sentezini etkileyebilir ama bitki içerisinde büyük olumsuz etkilere yol açma şansı oldukça düşüktür. Buna karşın, gamma ışını ve X-ışınları gibi fiziksel mutasyonların kromozomal bir kırılmadan kaynaklanan yapısal kromozom mutasyonlarına yol açmaktadırlar (van Harten 1998). Delesyonlar, duplikasyonlar, inversiyonlar ve translokasyonlar gibi yapısal mutasyon meydana getirerek bitkinin agronomik ve fenotipik özelliklerini oldukça değiştirmektedir. Bu bitkide istenilen özelliklerin yanında birçok istenmeyen özelliği de beraberinde getirmektedir. Herbisite toleranslı mutantların gelişiminde gama ışınlanması ile yapılan mutasyonlar, kimyasal mutagenler kadar popüler ve başarılı olamamaktadır. Gama ışınlamasını, kimyasal mutagen uygulamasına kıyasla daha pahalı ekipmana ihtiyaç duymakta ve daha zor gerçekleştirilmektedir. Bu zorlukların yanında Gama ışınlamasında başarı şansı da kimyasal mutagenlere göre çok düşüktür. Bugüne kadar, gama ışınlanması ile elde edilen veya geliştirilen herbisite toleranslı hiçbir bitki bulunmamaktadır. Çok sayıda farklı mutasyonlardan dolayı oluşan dayanıklı bitkilerin çokluğu düşünüldüğü zaman hepsinin pleiotropik etkilerinin araştırılması çok zordur. Yapılan bazı çalışmalardan yola çıkarak, ALS inhibitörlerine karşı hedef alan direncinin en azından bazı koşullar altında pleiotropik etkileri olabileceği ve bitki büyüme ve gelişimini etkilenebileceği belirtilmiştir. Fakat ALS bölgesinde oluşan dayanıklılıktan kaynaklanan pleiotropik etkiler triazin direncinin oluşturduğu pleiotropik etki kadar büyük fikrini beyan etmişlerdir. (Tranel ve Wright 2002). Bu tezde pleiotropik etkileri üzerine henüz araştırmalar yapılmamış, fakat bitkinin ilk izlenimlerine bakarak bu etkinin çok büyük olacağı düşünülmemektedir. Dayanıklı bitkiler tarla koşullarında ve hidroponik sistemde bitki ilaçlamadan sonrada hiçbir fenotipik etki göstermeden büyümesine

devam etmiştir. Fakat büyüme hızı ve verim gibi kriterler bakımından kesin fikirler yürütmek için veriler yetersizdir. Bu pleiotropik etki, mutasyon, herbisit miktarı ve çevresel faktörler gibi birçok değişkene bağlı olduğu için kesin sonuçlar almayı zorlaştırmaktadır. Arısoy çeşidi genetik olarak durulmuş olduğu için mutasyon uygulanmadan önce yaklaşık %98 saflıktaydı, şimdi mutasyon sonucu elde edilen dayanıklı ile kıyaslama yapıldığı zaman mutasyonun bitkinin agronomik özelliklerini ne kadar etkilediği ortaya çıkacaktır. Genelde yapılan pleiotropik etki çalışmaları yabancı otlarda yapılmış ve başlangıçtaki izogeniklik seviyesi belli olmadığı için çıkan sonuçlar net olarak yorumlanamamaktadır. Yapılacak olan ileriki pleiotropik etki çalışmasında başlangıç materyali nerdeyse aynı genetik benzerlikte olduğu için, çıkan farklılık büyük oranda mutasyondan kaynaklanacaktır. İleriki çalışmalarda ikisi arasındaki farka bakılarak mutasyonun etkisi daha net ortaya konabilecektir.

Kültür bitkilerinde ve yabancı otlarda şimdiye kadar birçok ALS inhibitörü herbisitlere karşı dayanıklılık çalışmaları yapılmış ve raporlanmıştır (Mazur vd. 1987; Swanson vd. 1988; Mchugen 1989; Anderson ve Georgeson 1989; Sebastian vd. 1987, 1989; Mallory-Smith vd. 1990; Brown vd. 1990; Newhouse vd. 1992; Dewaele vd. 1997; Wright ve Penner 1998; Kolkman vd. 2004; Yu vd. 2008; Sala vd. 2008, 2012; Lamego vd. 2009; Krysiak vd. 2011; Adamczewski ve Matysiak 2012; Ghio vd. 2013; Walter vd. 2014; Brosnan vd. 2016; Jimenez vd. 2016; Kaya Altop vd. 2017; Zhang vd. 2017). Bitkilerin ALS inhibitörlerine karşı dayanıklılık geliştirmeleri genellikle hedef bölge mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (Tranel ve Wright 2002). ALS dayanıklılığı kazanmış bitkilerde sekiz farklı amino asidin mutasyona uğraması sonucu ortaya çıkmış ve bu noktalar; Ala-122, Pro-197, Ala-205, Asp-376, Arg-377, Trp-574, Ser-653 ve Gly- 654 (*Arabidopsis thaliana* protein sekansına göre).

Ala-122 noktasında meydana gelen mutasyonlar IMI grubu herbisitlere dayanıklılık sağlamakta SU grubu herbisitlere dayanıklılık konusunda tutarlı sonuçlar alınamamıştır (Çizelge 2.2). Ala-122-Asn değişikliği *Echinochloa crus-galli*'de hem IMI hemde SU grubu dayanıklılık sağladığı bildirilmiştir (Panozzo vd. 2017). Bu noktadaki değişiklik mayada SU kimyalarına direnç sağladığı bildirilmiştir (Duggleby vd. 2008) ve bu pozisyondaki amino asit değişiklikleri hem SU hem de IMI kimyalarına direnç gösterebilmektedir (Yu vd. 2014). Rapor edilen 12 tane Ala-122 nokta mutasyonunun hepsi IMI grubuna dayanıklılık sağlarken bunlardan sadece 3 tanesi SU grubuna dayanıklı bulunmuştur. Geri kalanlardan 4 tanesi hassas ve 5 tanesi dayanıklılık olup olmadığı belirlenememiştir (Çizelge 2.2).

Şimdiye kadar ALS gen bölgesinde amino asit noktalarında meydana gelen mutasyon sonucu rapor edilen dayanıklılık sayısı 180 adettir. Bu mutasyonlar 12 adet Ala-122, 91 adet Pro-197, 6 adet Ala-205, 13 adet Asp-376, 1 adet Arg-377, 41 adet Trp-574, 14 adet Ser-653 ve 2 adet Gly- 654 noktalarında gerçekleşmiştir (Çizelge 2.2). Rapor edilen mutasyon noktalarının yarısından fazlası Pro-197 noktasında ve sonrasında en fazla Trp-574 noktasında gerçekleşmiştir. Rapor edilen yaklaşık 21 yabancı ot türünde Pro-197 bölgesinde tespit edilen 12 amino asit değişimleri içerisinde Pro-197-Ser değişikliğinin frekansı diğerlerinin frekansından çok daha yüksektir. Bir nükleotid değişikliği gerektiren mutasyonların frekansı, birden çok nükleotid değişikliği gerektiren mutasyonların frekansından fazla olduğu önceki çalışmalarda raporlanmıştır (Yu ve Powles 2014). SU grubu herbisitlere dayanıklılığı çoğunlukla Pro-197'deki amino asit mutasyonu sağlarken, Trp-574-Leu amino asit değişikliği hem SU hem de

IMI grubu herbisitlerin ikisine birden dayanıklılık sağlamaktadır. Bazı raporlarda Pro-197 değişikliği olan biyotiplerde düşük veya orta seviyelerde IMI dayanıklılığı gözlenmiştir ancak çeşitli IMI herbisitleri arasında tutarlılık sağlanmamıştır (Saari vd. 1994). ALS dayanıklılığındaki nokta mutasyonların çoğunun Pro-197 noktasında olması ve bu noktada daha fazla dayanıklılık rapor edilmesi dayanıklılığın güvenilirliğini artırmaktadır. Yapılan bu tezde tüm dayanıklılık sağlayan bitkilerde tek ortak mutasyon bu noktada tespit edilmiştir. Bu noktanın mutasyona uğramasının frekansı diğer noktalara göre daha fazla olmasının sebebi bilinmemektedir. Buna karşın SU grubu herbisitlerin enzime bağlanma noktasındaki kritik noktanın burası olabileceği ve bu noktadaki mutasyonun herbisit bağlanmasını engellediği düşünülmektedir.

Şimdiye kadar Trp-574 noktasında 41 vaka rapor edilmiş ve bunların 38 tanesi Trp-574-Leu değişikliği olmuştur (Çizelge 2.2). Yapılan bazı çalışmalarda *Kochia scoparia*'da Trp-574-Arg (Warwick vd. 2008), *Galium aparine*'da Trp-574-Gly (Sun vd. 2011) ve *Apera spica-venti*'de Trp-574-Met (Hamouzova vd. 2013) tespit edilen bu amino asit değişiklikleri IMI herbisit dayanıklılığı göstermemiştir. Fakat *Digitaria sanguinalis* bitkisinde Trp-574-Arg değişikliği hem IMI hemde SU grubu herbisitlere dayanıklılık sağlamıştır. Ala-205 noktasında meydana gelen ALS dayanıklılık olan bir yabancı ot biyotipi geniş çapraz dayanıklılık göstermiştir fakat direnç seviyesi Trp574 değişikliği olan biyotiplerde yaklaşık 10 kat daha az olduğu belirtilmiştir (Tranel ve Wright 2002).

Yapılan birçok SU grubu herbisit dayanıklılık çalışmalarında *Arabidopsis thaliana* ALS gen dizilimine göre 197. amino asitte mutasyonlar tespit edilmiştir. Sebastian vd. (1989) yaptıkları çalışmada 3 farklı soya çeşidine farklı oranlarda mutasyonlar uygulamışlar ve elde ettikleri dayanıklı hatta Pro-197 noktasında mutasyon tespit etmişlerdir. Yu vd. (2008), Avustralya'da İtalyan çimi (*Lolium rigidum*) herbisit dayanıklılığı üzerine yaptıkları çalışmada Pro-197-Ala, Pro-197-Arg, Pro-197-Gln, Pro-197-Leu, Pro-197-Ser değişiklikleri rapor etmiştir. Krysiak vd. (2011) ipek çiminde (*Apera spica-venti* L.) dokuz biyotip Pro-197 Serin veya Treonin amino asit değişikliği olduğunu bildirmişlerdir. Adamczewski ve Matysiak (2012) Polonya'da yaptıkları bir çalışmada ipek çimi (*Apera spica-venti* L.) biyotip R3'teki dayanıklılık mekanizmasının mutasyon (hedef bölge) tipinde olduğu ve Pro-197-Ser mutasyonundan kaynaklandığı belirtmişlerdir. Ghio vd. (2013) soyada sülfonilüre (SU grubu) herbisitlere dayanıklılık sağlayan Als1 geninin moleküler karakterizasyonu yaptıkları çalışmada, 532. noktadaki bazın sitozinden timine dönüştüğünü bildirmişlerdir. Bu baz değişikliği sebebiyle 197. sıradaki prolin (CCC) amino asidinin, serin (TCC) amino asidine dönüşmesi sonucu herbisit dayanıklılığı kazandığını bildirmişlerdir. Walter vd. (2014) soyada asetolaktat sentez herbisitlerine tolerans sağlayan Als1 ve Als2 mutasyonlarının moleküler ve fenotipik karakterizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada Pro-197-Ser değişikliği tespit ettiklerini raporlamışlardır. Zhang vd. (2017) Çin'de kış buğday tarlalarında gözlemledikleri *D. sophia* türünde dayanıklılığın farklı bitkilerde Pro-197-Leu, Pro-197-His, Pro-197-Ser, Pro-197-Thr mutasyonlarından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Yapılan bu tezde 8 nokta mutasyonu tespit edilmiş ve bunun sonucunda 7 amino asit değişikliği bulunmuştur. Sırasıyla 404, 407, 408, 431, 532, 1768, 1790 ve 1875 noktalarında mutasyon ve 154, 155, 163, 197, 609, 616 ve 644 noktalarında amino asit değişikliği tespit edilmiştir. *Arabidopsis thaliana* model bitkisinin ALS gen protein sekans dizilimine göre Tyr-154-Ser, Ala-155-Val, Val-163-Asp, Pro-197-Ser, Gly609-

Val, Thr-616-Met ve Gln-644-His amino asit değişiklikleri tespit edilmiştir. Tüm dayanıklı bitkilerde farklı sayı ve noktalarda mutasyon meydana gelmiştir. Dayanıklılık gösteren 6 bitkide ortak olan tek mutasyon Ghio vd. (2013) çalışması ile aynı noktadaki baz değişikliğidir. Bu mutasyon sonucunda *Arabidopsis thaliana* ALS gen sekansına göre 197. noktadaki CCC olan baz dizilimi TCC dizilimine dönmesi sonucu prolin-197 serin (Pro197-Ser) dönüşmüştür. Hassas olan Arısoy çeşidinde ise dizilim değişmeden kalmıştır. Bu mutasyon noktasının literatürde SU grubu herbisitlere dayanıklılık sağladığı birçok çalışmada belirtilmiştir. Tüm dayanıklı bitkilerde bu mutasyon noktasının bulunduğu için diğer mutasyon noktalarının dayanıklılık sağlayıp sağlamadığı veya dayanıklılığa katkısının olup olmadığı net olarak belirlenememiştir. Yine bu noktalardan bazılarının veya hepsinin dayanıklılığı artırıcı etkisinin olup olmadığı soru işaretidir. Bu potansiyel dayanıklılık mutasyon noktalarının doğrulamak için bitkide başka amino asit değişikliği yokluğunda tek tek fonksiyonel karakterizasyonu yapılması gerekmektedir. Elde edilen 7 amino asit değişikliğinden Pro197-Ser noktası hariç, diğerleri literatürde hiç dayanıklılık mekanizması ile ilişkilendirilmemiştir.

Swanson vd. (1988) kanola (*Brassica napus*) bitkisinde in vitro kültüründe mikrospor ve protoplast seçimi ile klorosülfürona karşı toleranslı bitki seçimi yapmışlardır. Elde ettikleri dayanıklı hat ile ticari bir çeşidi melezlemişlerdir. M-37 ve Topas'ın karşılıklı olarak melezlemesi sonucunda dayanıklılığın yarı-dominant olarak taşındığını bildirmişlerdir. Melezleme sonucunda seçilen hat 30 g ha⁻¹ klorosülfüron tolerans sağlamıştır. Yapılan bu tezde ise tarla herbisit uygulamasında 1200 m² alan için 9 g (7.5x1.2 = 9) tavsiye edilirken ilaçlama için 400 litre olan su tankına 12 g ilaç konulmuştur. Tavsiye edilen dozun %25 fazlası atılmıştır. Bu tez çalışmasında 100 g ha⁻¹ oranında herbisit kullanılmış ve Swanson vd. (1988) yaptıkları çalışmada uyguladıkları dozun 3 katından daha fazla herbisit uygulanmıştır. 60 ve 90 ppm uygulanan herbisit çalışmalarında ise bu oran katlanarak artmıştır. 60 ve 90 ppm kullanıldığı durumlarda bile bitkide fenotipik bir zarar gözlemlenmemiştir. Genetik dayanıklılık elde edildiği için doz artsa bile bitkide zarar meydana getirmeyeceği düşünülmektedir. Çünkü bu nokta mutasyonu herbisit bitki içerisindeki enzime bağlanmasını engellemekte ve böylece enzim hiç etkilenmeden bitki içerisindeki faaliyetine devam etmektedir. Bitki tamamen herbisit ile yıkansa bile herbisit hedef bölgeye bağlanmayacaktır. Ancak her kimyasalın fazlası gibi herbisitlerinde fazlası da toksik etki yapabilir.

Sebastian vd. (1989) yaptıkları çalışmada AlsI'i SU herbisitlerine dayanıklılık sağlayan yarı-dominant soya mutasyonu olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu tezde dayanıklılık dominant kalıtım göstermiştir. Yapılan testlemelerde dayanıklılık 3:1 oranında açılım göstermiştir. Dayanıklılığın dominant kalıtım göstermesi ıslah açısından ileri generasyonlara aktarılması ve takip edilmesi bakımından büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Herbisit dayanıklılığı heterozigot durumda bile dayanıklılık sağladığından dolayı genetik çalışmalarda ve tohum üretiminde çok faydalı olacaktır. SU grubu herbisitlere dayanıklı bir erkek ebeveyn ile hassas bir dişi ebeveyn melezlemesi sonucunda elde edilen F₁ melezleri hepsi dayanıklılık özelliğini taşıyacaktır. Hassas bitkilerle melezleme yaparken melezin tutmadığı durumlarda SU grubu herbisit ile muamele edilince hassasların ölmesi sonucunda hibrid popülasyondan hassas genotipler kolaylıkla ayrılacaktır. Dominant herbisit dayanıklılığı olan çeşitlerde

tüm alana sadece seçici bir herbisit püskürtülerek hassas bitkilerin ölmesiyle, sadece dayanıklıların seçilmesine imkânı tanıyacaktır. Böylece kolaylıkla kendi kendine melezlenmiş veya melezleme sırasında problem olan hassas hatların ticari ölçekte saflaştırılması veya karışan hassas bitkilerin kolayca ayrılmasına olanak sağlayacaktır. Yapılan bu tez çalışmasında da dayanıklılık dominant olduğu düşünülmektedir. Yapılan testlerde 8 bitkinin 6'sının dayanıklı çıkması bu fikrimizi desteklemektedir. Yapılacak olan açılım çalışmalarından sonra tam olarak sonuçlar elde edilecektir. Herbisit dayanıklılığın dominant olması bize ıslah ve melezleme çalışmalarında çok kolaylıklar sağlayacaktır. Elde edilen dayanıklı bitkilerde mutasyonun yan etkilerinin az olduğu izlenimleri oluşmuştur. Tersine bir durumda dayanıklılık dominant olduğu için kolaylıkla ticari çeşitlere aktarılıp hızlı şekilde ticari hale getirilebilecektir.

Ghio vd. (2013) yürüttükleri çalışmada ALS genini soya bitkisi genomunda blast yapmışlardır. 4 farklı kromozomda (4, 6, 13, 15) ALS genini tespit etmişlerdir. Walter vd. (2014) Yabancı tip Williams 82 genomunda ALS genini blast etmişler ve kromozom 1, 4, 6, 13 ve 15 olmak üzere 5 kromozom üzerinde bu geni tespit etmişlerdir. İntronlar ile kromozom 1 üzerindeki genin 278 amino asit tespit edilmiş çok kısa olduğu halde yine de gen sekanslama analizine dâhil edilmiştir. Fakat yapılan analizler sonucunda kromozom 1 üzerinde bulunan bu gen geçerli ve tutarlı bir sonuç vermemiştir. Yapılan iki çalışmada Kromozom 4 üzerindeki ALS geninde Pro-197 noktasında mutasyon tespit edilmiştir. Diğer kromozom 6-13-15 üzerindeki ALS geninde bu noktada hiç mutasyona rastlanmamıştır. Bu kromozom üzerindeki ALS genleri bitki içerisinde faaliyette mi değil yoksa bu bölgeler çok daha korunaklı olduğu için mutasyona mı uğramıyor soruları akıllara gelmektedir. Yapılan bu tezde de tüm mutasyonlar Kromozom-4 üzerindeki ALS geninde meydana gelmiştir. Diğer kromozom üzerinde bulunan ALS genlerinde ise hiçbir mutasyona rastlanmamıştır. Burdan yola çıkarak bu bölgelerin daha korunaklı olabileceği fikri bir adım öne çıkmaktadır. Bu soruların cevabı ileriki çalışmalar ile netlik kazanacaktır.

Bu tez çalışmasında elde edilen dayanıklı bitkiler agronomik testler sonucunda yeterli bulunması halinde direkt tescil ve patent başvurusunda bulunulacaktır. Herbisit dayanıklılığına sahip fakat istenmeyen özelliklerin bulunduğu hatlar elit ve ticari hatlarla melezlenerek ülkemizde ıslah edilmiş ilk herbisit dayanıklı soya hatlarının geliştirilmesine imkân sağlayacaktır. Bu herbisit dayanıklı hatlar sayesinde soya da yeni herbisit grubunun kullanılmasına ve ruhsat almasına fırsat tanıyacaktır. Sürekli aynı herbisit gruplarının kullanılması sonucu yabancı otların dayanıklılık kazanması kaçınılmazdır. Bu sebepten dolayı soyada kullanılabilecek ve diğer herbisitlerle rotasyona girebilecek yeni herbisitler ülkemiz ekolojisi ve üreticileri adına büyük katkılar sağlayacaktır. Ülkemizde soya herbisit dayanıklılık çalışmasının bulunmamasından dolayı bu tez oldukça özgün bir çalışma olmuştur.



6. SONUÇLAR

Ülkemizin toprak özellikleri ve iklim koşulları yağlı tohumlu bitkilerin üretimi açısından büyük bir potansiyele sahip olmasına rağmen, yağ ihtiyacını karşılayacak seviyelerde üretim gerçekleştirilememekte ve oluşan bitkisel yağ açığı ithalat yoluyla karşılanmaktadır. Ülkemizin artan yağ açığını kapatmak için soya üretimini artırmaya yönelik bir takım çalışmalar yapmak gerekmektedir. Yabancı otlar soyada verimi kısıtlayan en önemli sebeplerden biridir. Bu nedenle soya ekim alanlarının tamamında yabancı ot mücadelesi yapılmaktadır. Soya bitkisine ruhsatlı ot ilacının az sayıda olması ve sürekli aynı türden herbisitlerin kullanılması; herbisite dirençli yabancı otların oluşumuna neden olabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı diğer herbisitlerle döngüye girebilecek yeni total herbisitlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında soya tohumlarına kimyasal bir mutagen olan EMS uygulanarak, SU grubu herbisitlere dayanıklı yeni soya hatlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu ana amaç doğrultusunda aşağıda sunulan sonuçlara ulaşılmıştır. Bunlar:

1. Bu tez çalışmasında Arısoy çeşidine ait 10.000 adet soya tohumuna %0.1 dozunda EMS uygulanmıştır. Uygulama yapılan 10.000 adet tohumdan 4150 adet tek bitki yetiştirilmiştir. Bu oran yaklaşık %42'ye denk gelmektedir.
2. Herbisit etkili dozu belirlemek için sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 100 ppm dozlarında herbisit ayarlanarak bitkilere uygulanmıştır. Gözlemler sonrasında en uygun herbisit dozunun 30 ppm olduğu belirlenmiştir.
3. Hidroponik sistem hızlı ve güvenilir bir sistem olmasının yanında az bir alandan birçok bitkiyi testleme imkânı sunmaktadır. Aynı zamanda herbisit su kültürüne ilave edilmesinden dolayı her bitki eşit oranda herbisite maruz kalmakta ve daha homojen ve sağlıklı bir testleme yapılmaktadır. Hidroponik sistemin hızlı bir testleme aracı olduğu gösterilmiştir.
4. M₂ generasyonunda 4150 bitkiden elde edilen 300.000 adet tohum bulk olarak ekilmiştir. Bitkiler 40 cm boya ulaştığında klorosulforon etken maddeli herbisit ile 30 ppm dozunda ilaçlanmıştır. Herbisit için firma tarafından önerilen doz 7.5 gr da⁻¹ olarak belirtilmesine rağmen, potansiyel dayanıklı bitkilerin çok daha rahat bir şekilde seçilebilmesine imkan veren 30 ppm dozun (10 gr da⁻¹) tarlada da etkili sonuç verdiği gösterilmiştir.
5. Tarla koşullarında 7 bitki (TAR1-7) ve hidroponik sistemde 3 bitki (SU1-3) potansiyel dayanıklı olarak belirlenmiştir. Dayanıklılık konfirmasyonu için bu bitkilerden 10'ar tohum su kültürüne ekilmiş ve tekrar herbisit testlemesinden geçirilmiştir. Bu konfirmasyon testlemesinde sadece TAR 1 bitkisinin dayanıklı olduğu bulunmuştur.
6. TAR1 bitkisine 2X ve 3X (60 ve 90 ppm) herbisit testlemesi yapılmış ve bu yüksek dozlarda da bitki dayanıklılık göstermiştir. Bu sonuç dayanıklılığın metabolik olmadığını, genetik kaynaklı olduğunu göstermiştir.
8. Fenotipik olarak dayanıklılığı konfirme edilen TAR1 bitkisinin tohumlarından yetiştirilen bitkilerin 5'inde moleküler analizler yapılmıştır. Bu

dayanıklı bitkilerin PCR ürünün sekansında 8 nokta mutasyonu saptanmıştır. Sırasıyla 404 (A/C), 407 (C/T), 408 (G/A), 431 (T/A), 532 (C/T), 1768 (G/T), 1790 (C/T) ve 1875 (G/T). Tespit edilen 8 nokta mutasyonu 7 amino asit değişikliğine neden olmuştur. *Arabidopsis thaliana* model bitkisinin ALS gen protein sekans sıralamasına göre 154. amino asit tirozinden serine (Tyr/Ser), 155. aminoasit alaninden valine (Ala/Val), 163. amino asit valinden aspartata (Val/Asp), 197. amino asit prolinden serine (Pro/Ser), 609. amino asit glisinden valine (Gly/Val), 616. amino asit treoninden metionine (Thr/Met) ve 644. amino asit glutaminden histidine (Gln/His) dönüşmüştür.

9. Tüm dayanıklı bitkilerde farklı sayı ve noktalarda mutasyon meydana gelmiştir. Dayanıklılık gösteren tüm bitkilerde tek ortak mutasyon, 197. noktadaki (*Arabidopsis thaliana*'ya göre) CCC olan baz dizilimi TCC dizilimine dönüşmüştür.

10. GmAHAS1 primeri ile çoğaltılan ve 4. kromozomda bulunan ALS geni için 5 bitkide toplam 32 nokta mutasyonu tespit edilmiştir. Mutasyon frekansı bu bölge için 3.2/1000 bp olarak bulunmuştur.

11. GmAHAS1 primeri ile çoğaltılan ALS gen bölgesi GmAHAS4, GM13 ve GM15 primerleri ile çoğaltılan ALS bölgeleriyle ve model bitki *Arabidopsis thaliana* ALS gen bölgesi ile sırasıyla, %78.8, %78.2, %78.5 ve %69.9 oranında benzer bulunmuştur.

Bu tez çalışması kapsamında ülkemizde ilk defa soyada EMS mutageni kullanılarak klorosulforon etken maddeli herbisite karşı dayanıklı soya mutanı bulunmuştur. Bu mutantın çeşit olarak tescil edilmesi için gerekli çalışmalar başlatılmış olup, soya yetiştiriciliğinde önemli bir sorun olan yabancı ot mücadelesinde bu mutanttan üretilebilecek çeşitlerin önemli bir imkan ve kolaylık sunması beklenmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Adamczewski, K. and Maysiak, K. 2012. The mechanism of resistance to ALS-inhibiting herbicides in biotypes of wind bent grass (*Apera spica-venti* L.) with cross and multiple resistance. *Polish Journal of Agronomy*, 10: 3–8.
- Alcocer-Ruthling, M., Thill, D.C. and Shafii, B. 1992. Differential competitiveness of sulfonylurea resistant and susceptible prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technol*, 6: 303-309.
- Anai, T. 2012. Potential of a mutant-based reverse genetic approach for functional genomics and molecular breeding in soybean. *Breeding Science*, 61: 462–467
- Anderson, P.C. and Georgeson, M. 1989. Herbicide tolerant mutants of corn. *Genome*, 34: 994-999.
- Arntz, A.M., DeLucia, E.H. and Jordan, N. 1998. Contribution of photosynthetic rate to growth and reproduction in *Amaranthus hybridus*. *Oecologia*, 117: 323–330.
- Aragão, F.J.L., Sarokin, L., Vianna, G.R. and Rech, E.L. 2000. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean plants at high frequency. *Theor Appl Genet*, 101:1-6.
- Arisha, M.H., Shah, S.N.M., Gong, H., Jing, H., Li, C., Zhang, H.X. vd. 2015. Ethyl methane sulfonate induced mutations in M₂ generation and physiological variations in M₁ generation of peppers (*Capsicum annuum* L.). *Front. Plant Sci*, 6: 399.
- Ashburner, M. 1990. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1440 p.
- Auerbach, C. 1941. The effect of sex on the spontaneous mutations rate in *Drosophila melanogaster*. *J. Genet.* 11: 255-265.
- Auerbach, C. and Robson, J.M. 1946. Chemical production of mutations. *Nature*, 157: 302.
- Bai, S., Zhang, F., Li, Z., Wang, H., Wang, Q., Wang, J., Liu, W. and Bai, L. 2019. Target-site and non-target-site-based resistance to tribenuron-methyl in multiply-resistant *Myosoton aquaticum* L. *Pestic. Biochem. Phys*, 155: 8–14.
- Bass, C. and Field, L.M. 2011. Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Management Science*, 67: 886–890.
- Beckie, H.J. and Tardif, F.J. 2012. Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Prot*, 35:15–28.
- Behrens, R. and Lueschen, W.E. 1979. Dicamba volatility. *Weed Sci*, 27: 486–493.
- Bekkaoui, F., Nadin-Davis, S.A. and Crosby, W.L. 1993. Isolation and structure of an acetolactate synthase gene from *Schizosaccharomyces pombe* and complementation of the *ilv2* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet*, 24: 544-547.

- Bellinder, R., Gummesson R.G. and Karlsson, C. 1994. Percentage driven government mandates for pesticide reduction: the Swedish model. *Weed Technol.* 8: 350-359.
- Bergelson, J. and Purrington, C.B. 1996. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *The American Naturalist* 148: 536–558
- Bernard, R.L. 1972. Two genes affecting stem termination in soybeans. *Crop Sci.* 12: 235–239.
- Bernasconi, P., Woodworth, A.R., Rosen, B.A., Subramanian, M.V. and. Siehl, D. L. 1995. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *J. Biol. Chem.* 270: 381-385.
- Bernasconi, P., Woodworth, A.R., Rosen, B.A., Subramanian, M.V. and Siehl, D.L. 1996. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *J. Biol. Chem.* 271: 925.
- Bhowmik, P.C. 1997. Weed biology: importance to weed management. *Weed Science*, 45: 349-356.
- Blackshaw, R.E., Kanashiro, D., Moloney, M.M. and. Crosby, W.L. 1994. Growth, yield and quality of canola expressing resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. *Can. J. Plant Sci*, 74:745-751
- Bolon, Y.T., Haun, W.J., Xu, W.W., Grand, D., Stacey, M.G., Nelson, R.T., Gerhardt, D.J., Jeddeloh, J.A., Stacey, G., Muehlbauer, G.J., Orf, J.H., Naeve, S.L., Stupar, R.M. and Vance, C.P. 2011. Phenotypic and Genomic Analyses of a Fast Neutron Mutant Population Resource in Soybean. *Plant Physiology*, 156: 240–253.
- Bork, P., Ouzounis, C., Sander, C., Scharf, M., Schneider, R. and Sonnhhammer, E. 1992. Comprehensive sequence analysis of the 182 predicted open reading frames of yeast chromosome III. *Protein Sci*, 1: 1677-1690.
- Boyko, A. And Kovalchuk, I. 2008. Epigenetic control of plant stress response. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49: 61–72.
- Bradshaw, L.D., Padgett, S. R., Kimball, S.L. and Wells, B.H. 1997. Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technol*, 11:189-198.
- Brandle, J. E. and. Miki, B.L. 1993. Agronomic performance of sulfonylurea-resistant transgenic fluecured tobacco grown under field conditions. *Crop Sci*, 33: 847-852.
- Brattsten, L.B., Holyoke, C.W., Leeper, J.R. and Raffa, K.F. 1986. Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. *Science*, 231: 1255-1260
- Brosnan, J.T., Vargas, J.J., Breeden, G.K., Grier, L., Aponte, R.A., Tresch, S. and Laforest, M. 2016. A new amino acid substitution (Ala-205-Phe) in acetolactate synthase (ALS) confers broad spectrum resistance to ALS-inhibiting herbicides. , 243:149–159.

- Brown, H.M., Wittenbach, V.A., Forney, D.R. and Strachan, S.D. 1990. Basis for soybean tolerance to thifensulfuron methyl. *Pestic Biochem Physiol*, 37: 303-313.
- Brown-Guedira, G.L., Thompson, J.A., Nelson, R.L. and Warburton M.L. 2000. Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers. *Crop Sci*, 40: 815-823.
- Bowen, T.L., Union, J., Tumbula, D.L. and Whitman, W.B. 1997. Cloning and phylogenetic analysis of the genes encoding acetohydroxyacid synthase from the archaeon *Methanococcus aeolicus*. *Gene*, 188: 77-84.
- Buhler, D.D., Hartzler, R.G. and Forcella, F. 1997. Implications of weed seedbank dynamics to weed management. *Weed Science*, 45: 329-336.
- Burnet, M.W., Christopher, M.J.T., Holtum, J.A.M. and Powles, S.B. 1994a. Identification of two mechanisms of sulfonylurea resistance within one population of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) using a selective germination medium. *Weed Sci*, 42: 468-473
- Burton, J.W. 1985. Breeding soybeans for improved protein quantity and quality. In Proceedings of the 3rd World Soybean Research Conference., Ames, I A, August R. Shibles, (Eds). Westview Press, Boulder, CO, pp. 361-367.
- Burton, J. W. 1997. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Field Crops Res*, 53: 171-186.
- Busi, R. and Powles, S.B. 2009. Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. *Heredity*, 103: 318-325.
- Busi, R. Vila-Aiub, M.M. and Powles, S.B. 2011. Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Heredity*, 106: 817-824.
- Busi, R. Neve, P. and Powles, S. 2013. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. *Evolutionary Applications*, 6: 231-242.
- Buss, G.R. 1983. Inheritance of a male-sterile mutant from irradiated Essex soybeans. *Soybean Genet. Newsl*, 10: 104-108.
- Carlson, J.B. and Lersten, N.R. 2004. Reproductive morphology. In Soybeans: Improvement, Production, and Uses, 3rd ed., Agronomy Monograph 16. H.R. Boerma and J.E. Specht, (Eds). American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/Soil Science Society of America, pp. 59-95.
- Carroll, B.J., McNeil, D.L. and Gresshoff, P.M. 1985. Isolation and properties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *Proc Natl Acad Sci*, 82: 4162-4166.
- Chaleff, R.S. and Mauvais, C.J. 1984. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science* 224: 1443-1445.
- Chapin, F.S. Autumn, K. and Pugnaire, F. 1993. Evolution of suites of traits in response to environmental stress. *American Naturalist*, 142: 78-92.

- Chen, J., Chu, Z., Han, H., Goggin, D.E., Yu, Q., Sayer, C. and Powles, S.B. 2020. A Val-202-Phe α -tubulin mutation and enhanced metabolism confer dinitroaniline resistance in a single *Lolium rigidum* population. *Pest Manag Sci*, 76: 645-652.
- Chevillon, C., Pasteur, N., Marquine, M., Heyse, D. and Raymond, M. 1995. Population-structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*, 49: 997–1007.
- Chipman, D., Barak, Z and Schloss, J.V. 1998. Biosynthesis of 2-aceto- 2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. *Biochim Biophys Acta*, 1385: 401-419.
- Christoffoleti, P.J., Westra, P. and Moore, E. 1997. Growth analysis of sulfonylurea resistant and susceptible *kochia* (*Kochia scoparia*). *Weed Sci*. 45: 691-695.
- Christopher, J.T., Powles, S.B., Liljegren, D.R. and Holtum, J.A.M. 1991. Cross resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*): II. Chlorsulfuron resistance involves a wheat-like detoxification system. *Plant Physiol*, 95: 1036-1043.
- Christopher, J.T., Powles, S.B. and Holtum, J.A.M. 1992. Resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*) involves at least two mechanisms. *Plant Physiol*. 100: 1909-1913.
- Cobb, A. 1992. Herbicides and plant physiology, department of life sciences. *polytechnic*, 126–143
- Cohan, F.M., King, E.C. and Zawadzki, P. 1994. Amelioration of the deleterious pleiotropic effects of an adaptive mutation in *Bacillus subtilis*. *Evolution* 48: 81–95.
- Coley, P.D., Bryant, J.P. and Chapin, F.S. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* 230: 895–899.
- Conner, A.J. and Jacobs, J.M.E. 2019. A natural, conditional gene drive in plants. *bioRxiv*, 519884.
- Cooper, J.L., Till, B.J., Laport, R.G., Darlow, M.C., Kleffner, J.M., Jamai, A. et al. El-Mellouki, T., Liu, S., Ritchie, R., Nielsen, N., Bilyeu, K.D., Meksem, K., Comai, L and Henikoff, S. 2008. TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biol*, 8:9.
- Coscina, D.V., Yehuda, S., Dixon, L.M., Kish, S.J. and Greenwood, C.E.L. 1986. Learning is improved by soybean oil diet in rats. *Life Sci*, 38: 1789–1794.
- Cotterman, J.C. and Saari, L.L. 1992. Rapid metabolic inactivation is the basis for cross-resistance to chlorsulfuron in diclofop-methyl-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) SR4/84. *Pestic. Biochem. Physiol.* 43: 182-192.
- Cui, Z., Carter, T.E.J. and Burton, J.W. 2000. Genetic base of 651 Chinese soybean cultivars released during 1923 to 1995. *Crop Sci*, 40: 1470–1481.

- Cullin, C., Baudin-Baillieu, A., Guillemet, E. and Kalogeropoulos. O. 1996. Functional analysis of ycl09c: evidence for a role as the regulatory subunit of acetolactate synthase. *Yeast* 12: 1511-1518.
- Dayan, F.E., Owens, D.K., Tranel, P.J., Preston, C. and Duke, S.O. 2014. Evolution of resistance to phytoene desaturase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors—state of knowledge. *Pest Management Science* 70: 1358–1366
- Holtzclaw, W.D. and Chapman, L.F. 1975. Degradative, acetolactate synthase of *Bacillus subtilis*: purification and properties. *J. Bacteriol*, 121: 917-922.
- Dekker, J. H. and Sharkey, T. D. 1992. Regulation of photosynthesis in triazine-resistant and susceptible *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 98: 1069–1073
- De Micco, V., Buonomo, R., Paradiso, R., De Pascale, S. and Aronne, G. 2012. Soybean cultivar selection for Bioregenerative Life Support Systems (Blsss): theoretical selection. *Adv Space Res*, 49: 1415–1421
- Denis, J.M. 1994. Designer oil crops. Breeding, Processing and Biotechnology, VCH, Weinheim, 317 p.
- De Prado, R.A. and Franco. A.R. 2004. Cross-resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: biochemical and physiological aspects. *Weed Science*, 52: 441-447
- Delye, C. 2005. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Weed Science*, 53: 728–746.
- Délye, C., Gardin, J.A.C., Bucansaud, K., Chauvel, B. and Pett, C. 2011. Non-target-site-based resistance should be the centre of attention for herbicide resistance research: *Alopecurus myosuroides* as an illustration. *Weed Res*, 51: 433–437
- Delye, C., Jasieniuk, M. and Le Corre, V. 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29: 649-658.
- Delye, C. 2013. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Management Science*, 69: 176-187.
- Delye, C., Duhoux, A., Pernin. F., Riggins, C.W. and Tranel, P.J. 2015. Molecular mechanisms of herbicide resistance. *Weed Science*, 63: 91-115.
- Devine, M.D. 1989. Phloem translocation of herbicides. *Rev. Weed Sci*, 4: 191–213.
- Devine, M.D. Marles, M.A.S. and Hall, L.M. 1991. Inhibition of acetolactate synthase in susceptible and resistant biotypes of *Stellaria media*. *Pestic. Sci*, 31: 273-280.
- Devine, M.D. Duke, S.O. and Fedtke, C. 1993. Foliar Absorption of Herbicides. *Englewood Cliffs*, 29–52.
- Devine, M.D. and Shimabukuro, R.H. 1994. Resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in Powles S. B. and Holtum, J.A.M. (Eds) *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, pp. 141-170.

- Devine, M.D. and Eberlein, C.V. 1997. Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites. In *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*; Roe, R.M., Burton, J.D., Kuhr, R.J. (Eds). IOS, Amsterdam, The Netherlands, pp. 159–185.
- Devine, M.D. and Shukla, A. 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protect*, 19: 881–889.
- Dewaele, E., Forlani, G., Degrande, D., Nielsen, E. and Rambour, S. 1997. Biochemical characterization of chlorsulfuron resistance in *Cichorium intybus* L. Var. Witloof *J Plant Physiol*, 151: 109–114
- Dill, G.S., Baerson, L., Casagrande, Y., Feng, R., Brinker, T., Reynolds, N., Taylor, D., Rodriguez, A. and Teng, Y. 2000. Characterization of glyphosate resistant Eleusine indica biotypes from Malaysia. *Third International Weed Science Congress Abstracts*. Corvallis, OR: International Weed Science Society. p. 150.
- Dill, G.M., Sammons, R.D., Feng, P.C.C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J.L., Farmer, D. and Wright, D. 2010. Glyphosate: Discovery, development, applications, and properties. Pages 1-33 in V. K. Nandula, ed. *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Dong, Y.S., Zhuang, B.C., Zhao, L.M., Sun, H. and He, M.Y. 2001. The genetic diversity of annual wild soybeans grown in China. *Theor Appl Genet* 103: 98–103.
- Dorrance, A.E., Berry, S.A., Anderson, T.R. and Meharg, C. 2008. Isolation, storage, pathotype characterization, and evaluation of resistance for *Phytophthora sojae* in soybean. *Plant Health Prog*
- Ducruet, J.M. and Ort, D.R. 1988. Enhanced susceptibility of photosynthesis to high leaf temperature in triazine-resistant *Solanum nigrum* L. Evidence for photosystem II D1 protein site of action. *Plant Science*, 56: 39–48.
- Duhoux, A., Carrere, S., Gouzy, J., Bonin, L. and Delye, C. 2015. RNA-Seq analysis of rye-grass transcriptomic response to an herbicide inhibiting a acetolactate-synthase identifies transcripts linked to non-target-site-based resistance. *Plant Mol Biol*, 87: 473–487.
- Duggleby, R.G. 1997. Identification of an acetolactate synthase small subunit gene in two eucaryotes. *Gene*, 190: 245-249.
- Duggleby, R.G. and Pang, S.S. 2000. Acetohydroxyacid Synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 1-36.
- Duggleby, R.G. Kartikasari, A.E.R., Wunsch, R.M., Lee, Y.T., Ki, M.W., Shin, J.Y. and Chang, S.I. 2000. Expression in *Escherichia coli* of a putative human acetohydroxyacid synthase. *J Biochem Mol Biol*, 33: 195-201.
- Duggleby, R.G., Court, J.A. and Guddar, L.W. 2008. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol Biochem*, 46:309–324.

- Durner, J., Gailus, V. and Böger, P. 1991. New aspects of inhibition of plant acetolactate synthase by chlorsulfuron and imazaquin. *Plant Physiol.* 95: 1144-1149.
- Dutton, H.J., Lancaster, C.R., Evans, C.D. and Cowan, J.C. 1951. The flavor problem of soybean oil. VIII. Linolenic acid. *J Am Oil Chem Soc* 28: 115–118.
- Dyer, W E. Chee, P. W. and Fay, P. K. 1993. *Rapid germination of sul- fonylurea-resistant Kochia scoparia L. accessions is associated with el- evated seed levels of branched chain amino acids.* *Weed Sci.* 41:18- 22.
- Eberlein, C.V., Guttieri, M.J., Berger, P.H., Fellman, J.K., Mallory-Smith, C.A., Thill, D.C., Baerg, R.J. and Belknap, W.R. 1999. Physiological consequences of mutation for ALS-inhibitor resistance. *Weed Sci*, 47: 383-392.
- El-Shemy, H.A., Khalafalla, M.M., Fujita, K. and Ishimoto, M. 2006. Molecular control of gene co-suppression in transgenic soybean via particle bombardment. *J Biochem Mol Biol* 39: 61-67.
- Lamego, F.P., Charlson, D., Delatorre, C.A., Burgos, N.R. and Vidal, R:A. 2009. Molecular Basis of Resistance to ALS-Inhibitor Herbicides in Greater Beggarticks. *Weed Science*, 57: 474–481
- Falco, S.C. and Dumas, K.S. 1985. Genetic analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the herbicide sulfometuron methyl. *Genetics*, 109: 21-35.
- Fang, L.Y., Gross, P.R., Chen, C.H. and Lillis, M. 1992. Sequence of two acetohydroxyacid synthase genes from *Zea mays*. *Plant Molec Biol*, 18: 1185-1187.
- Fausey, J.C. and Renner, K.A. 2001. Environmental effects on CGA-248757 and flumiclorac efficacy/soybean tolerance. *Weed Sci*, 49: 668–674.
- Feder, M. E., Bennett, A. F. and Huey, R.B. 2000. Evolutionary physiology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 31: 315–341.
- Fehr, W.R., Welke, G.A., Hammond, E.G., Duvick, D.N. and Cianzio, S.R. 1991. Inheritance of reduced palmitic acid content in seed oil of soybean. *Crop Sci*, 31: 88–89
- Feng, Y.J., Gao, Y., Zhang, Y., Dong, L.Y. and Li, J. 2016. Mechanisms of resistance to pyroxsulam and ACCase inhibitors in Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*). *Weed Science*, 64: 695-704.
- Foes, M.J.L., Liu, G., Vigue, E.W., Stoller, L., Wax, M. and Tranel, P.J. 1999. A *kochia* (*Kochia scoparia*) biotype resistant to triazine and ALS- inhibiting herbicides. *Weed Sci*, 47: 20-27.
- Forouzesh, A., Zand, E., Soufizadeh, S. and Foroushani, S. 2015. Classification of herbicides according to chemical family for weed resistance management strategies an update. *Weed Research*, 55: 334-358.
- Fowlkes, D.J. 2001. Burley tobacco production in Tennessee: the float system for tobacco transplants. *Agri Ext Ser, The University of Tennessee*, 1-20

- Gady, A.L.F., Hermans, F.W. K, Van De Wal, M.H.B.J, Van Loo E.N., Visser R.G.F. and Bachem, C.W.B. 2009. Implementation of two high throughput techniques in a novel application: detecting point mutations in large EMS mutated plant populations. *Plant Methods* 5: 13.
- Gai, J. 1997. Soybean breeding. In *Plant Breeding: Crop Species*. Gai, J. (Ed.). China Agricultural Press, Beijing , pp.40
- Gai, J., Gao, Z., Zaho, T., Shimamoto, Y., Abe, J., Fukushi, H. and Kitajima, S. 1999. Genetic diversity of annual species of soybeans and their evolutionary relationship in China. In *Proceedings of the World Soybean Research Conference VI*, Chicago, August 4–7, H.E. Kauffman, Ed. Superior Printing, Champaign, IL, p. 515.
- Gai, J.Y., Xu, D.H., Gao, Z., Shimamoto, Y., Abe, J., Fukushi, H. and Kitajima, S. 2000. Studies on the evolutionary relationship among eco-types of *G. max* and *G. soja* in China. *Acta Agron Sin*, 26: 513–520.
- Gai, J. and Guo, W. 2001. History of Maodou production in China. In *Proceedings of the 2nd International Vegetable Soybean Conference (Edamame/Maodou)*, Tacoma, WA, August 10–11, 2001. T.A. Lumpkin and S. Shanmugasundaram, Eds. Washington State University, Pullman, pp. 41–47.
- Gaines, T.A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S.T., Shaner, D.L., Nissen, S.J., Patzoldt, W.L., Tranel, P.J., Culpepper, A.S., Grey, T.L., Webster, T.M., Vencill, W.K., Sammons, R.D., Jiang, J., Preston, C., Leach, J.E. and Westra, P. 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 1029-1034
- Gardin, J., Gouzy, J., Carrere, S. And Delye, C. 2015. Alomy base, a resource to investigate non-target-site-bas. A.C. ed resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase (ALS) in the major grass weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *BMC Genom*,16: 590
- Gardner, E.J. and Snustad, D.P. 1984. *Principles of Genetics*. 7th ed. New York: J. Wiley. pp. 275.
- Gassmann, A.J. 2005. Resistance to herbicide and susceptibility to herbivores: environmental variation in the magnitude of an ecological trade-off. *Oecologia*, 145: 575–585.
- Gassmann, A.J. and Futuyma, D.J. 2005. Consequence of herbivory for the fitness cost of herbicide resistance: photosynthetic variation in the context of plant–herbivore interactions. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 447–454
- Georghiou, G.P. 1986. The magnitude of the resistance problem. In *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, National Academy Press, Washington D.C., pp. 14-43.
- Ghanizadeh, H. Harrington, K.C. and James, T.K. 2016. Genetic inheritance of restricted herbicide translocation in a glyphosate-resistant *Lolium perenne* population. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 59: 269–279.

- Ghanizadeh, H. and Harrington, K.C. 2017. Perspectives on non-target site mechanisms of herbicide resistance in weedy plant species using evolutionary physiology. *AoB Plants* 9:5
- Ghanizadeh, H. and Harrington, K. C. 2017b. Non-target site mechanisms of resistance to herbicides. *Crit Rev Plant Sci*, 36: 24–34.
- Ghanizadeh, H. Buddenhagen, C.E., Harrington, K.C. and James. 2019. The Genetic Inheritance of Herbicide Resistance in Weeds. *Critical reviews in Plant Sciences*, 38: 295–312
- Ghio, C., Ramos M.L., Altieri, E., Bulos, M. and Sala, C.A. 2013. Molecular characterization of *Als1*, an acetohydroxyacid synthase mutation conferring resistance to sulfonylurea herbicides in soybean. *Theor Appl Genet*, 126: 2957-2968.
- Gianessi, L.P. 2013. The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. *Pest Manag Sci* 69: 1099–1105.
- Gizlice, Z., Carter, T.E., Gerig, T.M. and Burton, J.W. 1996. Genetic diversity patterns in North American public soybean cultivars based on coefficient of parentage. *Crop Sci*, 36: 753–765.
- Godar, A.S., Stahlman, P.W., Jugulam, M. and Dille, J.A. 2015. Glyphosate-Resistant *Kochia* (*Kochia scoparia*) in Kansas: EPSPS gene copy number in relation to resistance levels. *Weed Science*, 63: 587-595
- Godon, J.J. Chopin, M.C. and Ehrlich, S.D. 1992. Branchedchain amino acid biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Bacteriol*, 174: 6580-6589.
- Goll, M.G. and Bestor, T.H. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 74: 481–514.
- Gollop, N., Damri, B., Barak, Z. and Chipman, D.M. 1989. Kinetics and mechanism of acetohydroxy acid synthase isozyme III from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 28: 6310-6317.
- Gorla, M.S., Ottaviano, E., Frascaroli, E. and Landi, P. 1989. Herbicide-tolerant corn by pollen selection. *Sexual Plant Reprod*, 2: 65–69
- Greene, E.A., Codomo, C.A., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Till, B.J., Reynolds, S.H., Enns, L.C., Burtner, C., Johnson, J.E., Odden, A.R., Comai, L. and Henikoff, S. 2003. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* 164: 731-740
- Green, J.M. 2014. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Manag. Sci.* 70: 1351-1357
- Groeters, F.R., Tabashnik, B.E., Finson, N. and Johnson, M.W. 1994. Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Evolution*, 48: 197–201.
- Gronwald, J.W. 1994. Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. Powles S.B. and Holtum, J.A.M. (eds.) *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Ann Arbor, MI: Lewis. Pp. 27-60

- Godar, A.S., Varanasi, V.K., Nakka, S., Prasad, P.V., Thompson, C.R. and Mithila, J. 2015. Physiological and molecular mechanisms of differential sensitivity of *palmer amaranth* (*Amaranthus palmeri*) to mesotrione at varying growth temperatures. *PLoS ONE* 10: 126731.
- Gottschalk, W. and Wolff, G. 1983. Induced mutations in plant breeding. monographs on theoretical and applied genetics *Berlin Heidelberg New York Tokyo* 10-14
- Grula, J.W., Hudspeth, R.L., Hobbs, S.L. and Anderson, D.M. 1995. Organization, inheritance and expression of acetohydroxyacid synthase genes in the cotton allotetraploid *Gossypium hirsutum*. *Plant Molec Biol*, 28: 837-846.
- Guerra, D., Crosatti, C., Khoshro, H.H., Mastrangelo, A.M., Mica, E. and Mazzucotelli, E. 2015. Post-transcriptional and post-translational regulations of drought and heat response in plants: a spider's web of mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 6: 57.
- Guo, P. and Al-Khatib, K. 2003. Temperature effects on germination and growth of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*), Palmer amaranth (*A.palmeri*), and common waterhemp (*A.rudis*). *Weed Sci*, 51: 869–875.
- Guttieri, M.J., Eberlein, C.V., Mallory-Smith, C.A., Thill, D.C. And Hoffman, D.L. 1992. DNA sequence variation in Domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and susceptible weed biotypes. *Weed Sci* 40: 670–676.
- Guttieri, M.J., Eberlein, C.V., Mallory-Smith, C.A. and Thill, D.C. 1996. Molecular genetics of target-site resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In Brown T. M. (ed.) *Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance*. Washington, DC: American Chemical Society, pp. 10-16.
- Hall, L.M., Holtum, J.M. and Powles, S.B. 1994. Mechanisms responsible for cross resistance and multiple resistance. In: Powles, S.B. and Holtum, J.A.M. (eds.) *Herbicide Resistance in Plants, Biology and Biochemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 365.
- Hammond, E.G., Fehr, W.R. and Synder, H.E. 1972. Improving soybean quality by plant breeding. *J Am Oil Chem Soc*, 49: 33–35.
- Hammond, E.G. and Fehr, W.R. 1975. Oil quality improvement in soybeans: *Glycine max* (L.) Merr. *Fette Seifen Anstrichm.* 77: 97–101.
- Hammond, E.G. and Fehr, W.R. 1983a. Registration of A5 germplasm line of soybean (reg. no. GP44). *Crop Sci*, 23: 192.
- Hammond, E.G. and Fehr, W.R. 1983b. Registration of A6 germplasm line of soybean (reg. no. GP45). *Crop Sci*, 23: 192–193.
- Hamouzova, K., Kosnarova, P., Salava, J., Soukup, J. and Hamouz, P. 2013. Mechanisms of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. *Pest Manag Sci D. O. I*:10:1002..

- Han, H., Yu, Q., Purba, E., Li, M., Walsh, M. and Powles, S.B.A. 2012. novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. *Pest Manag Sci*, 68: 1164–1170.
- Han, H., Yu, Q., Vila-Aiub, M. and Powles, S.B. 2014. Genetic inheritance of cytochrome P450-mediated metabolic resistance to chlorsulfuron in a multiple herbicide resistant *Lolium rigidum* population. *Crop Protect.* 65: 57–63
- Harms, E., Hsu, J.H., Subrahmanyam, C.S. and Umbarger, H.E. 1985. Comparison of the regulatory regions of ilvgeda operons from several enteric organisms. *J. Bacteriol*, 164: 207-216.
- Harms, C.T., Armour, S.L., Di Maio, J.J., vd. 1992. Herbicide resistance due to amplification of a mutant acetohydroxyacid synthase gene. *Mol. Gen. Genet.* 233: 427-435.
- Hart, J.J. and Stemler, A. 1990. High light-induced reduction and low lightenhanced recovery of photon yield in triazine-resistant *Brassica napus* L. *Plant Physiology*, 94: 1301–1307.
- Hart, S.E., Saunders, J.W. and Penner, D. 1993. Semidominant nature of monogenic sulfonylurea herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*). *Weed Sci.* 41: 317-324.
- Hartwig, E.E. 1973. Varietal development. In Soybeans: Improvement, Production, and Uses, American Society of Agronomy Publication. Caldwell, B.E. (Ed.) American Society of Agronomy, Madison, pp. 187–210
- Haughn, G. and Somerville, C.R. 1987. Selection for herbicide resistance at the whole-plant level, In, LeBaron H.M., Mumma R.O., Honeycutt R.C. and Duesing, J.H. (Eds.) Applications of Biotechnology to Agricultural Chemistry American Chemical Society, Easton, PA. pp. 98–107
- Hayirli, T.C. and Martelli, P.F. 2019. Gene drives as a response to infection and resistance. *Infect. Drug Resist*, 12: 229–234.
- Heap, I. 1999. The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pesticide science*, 51: 235-243.
- Heap, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database. www.weedscience.org [Son erişim tarihi: 05.03.2020]
- Hermis, D.A. and Mattson, W.J. 1994. Plant-growth and defense. *Trends in Ecology & Evolution.* 9: 488.
- Ho, D.H. and Burggren, W.W. 2010. Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective. *The Journal of Experimental Biology*, 213: 3–16.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.J. 1950. The Water- Culture –Method for Growing Plants without Soil. *Circular*, 347

- Hoffman, T., Schmidt, J.S., Zheng, X. and Bent, A.F. 1999. Isolation of ethylene insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiol*, 119: 935-950
- Holt, J.S. and Thill, D.C. 1994. Growth and productivity of resistant plants. In Powles, S.B. and Holtum, J.A.M. (eds.) *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Ann Arbor, MI: Lewis, pp. 299-316.
- Hoshino, T., Watanabe, S., Takagi, Y. and Anai, T. 2014. A novel Gm Fad3-2a mutant allele developed through Tilling reduces α -linolenic acid content in soybean seed oil. *Breeding Science*, 64: 371–377.
- Hull, H.H., Morton, H.L. and Wharrie, J.R. 1975. Environmental influences on cuticle development and resultant foliar penetration. *Bot Rev*, 41: 421–452.
- Hymowitz, T. and Newell, C.A. 1981. Taxonomy of the genus *Glycine*, domestication and uses of soybean. *Econ. Bot*, 35: 272–288.
- Iwakami, S., Endo, M., Saika, H., Okuno, J., Nakamura, N., Yokoyama, M., Watanabe, H., Toki, S., Uchino, A. and Inamura, T. 2014. Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Physiol*, 165: 618–629.
- Iwakami, S., Kamidate, Y., Yamaguchi, T., Ishizaka, M., Endo, M., Suda, H., Nagai, K., Sunohara, Y., Toki, S., Uchino, A. vd. 2019. CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. *New Phytol*, 221: 2112–2122
- Izaguirre-Mayoral, M.L. and Sinclair, T.R. 2005. Variation in manganese and iron accumulation among soybean genotypes growing on hydroponic solutions of differing manganese and nitrate concentrations. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 521–535
- Jansen, M.A.K. and Pfister, K. 1990. Conserved kinetics at the reducing side of reaction-center-II in photosynthetic organisms-changed kinetics in triazine-resistant weeds. *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 45: 441–445.
- Jarai, G., Yagmai, B., Fu, Y.H. and Marzluf, G.A. 1990. Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis in *Neurospora crassa*: cloning and characterization of the leu-1 and ilv-3 genes. *Molec. Gen. Genet.* 224: 383-388.
- Jasieniuk, M., Brule-Babel, A.L. and Morrison, I.N. 1994. Inheritance of trifluralin resistance in green foxtail (*Setaria viridis*). *Weed Sci.* 42: 123-127.
- Jasieniuk, M., Ian, N.M. and Anita, L.B.B. 1995. Inheritance of dicamba resistance in wild mustard (*Brassica kaber*). *Weed Sci*, 43: 192–195.
- Jasieniuk, M., Brule-Babel, A.L. and Morrison, I.N. 1996. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Sci.* 44: 176–193.
- Jiménez, F., Rojano, A.M., Fernandez, P.T., Suarez, C.R., Atienza, S.G. and De Prado, R. 2016. Physiological, biochemical and molecular characterization of an

- induced mutation conferring imidazolinone resistance in wheat. *Physiologia Plantarum*, 158: 2–10.
- John, P., Reade, H. and Cobb, A.H. 2002. Weed Management Handbook. In: Robert, E.L. (ed.), *Herbicides: Modes of Action and Metabolism*. Blackwell Science, Oxford, pp. 134-171.
- Johnson, B.C. and Young, B.G. 2002. Influence of temperature and relative humidity on the foliar activity of mesotrione. *Weed Sci.* 50: 157–161.
- Jordan, N., Kelrick, M., Brooks, J. and Kinerk, W. 1999. Biorational management tactics to select against triazine-resistant *Amaranthus hybridus*: a field trial. *Journal of Applied Ecology*, 36: 123–132.
- Kachroo, D.K., Dixit, A.K. and Bali, A.S. 2003. Weed managementin oilseed crops. *A Review Journal Research*, 2: 1-2
- Kakefuda, G.K., Ott, H., Kwagh, J.G. and Stockton, G.W. 1996. Structure-based designed herbicide resistant products. *World patent* W096: 33270.
- Karagül, E., Ay, N., Meriç, Ş. and Huz, E. 2011. Ege Bölgesi'nde Ana Ürün Olarak Yetiştirilen Bazı Soya Genotiplerinin Verimi, Verim Öğeleri ve Nitelikleri Üzerinde Bir Araştırma. *Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 21: 59-68.
- Karaman, K. 2019. Yerfıstığında (*Arachis hypogaea* L.) mutajen uygulaması ile agro-morfolojik varyasyonun oluşturulması ve TILLING metodu kullanılarak yağ asidi sentezi ve alerjiniteden sorumlu genlerdeki tek baz değişikliklerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 72 s.
- Karmakar, P.G. and Bhatnagar, P.S. 1996. Genetic improvement of soybean varieties released in India from 1969 to 1993. *Euphytica*, 90: 95–103.
- Kaya, Altop., Mennan, E., Işık, DH. and Haghnama, K. 2017. Asetolaktat sentetaz (ALS) İnhibitörü Herbisitlere *Galium aparine* L. (Dilkanatan) Dayanıklılığı. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 34: 91-99.
- Kaya, Altop., Mennan, E. and Işık. D. H. 2017. Buğday ekim alanlarında sorun olan *Bifora radians* Bieb. (Kokarot)'ın ALS inhibitörü herbisitlere dayanıklılığının PCR temelli olarak belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilim. Dergisi* 32: 153-163
- Keeler, S.J., Sanders, P., Smith, J.K. and Mazur, B.J. 1993. Regulation of tobacco acetolactate synthase gene expression. *Plant Physiol*, 102: 1009-1018.
- Kells, J.J., Meggitt, W.F. and Penner, D. 1984. Absorption, translocation, and activity of fluazifop-butyl as influenced by plant growth stage and environment. *Weed Sci*, 32: 143–149.
- Keyser, H.H. and Li, F. 1992. Potential for increasing biological nitrogen fixation in soybean. *Plant and Soil* 141: 119-135.
- Khan, M.H. and Tyagi, S.D. 2009. Studies on induction of chlorophyll mutations in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill *Front. Agric. China* 3: 253–258.

- Kim, S.D. 1993. Country report 12: Republic of Korea. In Soybean in Asia. N. Chomchalow, Ed. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand. pp. 109–118.
- Kisha, T.J., Diers, B.W., Hoyt, J.M. and Sneller C.H. 1998. Genetic diversity among soybean plant introductions and North American germplasm. *Crop Sci.* 38: 1669–1680.
- Ko, T.S., Korban, S.S. and Somers, D.A. 1996. Soybean (*Glycine max*) transformation using immature cotyledon explants. In *Agrobacterium Protocols*, 343: 397-406.
- Kolkman, J.M., Slabaugh, M.B., Bruniard, J.M., Berry, S., Bushman, B.S., Olungu, C., Maes, N., Abratti, G., Zambelli, A., Miller, J.F., Leon, A. and Knapp, S.J. 2004. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. *Theor Appl Genet*, 109: 1147–1159.
- Krysiak, M., Gawroński, S.W., Adamczewski, K. and Kierzek, R. 2011. Als Gene Mutations in *Apera Spica-Venti* Confer Broad-Range Resistance to Herbicides. *Journal of Plant Protection Research*, 51: 3
- Lacey, A.J. 1985. Weed Control. In Haskell P.T. (ed.), Pesticide application: principles and practice, Oxford, Oxford University Press, pp. 456-85.
- Landstein, D.S., Arad, M., Barak, Z. and Chipman, D.M. 1993. Relationships among the herbicide and functional sites of acetohydroxy acid synthase from *Chlorella emersonii*. *Planta*, 191: 1-6
- Larossa, R.A. and Schloss, J.V. 1984. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 259: 8753-8757.
- Lawther, R.P., Wek, R.C., Lopes, J.M., Pereira, R., Taillon, B.E. and Hatfield, G.W. 1987. The complete nucleotide sequence of the *ilvgmda* operon of *Escherichia coli* K-12. *Nucl Acids Res*, 15: 2137-2155.
- Lebaron, H.M. and Gressel, J. 1982. Herbicide resistance in plants. John Wiley & Sons, Inc. New York, pp. 320.
- Lebreton, A., Labbe, C., De. Ronne, M., Xue, A.G., Marchand, G. and Be' langer, R.R. 2018. Development of a Simple Hydroponic Assay to Study Vertical and Horizontal Resistance of Soybean and Pathotypes of *Phytophthora sojae*. *Plant Disease*, 102: 114-123
- Lee, S.K., Sohn, E.Y., Hamayun, M., Yoon, J.Y. and Lee, I.J. 2010. Effect of silicon on growth and salinity stress of soybean plant grown under hydroponic system. *Agroforest Syst*, 80: 333–340
- Lee, T.F., Zhai, J.X. and Meyers, B.C. 2010. Conservation and divergence in eukaryotic DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 9027–9028.
- Li, Z., Qiu, L., Thompson J.A., Welsh, M.M. and Nelson R.L. 2001. Molecular genetic analysis of U.S. and Chinese soybean ancestral lines. *Crop Sci.* 41: 1330–1336.

- Li, Z. and Nelson, R. L. 2001. Genetic diversity among soybean accessions from three countries measured by Rapds. *Crop Sci*, 41: 1337–1347.
- Li, Z., Jiang, L., Ma, Y., Wei, Z., Liu, Z., Hong, H., Liu, Z., Lei, J., Liu, Y., Guan, R., Guo, Y., Jin, L., Zhang, L., Li, Y., Ren, Y., He, W., Liu, M., Htwe, N., Liu, L., Guo, B., Song, J., Tan, B., Liu, G., Li, M., Zhang, X., Liu, B., Shi, X., Han, S., Hua, S., Zhou, F., Yu, L., Li, Y., Wang, S., Wang, J., Chang, R. and Qiu, L. 2017. Development and utilization of a new chemically-induced soybean library with a high mutation density. *J Integr Plant Biol*, 59: 60–74.
- Lorraine-Colwill, D.F., Powles, S.B., Hawkes, T.R. and Preston, C. 2001. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Lolium rigidum* (Gaud.). *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 545–550.
- Lu, S.L. 1977. The origin of cultivated soybean (*G. max*). In Soybean. Wang, J.L. (Ed.) Shanxi Peoples Press, Shanxi, China, pp.80.
- Ma, R., Kaundun, S.S., Tranel, P.J., Riggins, C.W., McGinness, D.L., Hager, A.G., Hawkes, T., McIndoe, E and Riechers, D.E. 2013. Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp. *Plant Physiology*, 163: 363–377
- Magee, P.T. and Hereford, L.M. 1969. Multivalent repression of isoleucine-valine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol*, 98: 857-862.
- Mallory-Smith, C.A., Thill, D.C. and Dial, M.J. 1990. Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technol*, 4: 163-168.
- Mallory-Smith, C.A. and Retzinger, E.J. 2003. Revised classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. *Weed Technology*, 17: 605-617.
- Maluszynski, M., Ahloowalia, B.S. and Sigurbjornsson, B. 1995. Application of in vivo and invitro mutation techniques for crop improvement. *Euphytica*, 85: 303-315.
- Marr, C.W. 1994. Hydroponic Systems. Greenhouse Vegetable Production. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. 1-12
- Matthews, J.M., Holtum, J.A.M., Liljegren, D.R., Furness, B. and Powles, S.B. 1990. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). I. Properties of the herbicide target enzymes acetyl coenzyme-A carboxylase and acetolactate synthase. *Plant Physiol*, 94: 1180-1186
- Mazur, B.J., Chui, C.F. and Smith, J.K. 1987. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. *Plant Physiol*, 85: 1110-1117.
- Mengistu, L.W., Mueller-Warrant, G.W., Liston, A.I. and Barker, R.E. 2000. psbA mutation (valine219 to isoleucine) in *Poa annua* resistant to metribuzin and diuron. *Pest Manage Sci*, 56: 209-217.

- McBlain, B.A., Hacker, J.K., Zimmerly, M.M. and Schmitthenner, A.F. 1991. Tolerance to Phytophthora rot in soybean: II. Evaluation of three tolerance screening methods. *Crop Sci*, 31: 1412-1417
- McErlich, A.F. and Boydston, R.A. 2013. Current state of weed management in organic and conventional Cropping Systems. *The Future of Weed Control in Cropping Systems*, 11-32.
- McHughen, A. 1989. Agrobacterium mediated transfer of chlorsulfuron resistance to commercial flax cultivars. *Plant Cell Rep*, 8: 445-449.
- McHughen, A. and Holm, F. 1991. Herbicide-resistant transgenic flax field test: agronomic performance in normal and sulfonyleurea-containing soils. Miceli, A. Moncada, F. and Vetrano, D. F. 2003. First results on yield and quality response of basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in a floating system. *International Society for Horticultural Science International Symposium on Managing Greenhouse Crops in Slinia Environment*, 9-12 July, Pisa, Italy. *Euphytica* 55:49-56.
- Micke, A., Maluszynski, M. and Donini, B. 1985. Plant cultivars derived from mutation induction or the use of induced mutants in cross breeding. *Mutation Breed. Rev*, 3: 1-92.
- Milano, A., De Rossi, E., Zanaria, E., Barbierato, L., Ciferri, O. and Riccardi, G. 1992. Molecular characterization of the genes encoding acetohydroxy acid synthase in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1399-1408
- Morse, W.J. 1927. Soybeans: Culture and Varieties, U.S. Department of Agriculture Farmers. *Bulletin*, 1520: 1-33.
- Mounts, T.L., Warner, K., List, G.R., Kleiman, R., Fehr, W.R., Hammond, E.G. and Wilcox, J.R. 1988. Effect of altered fattyacid composition on soybean oil stability. *J Am Oil Chem Soc*, 65: 624-628.
- Nakka, S., Thompson, C.R., Peterson, D.E. and Jugulam, M. 2017. Target site-based and non-target site based esistance to ALS inhibitors in *Palmer amaranth* (*Amaranthus palmeri*). *Weed Sci*, 65: 681-689.
- Nandula, V.K. 2010. Herbicide resistance: definitions and concepts. In Nandula, V.K. (ed.) *Glyphosate resistance in crops and weeds*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, pp. 35-43
- Natochin, Y.V. and Chernigovskaya, T.V. 1997. Evolutionary physiology: history, principles. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology*, 118: 63-79.
- Newhouse, K.E., Smith, W.A., Starrett, M.A., Schaefer, T.J. and Singh, B.K. 1992. Tolerance to imidazolinone herbicides in wheat. *Plant Physiol*, 100: 882-886.
- Oerke, E.C. and Dehne, H.W. 2004. Safe guarding production losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 3: 275-285.

- Olhoft, P.M., Donovan, C.M. and Somers, D.A. 1996. Soybean. (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants. *Humana Press*, 385-396
- Oliver, S.G., Van der Aart, Q.J.M., Agostoni-Carbone, M.L., Aigle, M., Alberghina, L., Alexandraki, D., Antoine, G., Anwar, R., Ballesta, J.P., Benit, P. vd. 1992. The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature*, 357: 38-46
- Orf, J.H., Diers, B.W. and Boerma, H.R. 2004. Genetic improvement: conventional and molecular-based strategies. In Soybeans: Improvement, Production, and Uses, *American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/Soil Science Society of America*, 417–450.
- Orr, H.A. 2003. The distribution of fitness effects among beneficial mutations. *Genetics* 163: 1519–1526.
- Orr, H.A. 2009. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature Reviews of Genetics* 10: 531–539.
- Ouellet, T., Rutledge, R.G. and Miki, B.L. 1992. Members of the acetohydroxyacid synthase multigene family of *Brassica napus* have divergent patterns of expression. *Plant J.* 2: 321-330.
- Owen, M.D. and Zelaya, I.A. 2005. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Management Science*, 61: 301–311.
- Owen, M.J., Goggin, D.E. and Powles, S.B. 2012. Non-target-site-based resistance to ALS-inhibiting herbicides in six *Bromus rigidus* populations from Western Australian cropping fields. *Pest Manag. Sci*, 68: 1077–1082.
- Palermo, M., Paradiso, R., De Pascale, S. and Fogliano, V. 2012. Hydroponic cultivation improves the nutritional quality of soybean and its products. *J.Agric. Food Chem*, 60: 250–255
- Pan, L., Gao, H., Xia, W., Zhang, T. and Dong, L. 2016. Establishing a herbicide-metabolizing enzyme library in *Beckmannia syzigachne* to identify genes associated with metabolic resistance. *Journal of Experimental Botany*, 67: 1745–1757
- Paradiso, R., De Micco, V., Buonomo, R., Aronne, G., Barbieri, G. and De Pascale, S. 2014b. Soilless cultivation of soybean for Bioregenerative Life Support Systems (BLSSs): a literature review and the experience of the Melissa Project-Food characterization Phase I. *Plant Biol*. 16: 69–78
- Pavadai, P., Giriya, M. and Dhanavel, D. 2009. Effectiveness efficiency and biochemical content of physical and chemical mutagens in soybean (*glycine max* (L) merr.) *Journal of Phytology*, 1: 444–447
- Petersen, J.G.L., Kielland-Brandt, M.C., Holmberg, S. and Nilsson-Tillgren, T. 1983. Mutational analysis of isoleucinevaline biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mapping of *ilv2* and *ilv5*. *Carlsberg Res. Commun*, 48: 21-34.
- Petit, C., Duhieu, B., Boucansaud, K. and Delye, C. 2010. Complex genetic control of non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetyl-coenzyme A carboxylase and acetolactate-synthase in *Alopecurus myosuroides* Huds. *Plant Sci.* 178: 501–509

- Phalip, V., Schmitt, P. and Diviès, C. 1995. Purification and characterization of the catabolic α -acetolactate synthase from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. cremoris. *Curr. Microbiol*, 31: 316-321.
- Pimentel, D. McLaughlin, L. Zepp, A., vd. 1991. Environmental and economic effects of reducing pesticide use a substantial reduction in pesticides might increase food costs only slightly. *Bioscience*.: 41:402–409.
- Pline, W.A. Wu, J. and Hatzios, K.K. 1999. Effects of temperature and chemical additives on the response of transgenic herbicide-resistant soybeans to glufosinate and glyphosate applications. *Pestic. Biochem. Physiol*, 65: 119–131
- Plowman, A.B., Richards, A. J. and Tremayne, M.A. 1999. Environmental effects on the fitness of triazine-resistant and triazine-susceptible *Brassica rapa* and *Chenopodium album* in the absence of herbicide. *New Phytologist*, 141: 471–485.
- Polaina, J. 1984. Cloning of the *ilv2*, *ilv3* and *ilv5* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carlsberg Res. Commun*, 49:577584.
- Porch, T.G., Blair, M.W., Lariguet, P., Galeano, C., Pankhurst, C.E. and Broughton, W.J. 2009. Generation of a mutant population for tilling common bean genotype. *Am. Soc. Hortic. Sci*, 134: 348–355.
- Powles, S.B. and Holtum, J.A.M. 1994. Herbicide resistance in plants. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, pp. 365.
- Powles, S.B. and Preston, C. 2006. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technology* 20: 282– 289.
- Powles, S.B. and Yu, Q. 2010. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol*, 61: 317–47.
- Preston, C. and Mallory-Smith, C.A. 2001. Biochemical mechanisms, inheritance, and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. In Powles S.B. and Shaner D.L. (Eds.) *Herbicide Resistance and World Grains*. CRC Press: Boca Raton, FL, pp. 23–60
- Preston, C. and Powles, S. B. 2002. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. *Heredity* 88: 8-13.
- Preston, C. 2003. Inheritance and linkage of metabolismbased herbicide cross-resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci*, 51: 4.
- Preston, C. and Malone, J.M. 2015. Inheritance of resistance to 2,4-D and chlorsulfuron in a multiple-resistant population of *Sisymbrium orientale*. *Pest Manag Sci*, 71: 1523–1528
- Price, C.E. 1983. The effect of environment on foliage uptake and translocation of herbicides. In: Biologists, A.O.A. (Ed.) *Aspects of Applied Biology 4: Influence of Environmental Factors on Herbicide Performance and Crop and Weed Biology*, vol. 4. The Association of Applied Biologists, Warwick, pp. 157–169.

- Purrington, C.B. 2000. Costs of resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 305–308.
- Rapp, R.A. and Wendel, J.F. 2005. Epigenetics and plant evolution. *The New Phytologist*, 168: 81–91.
- Rapoport, I.A. 1946. Carbonyl compounds and the chemical mechanism of mutation. *Doklady Acad. Sci*, 54: 65.
- Rapoport, I.A. 1948. Alkylation of gene molecule. *Doklady Acad. Sci*, 59: 1183-1186
- Ray, T.B. 1984. Site of action of chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis of plants. *Plant Physiol*, 75: 827-831
- Reis, A.R. and Vivian, R. 2011. Weed competition in the soybean crop management in Brazil. *ISoybean- Applications and Technology*, 185-210.
- Retzinger, E. and Mallory-Smith, C. 1997. Classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. *Weed Technology*, 11: 384-393.
- Riar, D.S., Norsworthy, J.K., Bond, J.A., Bararpour, M.T., Wilson, M.J. and Scott, R.C. 2012. Resistance of *Echinochloa crus-galli* populations to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Int J Agron*, 893953.
- Richards, C.L., Bossdorf, O. and Pigliucci, M. 2010. What role does heritable epigenetic variation play in phenotypic evolution. *Bioscience*, 60: 232–237.
- Riederer, M. and Schonherr, J. 1985. Accumulation and transport of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid in plant cuticles: II. Permeability of the cuticular membrane. *Ecotoxicol Environ Safety*, 9: 196–208.
- Rubin, B. 1997. Herbicide resistance outside North America and Europe: causes and significance. In: De Prado, R., Jorrin, J. and Garcia-Torres, L. (Eds.) *Weed and Crop Resistance to Herbicides*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer, pp. 39-50
- Rutledge, R.G., Ouellet, T., Hattori, J. and Miki, B. L. 1991. Molecular characterization and genetic origin of the *Brassica napus* acetohydroxyacid synthase multigene family. *Molec Gen Genet* 229: 31-40.
- Saari, L.L., Cotterman, J.C., Smith, W.E. and Primiani, M.M. 1992. Sulfonylurea herbicide resistance in common chickweed, perennial rye- grass, and Russian thistle. *Pestic Biochem Physiol*, 42: 110-118.
- Saari, L.L. Cotterman, C. and Thill, D. C. 1994. Resistance to Acetolactate synthase inhibiting herbicides. *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry Lewis Publishers*, 141-169.
- Sadakerska-Chudy, A. and Filip, M. 2015. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs. *Neurotoxicity Research*, 27: 172–197.
- Sagel, Z., Tutluer, M.İ., Peskircioğlu, H., Kantoglu, Y. and Kunter, B. 2017. Determination of Effect of Chemical Mutagen EMS on TAEK A-3 and TAEK C-10 Mutant Soybean Varieties in M1 Generation. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics*, 3: 19-24.

- Sala, C.A., Bulos, M., Echarte, A.M., Whitt, S.R. and Ascenzi, R. 2008c. Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theor Appl Genet* 108: 105–112.
- Sala, C.A., Bulos, M., Altieri, E. and Weston, B. 2012. Response to imazapyr and dominance relationships of two imidazolinone-tolerant alleles at the Ahas11 locus of sunflower. *Theor Appl Genet*, 124: 385–396
- Salzmann, D., Handley, R.J. and Mueller-Scharer, H. 2008. Functional significance of triazine-herbicide resistance in defence of *Senecio vulgaris* against a rust fungus. *Basic and Applied Ecology*, 9: 577–587
- Sammons, R.D. and Gaines, T.A. 2014. Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Management Science* 70: 1367–1377.
- Santos, J.D., Lopes da Silva, A.L., Costa, J.L., Scheidt, G.N., Novak, A.C., Sydney, E.B. and Soccol, C.R. 2013. Development of a vinasse nutritive solution for hydroponics. *J Environ Manage*, 114: 8-12.
- Satoh, H., Matsusaka, H. and Kumamaru, T. 2010. Use of N-methyl-N-nitrosourea treatment of fertilized egg cells for saturation mutagenesis of rice. *Breed. Sci.* 60: 475–485
- Savvas, D., Gianquinto, G., Tuzel, Y. and Gruda, N. 2013. Soilless culture, in Good Agricultural Practices for Greenhouse Vegetable Crops. Principles for Mediterranean Climate Areas. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 303–354.
- Sebastian, S.A., Fader, G.M., Ulrich, J.F., Forney, D.R. and Chaleff, R.S. 1989. Semidominant soybean mutation for resistance to sulfonylurea herbicides. *Crop Sci*, 29: 1403-1408.
- Scarabel, L., Pernin, F. and Delye, C. 2015. Occurrence, genetic control and evolution of non-target-site based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase (ALS) in the dicot weed *Papaver rhoeas*. *Plant Sci.* 238: 158–169.
- Schmitt, G.K. and Singh, B.K. 1990. Tissue distribution of acetohydroxyacid synthase activity at various developmental stages of lima bean. *Pestic Sci*, 30: 418-419
- Schmitt, G.K. and Singh, B.K. 1991. Tissue distribution of acetohydroxyacid synthase activity at various developmental stages of Lima bean. *Pestic Sci*, 30: 418-419
- Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M.K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X.C., Shinozaki, K., Nguyen, H.T., Wing, R.A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R. C. and Jackson, S.A. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463: 178–183.

- Schnebly, S.R., Fehr, W.R., Welke, G.A., Hammond, E.G. and Duvick, D.N. 1994. Inheritance of reduced and elevated palmitate in mutant lines of soybean. *Crop Sci*, 34: 829–833.
- Shah, S., Gong, Z.H., Arisha, M.H., Khan, A. and Tian, S.L. 2015. Effect of ethyl methyl sulfonate concentration and different treatment conditions on germination and seedling growth of the cucumber cultivar Chinese long. *Genet Mol Res*, 14: 2440–2449
- Shalini, K., Pratibha, P., Ranjee, Y. and Santosh, K. 2018. Hydroponic technique: a soilless cultivation in agriculture. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 7: 1-6.
- Shaner, D.L., Anderson, P.C. and Stidham, M.A. 1984. Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol*, 76: 545-546.
- Shaner, D.L. 1991. Physiological effects of the imidazolinone herbicides. *Ann Arbor*, 129-138
- Sharma, S.D. and Singh, M. 2001. Environmental factors affecting absorption and bio-efficacy of glyphosate in Florida beggar weed (*Desmodium tortuosum*). *Crop Prot*, 20: 511–516
- Sharner, D.L. and Singh, B.K. 1997. Acetohydroxyacid synthase inhibitors. *Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, 69–110
- Sheikh, B.A. 2006. Hydroponics: key to sustain agriculture in water stressed and urban environment. *Pak. J. Agric., Agric. Eng. Vet. Sci*, 22: 53–57
- Shergill, L.S. Bish, M.D., Jugulam, M. and Bradley, K.W. 2018. Molecular and physiological characterization of six-way resistance in an *Amaranthus tuberculatus* var. rudis biotype from Missouri. *Pest Manag Sci*, 74: 2688–2698
- Shimamoto, Y., Fukushi, H., Abe, J., Kanazawa, A., Gai, J., Gao, Z. and Xu, D. 1998. RFLPs of chloroplast and mitochondrial DNA in wild soybean, *Glycine soja*, growing in China. *Genet Resour Crop Evol*, 45: 433–439.
- Shimizu, T., Nakayama, I., Nagayama, K., Miyazawa, T. and Nezu, Y. 2002. ALS inhibitors. In: Böger, P., Wakabayashi K. and Hirai, K. (Eds.), *Herbicide Classes in Development: Mode of Action, Targets, Genetic Engineering, Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 1–14.
- Sibony, M., Michel, A., Haas, H.U., Rubin, B. and Hurle, K. 2001. Sulfometuron-resistant *Amaranthus retroflexus* cross-resistance and molecular basis for resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Weed Res*. 41: 509-522.
- Silverstone, S., Nelson, M., Alling, A. and Allen, J. 2003. Development and research program for a soil-based bioregenerative agriculture system to feed a four person crew at a Mars base. *Adv. Space Res*, 31: 69–75.
- Singh, B.B. and H.H. Hadley. 1968. Material control of oil synthesis in soybeans, *Glycine max* (L.) Merr. *Crop Sci*, 8: 622–625.
- Singh, U.B. 1992. Tropical grain legumes as important human foods. *Economical Botany*, 46: 310-321

- Singh, R.J. and Hymowitz, T. 1999. Soybean genetic resources and crop improvement. *Genome* 42: 605–616.
- Smith, K.J. and Huyser, W. 1987. Soybean improvement, production, and uses. In Wilcox, J.R. (ed.), *Agronomy Monograph 16*. American Society of Agronomy. Second edition. Madison, Wisconsin, pp. 1-22.
- Snoep, J.L., Mattos, M.J., Starrenburg, M.J.C. and Hugenholtz, J. 1992. Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and alpha-acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. *J. Bacteriol*, 174: 4838-4841.
- Song, L., Carroll, B.J., Gresshoff, P.M. and Herridge, D.F. 1995. Field assessment of supernodulating genotypes of soybean for yield, N₂ fixation and benefit to subsequent crops. *Soil Biol Biochem*, 27: 563–569.
- SOYSTATS, 2019. <http://soystats.com/international-world-soybean-production>. [Son erişim tarihi: 03.05.2020]
- Steinger, T., Roy, B.A. and Stanton, M.L. 2003. Evolution in stressful environments II: adaptive value and costs of plasticity in response to low light in *Sinapis arvensis*. *J Evol Biol* 16: 313–323.
- Störmer, F.C. 1968a. The pH 6 acetolactate-forming enzyme from *Aerobacter aerogenes* I. kinetic studies. *J. Biol. Chem.* 243: 3735-3739.
- Störmer, F.C. 1968b. The pH 6 acetolactate-forming enzyme from *Aerobacter aerogenes*. II. Evidence that it is not a flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 243: 3740-3741
- Strachan, S.D., Casini, M.S., Heldreth, K.M., Scocas, J.A., Nissen, S.J., Bukun, B., Lindenmayer, R.B., Shaner, D.L., Westra, P. and Brunk, G. 2010. Vapor movement of synthetic auxin herbicides: aminocyclopyrachlor, aminocyclopyrachlor-methyl ester, dicamba, and aminopyralid. *Weed Sci*, 58: 103–108.
- Strauss, S.Y., Rudgers, J.A., Lau, J.A. and Irwin, R.E. 2002. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 278–285.
- Squires, C.H., De Felice, M., Devereux, J. and Calvo, J.M. 1983a. Molecular structure of *ilvH* and its evolutionary relationship to *ilvG* in *Escherichia coli* K12. *Nucl Acids Res*, 11: 5299-5313.
- Suematsua, K., Abikob, T., Nguyena, V.L. and Mochizukib, T. 2017. Phenotypic variation in root development of 162 soybean accessions under hypoxia condition at the seedling stage. *Plant Production Science*, 20: 323–335
- Sun, J., Wang, J.X., Zhang, H.J., Liu, J.L. and Bian, S.N. 2011. Study on mutations in ALS for resistant acetolactate synthase-methyl in *Galium aparine* L. *Agric Sci China*, 10: 86–91.
- Swanson, E.B., Coumans, M.P., Brown, G.L., Patel, J.D. and Beversdorf, W.D. 1988. The characterization of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L.

- after in vitro selection of microspores and protoplasts. *Plant Cell Rep*, 7: 83-87.
- Takagi, Y., Hossain, A.B.M.M., Yanagita, T. and Kusaba, S. 1989. High linolenic acid mutant in soybean induced by x-ray irradiation. *Jpn. J. Breed*, 39: 403-409.
- Talebi, A.B. and Shahrokhifar, B. 2012. Ethyl methane sulphonate (EMS) induced mutagenesis in Malaysian rice (Cv. MR219) for lethal dose determination. *Am.J.Plant Sci*, 3: 1661-1665
- Tarleton, J.C. and Ely, B. 1991. Isolation and characterization of *ilvA*, *ilvBN*, and *ilv D* mutants of *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, 173: 1259-1267.
- Tavcar, A. 1965. Gamma-Ray irradiation of seeds of wheat, barley and inbreeds of maize and the formation of some useful point mutations. *Supplement to Radiation Botany*, 5: 159-174
- Thompson, C.R., Thill, D.C. and Shafii, B. 1994a. Germination characteristics of sulfonyleurea-resistant and -susceptible *kochia* (*Kochia scoparia*). *Weed Sci*, 42: 50-56
- Thompson, C.R. Thill, D.C. and Shafli, B. 1994b. Growth and competitiveness of sulfonyleurea-resistant and -susceptible *kochia* (*Kochia scoparia*). *Weed Sci*. 42: 172-179.
- Thompson, J.A. Bernard, R.L and Nelson, R.L. 1997. A third allele at soybean *dt* locus. *Crop Sci*, 37: 757-762.
- Thompson, J.A. and Nelson, R.L. 1998. Utilization of diverse germplasm for soybean yield improvement. *Crop Sci*. 38: 1362-1368.
- Timmons, F.L. 2005. A history of weed control in the United States and Canada. *J Weed Sci*, 53: 748-761.
- Tripathi, P., Rabara, R.C., Shulaev, V., Shen, Q.J. and Rushton, P.J. 2015. Understanding water-stress responsible in soybean using hydroponics system as systems biology perspective. *Frontiers in plant Science*, 6: 1-5
- Tranel, P. J. Wright, T. R. and Heap, I. M. Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. <http://www.weedscience.com>. [Son erişim tarihi: 29.03.2020].
- Tranel, P.J. and Wright, T.R. 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned. *Weed Science*, 50: 700-712.
- Trebst, A. 1996. The molecular basis of plant resistance to photosystem II herbicides: Molecular genetics and evolution of pesticide resistance. *American Chemical Society*, 44-51.
- TUIK, 2019. Bitkisel üretim istatistikleri. www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 [Son erişim tarihi: 01.05.2020].

- Umbarger, H.E. 1987. Biosynthesis of branched chain amino acids; in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. In Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik B., Schaechter, M. and Umbarger, H. E. (eds.), *American Society for Microbiology, Washington, D.C.*, pp 352-367.
- Umbarger, H. E. 1996. Biosynthesis of the branched chain amino acids; in *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. In Neidhardt, F. C. Curtiss. R. III. Ingraham. J. L. Lin. E. C. C. Low. K. B. Magasanik. B. Reznikokk.W. S. Riley. M. Schaechter, M. and Umbarger, H. E. (eds.), *American Society for Microbiology, Washington, D. C.*, pp. 442-457
- Walter, K.L., Strachan, S.D., Ferry, N.M., Albert, H.H., Castlea, L.A. and Sebastian, S.A. 2014. Molecular and phenotypic characterization of *Als1* and *Als2* mutations conferring tolerance to acetolactate synthase herbicides in soybean. *Pest Manage Sci*, 70: 1831-1839.
- Walter, R. 1969. Effectiveness of mutagenic treatments with ionizing radiation in barley. *Induced Mutations in Plant*, 261-265
- Wang, J. L., vd. 1973. Analysis of the photoperiod ecotypes of soybeans from northern and southern China. *J Agric* 7: 169–180
- Wang, Q. and Calvo, J.M. 1993. Lrp, a global regulatory protein of *Escherichia coli*, binds cooperatively to multiple sites and activates transcription of *ilvIH*. *J Molec. Biol.* 229: 306-318.
- Warwick, S.I. 1991. Herbicide resistance in weedy plants:physiology and population biology. *Annual Reviewof Ecologyand Systematics*, 22: 95–114.
- Warwick, S.I., Xu, R., Sauder, C. and Beckie, H.J. 2008. Acetolactate synthase target-site mutations and single nucleotide polymorphism genotyping in ALS-resistant *kochia* (*Kochia scoparia*). *Weed Sci* 56: 797–806.
- Wek, R.C., Hauser, C.A. and Hatfield, G.W. 1985. The nucleotide sequence of the *ilvbn* operon of *Escherichia coli*: sequence homologies of the acetohydroxy acid synthase isozymes. *Nucl. Acids Res*, 13: 3995-4010.
- Wellensiek, S.J. 1965. Comparison of The Effect of EMS, Neutrons, Gamma and X-rays on Peas. *Supplement to Radiation Botany*, 227-235
- Werck-Reichhart, D., Hehn, A. and Didierjean, L. 2000. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in Plant Science*, 5: 116–123.
- Wilcox, J.R., Cavins, J.F. and Nielsen, N.C. 1984. Genetic alteration of soybean oil composition by a chemical mutagen. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 61: 97–100.
- Wilcox, J.R. 1985. Breeding soybeans for improved oil quantity and quality. In R. Shibles, (Ed.), *Proceedings of the 3rd World Soybean Research Conference*, Ames, IA, August 12–17, 1984. Westview Press, Boulder, CO, pp. 380–386.
- Wilcox, J.R. and Cavins, J.F. 1990. Registration of C1726 and C1727 soybean germplasm with altered levels of palmitic acid. *Crop Sci*, 30: 240.

- Wilcox, J.R. 2001. Sixty years of improvement in publicly developed elite soybean lines. *Crop Sci*, 49: 1711–1716
- Winsor G.W. and Schwarz, M. 1990. Soilles culture for Horticulture crop Production *FAO plant production and Protection paper*, 101: 188.
- Woodworth, C.M. 1933. Genetics of the soybean. *J Am Soc Agron*, 25: 36–51
- Wright, T. and Penner, D. 1998. Cell selection and inheritance of imidazolinone resistance in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theor Appl Genet*, 96: 612–620
- Wright, T.R., Bascomb, N.E., Sturmer, S.F. and Penner, D. 1998. Biochemical mechanism and molecular basis for ALS-inhibiting herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*) somatic cell selections. *Weed Sci*. 46: 13-23.
- WSSA, 1998. Herbicide resistance and herbicide tolerance defined. *Weed Technology*, 12,: 789-789.
- Yu, Q. and. Powles, S:B. 2014. Resistance to AHAS inhibitör herbicides: current understanding. *Pest Manag Sci*. 70: 1340–1350
- Qiu, L. et al. 1999. The history and use of primitive varieties in Chinese soybean breeding. In Kauffman, H.E. (Ed.), Proceedings of the World Soybean Research Conference VI, Chicago, August 4–7, 1999. Superior Print, Champaign, IL, pp. 165–172.
- Van Rensburg, E. and Breeze, V.G. 1990. Uptake and development of phytotoxicity following exposure to vapour of the herbicide ¹⁴C 2,4-d butyl by tomato and lettuce plants. *Environ. Exp. Bot*, 30: 405–414.
- Van Harten, A.M. 1998. Mutation breeding: Theory and practical applications. Cambridge University Press, Cambridge, England, pp. 340
- Van Eerd, L.L., Stephenson, G.R., Kwiatkowski, J., Grossmann, K. and Hall, J.C. 2005. Physiological and biochemical characterization of quinclorac resistance in a false cleavers (*Galium spurium* L.) biotype. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1144-1151
- Varanasi, A., Prasad, P.V.V. and Jugulam, M. 2016. Impact of Climate Change Factors on Weeds and Herbicide Efficacy. *Advances in Agronomy*, 135: 107-146.
- Vencil, W.K., Nichols, R.L., Webster, T.M., Soteres, J.K., Mallory-Smith, C., Burgos, N.R., Johnson, W.G. and McClelland, M.R. 2012. Herbicide Resistance: Toward an Understanding of Resistance Development and the Impact of Herbicide Resistant Crops. *Weed Science*, 2–30.
- Vidal, A., Abril, N. and Pueyo, C. 1995. DNA repair by Ogt alky- transferase influences EMS mutational specificity. *Carcinogenesis* 16: 817–821.
- Yang, Q., Deng, W., Li, X., Yu, Q., Bai, L. and Zheng, M. 2016. Target-site and non-target-site based resistance to the herbicide tribenuron-methyl in flaxweed (*Descurainia sophia* L.). *BMC Genom*, 17: 551.
- Yoshida, K. 2005. Evolutionary process of stress response systems controlled by abscisic acid in photosynthetic organisms. *Yakugaku Zasshi* 125: 927–936.

- Yuan, J.S., Tranel, P.J. and Stewart C.N. 2006. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Sci*, 12: 6-13.
- Yuan, J.S., Tranel, P.J. and Stewart, C.N. 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science*, 12: 6-13.
- Yu, Q., Han, H. and Powles, S.B. 2008. Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. *Pest Management Science* 64: 1229–1236
- Yu, Q., Han, H., Cawthray, G.R., Wang, S.F. and Powles, S.B. 2013. Enhanced rates of herbicide metabolism in low herbicide-dose selected resistant *Lolium rigidum*. *Plant, Cell and Environment* 36: 818–827.
- Xiao, W. and Rank, G.H. 1988. The yeast *ilv2* gene is under general amino acid control. *Genome* 30: 984-986.
- Xu, B. 1986. New evidence about the geographic origin of soybean. *Soybean Sci*, 5: 123–130
- Zeng, L. and Baird, W.V. 1997. Genetic basis of dinitroaniline herbicide resistance in a highly resistant biotype of goosegrass (*Eleusine indica*). *J Hered* 88: 427-432.
- Zhang, Y., Xu, Y., Wang, S., Li, X. and Zheng, M. 2017. Resistance mutations of Pro197, Asp376 and Trp574 in the acetohydroxyacid synthase (AHAS) affect pigments, growths, and competitiveness of *Descurainia sophia* L. *Scientific Reports* 7: 16380
- Zhao, N., Li, W., Bai, S., Guo, W., Yuan, G., Wang, F., Liu, W. and Wang, J. 2017. Transcriptome profiling to identify genes involved in mesosulfuron-methyl resistance in *Alopecurus aequalis*. *Front. Plant Sci*, 8: 1391.
- Zhao, N., Yan, Y., Ge, L., Zhu, B., Liu, W. and Wang, J. 2019. Target site mutations and cytochrome P450s confer resistance to fenoxaprop-P-ethyl and mesosulfuron-methyl in *Alopecurus aequalis*. *Pest Manag. Sci*, 75: 204–214
- Zhou, X. A., Peng Y. H., Wang G.X. and Chang R.Z. 1998. The genetic diversity and center of origin of Chinese cultivated soybean. *Sci Agric Sin*, 31: 37–43

8. EKLER

GmAHA51 primeri ile çoğaltılan dayanıklı ve hassas bitki örnekleri, KC254821.1 (dayanıklı) ve KC254825.1 (hassas) (Ghio vd. 2013) sekans analizleri

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

KC254821.1      ATGGCGGCCACCGCTTCCAGAACCACCGATTCTTCTTCTCTTACACCCACCTTC      60
KC254825.1      ATGGCGGCCACCGCTTCCAGAACCACCGATTCTTCTTCTCTTACACCCACCTTC      60
1_nolu_örnek_GmAHA51-F  -----CACCCACCTTC      12
6_nolu_örnek_GmAHA51-F  -----CACCCACCTTC      12
2_nolu_örnek_GmAHA51-F  -----CACCCACCTTC      12
4_nolu_örnek_GmAHA51-F  -----CACCCACCTTC      12
3_nolu_örnek_GmAHA51-F  -----CACCCACCTTC      12
7_nolu_örnek_GmAHA51-F  -----CACCCACCTTC      12
8_nolu_örnek_GmAHA51-F  -----CACCCACCTTC      12
*****

KC254821.1      CCCAAACGCATTACTAGATCCACCTCCCTCTCTCTCATCAAACCTCACCAAACCAAC      120
KC254825.1      CCCAAACGCATTACTAGATCCACCTCCCTCTCTCTCATCAAACCTCACCAAACCAAC      120
1_nolu_örnek_GmAHA51-F  CCCAAACGCATTACTAGATCCACCTCCCTCTCTCTCATCAAACCTCACCAAACCAAC      72
6_nolu_örnek_GmAHA51-F  CCCAAACGCATTACTAGATCCACCTCCCTCTCTCTCATCAAACCTCACCAAACCAAC      72
2_nolu_örnek_GmAHA51-F  CCCAAACGCATTACTAGATCCACCTCCCTCTCTCTCATCAAACCTCACCAAACCAAC      72
4_nolu_örnek_GmAHA51-F  CCCAAACGCATTACTAGATCCACCTCCCTCTCTCTCATCAAACCTCACCAAACCAAC      72
3_nolu_örnek_GmAHA51-F  CCCAAACGCATTACTAGATCCACCTCCCTCTCTCTCATCAAACCTCACCAAACCAAC      72
7_nolu_örnek_GmAHA51-F  CCCAAACGCATTACTAGATCCACCTCCCTCTCTCTCATCAAACCTCACCAAACCAAC      72
8_nolu_örnek_GmAHA51-F  CCCAAACGCATTACTAGATCCACCTCCCTCTCTCTCATCAAACCTCACCAAACCAAC      72
*****

KC254821.1      CACGCTCTCAAAATCAAATGTTCCATCTCCAACCCCCACGGCGGCGCCCTTACCAAG      180
KC254825.1      CACGCTCTCAAAATCAAATGTTCCATCTCCAACCCCCACGGCGGCGCCCTTACCAAG      180
1_nolu_örnek_GmAHA51-F  CACGCTCTCAAAATCAAATGTTCCATCTCCAACCCCCACGGCGGCGCCCTTACCAAG      132
6_nolu_örnek_GmAHA51-F  CACGCTCTCAAAATCAAATGTTCCATCTCCAACCCCCACGGCGGCGCCCTTACCAAG      132
2_nolu_örnek_GmAHA51-F  CACGCTCTCAAAATCAAATGTTCCATCTCCAACCCCCACGGCGGCGCCCTTACCAAG      132
4_nolu_örnek_GmAHA51-F  CACGCTCTCAAAATCAAATGTTCCATCTCCAACCCCCACGGCGGCGCCCTTACCAAG      132
3_nolu_örnek_GmAHA51-F  CACGCTCTCAAAATCAAATGTTCCATCTCCAACCCCCACGGCGGCGCCCTTACCAAG      132
7_nolu_örnek_GmAHA51-F  CACGCTCTCAAAATCAAATGTTCCATCTCCAACCCCCACGGCGGCGCCCTTACCAAG      132
8_nolu_örnek_GmAHA51-F  CACGCTCTCAAAATCAAATGTTCCATCTCCAACCCCCACGGCGGCGCCCTTACCAAG      132
*****

KC254821.1      GAAGCGCCGACCACGGAGCCCTTCGTGTACGGTTCGCCTCCGGCGAACCTCGCAAGGGC      240
KC254825.1      GAAGCGCCGACCACGGAGCCCTTCGTGTACGGTTCGCCTCCGGCGAACCTCGCAAGGGC      240
1_nolu_örnek_GmAHA51-F  GAAGCGCCGACCACGGAGCCCTTCGTGTACGGTTCGCCTCCGGCGAACCTCGCAAGGGC      192
6_nolu_örnek_GmAHA51-F  GAAGCGCCGACCACGGAGCCCTTCGTGTACGGTTCGCCTCCGGCGAACCTCGCAAGGGC      192
2_nolu_örnek_GmAHA51-F  GAAGCGCCGACCACGGAGCCCTTCGTGTACGGTTCGCCTCCGGCGAACCTCGCAAGGGC      192
4_nolu_örnek_GmAHA51-F  GAAGCGCCGACCACGGAGCCCTTCGTGTACGGTTCGCCTCCGGCGAACCTCGCAAGGGC      192
3_nolu_örnek_GmAHA51-F  GAAGCGCCGACCACGGAGCCCTTCGTGTACGGTTCGCCTCCGGCGAACCTCGCAAGGGC      192
7_nolu_örnek_GmAHA51-F  GAAGCGCCGACCACGGAGCCCTTCGTGTACGGTTCGCCTCCGGCGAACCTCGCAAGGGC      192
8_nolu_örnek_GmAHA51-F  GAAGCGCCGACCACGGAGCCCTTCGTGTACGGTTCGCCTCCGGCGAACCTCGCAAGGGC      192
*****

```

KC254821.1	GCGGACATCCTTGTGGAGGCGCTGGAGAGGCAGGGCGTGACGACGGTGTTCGCGTACCCC	300
KC254825.1	GCGGACATCCTTGTGGAGGCGCTGGAGAGGCAGGGCGTGACGACGGTGTTCGCGTACCCC	300
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCGGACATCCTTGTGGAGGCGCTGGAGAGGCAGGGCGTGACGACGGTGTTCGCGTACCCC	252
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCGGACATCCTTGTGGAGGCGCTGGAGAGGCAGGGCGTGACGACGGTGTTCGCGTACCCC	252
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCGGACATCCTTGTGGAGGCGCTGGAGAGGCAGGGCGTGACGACGGTGTTCGCGTACCCC	252
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCGGACATCCTTGTGGAGGCGCTGGAGAGGCAGGGCGTGACGACGGTGTTCGCGTACCCC	252
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCGGACATCCTTGTGGAGGCGCTGGAGAGGCAGGGCGTGACGACGGTGTTCGCGTACCCC	252
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCGGACATCCTTGTGGAGGCGCTGGAGAGGCAGGGCGTGACGACGGTGTTCGCGTACCCC	252
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCGGACATCCTTGTGGAGGCGCTGGAGAGGCAGGGCGTGACGACGGTGTTCGCGTACCCC	252

KC254821.1	GGCGGTGCGTCGATGGAGATCCACGAGGCGCTCACGCGCTCCGCCCATCCGCAACGTG	360
KC254825.1	GGCGGTGCGTCGATGGAGATCCACGAGGCGCTCACGCGCTCCGCCCATCCGCAACGTG	360
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGCGGTGCGTCGATGGAGATCCACGAGGCGCTCACGCGCTCCGCCCATCCGCAACGTG	312
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGCGGTGCGTCGATGGAGATCCACGAGGCGCTCACGCGCTCCGCCCATCCGCAACGTG	312
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGCGGTGCGTCGATGGAGATCCACGAGGCGCTCACGCGCTCCGCCCATCCGCAACGTG	312
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGCGGTGCGTCGATGGAGATCCACGAGGCGCTCACGCGCTCCGCCCATCCGCAACGTG	312
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGCGGTGCGTCGATGGAGATCCACGAGGCGCTCACGCGCTCCGCCCATCCGCAACGTG	312
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGCGGTGCGTCGATGGAGATCCACGAGGCGCTCACGCGCTCCGCCCATCCGCAACGTG	312
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGCGGTGCGTCGATGGAGATCCACGAGGCGCTCACGCGCTCCGCCCATCCGCAACGTG	312

KC254821.1	CTCCCGGCCACGAGCAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCGAAGGCTACGCGGTTCTCCGGC	420
KC254825.1	CTCCCGGCCACGAGCAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCGAAGGCTACGCGGTTCTCCGGC	420
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCCACGAGCAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCGAAGGCTCCGTACGTTCTCCGGC	372
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCCACGAGCAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCGAAGGCTCCGTACGTTCTCCGGC	372
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCCACGAGCAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCGAAGGCTCCGTACGTTCTCCGGC	372
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCCACGAGCAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCGAAGGCTCCGTACGTTCTCCGGC	372
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCCACGAGCAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCGAAGGCTACGCGGTTCTCCGGC	372
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCCACGAGCAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCGAAGGCTACGCGGTTCTCCGGC	372
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCCACGAGCAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCGAAGGCTACGCGGTTCTCCGGC	372
***** ** *****		
KC254821.1	CTCCCGGCGTCTGCATTGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTGAGCGGCTC	480
KC254825.1	CTCCCGGCGTCTGCATTGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTGAGCGGCTC	480
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCGACTGCATTGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTGAGCGGCTC	432
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCGACTGCATTGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTGAGCGGCTC	432
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCGACTGCATTGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTGAGCGGCTC	432
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCGACTGCATTGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTGAGCGGCTC	432
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCGTCTGCATTGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTGAGCGGCTC	432
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCGTCTGCATTGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTGAGCGGCTC	432
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTCCCGGCGTCTGCATTGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTGAGCGGCTC	432
***** *****		

KC254821.1	GCCGACGCTTTAATGGACAGCGTCCCAGTCGTCGCCATCACCAGGCCAGGTCTCCCGCCGG	540
KC254825.1	GCCGACGCTTTAATGGACAGCGTCCCAGTCGTCGCCATCACCAGGCCAGGTCTCCCGCCGG	540
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCCGACGCTTTAATGGACAGCGTCCCAGTCGTCGCCATCACCAGGCCAGGTCTCCCGCCGG	492
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCCGACGCTTTAATGGACAGCGTCCCAGTCGTCGCCATCACCAGGCCAGGTCTCCCGCCGG	492
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCCGACGCTTTAATGGACAGCGTCCCAGTCGTCGCCATCACCAGGCCAGGTCTCCCGCCGG	492
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCCGACGCTTTAATGGACAGCGTCCCAGTCGTCGCCATCACCAGGCCAGGTCTCCCGCCGG	492
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCCGACGCTTTAATGGACAGCGTCCCAGTCGTCGCCATCACCAGGCCAGGTCTCCCGCCGG	492
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCCGACGCTTTAATGGACAGCGTCCCAGTCGTCGCCATCACCAGGCCAGGTCTCCCGCCGG	492
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCCGACGCTTTAATGGACAGCGTCCCAGTCGTCGCCATCACCAGGCCAGGTCTCCCGCCGG	492

KC254821.1	ATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCGATCGTGGAGGTGAGCAGATCCATCACG	600
KC254825.1	ATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCGATCGTGGAGGTGAGCAGATCCATCACG	600
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCGATCGTGGAGGTGAGCAGATCCATCACG	552
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCGATCGTGGAGGTGAGCAGATCCATCACG	552
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCGATCGTGGAGGTGAGCAGATCCATCACG	552
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCGATCGTGGAGGTGAGCAGATCCATCACG	552
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCGATCGTGGAGGTGAGCAGATCCATCACG	552
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCGATCGTGGAGGTGAGCAGATCCATCACG	552
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCGATCGTGGAGGTGAGCAGATCCATCACG	552

KC254821.1	AAGCACAACCTACCTCATCTCGACGTCGACGACATCCCCGCGTCGTCGCCGAGGCTTTC	660
KC254825.1	AAGCACAACCTACCTCATCTCGACGTCGACGACATCCCCGCGTCGTCGCCGAGGCTTTC	660
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGCACAACCTACCTCATCTCGACGTCGACGACATCCCCGCGTCGTCGCCGAGGCTTTC	612
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGCACAACCTACCTCATCTCGACGTCGACGACATCCCCGCGTCGTCGCCGAGGCTTTC	612
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGCACAACCTACCTCATCTCGACGTCGACGACATCCCCGCGTCGTCGCCGAGGCTTTC	612
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGCACAACCTACCTCATCTCGACGTCGACGACATCCCCGCGTCGTCGCCGAGGCTTTC	612
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGCACAACCTACCTCATCTCGACGTCGACGACATCCCCGCGTCGTCGCCGAGGCTTTC	612
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGCACAACCTACCTCATCTCGACGTCGACGACATCCCCGCGTCGTCGCCGAGGCTTTC	612
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGCACAACCTACCTCATCTCGACGTCGACGACATCCCCGCGTCGTCGCCGAGGCTTTC	612

KC254821.1	TTCGTCGCCACCTCCGGCCGCCCGGTCCGGTCTCATCGACATTCCCAAGACGTTTCAG	720
KC254825.1	TTCGTCGCCACCTCCGGCCGCCCGGTCCGGTCTCATCGACATTCCCAAGACGTTTCAG	720
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTCGTCGCCACCTCCGGCCGCCCGGTCCGGTCTCATCGACATTCCCAAGACGTTTCAG	672
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTCGTCGCCACCTCCGGCCGCCCGGTCCGGTCTCATCGACATTCCCAAGACGTTTCAG	672
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTCGTCGCCACCTCCGGCCGCCCGGTCCGGTCTCATCGACATTCCCAAGACGTTTCAG	672
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTCGTCGCCACCTCCGGCCGCCCGGTCCGGTCTCATCGACATTCCCAAGACGTTTCAG	672
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTCGTCGCCACCTCCGGCCGCCCGGTCCGGTCTCATCGACATTCCCAAGACGTTTCAG	672
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTCGTCGCCACCTCCGGCCGCCCGGTCCGGTCTCATCGACATTCCCAAGACGTTTCAG	672
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTCGTCGCCACCTCCGGCCGCCCGGTCCGGTCTCATCGACATTCCCAAGACGTTTCAG	672

KC254821.1	CAGCAACTCGCCGTGCCTAATTGGGACGAGCCCGTTAACCTCCCCGGTTACCTCGCCAGG	780
KC254825.1	CAGCAACTCGCCGTGCCTAATTGGGACGAGCCCGTTAACCTCCCCGGTTACCTCGCCAGG	780
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAGCAACTCGCCGTGCCTAATTGGGACGAGCCCGTTAACCTCCCCGGTTACCTCGCCAGG	732
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAGCAACTCGCCGTGCCTAATTGGGACGAGCCCGTTAACCTCCCCGGTTACCTCGCCAGG	732
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAGCAACTCGCCGTGCCTAATTGGGACGAGCCCGTTAACCTCCCCGGTTACCTCGCCAGG	732
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAGCAACTCGCCGTGCCTAATTGGGACGAGCCCGTTAACCTCCCCGGTTACCTCGCCAGG	732
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAGCAACTCGCCGTGCCTAATTGGGACGAGCCCGTTAACCTCCCCGGTTACCTCGCCAGG	732
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAGCAACTCGCCGTGCCTAATTGGGACGAGCCCGTTAACCTCCCCGGTTACCTCGCCAGG	732
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAGCAACTCGCCGTGCCTAATTGGGACGAGCCCGTTAACCTCCCCGGTTACCTCGCCAGG	732

KC254821.1	CTGCCAGGCCCCCGCCGAGGCCAATTGGAACACATTGTCAGACTCATCATGGAGGCC	840
KC254825.1	CTGCCAGGCCCCCGCCGAGGCCAATTGGAACACATTGTCAGACTCATCATGGAGGCC	840
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTGCCAGGCCCCCGCCGAGGCCAATTGGAACACATTGTCAGACTCATCATGGAGGCC	792
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTGCCAGGCCCCCGCCGAGGCCAATTGGAACACATTGTCAGACTCATCATGGAGGCC	792
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTGCCAGGCCCCCGCCGAGGCCAATTGGAACACATTGTCAGACTCATCATGGAGGCC	792
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTGCCAGGCCCCCGCCGAGGCCAATTGGAACACATTGTCAGACTCATCATGGAGGCC	792
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTGCCAGGCCCCCGCCGAGGCCAATTGGAACACATTGTCAGACTCATCATGGAGGCC	792
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTGCCAGGCCCCCGCCGAGGCCAATTGGAACACATTGTCAGACTCATCATGGAGGCC	792
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CTGCCAGGCCCCCGCCGAGGCCAATTGGAACACATTGTCAGACTCATCATGGAGGCC	792

KC254821.1	CAAAAGCCCGTTCTCTACGTCGGCGGTGGCAGTTTGAATTCCAGTGCTGAATTGAGGCGC	900
KC254825.1	CAAAAGCCCGTTCTCTACGTCGGCGGTGGCAGTTTGAATTCCAGTGCTGAATTGAGGCGC	900
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAAAAGCCCGTTCTCTACGTCGGCGGTGGCAGTTTGAATTCCAGTGCTGAATTGAGGCGC	852
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAAAAGCCCGTTCTCTACGTCGGCGGTGGCAGTTTGAATTCCAGTGCTGAATTGAGGCGC	852
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAAAAGCCCGTTCTCTACGTCGGCGGTGGCAGTTTGAATTCCAGTGCTGAATTGAGGCGC	852
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAAAAGCCCGTTCTCTACGTCGGCGGTGGCAGTTTGAATTCCAGTGCTGAATTGAGGCGC	852
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAAAAGCCCGTTCTCTACGTCGGCGGTGGCAGTTTGAATTCCAGTGCTGAATTGAGGCGC	852
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAAAAGCCCGTTCTCTACGTCGGCGGTGGCAGTTTGAATTCCAGTGCTGAATTGAGGCGC	852
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	CAAAAGCCCGTTCTCTACGTCGGCGGTGGCAGTTTGAATTCCAGTGCTGAATTGAGGCGC	852

KC254821.1	TTTGTGAACTCACTGGTATTCCTGCTAGCACTTTAATGGGTCTTGGAACCTTTTCCT	960
KC254825.1	TTTGTGAACTCACTGGTATTCCTGCTAGCACTTTAATGGGTCTTGGAACCTTTTCCT	960
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTTGTGAACTCACTGGTATTCCTGCTAGCACTTTAATGGGTCTTGGAACCTTTTCCT	912
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTTGTGAACTCACTGGTATTCCTGCTAGCACTTTAATGGGTCTTGGAACCTTTTCCT	912
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTTGTGAACTCACTGGTATTCCTGCTAGCACTTTAATGGGTCTTGGAACCTTTTCCT	912
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTTGTGAACTCACTGGTATTCCTGCTAGCACTTTAATGGGTCTTGGAACCTTTTCCT	912
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTTGTGAACTCACTGGTATTCCTGCTAGCACTTTAATGGGTCTTGGAACCTTTTCCT	912
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTTGTGAACTCACTGGTATTCCTGCTAGCACTTTAATGGGTCTTGGAACCTTTTCCT	912
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TTTGTGAACTCACTGGTATTCCTGCTAGCACTTTAATGGGTCTTGGAACCTTTTCCT	912

KC254821.1	ATTGGTGATGAATATCCCTTCAGATGCTGGGTATGCATGGTACTGTTATGCTAACTAT	1020
KC254825.1	ATTGGTGATGAATATCCCTTCAGATGCTGGGTATGCATGGTACTGTTATGCTAACTAT	1020
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGGTGATGAATATCCCTTCAGATGCTGGGTATGCATGGTACTGTTATGCTAACTAT	972
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGGTGATGAATATCCCTTCAGATGCTGGGTATGCATGGTACTGTTATGCTAACTAT	972
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGGTGATGAATATCCCTTCAGATGCTGGGTATGCATGGTACTGTTATGCTAACTAT	972
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGGTGATGAATATCCCTTCAGATGCTGGGTATGCATGGTACTGTTATGCTAACTAT	972
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGGTGATGAATATCCCTTCAGATGCTGGGTATGCATGGTACTGTTATGCTAACTAT	972
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGGTGATGAATATCCCTTCAGATGCTGGGTATGCATGGTACTGTTATGCTAACTAT	972
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGGTGATGAATATCCCTTCAGATGCTGGGTATGCATGGTACTGTTATGCTAACTAT	972

KC254821.1	GCTGTTGACAATAGTGATTGTTGCTTGCCTTTGGGGTAAGGTTTGATGACCGTGTACT	1080
KC254825.1	GCTGTTGACAATAGTGATTGTTGCTTGCCTTTGGGGTAAGGTTTGATGACCGTGTACT	1080
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTGTTGACAATAGTGATTGTTGCTTGCCTTTGGGGTAAGGTTTGATGACCGTGTACT	1032
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTGTTGACAATAGTGATTGTTGCTTGCCTTTGGGGTAAGGTTTGATGACCGTGTACT	1032
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTGTTGACAATAGTGATTGTTGCTTGCCTTTGGGGTAAGGTTTGATGACCGTGTACT	1032
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTGTTGACAATAGTGATTGTTGCTTGCCTTTGGGGTAAGGTTTGATGACCGTGTACT	1032
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTGTTGACAATAGTGATTGTTGCTTGCCTTTGGGGTAAGGTTTGATGACCGTGTACT	1032
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTGTTGACAATAGTGATTGTTGCTTGCCTTTGGGGTAAGGTTTGATGACCGTGTACT	1032
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTGTTGACAATAGTGATTGTTGCTTGCCTTTGGGGTAAGGTTTGATGACCGTGTACT	1032

KC254821.1	GGGAAGCTTGAGGCTTTTGCTAGTAGGGCTAAGATTGTTACATTGATATTGATTCTGCC	1140
KC254825.1	GGGAAGCTTGAGGCTTTTGCTAGTAGGGCTAAGATTGTTACATTGATATTGATTCTGCC	1140
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGGAAGCTTGAGGCTTTTGCTAGTAGGGCTAAGATTGTTACATTGATATTGATTCTGCC	1092
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGGAAGCTTGAGGCTTTTGCTAGTAGGGCTAAGATTGTTACATTGATATTGATTCTGCC	1092
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGGAAGCTTGAGGCTTTTGCTAGTAGGGCTAAGATTGTTACATTGATATTGATTCTGCC	1092
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGGAAGCTTGAGGCTTTTGCTAGTAGGGCTAAGATTGTTACATTGATATTGATTCTGCC	1092
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGGAAGCTTGAGGCTTTTGCTAGTAGGGCTAAGATTGTTACATTGATATTGATTCTGCC	1092
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGGAAGCTTGAGGCTTTTGCTAGTAGGGCTAAGATTGTTACATTGATATTGATTCTGCC	1092
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GGGAAGCTTGAGGCTTTTGCTAGTAGGGCTAAGATTGTTACATTGATATTGATTCTGCC	1092

KC254821.1	GAGATTGGGAAGAACAGCAGGCGCACGTGTCGGTTGCGCGGATTTGAAGTTGGCCTTG	1200
KC254825.1	GAGATTGGGAAGAACAGCAGGCGCACGTGTCGGTTGCGCGGATTTGAAGTTGGCCTTG	1200
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGATTGGGAAGAACAGCAGGCGCACGTGTCGGTTGCGCGGATTTGAAGTTGGCCTTG	1152
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGATTGGGAAGAACAGCAGGCGCACGTGTCGGTTGCGCGGATTTGAAGTTGGCCTTG	1152
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGATTGGGAAGAACAGCAGGCGCACGTGTCGGTTGCGCGGATTTGAAGTTGGCCTTG	1152
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGATTGGGAAGAACAGCAGGCGCACGTGTCGGTTGCGCGGATTTGAAGTTGGCCTTG	1152
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGATTGGGAAGAACAGCAGGCGCACGTGTCGGTTGCGCGGATTTGAAGTTGGCCTTG	1152
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGATTGGGAAGAACAGCAGGCGCACGTGTCGGTTGCGCGGATTTGAAGTTGGCCTTG	1152
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGATTGGGAAGAACAGCAGGCGCACGTGTCGGTTGCGCGGATTTGAAGTTGGCCTTG	1152

KC254821.1	AAGGGAATTAATATGATTTTGGAGGAGAAAGGAGTGGAGGGTAAGTTTGATCTTGGAGGT	1260
KC254825.1	AAGGGAATTAATATGATTTTGGAGGAGAAAGGAGTGGAGGGTAAGTTTGATCTTGGAGGT	1260
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGGGAATTAATATGATTTTGGAGGAGAAAGGAGTGGAGGGTAAGTTTGATCTTGGAGGT	1212
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGGGAATTAATATGATTTTGGAGGAGAAAGGAGTGGAGGGTAAGTTTGATCTTGGAGGT	1212
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGGGAATTAATATGATTTTGGAGGAGAAAGGAGTGGAGGGTAAGTTTGATCTTGGAGGT	1212
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGGGAATTAATATGATTTTGGAGGAGAAAGGAGTGGAGGGTAAGTTTGATCTTGGAGGT	1212
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGGGAATTAATATGATTTTGGAGGAGAAAGGAGTGGAGGGTAAGTTTGATCTTGGAGGT	1212
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGGGAATTAATATGATTTTGGAGGAGAAAGGAGTGGAGGGTAAGTTTGATCTTGGAGGT	1212
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGGGAATTAATATGATTTTGGAGGAGAAAGGAGTGGAGGGTAAGTTTGATCTTGGAGGT	1212

KC254821.1	TGGAGAGAAGAGATTAATGTGCAGAAACACAAGTTTCCATTGGGTACAAGACATTCCAG	1320
KC254825.1	TGGAGAGAAGAGATTAATGTGCAGAAACACAAGTTTCCATTGGGTACAAGACATTCCAG	1320
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGGAGAGAAGAGATTAATGTGCAGAAACACAAGTTTCCATTGGGTACAAGACATTCCAG	1272
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGGAGAGAAGAGATTAATGTGCAGAAACACAAGTTTCCATTGGGTACAAGACATTCCAG	1272
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGGAGAGAAGAGATTAATGTGCAGAAACACAAGTTTCCATTGGGTACAAGACATTCCAG	1272
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGGAGAGAAGAGATTAATGTGCAGAAACACAAGTTTCCATTGGGTACAAGACATTCCAG	1272
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGGAGAGAAGAGATTAATGTGCAGAAACACAAGTTTCCATTGGGTACAAGACATTCCAG	1272
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGGAGAGAAGAGATTAATGTGCAGAAACACAAGTTTCCATTGGGTACAAGACATTCCAG	1272
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGGAGAGAAGAGATTAATGTGCAGAAACACAAGTTTCCATTGGGTACAAGACATTCCAG	1272

KC254821.1	GACGCGATTTCTCCGAGCATGCTATCGAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGAGATGCT	1380
KC254825.1	GACGCGATTTCTCCGAGCATGCTATCGAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGAGATGCT	1380
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GACGCGATTTCTCCGAGCATGCTATCGAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGAGATGCT	1332
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GACGCGATTTCTCCGAGCATGCTATCGAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGAGATGCT	1332
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GACGCGATTTCTCCGAGCATGCTATCGAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGAGATGCT	1332
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GACGCGATTTCTCCGAGCATGCTATCGAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGAGATGCT	1332
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GACGCGATTTCTCCGAGCATGCTATCGAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGAGATGCT	1332
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GACGCGATTTCTCCGAGCATGCTATCGAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGAGATGCT	1332
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GACGCGATTTCTCCGAGCATGCTATCGAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGAGATGCT	1332

KC254821.1	ATTGTTAGTACTGGGGTGGGCAGCATCAAATGTGGGCTGCGCAGTTTACAAGTACAAG	1440
KC254825.1	ATTGTTAGTACTGGGGTGGGCAGCATCAAATGTGGGCTGCGCAGTTTACAAGTACAAG	1440
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTTAGTACTGGGGTGGGCAGCATCAAATGTGGGCTGCGCAGTTTACAAGTACAAG	1392
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTTAGTACTGGGGTGGGCAGCATCAAATGTGGGCTGCGCAGTTTACAAGTACAAG	1392
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTTAGTACTGGGGTGGGCAGCATCAAATGTGGGCTGCGCAGTTTACAAGTACAAG	1392
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTTAGTACTGGGGTGGGCAGCATCAAATGTGGGCTGCGCAGTTTACAAGTACAAG	1392
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTTAGTACTGGGGTGGGCAGCATCAAATGTGGGCTGCGCAGTTTACAAGTACAAG	1392
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTTAGTACTGGGGTGGGCAGCATCAAATGTGGGCTGCGCAGTTTACAAGTACAAG	1392
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTTAGTACTGGGGTGGGCAGCATCAAATGTGGGCTGCGCAGTTTACAAGTACAAG	1392

KC254821.1	AGACCGAGGCAGTGGTTGACCTCAGGGGGTCTTGGAGCCATGGGTTTGGATTGCCTGCG	1500
KC254825.1	AGACCGAGGCAGTGGTTGACCTCAGGGGGTCTTGGAGCCATGGGTTTGGATTGCCTGCG	1500
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGACCGAGGCAGTGGTTGACCTCAGGGGGTCTTGGAGCCATGGGTTTGGATTGCCTGCG	1452
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGACCGAGGCAGTGGTTGACCTCAGGGGGTCTTGGAGCCATGGGTTTGGATTGCCTGCG	1452
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGACCGAGGCAGTGGTTGACCTCAGGGGGTCTTGGAGCCATGGGTTTGGATTGCCTGCG	1452
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGACCGAGGCAGTGGTTGACCTCAGGGGGTCTTGGAGCCATGGGTTTGGATTGCCTGCG	1452
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGACCGAGGCAGTGGTTGACCTCAGGGGGTCTTGGAGCCATGGGTTTGGATTGCCTGCG	1452
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGACCGAGGCAGTGGTTGACCTCAGGGGGTCTTGGAGCCATGGGTTTGGATTGCCTGCG	1452
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGACCGAGGCAGTGGTTGACCTCAGGGGGTCTTGGAGCCATGGGTTTGGATTGCCTGCG	1452

KC254821.1	GCTATTGGTGCTGCTGTTGCTAACCTGGGGCTGTTGTGGTTGACATTGATGGGGATGGT	1560
KC254825.1	GCTATTGGTGCTGCTGTTGCTAACCTGGGGCTGTTGTGGTTGACATTGATGGGGATGGT	1560
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTATTGGTGCTGCTGTTGCTAACCTGGGGCTGTTGTGGTTGACATTGATGGGGATGGT	1512
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTATTGGTGCTGCTGTTGCTAACCTGGGGCTGTTGTGGTTGACATTGATGGGGATGGT	1512
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTATTGGTGCTGCTGTTGCTAACCTGGGGCTGTTGTGGTTGACATTGATGGGGATGGT	1512
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTATTGGTGCTGCTGTTGCTAACCTGGGGCTGTTGTGGTTGACATTGATGGGGATGGT	1512
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTATTGGTGCTGCTGTTGCTAACCTGGGGCTGTTGTGGTTGACATTGATGGGGATGGT	1512
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTATTGGTGCTGCTGTTGCTAACCTGGGGCTGTTGTGGTTGACATTGATGGGGATGGT	1512
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GCTATTGGTGCTGCTGTTGCTAACCTGGGGCTGTTGTGGTTGACATTGATGGGGATGGT	1512

KC254821.1	AGTTTCATCATGAATGTTCAGGAGTTGGCCACTATAAGAGTGGAGAATCTCCAGTTAAG	1620
KC254825.1	AGTTTCATCATGAATGTTCAGGAGTTGGCCACTATAAGAGTGGAGAATCTCCAGTTAAG	1620
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGTTTCATCATGAATGTTCAGGAGTTGGCCACTATAAGAGTGGAGAATCTCCAGTTAAG	1572
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGTTTCATCATGAATGTTCAGGAGTTGGCCACTATAAGAGTGGAGAATCTCCAGTTAAG	1572
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGTTTCATCATGAATGTTCAGGAGTTGGCCACTATAAGAGTGGAGAATCTCCAGTTAAG	1572
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGTTTCATCATGAATGTTCAGGAGTTGGCCACTATAAGAGTGGAGAATCTCCAGTTAAG	1572
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGTTTCATCATGAATGTTCAGGAGTTGGCCACTATAAGAGTGGAGAATCTCCAGTTAAG	1572
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGTTTCATCATGAATGTTCAGGAGTTGGCCACTATAAGAGTGGAGAATCTCCAGTTAAG	1572
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AGTTTCATCATGAATGTTCAGGAGTTGGCCACTATAAGAGTGGAGAATCTCCAGTTAAG	1572

KC254821.1	ATATTGTTGTTGAACAATCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAAGTGGGAGGATAGGTTCTAC	1680
KC254825.1	ATATTGTTGTTGAACAATCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAAGTGGGAGGATAGGTTCTAC	1680
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATATTGTTGTTGAACAATCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAAGTGGGAGGATAGGTTCTAC	1632
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATATTGTTGTTGAACAATCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAAGTGGGAGGATAGGTTCTAC	1632
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATATTGTTGTTGAACAATCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAAGTGGGAGGATAGGTTCTAC	1632
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATATTGTTGTTGAACAATCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAAGTGGGAGGATAGGTTCTAC	1632
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATATTGTTGTTGAACAATCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAAGTGGGAGGATAGGTTCTAC	1632
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATATTGTTGTTGAACAATCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAAGTGGGAGGATAGGTTCTAC	1632
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATATTGTTGTTGAACAATCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAAGTGGGAGGATAGGTTCTAC	1632

KC254821.1	AAGTCCAATAGAGCTCACACCTATCTTGGAGATCCGTCTAGCGAGAGCGAGATATCCCA	1740
KC254825.1	AAGTCCAATAGAGCTCACACCTATCTTGGAGATCCGTCTAGCGAGAGCGAGATATCCCA	1740
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGTCCAATAGAGCTCACACCTATCTTGGAGATCCGTCTAGCGAGAGCGAGATATCCCA	1692
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGTCCAATAGAGCTCACACCTATCTTGGAGATCCGTCTAGCGAGAGCGAGATATCCCA	1692
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGTCCAATAGAGCTCACACCTATCTTGGAGATCCGTCTAGCGAGAGCGAGATATCCCA	1692
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGTCCAATAGAGCTCACACCTATCTTGGAGATCCGTCTAGCGAGAGCGAGATATCCCA	1692
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGTCCAATAGAGCTCACACCTATCTTGGAGATCCGTCTAGCGAGAGCGAGATATCCCA	1692
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGTCCAATAGAGCTCACACCTATCTTGGAGATCCGTCTAGCGAGAGCGAGATATCCCA	1692
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AAGTCCAATAGAGCTCACACCTATCTTGGAGATCCGTCTAGCGAGAGCGAGATATCCCA	1692

KC254821.1	AACATGCTCAAGTTTGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCGCGAGTGACGAAGAAGGAA	1800
KC254825.1	AACATGCTCAAGTTTGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCGCGAGTGACGAAGAAGGAA	1800
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AACATGCTCAAGTTTGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCGCGAGTGATGAAGAAGGAA	1752
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AACATGCTCAAGTTTGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCGCGAGTGATGAAGAAGGAA	1752
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AACATGCTCAAGTTTGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCGCGAGTGATGAAGAAGGAA	1752
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AACATGCTCAAGTTTGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCGCGAGTGATGAAGAAGGAA	1752
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AACATGCTCAAGTTTGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCGCGAGTGACGAAGAAGGAA	1752
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AACATGCTCAAGTTTGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCGCGAGTGACGAAGAAGGAA	1752
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	AACATGCTCAAGTTTGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCGCGAGTGACGAAGAAGGAA	1752

KC254821.1	GAGCTTAGAGCGGCAATTCAGAGAATGTTGGACACCCCTGGCCCTACCTTCTTGATGTC	1860
KC254825.1	GAGCTTAGAGCGGCAATTCAGAGAATGTTGGACACCCCTGGCCCTACCTTCTTGATGTC	1860
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGCTTAGAGCGGCAATTCAGAGAATGTTGGACACCCCTGGCCCTACCTTCTTGATGTC	1812
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGCTTAGAGCGGCAATTCAGAGAATGTTGGACACCCCTGGCCCTACCTTCTTGATGTC	1812
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGCTTAGAGCGGCAATTCAGAGAATGTTGGACACCCCTGGCCCTACCTTCTTGATGTC	1812
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGCTTAGAGCGGCAATTCAGAGAATGTTGGACACCCCTGGCCCTACCTTCTTGATGTC	1812
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGCTTAGAGCGGCAATTCAGAGAATGTTGGACACCCCTGGCCCTACCTTCTTGATGTC	1812
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGCTTAGAGCGGCAATTCAGAGAATGTTGGACACCCCTGGCCCTACCTTCTTGATGTC	1812
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GAGCTTAGAGCGGCAATTCAGAGAATGTTGGACACCCCTGGCCCTACCTTCTTGATGTC	1812

KC254821.1	ATTGTGCCCCATCAGGAGCATGTGTTGCCGATGATCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1920
KC254825.1	ATTGTGCCCCATCAGGAGCATGTGTTGCCGATGATCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1920
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCATGAGCATGTGTTGCCGATGATCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCATGAGCATGTGTTGCCGATGATCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCATGAGCATGTGTTGCCGATGATCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCATGAGCATGTGTTGCCGATGATCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCAGGAGCATGTGTTGCCGATGATCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCAGGAGCATGTGTTGCCGATGATCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCAGGAGCATGTGTTGCCGATGATCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872

KC254821.1	ATTGTGCCCCATCAGGAGCATGTGTTGCCGATGATCCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1920
KC254825.1	ATTGTGCCCCATCAGGAGCATGTGTTGCCGATGATCCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1920
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCATGAGCATGTGTTGCCGATGATCCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCATGAGCATGTGTTGCCGATGATCCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCATGAGCATGTGTTGCCGATGATCCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCATGAGCATGTGTTGCCGATGATCCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCAGGAGCATGTGTTGCCGATGATCCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCAGGAGCATGTGTTGCCGATGATCCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	ATTGTGCCCCATCAGGAGCATGTGTTGCCGATGATCCCAGTAATGGATCCTTCAAGGAT	1872

KC254821.1	GTGATAACTGAGGGTGATGGTAGAACGAGGTACTGA-----	1956
KC254825.1	GTGATAACTGAGGGTGATGGTAGAACGAGGTACTGA-----	1956
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GTGATAACTGAGGGTGATGGTAGAACGAGGTACTGATTCCTAGACCAAATGTTCTTGA	1932
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GTGATAACTGAGGGTGATGGTAGAACGAGGTACTGATTCCTAGACCAAATGTTCTTGA	1932
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GTGATAACTGAGGGTGATGGTAGAACGAGGTACTGATTCCTAGACCAAATGTTCTTGA	1932
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GTGATAACTGAGGGTGATGGTAGAACGAGGTACTGATTCCTAGACCAAATGTTCTTGA	1932
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GTGATAACTGAGGGTGATGGTAGAACGAGGTACTGATTCCTAGACCAAATGTTCTTGA	1932
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GTGATAACTGAGGGTGATGGTAGAACGAGGTACTGATTCCTAGACCAAATGTTCTTGA	1932
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	GTGATAACTGAGGGTGATGGTAGAACGAGGTACTGATTCCTAGACCAAATGTTCTTGA	1932

KC254821.1	-----	1956
KC254825.1	-----	1956
1_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGCTTGTTTT	1942
6_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGCTTGTTTT	1942
2_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGCTTGTTTT	1942
4_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGCTTGTTTT	1942
3_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGCTTGTTTT	1942
7_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGCTTGTTTT	1942
8_nolu_örnek_GmAHAS1-F	TGCTTGTTTT	1942

>1_nolu_örnek_GmAHAS4-F

AAGCCCTCCCATCTTCATCATCATCATCTTCCCAGAAGCCCTTTCTGCGTCTCGCCCT
CCAATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCTTACTCCCAACGCCCTTCTCTCAAAAT
CTCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAAAACCACCACCGCCGCCGCCGCGAAG
ATTTTGTCTCCCGATTTCGGCCTGGAGGAGCCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTG
GAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGACGTGTTTCGCCTACCCCGGTGGTGCTTC
CATGGAGATCCACCAGGCACTCACCCGCTCCGCCTCCATCCGCAACGTCCTCCCC
GCCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCGAGGGCTACGCCCGTTCTCCGGCATC
CCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCCGGCGCCACCAACCTCGTCAGCGGCCT
CGCCGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCTCGTCGCCATCACCGGCCAGGTCCCC
GCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCATCGTCGAGGTAACGCGT
TCCGTCACAAAGCATAACTATCTCGTTCTAGATGTTGATGATATTCTAGAAATCGTT
AATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGACCTGGCCCTGTGTTAATTGATATA
CCCAAAGATATTCAGCAACAGTTTGCGATTCTTAATTGGGATCAACCAATTAGGTT
ACCTGGTTACATGTCTAGGTTGCCTAAGTCTCCCAATGAGAATCATTTGGAGCTTAT
TGTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAGAAACCTGTTTTGTATGTTGGTGGTGGTTGTTT
GAATTCTAGTGAAGAATTGCGGCGTTTTGTTCGAGCTCACTGGTGTTCCTGTTGCTAG
TACTTTGATGGGTCTTGGTGCTTATCCCATTTGCTGATGAGAATTCTCTTCAGATGCTT
GGGATGCACGGGACTGTTTATGCTAATTATGCTGGGACAAGGCTGATATTTTGCTTG
CGTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGTACGGGGAAGCTCGAGGCTTTTGCGAGC
CGGGCTAAGATAGTTTACATTGATATTGATTCGGCAGAGATTGAAAGAACAAGCAG
CCGCATGTTTCGGTTTGCGCTGATTTGAAGCTGGCGTTGAAGGGGATTAATCACATG
TTGGAGAGCAGAGGGGTTGGGGGGAAGCTTGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAGC
TGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTGAGCTATAAGACTTTTGAGGATGAGATT
TCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGGGATGCTATTGTG
AGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAG
GCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTCTTGGTGCTATGGGGTTTGGATTGCCGG
CTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATCCGGGTGCGGTTGTGGTTGACATTGATGGT
GATGGGAGTTTTATAATGAATGTTTCAAGGAGCTGGCCACTATCAAGGTAGAGAAGCT
CCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAATCAACACTTGGGTATGGTTGTTCAAGTGGGA
GGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGGCTCACACGTATCTGGGAGACCCCTCTAATG
AGAATGCCATATTTCTTGATATGTTGAAGTTTGCTGATGCTTGCGGGATACCGGCAG
CTCGTGTGACCAAGAAAGAACCTTAGAGCGGCAATTCAGAAAATGTTGGACAC
CCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTACCCCATCAAGAGCATGTCTTGCCCAT
GATTCCTAGCAATGGAACCTTCAGGACGTGATAACTGAGGGTGATGGCAGGACAA
GTTACTGATTTCTGAGCAAATTTATCTTATGGTTGTTTTGTAAAAATAGTAAGCTA
ATAGCTTCTTAAATTTTGTATTCATGTTGGCAACTTTTAC

>2_nolu_örnek_GmAHAS4-F

GCCCTCCCATCTTCATCATCATCATCTTCCCAGAAGCCCTTTCTGCGTCTCGCCCTCC
 AATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCCTATCACTCCCAACGCCCTTCTCTCAAAATCT
 CCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAAAACCACCACGCCGCCGCCGCGGAAGAT
 TTTGTCTCCCGATTTCGGCCTGGAGGAGCCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTGGA
 GCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGACGTGTTTCGCCTACCCCGGTGGTGCTTCCA
 TGGAGATCCACCAGGCACTACCCGCTCCGCCTCCATCCGCAACGTCCTCCCCCGCC
 ACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCGAGGGCTACGCCCGTTCCTCCGGCATCCCC
 GCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTCAGCGGCCTCGC
 CGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCTCGTCGCCATCACCGGCCAGGTCCCCCGCC
 GCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCATCGTCGAGGTAACGCGTTCC
 GTCACAAAGCATAACTATCTCGTTCTAGATGTTGATGATATTCCTAGAATCGTTAAT
 GAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGACCTGGCCCTGTGTTAATTGATATACCC
 AAAGATATTCAGCAACAGTTTGCGATTTCCTAATTGGGATCAACCAATTAGGTTACC
 TGGTTACATGTCTAGGTTGCCTAAGTCTCCCAATGAGAATCATTTGGAGCTTATTGT
 GAGGTTGGTTATGGAATCTAAGAAACCTGTTTTGTATGTTGGTGGTGGTTGTTTGAA
 TTCTAGTGAAGAATTGCGGCGTTTTGTTCGAGCTCACTGGTGTTCCTGTTGCTAGTAC
 TTTGATGGGTCTTGGTGCTTATCCATTGCTGATGAGAATTCTCTTCAGATGCTTGG
 GATGCACGGGACTGTTTATGCTAATTATGCTGTGGACAAGGCTGATATTTTGCTTGC
 GTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGTACGGGGAAGCTCGAGGCTTTTGCGAGCC
 GGGCTAAGATAGTTCACATTGATATTGATTCGGCAGAGATTGGAAAGAACAAGCAG
 CCGCATGTTTCGGTTTGCGCTGATTTGAAGCTGGCGTTGAAGGGGATTAATCACATG
 TTGGAGAGCAGAGGGGTTGGGGGGAAGCTTGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAGC
 TGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTGAGCTATAAGACTTTTGAGGATGAGATT
 TCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGGGATGCTATTGTG
 AGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAG
 GCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTCTTGGTGCTATGGGGTTTGATTGCCGG
 CTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATCCGGGTGCGGTTGTGGTTGACATTGATGGT
 GATGGGAGTTTTATAATGAATGTTTCAGGAGCTGGCCACTATCAAGGTAGAGAAGCT
 CCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAATCAACACTTGGGTATGGTTGTTCACTGGGA
 GGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGCTCACACGTATCTGGGAGACCCCTCTAATG
 AGAATGCCATATTTCTTGATATGTTGAAGTTTGCTGATGCTTGCGGGATACCGGCAG
 CTCGTGTGACCAAGAAAGAACCTTAGAGCGGCAATTCAGAAAATGTTGGACAC
 CCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTACCCCATCAAGAGCATGTCTTGCCCAT
 GATTCCTAGCAATGGAACCTTCAGGACGTGATAACTGAGGGTGATGGCAGGACAA
 GTTACTGATTTCTGAGCAAATTTATCTTATGGTTGTTTTGTAAAAATAGTAAGCTA
 ATAGCTTCTTAAATTTTGTATTCATGTTGGCAACTT

>3_nolu_örnek_GmAHAS4-F

GTAAACCCTCCAATCTTCATCATCATCATCTTCCCAGAAGCCCTTTCTGCGTCTCGC
CCTCCAATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCCTATCACTCCCAACGCCCTTCTCTCAA
AATCTCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAAAACCACCACCGCCGCCGCCGCCG
AAGATTTTGTCTCCCGATTCTGGCCTGGAGGAGCCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTC
GTGGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGACGTGTTTCGCCTACCCCGGTGGTGC
TTCCATGGAGATCCACCAGGCACTCACCCGCTCCGCCTCCATCCGCAACGTCTCTCC
CCGCCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCGAGGGCTACGCCCGTTCCTCCGGCA
TCCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTCAGCGGC
CTCGCCGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCTCGTCGCCATCACCGGCCAGGTCCC
CCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCCATCGTCGAGGTAACGC
GTTCCGTCACAAAGCATAACTATCTCGTTCTAGATGTTGATGATATTCCTAGAATCG
TTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGACCTGGCCCTGTGTTAATTGATA
TACCCAAAGATATTCAGCAACAGTTTGCATTCTTAATTGGGATCAACCAATTAGG
TTACCTGGTTACATGTCTAGGTTGCCTAAGTCTCCCAATGAGAATCATTTGGAGCTT
ATTGTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAGAAACCTGTTTTGTATGTTGGTGGTGGTTGT
TTGAATTCTAGTGAAGAATTGCGGCGTTTTGTTCGAGCTCACTGGTGTTCCTGTTGCT
AGTACTTTGATGGGTCTTGGTGCTTATCCCATTGCTGATGAGAATTCTCTTCAGATG
CTTGGGATGCACGGGACTGTTTATGCTAATTATGCTGTGGACAAGGCTGATATTTTG
CTTGGCTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGTACGGGGAAGCTCGAGGCTTTTGC
GAGCCGGGCTAAGATAGTTCACATTGATATTGATTTCGGCAGAGATTGGAAGAACA
AGCAGCCGCATGTTTCGGTTTTGCGCTGATTTGAAGCTGGCGTTGAAGGGGATTAAT
CACATGTTGGAGAGCAGAGGGGTTGGGGGGAAGCTTGATTTTAGAGGTTGGAGGG
AAGAGCTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTGAGCTATAAGACTTTTGAGGAT
GAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGGGATGCT
ATTGTGAGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAAGTA
CAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTCTTGGTGCTATGGGGTTTGGAT
TGCCGGCTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATCCGGGTGCGGTTGTGGTTGACATT
GATGGTGATGGGAGTTTTATAATGAATGTTTCAGGAGCTGGCCACTATCAAGGTAGA
GAAGCTCCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAATCAACACTTGGGTATGGTTGTTCA
GTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGCTCACACGTATCTGGGAGACCCCT
CTAATGAGAATGCCATATTTCTGATATGTTGAAGTTTGCTGATGCTTGCGGGATAC
CGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTAGAGCGGCAATTCAGAAAATGTT
GGACACCCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTACCCCATCAAGAGCATGTCTT
GCCCATGATTCCTAGCAATGGAACCTTCCAGGACGTGATAACTGAGGGTGATGGCA
GGACAAGTTACTGATTTCTGAGCAAATTTATCTTATGGTTGTTTTGTAAAAATAGT
AAGCTAATAGCTTCTTAAATTTTGTATTCAATTTGGCAATTT

>4_nolu_örnek_GmAHAS4-F

AAGGCCCTCCAATCTTCATCATCATCTTCCCAGAAGCCCTTTCTGCGTCTCGCC
CTCCAATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCTATCACTCCCAACGCCCTTCTCTCAA
ATCTCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAAAACCACCACCGCCGCCGCCGA
AGATTTTGTCTCCCGATTTCGGCCTGGAGGAGCCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCG
TGGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGACGTGTTTCGCCTACCCCGGTGGTGCT
TCCATGGAGATCCACCAGGCACTCACCCGCTCCGCCTCCATCCGCAACGTCCTCCCC
CGCCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCGAGGGCTACGCCCGTTCTCCGGCAT
CCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTCAGCGGCC
TCGCCGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCTCGTCGCCATCACCGGCCAGGTCCCC
CGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCCATCGTCGAGGTAACGCG
TTCCGTCACAAAGCATAACTATCTCGTTCTAGATGTTGATGATATTCTAGAAATCGT
TAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGACCTGGCCCTGTGTTAATTGATAT
ACCCAAAGATATTCAGCAACAGTTTTCGATTCTTAATTGGGATCAACCAATTAGGT
TACCTGGTTACATGTCTAGGTTGCCTAAGTCTCCCAATGAGAATCATTTGGAGCTTA
TTGTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAGAAACCTGTTTTGTATGTTGGTGGTGGTTGTT
TGAATTCTAGTGAAGAATTGCGGCGTTTTGTTCGAGCTCACTGGTGTTCCTGTTGCTA
GTACTTTGATGGGTCTTGGTGCTTATCCCATTGCTGATGAGAATTCTCTTCAGATGC
TTGGGATGCACGGGACTGTTTATGCTAATTATGCTGGGGACAAGGCTGATATTTTGC
TTGCGTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGTACAGGGGAAACCTCGAGGCTTTTGC
GAGCCGGGCTAAGATAGTTCACATTGATATTGATTTCGGCAGAGATTGGAAAGAACA
AGCAGCCGCATGTTTCGGTTTTCGCTGATTTGAAGCTGGCGTTGAAGGGGATTAAT
CACATGTTGGAGAGCAGAGGGGTTGGGGGGAAGCTTGATTTTAGAGGTTGGAGGG
AAGAGCTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTTCCTTTGAGCTATAAGACTTTTGAGGAT
GAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGGGATGCT
ATTGTGAGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAAGTA
CAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTCTTGGTGCTATGGGGTTTGGAT
TGCCGGCTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATCCGGGTGCGGTTGTGGTTGACATT
GATGGTGATGGGAGTTTTATAATGAATGTTTCAGGAGCTGGCCACTATCAAGGTAGA
GAAGCTCCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAATCAACACTTGGGTATGGTTGTTCA
GTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGCTCACACGTATCTGGGAGACCCCT
CTAATGAGAATGCCATATTTCTGATATGTTGAAGTTTGTGATGCTTGCGGGATAC
CGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTAGAGCGGCAATTCAGAAAATGTT
GGACACCCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTACCCCATCAAGAGCATGTCTT
GCCCATGATTCTAGCAATGGAACCTTCCAGGACGTGATAACTGAGGGTGATGGCA
GGACAAGTTACTGATTTCTGAGCAAATTTATCTTATGGTTGTTTTGTAAAAATAGT
AAGCTAATAGCTTCTTAAATTTTGTATTCATGTTGGCAATTTTACCTA

>5_nolu_örnek_GmAHAS4-F

GGTATTTTATGCTAAGTCCCTCCATTCTTCATCATCATCATCTTCCCAGAAGCCCTTT
CTGCGTCTCGCCCTCCAATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCCTATCACTCCCAACGC
CCTTCTCTCAAAATCTCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAAAACCAACCGC
CGCCGCCGCCGAAGATTTTGTCTCCCGATTCTGGCCTGGAGGAGCCCCGCAAGGGCG
CCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGACGTGTTTCGCTAC
CCCGGTGGTGCTTCCATGGAGATCCACCAGGCACTACCCGCTCCGCCTCCATCCGC
AACGTCCTCCCCCGCCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCGAGGGGCTACGCCCG
TTCCTCCGGCATCCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCT
CGTCAGCGGCCTCGCCGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCTCGTCGCCATCACCG
GCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCCATCGTC
GAGGTAACGCGTTCGTCACAAAGCATAACTATCTCGTTCTAGATGTTGATGATATT
CCTAGAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGACCTGGCCCTGTG
TTAATTGATATACCCAAAGATATTCAGCAACAGTTTGCGATTCTAATTGGGATCAA
CCAATTAGGTACCTGGTTACATGTCTAGGTGCCTAAGTCTCCCAATGAGAATCAT
TTGGAGCTTATTGTGAGGTGGTTATGGAATCTAAGAAACCTGTTTTGTATGTTGGT
GGTGGTTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGCGGCGTTTTGTGCGAGCTCACTGGTGT
CCTGTTGCTAGTACTTTGATGGGTCTTGGTGCTTATCCCATTGCTGATGAGAATTCT
CTTCAGATGCTTGGGATGCACGGGACTGTTTATGCTAATTATGCTGTGGACAAGGCT
GAAATTTTGCTTGCCTTTGGGGGTGAGGTTTATGACCGTGTACGGGGGAAGCTCG
AGGCTTTTGCGAGCCGGGCTAAGATAGTTCACATTGATATTGATTTCGGCAGAGATT
GGAAAGAACAAGCAGCCGCATGTTTCGGTTTGCCTGATTTGAAGCTGGCGTTGAA
GGGGATTAATCACATGTTGGAGAGCAGAGGGGTTGGGGGGAAGCTTGATTTTAGA
GGTTGGAGGGAAGAGCTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTGAGCTATAAGA
CTTTTGAGGATGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGATGAGTTGACTA
ATGGGGATGCTATTGTGAGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGGGCTGCTCAG
TTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTCTTGGTGCTAT
GGGGTTTGATTGCCGGCTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATCCGGGTGCGGTTG
TGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATAATGAATGTTTCAGGAGCTGGCCACT
ATCAAGGTAGAGAAGCTCCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAATCAACACTTGGG
TATGGTTGTTTCACTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGCTCACACGTATCT
GGGAGACCCCTCTAATGAGAATGCCATATTTCTGATATGTTGAAGTTTGCTGATGC
TTGCGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTAGAGCGGCAATTC
AGAAAATGTTGGACACCCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTACCCCATCAAG
AGCATGTCTTGCCCATGATTCTAGCAATGGAACCTTCCAGGACGTGATAACTGAG
GGTGATGGCAGGACAAGTTACTGATTTCTGAGCAAATTTATCTTATGGTTGTTTTG
TAAAAATAGTAAGCTAATAGCTTCTTAAATTTTGTATTCATGTTGGCAATTTTAA

>6_nolu_örnek_GmAHAS4-F

AGCCCTCCCATCTTCATCATCATCATCTTCCCAGAAGCCCTTTCTGCGTCTCGCCCTC
CAATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCTATCACTCCCAACGCCCTTCTCTCAAAATC
TCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAAAACCACCACCGCCGCCGCCGCCGAAGA
TTTTGTCTCCCGATTTCGGCCTGGAGGAGCCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTGG
AGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGACGTGTTTCGCCTACCCCGGTGGTGCTTCC
ATGGAGATCCACCAGGCACTACCCGCTCCGCCTCCATCCGCAACGTCTCCCCCG
CCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCGAGGGCTACGCCCGTTCCTCCGGCATCC
CCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTCAGCGGCCTC
GCCGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCTCGTCGCCATCACCGGCCAGGTCCCCCG
CCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCCATCGTCGAGGTAACGCGTT
CCGTCACAAAGCATAACTATCTCGTTCTAGATGTTGATGATATTCCTAGAATCGTTA
ATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGACCTGGCCCTGTGTTAATTGATATAC
CCAAAGATATTTCAGCAACAGTTTTCGATTCTTAATTGGGATCAACCAATTAGGTTA
CCTGGTTACATGTCTAGGTTGCCTAAGTCTCCCAATGAGAATCATTTGGAGCTTATT
GTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAGAAACCTGTTTTGTATGTTGGTGGTGGTTGTTTG
AATTCTAGTGAAGAATTGCGGCGTTTTGTTCGAGCTCACTGGTGTTCCTGTTGCTAGT
ACTTTGATGGGTCTTGGTGCTTATCCCATTTGCTGATGAGAATTCTCTTCAGATGCTT
GGGATGCACGGGACTGTTTATGCTAATTATGCTGTGGACAAGGCTGATATTTTGCTT
GCGTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGTACGGGGAAGCTCGAGGCTTTTGCGAG
CCGGGCTAAGATAGTTCACATTGATATTGATTTCGGCAGAGATTGGAAAGAACAAGC
AGCCGCATGTTTCGGTTTTCGCTGATTTGAAGCTGGCGTTGAAGGGGATTAATCAC
ATGTTGGAGAGCAGAGGGGTTGGGGGGAAGCTTGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAG
AGCTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTGAGCTATAAGACTTTTGAGGATGAG
ATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGGGATGCTATT
GTGAGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAAGTACAA
GAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTCTTGGTGCTATGGGGTTTGGATTGC
CGGCTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATCCGGGTGCGGTTGTGGTTGACATTGAT
GGTGATGGGAGTTTTATAATGAATGTTTCAGGAGCTGGCCACTATCAAGGTAGAGAA
GCTCCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAATCAACACTTGGGTATGGTTGTTTCAGTG
GGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGGCTCACACGTATCTGGGAGACCCCTCTA
ATGAGAATGCCATATTTCTTGATATGTTGAAGTTTGCTGATGCTTGCGGGATACCGG
CAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTAGAGCGGCAATTCAGAAAATGTTGGA
CACCCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTACCCCATCAAGAGCATGTCTTGCC
CATGATTCCTAGCAATGGAACCTTCCAGGACGTGATAACTGAGGGTGATGGCAGGA
CAAGTTACTGATTTCTGAGCAAATTTATCTTATGGTTGTTTTGTAAAAATAGTAAG
CTAATAGCTTCTTAAATTTTGTATTCATGTTGGCAACTTTACCT

>8_nolu_örnek_GmAHAS4-F

AATCTTCATCATCAGTCATCTTCCCAGAAGCCCTTTCTGCGTCTCGCCCTCCAATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCCTATCACTCCCAACGCCCTTCTCTCAAAATCTCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAAAACCACCACCGCCGCCGCCGCGCAAGATTTTGTCTCCCGATTTCGGCCTGGAGGAGCCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAACGGCAGGGCGTGACGGACGTGTTTCGCCTACCCCGGTGGTGCTTCCATGGAGATCCACCAGGCACTCACCCGCTCCGCCTCCATCCGCAACGTCCTCCCCCGCCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCGAGGGCTACGCCCCTCCTCCGGCATCCCCGGCGTCTGTCATCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTCAGCGGCCTCGCCGACGCATGCTCGACAGCGTCCCCCTCGTCGCCATCACCGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCATCGTCGAGGTAACGCGTTCGGTCACA AAGCATAACTATCTCGTTCTAGATGTTGATGATATTCCTAGAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGACCTGGCCCTGTGTTAATTGATATACCCAAAGATATTCAGCAACAGTTTGCATTTCCTAATTGGGATCAACCAATTAGGTTACCTGGTTACATGTCTAGGTTGCCTAAGTCTCCCAATGAGAATCATTTGGAGCTTATTGTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAGAAACCTGTTTTGTATGTTGGTGGTGGTTGTTTGAATTCTAGTGAGGAATTGCGGCGTTTTGTGCGAGCTCACTGGTGTTCCTGTTGCTAGTACTTTGATGGTCTGGGTGCTTATCCCATTTGCTGATGAGAATTCTCTTCAGATGCTTGGGATGCACGGGACTGTTTATGCTAATTATGCTGTGGACAAGGCTGATCTTTTGTGCTTGGGTTGGGTGAGGTTTGATGACCGTGTACGGGGAAGCTCGAGGCTTTTGCAGCCGGGCTAAGATAGTTTCACATTGATATTGATTCGGCAGAGATTGGAAAGAACAAGCAGCCGCATGTTTCGGTTTGCCTGATTTGAAGCTGGCGTTGAAGGGGATTAATCACATGTTGGAGAGCAGAGGGGTTGGGGGGAAGCTTGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAGCTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTGAGCTATAAGACTTTTGAGGATGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGGGGATGCTATTGTGAGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTCTTGGTGCTATGGGGTTTGATTGCCGGCTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATCCGGGTGCGGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATAATGAATGTTTCAGGAGCTGGCCACTATCAAGGTAGAGAAGCTCCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAATCAACACTTGGGTATGGTTGTTTCAGTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGCTCACACGTATCTGGGAGACCCCTCTAATGAGAATGCATATTTCTTGATATGTTGAAGTTTGTGATGCTTGGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTAGAGCGGCAATTCAGAAAATGTTGGACACCCCTGGCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTACCCCATCAAGAGCATGTCTTGCCCATGATTCCTAGCAATGGAACCTTCCAGGACGTGATAACTGAGGGTGATGGCAGGACAAGTTACTGATTTCTGAGCAAATTTATCTTATGGTTGTTTTGTAAAAATAGTAAGCTAATAGCTTCTTAATATCTCTTGATTTCGATTTT

>1_nolu_örnek_GM13-F

AAAGGTTAATCGAATGAAAAGTGAAAAGCATAAACACAGTTAAAATGTGGGAGCA
 GCAGGGAGAATTCAGTTTTTATATAGATTATTAGGGCCTGGCTTTAGATTATTGTGG
 TATTGGAAGATGGCGGCTATAACTGCCCCAAAAGCTGCGTTCAGCGTCCTCCCTTC
 ATCATCCCATTCCTCCGAATCCCTTTGTGCGTTTCGCAATCCCATACAGCCCCCATCA
 CTCCAGCGCCGTTCTCTCAGAATCTCCAGCGCCCTATCCGATGCAACCACGAAATC
 CTCCACCGCCGCGCTGAAGCTTTCGCCTCCCGATTTCGGCCTCGATGAGCCCCGCAA
 GGGCGCCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGACGTCTTC
 GCCTACCCCGGAGGCGCCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTCACTCGCTCATCCTC
 CATCCGCAACGTCTCCTCGCCACGAACAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCGAGGGCT
 ACGCCCGCTCTTCGGGCTCCCGGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCA
 CCAACCTCGTCTCCGGCCTCGCCGACGCCTTGCTTGACAGCGTCCCCCTCGTCGCCA
 TCACCGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACAGACGCCTTCCAAGAAACCCCC
 ATCGTCGAGGTAACACGTTCCATCACTAAGCATAACTATCTCGTTCTCGATGTTGAT
 GACATTCCTAGAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGACCTGGC
 CCTGTGTTAATTGATATACCTAAAGATATTCAGCAACAGCTTGCATTCTAATTGG
 GATCAACCAATTAGGTTACCTGGTTACACGTCTAGGTTGCCTAAGTCTCCTAATGAG
 AAACATTTGGAGCTTATTGTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAGAAAACCGGTTTTGT
 ATGTTGGGTGGGGGTGGTTTGAAATTCAAGTGAGGAATTGCGGGGTTTTTGTCAA
 ACCCACTGGTGTTCTGTGCTAGCACTTTGATGGGTCTTGGTGCTTATCCCATTCG
 TGATGATAATTTTCTTCAGATGCTTGGGATGCATGGGACTGTTTATGCTAATTATGC
 TGTGGATAGGGCTGATCTTTTGCTTGCGTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGTCAC
 CGGGAAGCTTGAGGCTTTTGCGAGCCGGGCTAAGATTGTTACATTGATATTGATTC
 AGCTGAGATTGGGAAGAACAAGCAGCCGCATGTGTGCGTTTGTGCGGATTTGAAGT
 TGGCATTGAAGGGGATTAATCGCGTGTTAGAGAGCAGAGGGGTTGCAGGGAAGCT
 TGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAACTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTGA
 GTTATAAGACTTTTGAGAAAGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGACG
 AGTTAACCAATGGGGAAGCTATTGTGAGTACCGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGG
 GCTGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTCT
 TGGTGCTATGGGGTTTGATTGCCGGCTGCCATTGGTGCGGCTGTGGCTAATCCCGG
 TCGGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATGATGAATGTTTCAGGAGCT
 GGCCACCATCAAGGTGGAGAAGCTCCCTGTAAAGATATTGTTGTTGAATAATCAAC
 ACTTGGGTATGGTTGTTCACTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGCTCAC
 ACATATCTGGGAGACCCCTCTAATGAGAATGCCATATACCCCAATATGTTGAAGTT
 TGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTAGAG
 CGGCAATTCAGAAAATGCTGGAGACCCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTAC
 CCCATCAAGAGCATGTCTTGCCCATGATTCCTAGCAATGGAACCTTCCAGGACGTG
 ATAAGTGGGGTGATGGCAGGACAATGTTTTTTGA

>2_nolu_örnek_GM13-F

TTAAATAGGGTTAATGAATGAAAAGTGAAAAGCATAAACACAGTTAAAATGTGG
GAGCAGCAGGGAGAATTCAGTTTTTATATAGATTATTAGGGCCTGGCTTTAGATTAT
TGTGGTATTGGAAGATGGCGGCTATAACTGCCCCAAAAGCTGCGTTCAGCGTCCTC
CCTTCATCATCCCATTCCTCCGAATCCCTTTGTGCGTTTCGCAATCCCATACAGCCCC
CATCACTCCCAGCGCCGTTCTCTCAGAATCTCCAGCGCCCTATCCGATGCAACCACG
AAATCCTCCACCGCCGCCGCTGAAGCTTTCGCCTCCCGATTTCGGCCTCGATGAGCCC
CGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGACG
TCTTCGCTACCCCGGAGGCGCCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTCACTCGCTCAT
CCTCCATCCGCAACGTCTCTCCCTCGCCACGAACAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCGAG
GGCTACGCCCCGCTCTTCGGGCTCCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGGC
GCCACCAACCTCGTCTCCGGCCTCGCCGACGCCTTGCTTGACAGCGTCCCCCTCGTC
GCCATCACCGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACAGACGCCTTCCAAGAAAC
CCCCATCGTCGAGGTAACACGTTCCATCACTAAGCATAACTATCTCGTTCTCGATGT
TGATGACATTCCTAGAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGACC
TGGCCCTGTGTAAATTGATATACCTAAAGATATTAGCAACAGCTTGCATTCTCTAA
TTGGGATCAACCAATTAGGTTACCTGGTTACACGTCTAGGTTGCCTAAGTCTCTCTAA
TGAGAAACATTTGGAGCTTATTGTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAGAAACCGGTTT
TGTATGTTGGTGGTGGTTGTTTGAATTCTAGTGAGGAATTGCGGCGTTTTGTGAGC
TCACCGGTGTTCTGTTGCTAGCACTTTGATGGGTCTTGGTGCTTATCCCATTGCTG
ATGATAATTCTCTTCAGATGCTTGGGATGCATGGGACTGTTTATGCTAATTATGCTG
TGGATAGGGCTGATCTTTTGCTTGCGTTTGGGGTGAGGTTTATGACCGTGTACCG
GGAAGCTTGAGGCTTTTGCGAGCCGGGCTAAGATTGTTACATTGATATTGATTCA
GCTGAGATTGGGAAGAACAAGCAGCCGCATGTGTTCGGTTTGTGCGGATTTGAAGTT
GGCATTGAAGGGGATTAATCGCGTGTTAGAGAGCAGAGGGGTTGCAGGGAAGCTT
GATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAACTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTGAG
TTATAAGACTTTTGAGAAAGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGACGA
GTTAACCAATGGGGAAGCTATTGTGAGTACCGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGGG
CTGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTCTT
GGTGCTATGGGGTTTGGATTGCCGGCTGCCATTGGTGCGGCTGTGGCTAATCCCGGT
GCGGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATGATGAATGTTTCAGGAGCT
GGCCACCATCAAGGTGGAGAAGCTCCCTGTAAAGATATTGTTGTTGAATAATCAAC
ACTTGGGTATGGTTGTTCACTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGCTCAC
ACATATCTGGGAGACCCCTCTAATGAGAATGCCATATACCCCAATATGTTGAAGTT
TGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTAGAG
CGGCAATTCAGAAAATGCTGGAGACCCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTAC
CCCATCAAGAGCATGTCTTGCCCATGATTCCTAGCAATGGAACCTTCCAGGACGTG
ATAACTGAGGGTGATGGCAGGACAATGTTATTGAA

>4_nolu_örnek_GM13-F

TAATGAATGAAAGTGAAAAGCATAAACACAGTTAAAATGTGGGAGCAGCAGGGAG
AATTCAGTTTTTATATAGATTATTAGGGCCTGGCTTTAGATTATTGTGGTATTGGAA
GATGGCGGCTATAACTGCCCCAAAAGCTGCGTTCAGCGTCCTCCCTTCATCATCCCA
TCCCCGAATCCCTTTGTGCGTTTCGCAATCCCATACAGCCCCCATCACTCCCAGCG
CCGTTCTCTCAGAATCTCCAGCGCCCTATCCGATGCAACCACGAAATCCTCCACCGC
CGCCGCTGAAGCTTTCGCCTCCCGATTTCGGCCTCGATGAGCCCCGCAAGGGCGCCG
ACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGACGTCTTCGCCTACCCC
GGAGGCGCCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTCACTCGCTCATCCTCCATCCGCAA
CGTCTCCTCGCCACGAACAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCGAGGGGCTACGCCCGCT
CTTCGGCCTCCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCG
TCTCCGGCCTCGCCGACGCCTTGCTTGACAGCGTCCCCCTCGTCGCCATCACCGGCC
AGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACAGACGCCTTCCAAGAAACCCCCATCGTCGAG
GTAACACGTTCCATCACTAAGCATAACTATCTCGTTCTCGATGTTGATGACATTCTT
AGAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGACCTGGCCCTGTGTTA
ATTGATATACCTAAAGATATTCAGCAACAGCTTGCGATTCTTAATTGGGATCAACC
AATTAGGTTACCTGGTTACACGTCTAGGTTGCCTAAGTCTCCTAATGAGAAACATTT
GGAGCTTATTGTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAGAAACCGGTTTTGTATGTTGGTGG
TGGTTGTTTGAATTCTAGTGAGGAATTGCGGCGTTTTGTGCGAGCTCACTGGGGTTCC
TGTTGCTAGCACTTTGATGGGTCTTGTTGCTTTCCCATGCTGATGATAATTCTCTTC
AGATGCTTGGGATGCATGGGACTGTTTATGCTAATTATGCTGTGGATAGGGCTGAT
CTTTTGCTTGCGTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGTACCCGGGAAGCTTGAGGCT
TTTGCGAGCCGGGCTAAGATTGTTACATTGATATTGATTACAGCTGAGATTGGGAA
GAACAAGCAGCCGCATGTGTCCGTTTGTGCGGATTTGAAGTTGGCATTGAAGGGGA
TTAATCGCGTGTTAGAGAGCAGAGGGGTTGCAGGGAAGCTTGATTTTAGAGGTTGG
AGGGAAGAAGTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTGAGTTATAAGACTTTTGA
GAAAGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGACGAGTTAACCAATGGGG
AAGCTATTGTGAGTACCGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTAC
AAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGTTAACATCCGGTGGTCTTGGTGCTATGGGGTT
TGGATTGCCGGCTGCCATTGGTGCGGCTGTGGCTAATCCCGGTGCGGTTGTGGTTGA
CATTGATGGTGATGGGAGTTTTATGATGAATGTTTCAGGAGCTGGCCACCATCAAGG
TGGAGAAGCTCCCTGTAAAGATATTGTTGTTGAATAATCAACACTTGGGTATGGTTG
TTCAGTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGCTCACACATATCTGGGAGAC
CCCTCTAATGAGAATGCCATATACCCCAATATGTTGAAGTTTGCTGATGCTTGTGGG
ATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTAGAGCGGCAATTCAGAAAA
TGCTGGAGACCCCTGGCCCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTACCCCATCAAGAGCATG
TCTTGCCCATGATTCTAGCAATGGAACCTTCAGGACGTGATAACTGAGGGTGTT
GGCAGGACATATTTTACT

>6_nolu_örnek_GM13-F

TAAAATTTAAAAATAGGTTAATGAATGAAAAGTGAAAAGCATAAACACAGTTAAA
ATGTGGGAGCAGCAGGGAGAATTCAGTTTTTATATAGATTATTAGGGCCTGGCTTT
AGATTATTGTGGTATTGGAAGATGGCGGCTATAACTGCCCCAAAAGCTGCGTTCAG
CGTCCTCCCTTCATCATCCCATTCCTTCCTTTGTGCGTTTCGCAATCCCATAC
AGCCCCCATCACTCCCAGCGCCGTTCTCTCAGAATCTCCAGCGCCCTATCCGATGCA
ACCACGAAATCCTCCACCGCCGCGCTGAAGCTTTCGCCTCCCGATTTCGGCCTCGAT
GAGCCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGA
CGGACGTCTTCGCCTACCCCGGAGGCGCCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTCACT
CGCTCATCCTCCATCCGCAACGTCCTCCCTCGCCACGAACAGGGCGGCGTCTTCGCC
GCCGAGGGCTACGCCCGCTCTTCGGCCTCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGC
CCCGGCCGCCACCAACCTCGTCTCCGGCCTCGCCGACGCCTTGCTTGACAGCGTCCCC
CTCGTCGCCATCACCGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACAGACGCCTTCCA
AGAAACCCCCATCGTCGAGGTAACACGTTCCATCACTAAGCATAACTATCTCGTTCT
CGATGTTGATGACATTCTAGAAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGG
TAGACCTGGCCCTGTGTTAATTGATATACCTAAAGATATTCAGCAACAGCTTGCGAT
TCCTAATTGGGATCAACCAATTAGGTTACCTGGTTACACGTCTAGGTTGCCTAAGTC
TCCTAATGAGAAACATTTGGAGCTTATTGTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAGAAAC
CGTTTTTGTATGTTGGTGGTGGTTGTTGAATTCTAGTGAGGAATTGCGGCGTTTTG
TCGAGCTCACCGGTGTTCTGTGCTAGCACTTTGATGGGTCTTGGTGCTTATCCCA
TTGCTGATGATAATTCTCTTCAGATGCTTGGGATGCATGGGACTGTTTATGCTAATT
ATGCTGTGGATAGGGCTGATCTTTTGCTTGCGTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTG
TCACCGGGAAGCTTGAGGCTTTTGCGAGCCGGGCTAAGATTGTTACATTGATATT
GATTCAGCTGAGATTGGGAAGAACAAGCAGCCGCATGTGTGCGTTTGTGCGGATTT
GAAGTTGGCATTGAAGGGGATTAATCGCGTGTTAGAGAGCAGAGGGGTTGCAGGG
AAGCTTGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAACTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTC
CTTTGAGTTATAAGACTTTTGAGAAAGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTT
TTGACGAGTTAACCAATGGGGAAGCTATTGTGAGTACCGGAGTTGGACAGCACCAG
ATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGTTAACATCCGG
TGGTCTTGGTGCTATGGGGTTTGGATTGCCGGCTGCCATTGGTGCGGCTGTGGCTAA
TCCCGGTGCGGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATGATGAATGTTCA
GGAGCTGGCCACCATCAAGGTGGAGAAGCTCCCTGTTAAGATATTGTTGTTGAATA
ATCAACACTTGGGTATGGTTGTTTCAGTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGG
GCTCACACATATCTGGGAGACCCCTCTAATGAGAATGCCATATACCCCAATATGTT
GAAGTTTGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACC
TTAGAGCGGCAATTCAGAAAATGCTGGAGACCCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTC
ATTGTACCCCATCAAGAGCATGTCTTGCCCATGATTCCTAGCAATGGAACCTTCCAG
GACGTGATAACTGAGGGTGATGGCAGGACAATGTTATTTGGAT

>7_nolu_örnek_GM13-F

TAAAAATAAGGTTAATCGAATGAAAAGTGAAAAGCATAAACACAGTTAAAAATGTG
GGAGCAGCAGGGAGAATTCAGTTTTTATATAGATTATTAGGGCCTGGCTTTAGATT
ATTGTGGTATTGGAAGATGGCGGCTATAACTGCCCCAAAAGCTGCGTTCAGCGTCC
TCCCTTCATCATCCCATTCCTCCGAATCCCTTTGTGCGTTTCGCAATCCCATACAGCCC
CCATCACTCCCAGCGCCGTTCTCTCAGAATCTCCAGCGCCCTATCCGATGCAACCAC
GAAATCCTCCACCGCCGCGCTGAAGCTTTCGCCTCCCGATTTCGGCCTCGATGAGCC
CCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGAC
GTCTTCGCCTACCCCGGAGGCGCCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTCACTCGCTC
ATCCTCCATCCGCAACGTCCTCCCTCGCCACGAACAGGGCGGCGTCTTCGCCGCCG
AGGGCTACGCCCGCTCTTCGGGCTCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCG
GCGCCACCAACCTCGTCTCCGGCCTCGCCGACGCCTTGCTTGACAGCGTCCCCCTCG
TCGCCATCACCGGCCAGGTCCCCGCGCATGATCGGCACAGACGCCTTCCAAGAA
ACCCCCATCGTCGAGGTAACACGTTCCATCACTAAGCATAACTATCTCGTTCTCGAT
GTTGATGACATTCTAGAAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGA
CCTGGCCCTGTGTTAATTGATATACCTAAAGATATTCAGCAACAGCTTGCGATTCT
AATTGGGATCAACCAATTAGGTTACCTGGTTACACGTCTAGGTTGCCTAAGTCTCCT
AATGAGAAACATTTGGAGCTTATTGTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAAAAAACCGG
TTTTGTATGTTGGGTGGTGGTTGTTTGAATTCTAGTGAGGAATTGCGGCGTTTTGTC
GAGCTCACCGGGGGTTCCTGTTGCTAGCACTTTGATGGGTCTTGGGGGCTTACCCCA
TTGCTGATGATAATTTTCTTCAGATGCTTGGGATGCATGGGACTGTTTATGCTAATT
ATGCTGTGGATAGGGCTGATCTTTTGCTTGCGTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTG
TCACCGGGAAGCTTGAGGCTTTTGCGAGCCGGGCTAAGATTGTTACATTGATATT
GATTCAGCTGAGATTGGGAAGAACAAGCAGCCGCATGTGTGCGTTTGTGCGGATTT
GAAGTTGGCATTGAAGGGGATTAATCGCGTGTTAGAGAGCAGAGGGGTTGCAGGG
AAGCTTGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAACTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTC
CTTTGAGTTATAAGACTTTTGAGAAAGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTT
TTGACGAGTTAACCAATGGGGAAGCTATTGTGAGTACCGGAGTTGGACAGCACCAG
ATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGG
TGGTCTTGGTGCTATGGGGTTTGATTGCCGGCTGCCATTGGTGCGGCTGTGGCTAA
TCCCGGTGCGGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATGATGAATGTTCA
GGAGCTGGCCACCATCAAGGTGGAGAAGCTCCCTGTTAAGATATTGTTGTTGAATA
ATCAACACTTGGGTATGGTTGTTTCAGTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGG
GCTCACACATATCTGGGAGACCCCTTTAATGAGAATGCCATATACCCCAATATGTT
GAAGTTTGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACC
TTAGAGCGGCAATTCAGAAAATGCTGGAGACCCCTGGCCCCCTATTTTTTTGATGTCA
TTGTACCCCATCAAGAGCATGTTTTGCCCATGATTCTAGCAATGGAACCTTCCAGG
ACGTGATAACTGAGGGTGATGGCAGGACAAGTTACTTG

>8_nolu_örnek_GM13-F

AGGTAATAATAAATTTAAAATAGGTTAATGAATGAAAAGTGAAAAGCATAAACAC
AGTTAAAATGTGGGAGCAGCAGGGAGAATTCAGTTTTTATATAGATTATTAGGGCC
TGGCTTTAGATTATTGTGGTATTGGAAGATGGCGGCTATAACTGCCCCAAAAGCTG
CGTTCAGCGTCCTCCCTTCATCATCCCATTCCCCGAATCCCTTTGTGCGTTTCGCAAT
CCCATACAGCCCCCATCACTCCCAGCGCCGTTCTCTCAGAATCTCCAGCGCCCTATC
CGATGCAACCACGAAATCCTCCACCGCCGCGCTGAAGCTTTCGCCTCCCGATTGCG
GCCTCGATGAGCCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGCA
GGGCGTGACGGACGTCTTCGCCTACCCCGGAGGCGCCTCCATGGAGATCCACCAGG
CGCTCACTCGCTCATCCTCCATCCGCAACGTCCTCCCTCGCCACGAACAGGGCGGC
GTCTTCGCCGCCGAGGGCTACGCCCGCTCTTCGGCCTCCCCGGCGTCTGCATCGCC
ACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAACCTCGTCTCCGGCCTCGCCGACGCCTTGCTTGAC
AGCGTCCCCCTCGTCGCCATCACCGGCCAGGTCCCCCGCCGATGATCGGCACAGA
CGCCTTCCAAGAAACCCCCATCGTCGAGGTAACACGTTCCATCACTAAGCATAACT
ATCTCGTTCTCGATGTTGATGACATTCTAGAAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAG
CCACTTCGGGTAGACCTGGCCCTGTGTTAATTGATATACCTAAAGATATTAGCAAC
AGCTTGCGATTCTTAATTGGGATCAACCAATTAGGTTACCTGGTTACACGTCTAGGT
TGCCTAAGTCTCCTAATGAGAAACATTTGGAGCTTATTGTGAGGTTGGTTATGGAAT
CTAAGAAACCGGTTTTGTATGTTGGTGGTGGTTGTTTGAATTCTAGTGAGGAATTGC
GGCGTTTTGTGAGCTCACCGGTGTTCTGTTGCTAGCACTTTGATGGGTCTTGGTG
CTTATCCCATTGCTGATGATAATTCTCTTCAGATGCTTGGGATGCATGGGACTGTTT
ATGCTAATTATGCTGTGGATAGGGCTGATCTTTTGCTTGCGTTTGGGGTGAGGTTTG
ATGACCGTGTACCCGGGAAGCTTGAGGCTTTTGCGAGCCGGGCTAAGATTGTTTAC
ATTGATATTGATTAGCTGAGATTGGGAAGAACAAGCAGCCGCATGTGTGCGTTTG
TGCGGATTTGAAGTTGGCATTGAAGGGGATTAATCGCGTGTTAGAGAGCAGAGGGG
TTGCAGGGAAGCTTGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAACTGAATGAGCAGAAGCG
AAGGTTTCCTTTGAGTTATAAGACTTTTGAGAAAGAGATTTCTCCTCAGTATGCTAT
ACAGGTTCTTGACGAGTTAACCAATGGGGAAGCTATTGTGAGTACCGGAGTTGGAC
AGCACCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTA
ACATCCGGTGGTCTTGGTGCTATGGGGTTTGGATTGCCGGCTGCCATTGGTGCGGCT
GTGGCTAATCCCGGTGCGGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATGATG
AATGTTTACAGGAGCTGGCCACCATCAAGGTGGAGAAGCTCCCTGTTAAGATATTGTT
GTTGAATAATCAACACTTGGGTATGGTTGTTTCACTGGGAGGATCGGTTCTATAAGT
CTAACAGGGCTCACACATATCTGGGAGACCCCTCTAATGAGAATGCCATATACCCC
AATATGTTGAAGTTTGCTGATGCTTGTGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAA
AGAAGACCTTAGAGCGGCAATTCAGAAAATGCTGGAGACCCCTGGCCCCTATCTTC
TTGATGTCATTGTACCCCATCAAGAGCATGTCTTGCCCATGATTCCTAGCAATGGAA
CCTTCCAGGACGTGATAACTGAGGGTGATGGCAGGACAATGTTACTTGATTCTGA
GGCAATATTT

>1_nolu_örnek_GM15-F

GAAAGGTTACTCAATGAAAACCATAAACACACTAACAATGTGGCATCAGCACGAA
GAATTGACAATAGATATAACTATAAGGTATAATATGTGATTCCGTGATTCACTTGTT
ATTGATTTAGGTTTGGATTGGATACCTTTTGGTGCTATTTGAAAATGGCGGCAACCA
CTGCCCCAAAACCTGCGTTCACCGCCCTCCCTTCTTCATCATCATCATCTTCCCAGA
AGCCCTTTCTGCGTCTCGCCCTCCAATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCCTATCACTC
CCAACGCCCTTCTCTCAAAATCTCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAAAACCA
CCACCGCCGCGCCGCGCCGAAGATTTTGTCTCCCGATTTCGGCCTGGAGGAGCCCCGC
AAGGGCGCCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGACGTGT
TCGCCTACCCCGGTGGTGCTTCCATGGAGATCCACCAGGCACTACCCGCTCCGCCT
CCATCCGCAACGTCCTCCCCCGCCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCGAGGGC
TACGCCCGTTTCTCCGGCATCCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCC
ACCAACCTCGTCAGCGGCCTCGCCGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCTCGTCGC
CATACCGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCC
CCATCGTCGAGGTAACGCGTTCCTGTCACAAAGCATAACTATCTCCGTCCAGACGTT
GAACCTTCACTGGGGTTCCCGTTGCTAGTACTTTGAGGGGTCTTGGGGCTTATCCCA
TGGTGATGAGAATTTTCTTCAGATGCTTGGGATGCACGGGACTGTTTATGCTAATTA
TGCTGTGGACAAGGCTGATATTTTGCTTGCCTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGT
CACGGGGAAGCTCGAGGCTTTTGCGAGCCGGGCTAAGATAGTTCACATTGATATTG
ATTCGGCAGAGATTGGAAAGAACAAGCAGCCGCATGTTTCGGTTTGCGCTGATTTG
AAGCTGGCGTTGAAGGGGATTAATCACATGTTGGAGAGCAGAGGGGTGGGGGGA
AGCTTGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAGCTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCT
TTGAGCTATAAGACTTTTGAGGATGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTT
GATGAGTTGACTAATGGGGATGCTATTGTGAGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGAT
GTGGGCTGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTG
GTCTTGGTGCTATGGGGTTTGGATTGCCGGCTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATC
CGGGTGCGGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATAATGAATGTTTCAG
GAGCTGGCCACTATCAAGGTAGAGAAGCTCCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAA
TCAACACTTGGGTATGGTTGTTCACTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGG
CTCACACGTATCTGGGAGACCCCTCTAATGAGAATGCCATATTTCTTGATATGTTGA
AGTTTGCTGATGCTTGCGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTT
AGAGCGGCAATTCAGAAAATGTTGGACACCCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTCATT
GTACCCCATCAAGAGCATGTCTTGCCCATGATTCCTAGCAATGGAACCTTCCAGGA
CGTGATAACTGAGGGTGATGGCAGGACAAGTTACTGATTTCTGAGCAAATTTATC
TTATGGTTGTTTTGTAAAAAA

>2_nolu_örnek_GM15-F

GAAAGAAAAGGTTACTCAATGAAAACCATAAACACACTAACAATGTGGCATCAGC
ACGAAGAATTGACAATAGATATAACTATAAGGTATAATATGTGATTCCGTGATTCA
CTTGTTATTGATTTAGGTTTGGATTGGATACCTTTTGGTGCTATTTGAAAATGGCGG
CAACCACTGCCCCAAAACCTGCGTTCACCGCCCTCCCTTCTTCATCATCATCATCTT
CCCAGAAGCCCTTTCTGCGTCTCGCCCTCCAATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCCT
ATCACTCCCAACGCCCTTCTCTCAAAATCTCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGA
AAACCACCACCGCCGCCGCCGCCGAAGATTTTGTCTCCCGATTCCGGCCTGGAGGAG
CCCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGG
ACGTGTTTCGCTACCCCGGTGGTGCTTCCATGGAGATCCACCAGGCACTACCCGCT
CCGCCTCCATCCGCAACGTCTCTCCCCGCCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCC
GAGGGCTACGCCCGTTCTCTCCGGCATCCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCC
GGCGCCACCAACCTCGTCAGCGGCCCTCGCCGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCT
CGTCGCCATCACCGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAG
AAACCCCCATCGTCGAGGTAACGCGTTCCGTACAAAGCATAACTATCTCGTTCTA
GATGTTGATGATATTCCTAGAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGT
AGACCTGGCCCTGTGTTAATTGATATAACCAAAGATATTCAGCAACAGTTTGCGATT
CCTAATTGGGATCAACCAATTAGGTTACCTGGTTACATGTCTAGGTTGCCTAAGTCT
CCCAATGAGAATCATTTGGAGCTTATTGTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAAAAAC
CTGTTTTGTATGTTGGTGGTGGTTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGCGGCGTTTTG
TCGAGCTCACTGGTGTTCGGTTGCTAGTACTTTGAAGGGGTCTGGGGGCTTATCCC
ATTGCTGAAGAAAAATTCTCTTCAAATGCTTGGGATGCCCGGGAATGTTTTGGCTA
ATTATGCTGTGGAAGGCTGAAATTTTGCTTGCGTTTGGGGTGAGGTTTGATGACC
GTGTCACGGGGAAGCTCGAGGCTTTTGCGAGCCGGGCTAAGATAGTTCACATTGAT
ATTGATTCGGCAGAGATTGGAAGAACAAGCAGCCGCATGTTTCGGTTTGCCTGA
TTTGAAGCTGGCGTTGAAGGGGATTAATCACATGTTGGAGAGCAGAGGGGTTGGGG
GGAAGCTTGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAGCTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTT
TCCTTTGAGCTATAAGACTTTTGAGGATGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGT
TCTTGATGAGTTGACTAATGGGGATGCTATTGTGAGTACTGGAGTTGGACAGCACC
AGATGTGGGCTGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCC
GGTGGTCTTGCTGCTATGGGGTTTGATTGCCGGCTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCT
AATCCGGGTGCGGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATAATGAATGTT
CAGGAGCTGGCCACTATCAAGGTAGAGAAGCTCCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAA
TAATCAACACTTGGGTATGGTTGTTTCAGTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACA
GGGCTCACACGTATCTGGGAGACCCCTCTAATGAGAATGCCATATTTCTGATATGT
TGAAGTTTGCTGATGCTTGCGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGAC
CTTAGAGCGGCAATTCAGAAAATGTTGGACACCCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTC
ATTGTACCCCATCAAGAGCATGTCTTGCCCATGATTCTAGCAATGGAACCTTCAG
GACGTGATAACTGAGGGTGATGGCAGGACAAGTTACTGATTTCTGAGCAAATTTA
TCTTATGGTTGTTTTGTAAAAATAGTAAGGCCTA

>3_nolu_örnek_GM15-F

GGTTTACATCAATGAAAACCATAAACACACTAACAATGTGGCATCAGCACGAAGA
 ATTGACAATAGATATAACTATAAGGTATAATATGTGATTCCGTGATTCACCTTGTAT
 TGATTTAGGTTTGGATTGGATACCTTTTGGTGCTATTTGAAAATGGCGGCAACCACT
 GCCCCAAAACCTGCGTTCACCGCCCTCCCTTCTTCATCATCATCATCTTCCCAGAAG
 CCCTTTCTGCGTCTCGCCCTCCAATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCCTATCACTCCC
 AACGCCCTTCTCTCAAAATCTCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAAAACCACC
 ACCGCCGCCGCCGCCGAAGATTTTGTCTCCCGATTCCGGCCTGGAGGAGCCCCGCAA
 GGGCGCCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGACGTGTTT
 GCCTACCCCGGTGGTGCTTCCATGGAGATCCACCAGGCACTACCCGCTCCGCCTCC
 ATCCGCAACGTCTCTCCCCCGCCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCGAGGGCTA
 CGCCCGTTCTCCGGCATCCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCAC
 CAACCTCGTCAGCGGCCTCGCCGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCTCGTCGCCA
 TCACCGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAAACCCCC
 ATCGTCGAGGTAACGCGTTCCGTACAAGCATAACTATCTCGTTCTAGATGTTGATG
 AAATTCCTAGAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGACCTGGCC
 CTGTGTTAATTGATATACCCAAAGATTTTCAGCAACAGTTTGCTATCCTATTGGTTT
 TCAGATGCTTGGGATGCACGGGACTGTTTATGCTAATTATGCTGTGGACAAGGCTG
 ATATTTTGCTTGCCTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGTACGGGGAAGCTCGAG
 GCTTTTGCGAGCCGGGCTAAGATAGTTCACATTGATATTGATTCCGGCAGAGATTGG
 AAAGAACAAGCAGCCGCATGTTTCGGTTTGCCTGATTTGAAGCTGGCGTTGAAGG
 GGATTAATCACATGTTGGAGAGCAGAGGGGTTGGGGGGAAGCTTGATTTTAGAGGT
 TGGAGGGAAGAGCTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTGAGCTATAAGACTTT
 TGAGGATGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGATGAGTTGACTAATGG
 GGATGCTATTGTGAGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTT
 ACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTCTTGGTGCTATGGGG
 TTTGGATTGCCGGCTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATCCGGGTGCGGTTGTGGTT
 GACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATAATGAATGTTTCAGGAGCTGGCCACTATCAA
 GGTAGAGAAGCTCCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAATCAACACTTGGGTATGG
 TTGTTCAAGTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGCTCACACGTATCTGGGA
 GACCCCTCTAATGAGAATGCCATATTTCTTGATATGTTGAAGTTTGCTGATGCTTGC
 GGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTAGAGCGGCAATTCAGA
 AAATGTTGGACACCCCTGGCCCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTACCCCATCAAGAGC
 ATGTCTTGCCCATGATTCCTAGCAATGGAACCTTCCAGGACGTGATAACTGAGGGT
 GATGGCAGGACAAGTTACTGATTTCTGAGCAAATTTATCTTATGGTTGTTTTGTAA
 AAAATAGT

>4_nolu_örnek_GM15-F

ATGTAACATCATGAAAACCATAAACACACTAACAAATGTGGCATCAGCACGAAGAATT
GACAATAGATATAACTATAAGGTATAATATGTGATTCCGTGATTCACTTGTTATTGA
TTTAGGTTTGGATTGGATACCTTTTGGTGCTATTTGAAAATGGCGGCAACCACTGCC
CCAAAACCTGCGTTCACCGCCCTCCCTTCTTCATCATCATCATCTTCCCAGAAGCCC
TTTCTGCGTCTCGCCCTCCATTTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCCTATCACTCCCAAC
GCCCTTCTCTCAAAATCTCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAAAACCAACCACC
GCCGCCGCCGCCGAAGATTTTGTCTCCCGATTCCGGCCTGGAGGAGCCCCGCAAGGG
CGCCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGACGTGTTCCGCCT
ACCCCGGTGGTGCTTCCATGGAGATCCACCAGGCACTCACCCGCTCCGCCTCCATCC
GCAACGTCTCTCCCCCGCCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCGAGGGCTACGCC
CGTTCCTCCGGCATCCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGGCGCCACCAAC
CTCGTCAGCGGCCTCGCCGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCTCGTCGCCATCACC
GGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGAAACCCCCCATCGTC
GAGGTAACGCGTTCGGTCACAAAGCATAACTATCTCGTTCATAGATGTTGATGATATT
CCTAGAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGACCTGGCCCTGTG
TTAATTGATATACCCAAAGATATTAGCAACAGTTTTCGATTCTAATTGGGATCAA
CCAATTAGGTTACCAGGTAAATGTCTAGGTGGCCTAAGTCTCCCAATGAAAATCA
TTTGGAACCTATTGTGAGGTTGTGCTTGCCTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGCC
ACGGGGAAGCTTGAGGCTTTTGCAGCGCGGGCTAAGATAGTTCACATTGATATTGA
TTCGGCAGAGATTGGAAGAACAAGCAGCCGCATGTTTCGGTTTTCGCTGATTTGA
AGCTGGCGTTGAAGGGGATTAATCACATGTTGGAGAGCAGAGGGGTTGGGGGGAA
GCTTGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAGCTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTT
TGAGCTATAAGACTTTTGAGGATGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTG
ATGAGTTGACTAATGGGGATGCTATTGTGAGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGATG
TGGGCTGCTCAGTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTG
TCTTGGTGCTATGGGGTTTGGATTGCCGGCTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATCC
GGGTGCGGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATAATGAATGTTTCAGG
AGCTGGCCACTATCTAGGTAGAGAAGCTCCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAAT
CAACACTTGGGTATGGTTGTTTCACTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGC
TCACACGTATCTGGGAGACCCCTCTAATGAGAATGCCATATTTCTTGATATGTTGAA
GTTTGCTGATGCTTGCGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTA
GAGCGGCAATTCAGAAAATGTTGGACACCCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTCATTG
TACCCCATCAAGAGCATGTCTTGCCCATGATTCCTAGCAATGGAACCTTCCAGGAC
GTGATAACTGAGGGTGATGGCAGGACAAGTACTGATTTCTGAGCAAATTTATCT
TATGGTTGTTTGGTGTG

>6_nolu_örnek_GM15-F

AAAAAAGTTACTCAATGAAAACCATAAACACACTAACAATGTGGCATCAGCACG
AAGAATTGACAATAGATATAACTATAAGGTATAATATGTGATTCCGTGATTCACCT
GTTATTGATTTAGGTTTGGATTGGATACCTTTTGGTGCTATTTGAAAATGGCGGCAA
CCACTGCCCCAAAACCTGCGTTCACCGCCCTCCCTTCTTCATCATCATCATCTTCCC
AGAAGCCCTTTCTGCGTCTCGCCCTCCAATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCCTATC
ACTCCCAACGCCCTTCTCTCAAATCTCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAAA
ACCACCACCGCCGCCGCCGCCGAAGATTTTGTCTCCCGATTCCGGCCTGGAGGAGCC
CCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGAC
GTGTTGCGCTACCCCGGTGGTGCTTCCATGGAGATCCACCAGGCACTCACCCGCTCC
GCCTCCATCCGCAACGTCTCCCCCGCCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCGA
GGGCTACGCCCGTTCCTCCGGCATCCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGG
CGCCACCAACCTCGTCAGCGGCCTCGCCGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCTCG
TCGCCATCACCGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAA
ACCCCCATCGTCGAGGTAACGCGTTCGTCACAAAGCATAACTATCTCGTTCTAGAT
GTTGATGATATTCTAGAAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGA
CCTGGCCCTGTGGTAATTGATATAACCAAAGATATTCAGCAACAGTTTGCGATTCT
AATTGGGATCAACCAATTAGGTTACCTGGTTACATGTCTAGGTTGCCTAAGTCTCCC
AATGAGAATCATTTGGAGCTTATTGTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAAAAACCTGT
TTTGTATGTTGGTGGTGGTTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGCGGCGTTTTGTCGA
GCTCACTGGTGTTTCTGTTGCTAGTACTTTGATGGGTCTTGGTGCTTATCCCATTGCT
GATGAGAATTCTCTTCAGATGCTTGGGATGCACGGGACTGTTTATGCTAATTATGCT
GTGGACAAGGCTGATATTTTGCCTTGCCTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGTCACG
GGGAAGCTCGAGGCTTTTGCAGGCCGGGCTAAGATAGTTCACATTGATATTGATTC
GGCAGAGATTGGAAAGAACAAGCAGCCGCATGTTTCGGTTTGCCTGATTTGAAGC
TGCGCTTGAAGGGGATTAATCACATGTTGGAGAGCAGAGGGGTTGGGGGAAGCT
TGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAGCTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTGA
GCTATAAGACTTTTGAGGATGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGATG
AGTTGACTAATGGGGATGCTATTGTGAGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGG
GCTGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTCT
TGGTGCTATGGGGTTTGGATTGCCGGCTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATCCGG
GTGCGGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATAATGAATGTTTCAGGAG
CTGGCCACTATCAAGGTAGAGAAGCTCCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAATCA
ACACTTGGGTATGGTTGTTCACTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGCTC
ACACGTATCTGGGAGACCCCTCTAATGAGAATGCCATATTTCTTGATATGTTGAAGT
TTGCTGATGCTTGCGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTAGA
GCGGCAATTCAGAAAATGTTGGACACCCCTGGCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTA
CCCCATCAAGAGCATGTCTTGCCCATGATTCCTAGCAATGGAACCTTCCAGGACGT
GATAACTGAGGGTGATGGCAGGACAAGTTACTGA

>7_nolu_örnek_GM15-F

CAGCAAGGTTACTCAATGAAAACCATAAACACACTAACAATGTGGCATCAGCACG
AAGAATTGACAATAGATATAACTATAAGGTATAATATGTGATTCCGTGATTCACCT
GTTATTGATTTAGGTTTGGATTGGATACCTTTTGGTGCTATTTGAAAATGGCGGCAA
CCACTGCCCCAAAACCTGCGTTCACCGCCCTCCCTTCTTCATCATCATCATCTTCCC
AGAAGCCCTTTCTGCGTCTCGCCCTCCAATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCTATC
ACTCCCAACGCCCTTCTCTCAAATCTCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAAA
ACCACCACCGCCGCCGCCGCCGAAGATTTTGTCTCCCGATTCCGGCCTGGAGGAGCC
CCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGAC
GTGTTGCGCTACCCCGGTGGTGCTTCCATGGAGATCCACCAGGCACTCACCCGCTCC
GCCTCCATCCGCAACGTCTCCCCCGCCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCGA
GGGCTACGCCCGTTCCTCCGGCATCCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCGG
CGCCACCAACCTCGTCAGCGGCCTCGCCGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCTCG
TCGCCATCACCGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGAA
ACCCCCATCGTCGAGGTAACGCGTTCCGTCACAAAGCATAACTATCTCGTTCTAGAT
GTTGATGATATTCTAGAAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTAGA
CCTGGCCCTGTGTTAATTGATATAACCAAAGATATTCAGCAACAGTTTGCGATTCTC
AATTGGGATCAACCAATTAGGTTACCTGGTTACATGTCTAGGTTGCCTAAGTCTCCC
AATGAGAATCATTTGGAGCTTATTGTGAGGTTGGTTATGGAATCTAAGAAACCTGT
TTTGTATGTTGGTGGGGGTTGTTTGAATTCAAGTGAAGAATTGCGGGCGTTTTGTGCG
AGCTCACTGGTGTTCTGTGCTAGTACTTTGATGGGTCTTGGTGCTTATCCCATTGC
TGATGAGAATTCTCTTCAGATGCTTGGGATGCACGGGACTGTTTATGCTAATTATGC
TGTGGACAAGGCTGATATTTTGCTTGCGTTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGTAC
GGGAAGCTCGAGGCTTTTGCGAGCCGGGCTAAGATAGTTCACATTGATATTGATT
CGGCAGAGATTGGAAGAACAAGCAGCCGCATGTTTCGGTTTGCCTGATTTGAAG
CTGGCGTTGAAGGGGATTAATCACATGTTGGAGAGCAGAGGGGTTGGGGGAAGC
TTGATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAGCTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTG
AGCTATAAGACTTTTGAGGATGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGAT
GAGTTGACTAATGGGGATGCTATTGTGAGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGATGTG
GGCTGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTC
TTGGTGCTATGGGGTTTGGATTGCCGGCTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATCCGG
GTGCGGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATAATGAATGTTTCAGGAG
CTGGCCACTATCAAGGTAGAGAAGCTCCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAATCA
ACACTTGGGTATGGTTGTTCACTGGGAGGATCGGTTCTATAAGTCTAACAGGGCTC
ACACGTATCTGGGAGACCCCTCTAATGAGAATGCCATATTCCTGATATGTTGAAGT
TTGCTGATGCTTGCGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTAGA
GCGGCAATTCAGAAAATGTTGGACACCCCTGGCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTA
CCCCATCAAGAGCATGTCTTGCCCATGATTCCTAGCAATGGAACCTTCCAGGACGT
GATAACTGAGGGTGATGGCAGGACAAGTTACTGATTTCTGAGCAAATTTATCTTA
TGGTTGTTTTGTAAAAATAGTATGGCCAAT

>8_nolu_örnek_GM15-F

AAAAAAAAAGGTTACTCAATGAAAACCATAAACACACTAACAATGTGGCATCAGCA
CGAAGAATTGACAATAGATATAACTATAAGGTATAATATGTGATTCCGTGATTCAC
TTGTTATTGATTTAGGTTTGGATTGGATACCTTTTGGTGCTATTTGAAAATGGCGGC
AACCACTGCCCCAAAACCTGCGTTACACGCCCTCCCTTCTTCATCATCATCATCTTC
CCAGAAGCCCTTTCTGCGTCTCGCCCTCCAATTTCCCTCCCTCCCAAACAGTTCCTA
TCACTCCCAACGCCCTTCTCTCAAAATCTCCAGCGCCCTCTCCGATGCAACCGCGAA
AACCACCACCGCCGCCGCCGCCGAAGATTTTGTCTCCCGATTCCGGCCTGGAGGAGC
CCCGCAAGGGCGCCGACATCCTCGTGAGGCGCTGGAGCGGCAGGGCGTGACGGA
CGTGTTGCTTACCCCGGTGGTGCTTCCATGGAGATCCACCAGGCACTACCCGCTC
CGCCTCCATCCGCAACGTCCTCCCCCGCCACGAGCAGGGTGGCGTCTTCGCCGCCG
AGGGCTACGCCCGTTCTCCGGCATCCCCGGCGTCTGCATCGCCACCTCCGGCCCCG
GCGCCACCAACCTCGTCAGCGGCCTCGCCGACGCCATGCTCGACAGCGTCCCCCTC
GTCGCCATCACCGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAAGA
AACCCCATCGTCGAGGTAACGCGTTCGGTCACAAAGCATAACTATCTCGTTCTAG
ATGTTGATGATATTCCTAGAATCGTTAATGAAGCGTTTTTCTTAGCCACTTCGGGTA
GACCTGGCCCTGTGTTAATTGATATACCCAAAGATATTCAGCAACAGTTTGCGATT
CTAATTGGGATCAACCAATTAGGTTACCTGGGTACATGTCTAGGGTGCCTAAGTCTC
CCAATGAGAATCATTTGGAGCTTATTGGGAGGTGGGTTTTGGAATCTAAGAAACCT
TTTTGTAGGTGGTGGGGTTGTTTGAATTCTAGTAGGAATTCGGCGTTTTGTGAGC
TCACTGGTGTTCCTGTGCTAGTACTTTGATGGGTCTTGGTGCTTATCCCATTGCTGAT
GAGAATTCTCTTCAGATGCTTGGGATGCACGGGACTGTTTATGCTAATTATGCTGTG
GACAAGGCTGATCTTTTGCTTGCCTTGGGGTGAGGTTTGATGACCGTGTACGGG
GAAGCTCGAGGCTTTTGCGAGCCGGGCTAAGATAGTTCACATTGATATTGATTCGG
CAGAGATTGGAAGAACAAGCAGCCGCATGTTTCGGTTTGCCTGATTTGAAGCTG
GCGTTGAAGGGGATTAATCACATGTTGGAGAGCAGAGGGGTGGGGGAAGCTTG
ATTTTAGAGGTTGGAGGGAAGAGCTGAATGAGCAGAAGCGAAGGTTTCCTTTGAGC
TATAAGACTTTTGAGGATGAGATTTCTCCTCAGTATGCTATACAGGTTCTTGATGAG
TTGACTAATGGGGATGCTATTGTGAGTACTGGAGTTGGACAGCACCAGATGTGGGC
TGCTCAGTTTTACAAGTACAAGAGGCCTAGGCAGTGGTTAACATCCGGTGGTCTTG
GTGCTATGGGGTTTGGATTGCCGGCTGCCATCGGTGCGGCTGTGGCTAATCCGGGT
GCGGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTTATAATGAATGTTACAGGAGCT
GGCCACTATCAAGGTAGAGAAGCTCCCGGTTAAGATATTGTTGTTGAATAATCAAC
ACGTATCTGGGAGACCCCTCTAATGAGAATGCCATATTTCTGATATGTTGAAGTTT
GCTGATGCTTGCGGGATACCGGCAGCTCGTGTGACCAAGAAAGAAGACCTTAGAGC
GGCAATTCAGAAAATGTTGGACACCCCTGGCCCCTATCTTCTTGATGTCATTGTACC
CCATCAAGAGCATGTCTTGCCCATGATTCCTAGCAATGGAACCTTCAGGACGTGA
TAACTGAGGGTGATGGCAGGACAAGTTACTGATTTCTGAGCAAATTTATCTTATG
GTTGTTTTGTAAAAATAGTAAGGCCTAA

>NM_114714.3 *Arabidopsis thaliana* AHAS Gen Bölgesi Sekans Dizisi

CAATCACAAATACAATAGATAGACTAGAGATTCCAGCGTCACGTGAGTTTTATCTA
 TAAATAAAGGACCAAAAATCAAATCCCGAGGGCATTTCGTAATCCAACATAAAAC
 CCTTAAACTTCAAGTCTCATTCTTAAACAAATCATGTTACAAGTCTCTTCTTCTCT
 CTGTTTCTCTATCTCTTGCTCATCTTTCTCCTGAACCATGGCGGCGGCAACAACAAC
 AACAACAACATCTTCTTCGATCTCCTTCTCCACCAAACCATCTCCTTCTCCTCCTCAA
 ATCACCATTACCAATCTCCAGATTCTCCCTCCCATTCTCCCTAAACCCCAACAATC
 ATCCTCCTCCTCCCGCCGCCGCGGTATCAAATCCAGCTCTCCCTCCTCCATCTCCGC
 CGTGCTCAACACAACCACCAATGTCACAACCACTCCCTCTCCAACCAAACCTACCA
 AACCCGAAACATTCATCTCCCGATTGCTCCAGATCAACCCCGCAAAGGCGCTGAT
 ATCCTCGTCGAAGCTTTAGAACGTCAAGGCGTAGAAACCGTATTCGCTTACCCTGG
 AGGTGCATCAATGGAGATTACCAAGCCTTAACCCGCTCTTCTCAATCCGTAACGT
 CCTTCTCGTCACGAACAAGGAGGTGTATTGCGAGCAGAAGGATACGCTCGATCCT
 CAGGTAAACCAGGTATCTGTATAGCCACTTCAGGTCCCGGAGCTACAAATCTCGTT
 AGCGGATTAGCCGATGCGTTGTTAGATAGTGTTCCTCTTGTAGCAATCACAGGACA
 AGTCCCTCGTCGTATGATTGGTACAGATGCGTTTCAAGAGACTCCGATTGTTGAGGT
 AACGCGTTGATTACGAAGCATAACTATCTTGTGATGGATGTTGAAGATATCCCTA
 GGATTATTGAGGAAGCTTTCTTTTCTAGCTACTTCTGGTAGACCTGGACCTGTTTGG
 TTGATGTTCTAAAGATATTCAACAACAGCTTGCGATTCTTAATTGGGAACAGGCT
 ATGAGATTACCTGGTTATATGTCTAGGATGCCTAAACCTCCGGAAGATTCTCATTTG
 GAGCAGATTGTTAGGTTGATTTCTGAGTCTAAGAAGCCTGTGTTGTATGTTGGTGGT
 GGTGTTTGAATTCTAGCGATGAATTGGGTAGGTTTGTGAGCTTACGGGGATCCCT
 GTTGGGAGTACGTTGATGGGGCTGGGATCTTATCCTTGTGATGATGAGTTGTCGTTA
 CATATGCTTGAATGCATGGGACTGTGTATGCAAATTACGCTGTGGAGCATAGTGA
 TTTGTTGTTGGCGTTTGGGGTAAGGTTTGTATGATCGTGTACGGGTAAGCTTGAGGC
 TTTTGCTAGTAGGGCTAAGATTGTTTATATTGATATTGACTCGGCTGAGATTGGGAA
 GAATAAGACTCCTCATGTGTCTGTGTGTGGTGTGTTAAGCTGGCTTTGCAAGGGAT
 GAATAAGGTTCTTGAGAACCGAGCGGAGGAGCTTAAGCTTGATTTTGGAGTTTGA
 GGAATGAGTTGAACGTACAGAAACAGAAGTTTCCGTTGAGCTTTAAGACGTTTGGG
 GAAGCTATTCCTCCACAGTATGCGATTAAGGTCCTTGATGAGTTGACTGATGGAAA
 AGCCATAATAAGTACTGGTGTGCGGGCAACATCAAATGTGGGCGGCGCAGTTCTACA
 ATTACAAGAAACCAAGGCAGTGGCTATCATCAGGAGGCCTTGAGCTATGGGATTT
 GGAATTCCTGCTGCGATTGGAGCGTCTGTTGCTAACCTGATGCGATAGTTGTGGAT
 ATTGACGGAGATGGAAGCTTTATAATGAATGTGCAAGAGCTAGCCACTATTCGTGT
 AGAGAATCTTCCAGTGAAGGTACTTTTATTAACAACCAAGCATCTTGGCATGGTTAT
 GCAATGGGAAGATCGGTTCTACAAAGCTAACCGAGCTCACACATTTCTCGGGGATC
 CGGCTCAGGAGGACGAGATATTCCCGAACATGTTGCTGTTTGCAGCAGCTTGCGGG
 ATTCCAGCGGCGAGGGTGACAAAGAAAGCAGATCTCCGAGAAGCTATTCAGACAA
 TGCTGGATACACCAGGACCTTACCTGTTGGATGTGATTTGTCCGCACCAAGAACAT
 GTGTTGCCGATGATCCCGAGTGGTGGCACTTTCAACGATGTCATAACGGAAGGAGA
 TGGCCGGATTAAATACTGAGAGATGAAACCGGTGATTATCAGAACCTTTTATGGTC
 TTTGTATGCATATGGTAAAAAACTTAGTTTGCAATTTCTGTTTGTGTTTGGTAATTT
 GAGTTTCTTTTAGTTGTTGATCTGCCTGCTTTTTGGTTTACGTCAGACTACTACTGCT
 GTTGTGTTTGGTTTCTTTCTTTTCAATTTATAAATAAATAATCCGGTTCGGTTTACT
 CCTTGTGACTGGCTCAGTTTGGTTATTGCGAAATGC

GmAHAS-1 primeri ile çoğaltılan AHAS gen bölgesinin protein dizilimi

>1_nolu_örnek_GmAHAS1

HPTFPKRITRSTLPLSHQTLTKPNHALKIKCSISKPPTAAPFTKEAPTTEPFVSRFA
 SGEPRKGADILVEALERQGVTTVFAYPGGASMEIHQALTRSAAIRNVLP RHEQG
 GVFAAEGSVRSSGLPGDCIATSGPGATNLVSGLADALMDSVPVVAITGQVSRR
 MIGTDAFQETPIVEVSRSTKHNYLILDVDDIPRVVAEAFVATSGRPGPVLIDIP
 KDVQQQLAVPNWDEPVNLPGYLARLP RPPEAEQLEHIVRLIMEAQKPVLVYVGG
 GSLNSSAELRRFVELTGIPVASTLMGLGTFPIGDEYSLQMLGMHGT VYANYAV
 DNSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQAHVSVCADL
 KLALKGINMILEEKGVEGKFDLGGWREEINVQKHKFPLGYKTFQDAISPQHAIE
 VLDEL TNGDAIVSTGVGQHQMWA AQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFGLPAA
 IGA AVANPGAVVVDIDGDSFIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQ
 WEDRFYKSNRAHTYLGDPSSSEIFPNMLKFADACVIP AARVMKKEELRAAIQR
 MLDTPGPYLLDVIVPHHEHVLPMIPSNGSFKDVITEGDGRTRY

>2_nolu_örnek_GmAHAS1-F

HPTFPKRITRSTLPLSHQTLTKPNHALKIKCSISKPPTAAPFTKEAPTTEPFVSRFA
 SGEPRKGADILVEALERQGVTTVFAYPGGASMEIHQALTRSAAIRNVLP RHEQG
 GVFAAEGSVRSSGLPGDCIATSGPGATNLVSGLADALMDSVPVVAITGQVSRR
 MIGTDAFQETPIVEVSRSTKHNYLILDVDDIPRVVAEAFVATSGRPGPVLIDIP
 KDVQQQLAVPNWDEPVNLPGYLARLP RPPEAEQLEHIVRLIMEAQKPVLVYVGG
 GSLNSSAELRRFVELTGIPVASTLMGLGTFPIGDEYSLQMLGMHGT VYANYAV
 DNSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQAHVSVCADL
 KLALKGINMILEEKGVEGKFDLGGWREEINVQKHKFPLGYKTFQDAISPQHAIE
 VLDEL TNGDAIVSTGVGQHQMWA AQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFGLPAA
 IGA AVANPGAVVVDIDGDSFIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQ
 WEDRFYKSNRAHTYLGDPSSSEIFPNMLKFADACGIP AARVMKKEELRAAIQR
 MLDTPGPYLLDVIVPHHEHVLPMIPSNGSFKDVITEGDGRTRY

>3_nolu_örnek_GmAHAS1-F

HPTFPKRITRSTLPLSHQTLTKPNHALKIKCSISKPPTAAPFTKEAPTTEPFVSRFA
 SGEPRKGADILVEALERQGVTTVFAYPGGASMEIHQALTRSAAIRNVLP RHEQG
 GVFAAEGYARSSGLPGVCIATSGPGATNLVSGLADALMDSVPVVAITGQVSRR
 MIGTDAFQETPIVEVSRSTKHNYLILDVDDIPRVVAEAFVATSGRPGPVLIDIP
 KDVQQQLAVPNWDEPVNLPGYLARLPRPPAEAQLAHIVRLIMEAQKPVLYVGG
 GSLNSSAELRRFVELTGIPVASTLMGLGTFPIGDEYSLQMLGMHGT VYANYAV
 DNSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQAHVSVCADL
 KLALKGINMILEEKGVGKFDLGGWREEINVQKHKFPLGYKTFQDAISPQHAIE
 VLDEL TNGDAIVSTGVGQHQMWAQAQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFLPAA
 IGA AVANPGAVVVDIDGDSFIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQ
 WEDRFYKSNRAHTYLGDPSSSESEIFPNMLKFADACGIPAARVTKKEELRAAIQR
 MLDTPGPYLLDVIVPHQEHLVPMIPSNGSFKDVITEGDGRTRY

>4_nolu_örnek_GmAHAS1-F

HPTFPKRITRSTLPLSHQTLTKPNHALKIKCSISKPPTAAPFTKEAPTTEPFVSRFA
 SGEPRKGADILVEALERQGVTTVFAYPGGASMEIHQALTRSAAIRNVLP RHEQG
 GVFAAEGSVRSSGLPGDCIATSGPGATNLVSGLADALMDSVPVVAITGQVSRR
 MIGTDAFQETPIVEVSRSTKHNYLILDVDDIPRVVAEAFVATSGRPGPVLIDIP
 KDVQQQLAVPNWDEPVNLPGYLARLPRPPAEAQLAHIVRLIMEAQKPVLYVGG
 GSLNSSAELRRFVELTGIPVASTLMGLGTFPIGDEYSLQMLGMHGT VYANYAV
 DNSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQAHVSVCADL
 KLALKGINMILEEKGVGKFDLGGWREEINVQKHKFPLGYKTFQDAISPQHAIE
 VLDEL TNGDAIVSTGVGQHQMWAQAQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFLPAA
 IGA AVANPGAVVVDIDGDSFIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQ
 WEDRFYKSNRAHTYLGDPSSSESEIFPNMLKFADACGIPAARVMKKEELRAAIQR
 MLDTPGPYLLDVIVPHHEHLVPMIPSNGSFKDVITEGDGRTRY

>6_nolu_örnek_GmAHAS1-F

HPTFPKRITRSTLPLSHQTLTKPNHALKIKCSISKPPTAAPFTKEAPTTEPFVSRFA
 SGEPRKGADILVEALERQGVTTVFAYPGGASMEIHQALTRSAAIRNVLP RHEQG
 GVFAAEGSVRSSGLPGDCIATSGPGATNLVSGLADALMDSVPVVAITGQVSRR
 MIGTDAFQETPIVEVSRSTKHNYLILDVDDIPRVVAEAFVATSGRPGPVLIDIP
 KDVQQQLAVPNWDEPVNLPGYLARLPRPPAEAQLAHIVRLIMEAQKPVLYVGG
 GSLNSSAELRRFVELTGIPVASTLMGLGTFPIGDEYSLQMLGMHGT VYANYAV
 DNSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQAHVSVCADL
 KLALKGINMILEEKGVGKFDLGGWREEINVQKHKFPLGYKTFQDAISPQHAIE
 VLDEL TNGDAIVSTGVGQHQMWAQAQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFLPAA
 IGA AVANPGAVVVDIDGDSFIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQ
 WEDRFYKSNRAHTYLGDPSSSESEIFPNMLKFADACVIPAARVMKKEELRAAIQR
 MLDTPGPYLLDVIVPHHEHLVPMIPSNGSFKDVITEGDGRTRY

>7_nolu_örnek_GmAHAS1-F

HPTFPKRITRSTLPLSHQTLTKPNHALKIKCSISKPPTAAPFTKEAPTTEPFVSRFA
SGEPRKGADILVEALERQGVTTVFAYPGGASMEIHQALTRSAAIRNVLP RHEQG
GVFAAEGYARSSGLPGVCIATSGPGATNLVSGLADALMDSVPVVAITGQVPRR
MIGTDAFQETPIVEVSRSTKHNYLILDVDDIPRVVAEAFVATSGRPGPVLIDIP
KDVQQQLAVPNWDEPVNLPGYLARLPRPPAEAQLEHIVRLIMEAQKPVLVYVGG
GSLNSSAELRRFVELTGIPVASTLMGLGTFFIGDEYSLQMLGMHGT VYANYAV
DNSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQAHVSVCADL
KLALKGINMILEEKGVGKFDLGGWREEINVQKHKFPLGYKTFQDAISPQHAIE
VLDEL TNGDAIVSTGVGQHQMWA AQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFGLPAA
IGA AVANPGAVVVDIDGDGSFIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQ
WEDRFYKSNRAHTYLGDPSSSESEIFPNMLKFADACGIPAARVTKKEELRAAIQR
MLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLP MIPSNGSFKDVITEGDGRTRY

>8_nolu_örnek_GmAHAS1-F

HPTFPKRITRSTLPLSHQTLTKPNHALKIKCSISKPPTAAPFTKEAPTTEPFVSRFA
SGEPRKGADILVEALERQGVTTVFAYPGGASMEIHQALTRSAAIRNVLP RHEQG
GVFAAEGYARSSGLPGVCIATSGPGATNLVSGLADALMDSVPVVAITGQVPRR
MIGTDAFQETPIVEVSRSTKHNYLILDVDDIPRVVAEAFVATSGRPGPVLIDIP
KDVQQQLAVPNWDEPVNLPGYLARLPRPPAEAQLEHIVRLIMEAQKPVLVYVGG
GSLNSSAELRRFVELTGIPVASTLMGLGTFFIGDEYSLQMLGMHGT VYANYAV
DNSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQAHVSVCADL
KLALKGINMILEEKGVGKFDLGGWREEINVQKHKFPLGYKTFQDAISPQHAIE
VLDEL TNGDAIVSTGVGQHQMWA AQFYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFGLPAA
IGA AVANPGAVVVDIDGDGSFIMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQ
WEDRFYKSNRAHTYLGDPSSSESEIFPNMLKFADACGIPAARVTKKEELRAAIQR
MLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLP MIPSNGSFKDVITEGDGRTRY

>AGL09058.1 Ghio Herbisit Dayanıklı Soya Protein Sekansı (KC254821.1)

MAATASRTTRFSSSSSHPTFPKRITRSTLPLSHQTLTKPNHALKIKCSISKPPTAAP
 FTKEAPTTEPFVSRFASGEPRKGADILVEALERQGVTTVFAYPPGGASMEIHQAL
 TRSAAIRNVLP RHEQGGVFAAEGYARSSGLPGVCIATSGPGATNLVSGLADAL
 MDSVPVVAITGQVSRMIGTDAFQETPIVEVSRITKHNYLILDVDDIPRVVAEA
 FFVATSGRPGPVLIDIPKDVQQQLAVPNWDEPVNLPGYLARLPRPPAEAQLEHI
 VRLIMEAQKPVLVYVGGSLSNSSAELRRFVELTGIPVASTLMGLGTFPIGDEYSLQ
 MLGMHGT VYANYAVDNSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAE
 IGKNKQAHVSVCADLKLALKGINMILEEKGVGKFDLGGWREEINVQKHKFPL
 GYKTFQDAISPQHAIEVLDEL TNGDAIVSTGVGQHQMWAQAQFYKYKRPRQWL
 TSGGLGAMGFLPAAIGA AVANPGAVVVDIDGDGSFIMNVQELATIRVENLPV
 KILLNNQHLGMVVQWEDRFYKSNRAHTYLGDPSSESEIFPNMLKFADACGIP
 AARVTKKEELRAAIQRMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLP MIPSNNGSFKDVITEGD
 GRTRY

>AGL09062.1 Ghio Herbisit Hassas Soya Protein Sekansı

MAATASRTTRFSSSSSHPTFPKRITRSTLPLSHQTLTKPNHALKIKCSISKPPTAAP
 FTKEAPTTEPFVSRFASGEPRKGADILVEALERQGVTTVFAYPPGGASMEIHQAL
 TRSAAIRNVLP RHEQGGVFAAEGYARSSGLPGVCIATSGPGATNLVSGLADAL
 MDSVPVVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVSRITKHNYLILDVDDIPRVVAEA
 FFVATSGRPGPVLIDIPKDVQQQLAVPNWDEPVNLPGYLARLPRPPAEAQLEHI
 VRLIMEAQKPVLVYVGGSLSNSSAELRRFVELTGIPVASTLMGLGTFPIGDEYSLQ
 MLGMHGT VYANYAVDNSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAE
 IGKNKQAHVSVCADLKLALKGINMILEEKGVGKFDLGGWREEINVQKHKFPL
 GYKTFQDAISPQHAIEVLDEL TNGDAIVSTGVGQHQMWAQAQFYKYKRPRQWL
 TSGGLGAMGFLPAAIGA AVANPGAVVVDIDGDGSFIMNVQELATIRVENLPV
 KILLNNQHLGMVVQWEDRFYKSNRAHTYLGDPSSESEIFPNMLKFADACGIP
 AARVTKKEELRAAIQRMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLP MIPSNNGSFKDVITEGD
 GRTRY

>NP_190425.1 *Arabidopsis thaliana* AHAS Gen Bölgesi Protein Sekansı

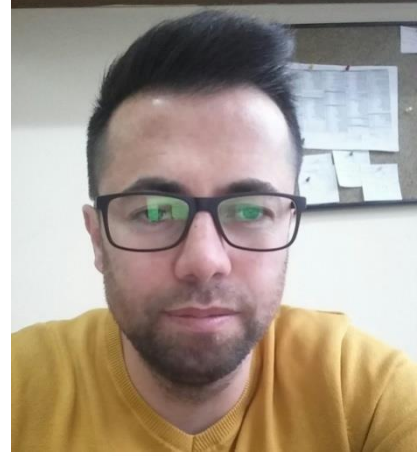
MAAATTTTTTSSSISFSTKPSPPSSSKSPLPISRFSLPFSLNPNKSSSSSRRRGIKSSSP
SSISAVLNTTTNVTTPSPTKPTKPETFISRFPDQPRKGADILVEALERQGVETV
FAYPGGASMEIHQALTRSSSIRNVLPREHQQGGVFAAEGYARSSGKPGICIATSGP
GATNLVSGLADALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYL
VMDVEDIPRIIEEAFFLATSGRPGPVLVDVPKDIQQQLAIPNWEQAMRLPGYMS
RMPKPPEDSHLEQIVRLISESKKPVLYVGGGCLNSSDELGRFVELTGIPVASTLM
GLGSYPCDDELSLHMLGMHGTVYANYAVEHSDLLAFGVRFDDRVTGKLEAF
ASRAKIVHIDIDSAEIGKNKTPHVSVC GDVKLALQGMNKVLENRAEELKLDFG
VWRNELNVQKQKFPLSFKTFGEAIPPQYAIKVLDELTDGKAIISTGVGQHQM
AAQFYNKYKKPRQWLSSGGLGAMGFLPAAIGASVANPDIVVDIDGDGSFIMN
VQELATIRVENLPVKVLLLNQHLGMVMQWEDRFYKANRAHTFLGDPAQEDE
IFPNMLLFAAACGIPAARVTKKADLREAIQTMLDTPGPYLLDVICPHQEHVLP
MI
PSGGTFNDVITEGDGRIKY



ÖZGEÇMİŞ

RÜSTEM ÜSTÜN

rustemustun@hotmail.com
rustemustun@akdeniz.edu.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2014-devam	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2011-2014	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2004-2009	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ziraat mühendisliği Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2013- devam	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya
------------------------------------	--

ESERLER**SCI, SSCI, AHCI indexlerine giren dergilerde yayınlanan makaleler**

- Üstün, R., Çat, A., Çatal, M. and Uzun, B. 2018. First report of *Fusarium proliferatum* causing seed rot on soybean (*Glycine max*) in Turkey. *Journal of biotechnology*, 28-29.
- Üstün, R. and Uzun, B. 2017. Breeding for introgression of FAD2-1A and FAD2-1B genes to local soybean cultivars of Turkey. *Journal of Biotechnology*. 103.
- Üstün, R., Yol, E., İkten, C., Çatal, M. and Uzun, B. 2017. Screening, selection and real-time qPCR validation for phytoplasma resistance in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Euphytica*, 213: 159.
- Yol, E., Üstün, R., Gölükçü, M. and Uzun, B. 2017. Oil Content, Oil Yield and Fatty Acid Profile of Groundnut Germplasm in Mediterranean Climates *Journal Of The American Oil Chemists Society*, 94; 787-804.
- İkten, C., Üstün, R., Çatal, M., Yol, E. and Uzun B. 2016. Multiplex Real-Time qPCR Assay for Simultaneous and Sensitive Detection of Phytoplasmas in Sesame Plants and Insect Vectors. *Plos One*, 11.
- İkten, C., Çatal, M., Yol, E., Üstün, R., Furat, S., Toker C., vd. 2014. Molecular identification, characterization and transmission of phytoplasmas associated with sesame phyllody in Turkey. *European Journal Of Plant Pathology*, 139; 217-229.
- Güden, B., Erdurmuş, C., Yol, E., Üstün, R., İkten, C., Akar T., vd. 2014. Evaluation of a sorghum germplasm for plant height characteristic by using molecular markers. *Journal of Biotechnology*, 185; 30.
- Çatal, M., İkten, C., Yol, E., Üstün, R. and Uzun, B. 2013. First Report of a 16SrIX Group (Pigeon Pea Witches'-Broom) Phytoplasma Associated with Sesame Phyllody in Turkey. *Plant Disease*, 97; 835-836.
- İkten, C., Yol, E., Çatal, M., Üstün, R. and Uzun B. 2013. Molecular diagnosis of peanut witches'-broom group (16SrII) phytoplasma infecting sesame in Turkey. *Current Opinion in Biotechnology*, 24;39-40.
- İkten, C., Üstün, R., Çatal, M., Yol, E. and Uzun B. 2013. Sensitive detection of sesame phytoplasmas of 16SrII and 16SrIX groups in its plant and insect host using real-time PCR. *Current Opinion in Biotechnology* 24; 40.

Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

- Yol, E., Üstün, R., Güden, B., Güçlü, V., Başak, M., Kızıl, S., vd. Batı akdeniz iklim kuşağında Yürütülen yağ bitkileri ıslah çalışmaları ve yeni perspektifler", Bitki Islahı ve Genetiği Öğrenci kongresi, Niğde, Türkiye, 2-3 Mayıs 2019, ss.11.

- Üstün, R., Çat, A., Çatal, M., Uzun, B., "Identification and Characterization of *Cladosporium cladosporioides* on Soybean Seed", World Oil Seed Congress, Lviv, Ukrayna, 6-7 Kasım 2019, pp.19.
- Uzun, B., Yol, E., Üstün, R., Güden, B., "Yağ Bitkilerinde Yüksek oleik Asit içeriğine sahip yeni çeşitlerin Geliştirilmesi ve Bitkisel yağ sanayisine Etkileri", YABİTED IV Ulusal yağ bitkileri kongresi, İstanbul, Türkiye, 18-19 Nisan 2019, pp. 10.
- Uzun, B., Yol, E., Üstün, R., Güden, B., "Integration of Molecular Tools to Oil and Energy Crops Breeding: Case Studies in Groundnut, Sesame, Soybean and Sweet Sorghum", International Congress On Oil And Protein Crops, kişinev, Moldova, 20-24 Mayıs 2018, pp. 94.
- Uzun, B., Yol ,E., Üstün, R., Güden, B., "Yağ ve Enerji Bitkilerinde Moleküler Bitki Islahı ve Uygulamaları", Bitki Islahı ve Genetiği Öğrenci kongresi, Niğde, Türkiye, 25-26 Nisan 2018, pp. 13.
- Uzun, B., Yol, E., Üstün, R., İkten, C., Çatal, M., "Susamda phyllody fitoplazmalarına dayanıklı hat seleksiyonu ve real time qPCR validasyonu", 12.Tarla Bitkileri Kongresi,, Kahramanmaraş, Türkiye, 12-15 Eylül 2017, pp. 429.
- Uzun, B., Yol, E., Üstün, R., İkten, C., "Breeding pipeline for resistance to phyllody phytoplasmas in sesame", 20th EUCARPIA General Congress, Zürih, İsviçre, 29 Ağustos - 1 Eylül 2016, pp.70.
- Üstün, R., Yol, E., Toker, R., Gölükçü ,M., Uzun B., "Variability in groundnut for oil content and fatty acid composition", Eucarpia International Symposium on Protein Crops - V Meeting AEL, Pontevedra, İspanya, 4-7 Mayıs 2015, pp.175.
- Polat, M., Üstün, R., Güden, B., Yol, E., Uzun, B., "Identification of chlorophyll content in soybean (*Glycine max* (L.) merrill) by using soil plant analytical development (Spad)-502 meter", II. International Plant Breeding Congress and EUCARPIA – Oil And Protein Crops Section Conference, Antalya, Türkiye, 1-6 Kasım 2015, pp.220.
- Uzun, B., Yol, E., Üstün, R., İkten, C., Çata,l M., Toker, C., vd. Screening, testing and molecular diagnosis for resistance against phyllody disease in sesame.", EUCARPIA Genetic Resources section meeting, Alpnar, İsveç, 10-13 Haziran 2013, pp.82-82

Uzun, B., İkten, C., Çatal, M., Üstün, R., Furat, S., Yol, E., "Advances in molecular diagnosis of the sesame phytoplasmas and resistance to sesame phyllody.", COST action FA0807 final meeting, lizbon, Portekiz, 30 Eylül - 1 Ekim 2013, pp.59.

Uzun, B., Yol, E., Furat, S., Üstün, R., Toker, R., Gölükçü, M., "Assessment Of Oil Content And Fatty Acid Composition Of The Sesame Core Collection", Plant Breeding for Future Generations", EUCARPIA 19th General Congress, Budapeşte, Macaristan, 21-24 Mayıs 2012, pp.274.

