



## Asetolaktat sentetaz (ALS) İnhibitörü Herbisitlere *Galium aparine* L. (Dilkanatan) Dayanıklılığı

Emine KAYA ALTOP<sup>1\*</sup> Hüsrev MENNAN<sup>1</sup> Doğan ISIK<sup>2</sup> Kianoosh HAGHNAMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Samsun Türkiye

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Kayseri Türkiye

\*e-mail: kayae@omu.edu.tr

Alındığı tarih (Received): 15.11.2016

Kabul tarihi (Accepted): 31.10.2017

Online Baskı tarihi (Printed Online): 18.11.2017

Yazılı baskı tarihi (Printed): 29.12.2017

**Öz:** 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*'dir. Türün mücadelesinde yoğun olarak kullanılan ALS (Acetolactate synthase) inhibitörü herbisitlere karşı etkisizlik durumunun olduğuna dair gözlemler ve çiftçi şikayetleri doğrultusunda, buğday alanlarında *G. aparine*'ye ruhsatlı ALS inhibitörü herbisitlerden özellikle sulfonyleurea grubu aktif maddeler ile çalışılmıştır. Bu amaçla Türkiye'de bu yabancı otun sorun olduğu İç Anadolu ve Orta Karadeniz Bölgesi buğday ekim alanlarından toplam 1359 populasyonun dayanıklı biyotipleri ve dayanıklılık dereceleri bioassay ve moleküler yöntemlerle belirlenmiştir. Yirmi üç *G. aparine* populasyonunun ALS inhibitörü herbisitlerle kontrol edilemediği saptanmıştır. Ancak herhangi bir mutasyon varlığı belirlenmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** ALS inhibitörü herbisitler, bioassay, dayanıklılık, *Galium aparine*, mutasyon

## Resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibitors herbicides of *Galium aparine* L. (Catchweed bedstraw)

**Abstract:** Due to intensive herbicide use in wheat growing areas in Turkey is resistance problems in some important weed species such as *Galium aparine* is annual and very competitive troublesome broadleaved weeds. There are some observations concerning the efficacy failures of some ALS inhibitor herbicides and we received complained from wheat growers that this species control was reduced when most of the sulfonyleurea herbicides were applied. Studied active ingredients are currently registered for this species on wheat fields in Turkey. With this aim, weed seeds were collected from different wheat growing provinces in Central Anatolia and Black Sea Region of Turkey, in total from 1359 different wheat fields. The resistant biotypes and resistance ratings in the collected populations were determined by bioassay and molecular methods. Twenty-three of *Galium aparine* accessions tested didn't control by ALS inhibitor. In addition, a gene mutation wasn't found.

**Keywords:** ALS inhibitor herbicides, bioassay, *Galium aparine*, mutation, resistance

### 1. Giriş

Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak tarımı yapılan buğdayın “ana zararlısı” yabancı otlardır. Yabancı otlar, buğday ile bitki besin maddesi, su, ışık ve yer bakımından rekabete girerek istisnasız her yıl mücadele edilmesine rağmen % 25-35 arasında değişen bir ürün kaybına neden olmaktadır (Vencill ve ark., 1993; Savary ve ark., 2000). Buğday ekim alanlarında birçok yabancı ot türü sorun teşkil etmektedir (Kadioğlu ve ark. 1998; Uygur ve ark.

1999; O'donovan ve ark. 2000). Türkiye'de 101 türü bulunan *Galium* cinsine ait dilkanatan (*Galium aparine* L.)'ın ülkemizin değişik bölgelerinde görüldüğü bilinmektedir (Davis 1972; Taştan 1998).

*Galium aparine* Avrasya'dan Kuzey Amerika'ya kadar geniş bir alanda buğday (*Triticum aestivum* L.), kolza (*Brassica napus* L.) ve diğer birçok kışlık ekimi yapılan kültür bitkilerinde sorun olan bir türdür (Defelice 2002;

Mennan ve Zandstra 2005). Bu türün çimlenme zamanında göstermiş olduğu esneklik, değişik büyüme formları, değişken zamanlı tek yıllık hayat döngüsü, soğuğa karşı tolerans, yüksek yayılabilme kapasitesi ve yüksek genetik farklılık göstermesinden dolayı geniş bir ekolojik toleransa sahiptir (Hubner ve ark. 2003; Mennan 2003; Mennan ve Ngouajio 2006).

Yabancı otlar agroekosistemin temel bileşenlerinden biri olup çeşitli mücadele metotlarıyla baskı altına alınmak istenmektedir. Buğdayda yabancı otlarla mücadelede kimyasal kullanımı; uygulanmasının kolay olması, kısa sürede etki göstermesi ve diğer yöntemlere kıyasla maliyetinin az olmasından dolayı tercih sebebidir.

ALS inhibitörü herbisitler düşük dozda uygulanması, memelilere karşı toksitesinin az olması, etki spektrumunun geniş olması ve uygulama dönemindeki esnekliklerden dolayı en fazla tercih edilen grup haline gelmiştir (Prado ve ark. 2004). Yoğun kullanım ise dayanıklılık vakalarını ortaya çıkarmıştır (Letouze ve Gasquez 2003; Sibony ve Rubin 2003; Tranel ve ark. 2017).

Yabancı otlarda herbisitlere dayanıklılığın tespiti çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir. Herhangi bir yabancı ot türünde dayanıklılığa bazen birden fazla gen sebep olabilmekte bundan dolayı dayanıklılığın hızlı ve doğru tespitine önemle ihtiyaç vardır. Bu metotların en önemlisi moleküler yöntemler olup dayanıklılığı ve buna neden olan mutasyonun tespit edilmesi bu yabancı otlarla mücadeleye farklı bir bakış tarzı getirebilmektedir (Corbett ve Tardif 2006; Santaella ve ark. 2006; Duhoux ve ark. 2017).

Bu çalışmada da *G. aparine* mücadelesinde yoğun olarak kullanılan ALS inhibitörü herbisitlere karşı etkisizlik durumunun söz konusu olduğuna dair son zamanlarda gelen çiftçi şikayetleri ve arazi gözlemleri dikkate alınarak dayanıklılığın geniş bir perspektifle ele alınabilmesi ve güvenilir sonuçlarla yorumlanabilmesi için ülkemizde *G. aparine*'ye ruhsatlı sulfonyleurea ve triazolopyrimidine grubu ALS herbisitlerine dayanıklılık durumu bioassay ve moleküler yöntemlerle araştırılmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Bitki Materyalleri

Dayanıklılık şüphesi olan biyotiplere ait tohumlar 2010 yılı Mayıs-Ağustos ayları arasında tohum olgunlaşma sürecine bağlı kalınarak toplanmıştır. Yetiştiriciliğin yoğun olarak yapıldığı Orta ve Batı Karadeniz ile İç Anadolu Bölgesi'ne bağlı Samsun, Amasya, Sinop, Çorum, Kastamonu, Çankırı, Bartın, Zonguldak, Karabük, Kırıkkale, Ankara, Bolu ve Eskişehir illerinin buğday yetiştirilen alanlarından sırasıyla 145, 117, 19, 220, 49, 53, 3, 14, 14, 123, 390, 43 ve 169 olmak üzere herbisit uygulaması sonrası canlı kalan toplam 1 359 popülasyona ait tohumlar toplanmıştır (Çizelge 1). Kontrol bitkisi olarak her bir lokasyondan herbisit uygulanmamış bitkilere ait tohumlar da toplanarak denemeye alınmıştır.

### 2.2. Dayanıklılık Tarama Testi

ALS inhibitörü herbisitlere dayanıklılık şüphesi taşıyan biyotiplerin belirlenmesi amacıyla popülasyonlar amidosulfuron+iodosulfuron-methyl sodium+mefenpyr-diethyl (Safener) (12.5 ml da<sup>-1</sup>), aminopyralid+florasulam (3 g da<sup>-1</sup>), flumetsulam+florasulam (6 ml da<sup>-1</sup>), mesosulfuron methyl+iodosulfuron methyl sodium (25 g da<sup>-1</sup>), pyroxsulam + cloquintocet mexyl (Safener) (20+25 g da<sup>-1</sup>), thifensulfuron methyl+tribenuron methyl (2.5 g da<sup>-1</sup>) ve tribenuron-methyl (1 g da<sup>-1</sup>) aktif maddeleri tavsiye edilen dozlarda (Çizelge 2) Moss ve ark. (1999), tarafından geliştirilen ön dayanıklılık tarama testinden geçirilmiştir.

Ruhsat dozu uygulanarak yapılan çalışmada aktif madde etkinliğinin %80 'in altında görüldüğü popülasyonlar şüpheli olarak kabul edilip detaylı doz etki çalışmalarına alınmıştır. Etkinliğin %100 olduğu popülasyonlar duyarlı olarak değerlendirilmiştir.

### 2.3. Doz-Etki Denemeleri

Ön dayanıklılık testlerinde ele alınan herbisitlere dayanıklılık şüphesi bulunan popülasyonlara aktif maddelerin ruhsatlı dozu esas alınarak 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ve 16.0 katı dozlar uygulanmıştır (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** *Galium aparine*'nin ruhsat dozu esas alınarak aktif maddelere göre uygulanan dozlar**Table 2.** *Doses of applications according to active ingredients for Galium aparine*

Doz katları	A (ml da <sup>-1</sup> )	B (g da <sup>-1</sup> )	C (ml da <sup>-1</sup> )	D (ml da <sup>-1</sup> )	E (g da <sup>-1</sup> )	F (g da <sup>-1</sup> )	G (g da <sup>-1</sup> )
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0
0.25X	4.17	0.75	4.17	1.5	6.25	0.625	0.25
0.5X	6.25	1.5	6.25	3	12.5	1.25	0.5
*1.0X	12.5	3	12.5	6	25	2.5	1
2.0X	25	6	25	12	50	5	2
4.0X	50	12	50	24	100	10	4
8.0X	100	24	100	48	200	20	8
16.0X	200	48	200	96	400	40	16

\***Ruhsat dozu A:** amidosulfuron+iodosulfuron-methyl sodium+mefenpyr-diethyl (Safener), **B:** aminopyralid+florasulam **C:** dicamba+triasulfuron, **D:** flumetsulam+florasulam **E:** mesosulfuron methyl+iodosulfuron methyl sodium, **F:** thifensulfuron methyl+tribenuron methyl, **G:** tribenuron-methyl

Denemeler 5 kg'lık saksılarda yürütülmüş ve her bir populasyon ve her ilaç için 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Saksılar ilaçlamadan sonra 20 ±2 °C 'de çalışan kontrollü seraya konmuştur. İlaçlama 3 atm. sabit basınçla çalışan 8004 nolu yelpaze huzmeli meme ile dekara 30 lt su hesabı ile bitkiler 4-6 yapraklı dönemdeyken uygulanmıştır. Uygulamadan 7, 14 ve 28. günler sonunda gözlemler alınmış ve %0-100 skalasına göre değerlendirmeler yapılmıştır.

#### 2.4. Veri Analizi

Farklı doz uygulamalarının 28. gün sonunda hasat edilen bitkiler 60 °C 'de 72 saat kurutulmuş ve kuru biomass ağırlıkları doz-etki çalışmalarına esas olacak verileri oluşturmuştur. Doz-etki analizleri R paket programında ve Weibull modeline (Model 1) göre yapılmıştır (Ritz ve Streibig 2005).

$$y = C + \frac{D-C}{1 + e^{[b(\ln(x) - \ln(ED_{90}))]}} \quad [1]$$

Bu formülde;  $Y$  biomass bitki<sup>-1</sup>,  $D$  üst limit,  $C$  alt limit,  $b$   $e$  tarafından belirlenen regresyonun eğimi,  $ED_{90}$  %90 etkili doz.

Yapılan analizler sonucunda elde edilen  $ED_{90}$  değerlerine göre tavsiye dozun iki katı dayanıklı olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, dayanıklılık katsayısı, dayanıklı biyotipin  $ED_{90}$ 'ının duyarlı biyotipin  $ED_{90}$ 'una oranlanmasıyla bulunmuştur.

#### 2.5. Moleküler Analizler

##### 2.5.1. DNA İzolasyonu

Doz etki analizi sonucu  $ED_{90}$  değeri temel alınarak herbisitlere dayanıklılık gösteren 23 populasyonda moleküler çalışmalar yapılmıştır. Sera koşullarında yetiştirilen populasyonlar 4-6 yapraklı döneme geldiğinde genç yaprak örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA'lar DNeasy DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak, kit protokolüne göre elde edilmiştir (Danquash ve ark. 2002).

##### 2.5.2. PCR Analizi

Her bir DNA örneğinin PCR uygulamalarında ALS gen bölgelerini çoğaltacak universal (Prado ve ark. 2004) primerler (750 bp ürün veren ALS-U-295 5'AAGGCCGATATTCTTGTCGAGGC-3', ALS-L-1170 5'- TACGAACCATAACGTACG TACCCTGAC A-3' ve 520 bp ürün veren ALS-U-1580 5'- TGTGGGGCAGCACCAGATGTGGG-3', ALS-L-2160 5'ATCACCTTCTGTGATCATG TCTTTGAA-3') kullanılmıştır. PCR reaksiyonu 25 µl toplam hacimde gerçekleştirilmiş olup, karışım bileşenleri: 10X PCR buffer, 20 ng Genomik DNA, her bir primerden 0.55 mM, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP ve 1 Unite Taq DNA Polimeraz'dır. PCR koşullarında başlangıç denaturasyonu 94 °C 'de 3 dk. olup 94 °C 'de 1 dk, 55°C'de 1 dk, 72°C'de 1.5 dk. periyotları 30 döngüde ve 72 °C 'de 10 dk. olarak optimize

edilmiştir. PCR sonrası elde edilen ürünlerden 10 µl ürün ve 3 µl loading solusyonu olmak üzere toplam 13 µl hacimdeki karışım %3 'lük agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur.

### 2.5.3. Sekans (nükleotid dizi) Analizinin Yapılması

Jeldeki PCR fragmentlerinin analizi GelDoc 2000 (Biorad, ABD) görüntüleme sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş örnekler İntek firmasına (İstanbul) gönderilerek baz dizisi analizleri yaptırılmıştır. 1 740 bç 'lik sekans pozisyonunda mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla *Arabidopsis thaliana* L.'nin ALS gen bölgesi temel alınarak dayanıklı ve duyarlı populasyonların ALS genine ait sekans dizilimleri karşılaştırılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Elde edilen baz dizi analiz sonuçları NCBI/gen bankası ve mevcut yayınlarda elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak incelenen bölgelerdeki mutasyonlar ve farklılıklar belirlenmiştir.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. Doz -Etki Analizi

Farklı illerden toplanan 1 359 populasyon ilk olarak herbisitlerin ruhsat dozunda Moss tarama testinden geçirilmiş ve buna göre %80'nin altında etkinlik görülen 278 populasyon doz-etki çalışmalarına alınmıştır. Çalışma sonunda 23 populasyonun dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 1). Doz-etki analizlerinde hassas populasyonlar tüm herbisitler tarafından kontrol altına alınan populasyonlardan seçilmiştir. Tarama testinde herhangi bir herbisite muhtemel dayanıklılık gösteren populasyonlar ise doz-etki çalışmalarına alınmış ve analiz sonucunda dayanıklı olup olmadığı tespit edilmiştir. Yapılan doz-etki denemeleri sonucunda pyroxsulam+cloquintocet mexyl (Safener) ve dicamba+triasulfuron'a dayanıklı populasyon tespit edilmemiş ancak etki kaybının olduğu ortaya konmuştur. Çalışmada 17 dayanıklı populasyon sayısı ile tribenuron-methyl dayanıklılığı en yüksek düzeyde çıkmıştır. Tribenuron-methyl'e dayanıklı populasyonların ED<sub>90</sub> değerleri ve dayanıklılık oranları incelendiğinde katsayının 0.5-8.8 (ANK-G-45/AMS-G-25) arasında değiştiği (Çizelge 3) dikkat çekmiştir.

**Çizelge 3.** *Galium aparine*'nin tribenuron-methyl'e dayanıklı populasyonlarının ED<sub>90</sub> değerleri

**Table 3.** ED<sub>90</sub> values of *Galium aparine* populations to tribenuron-methyl

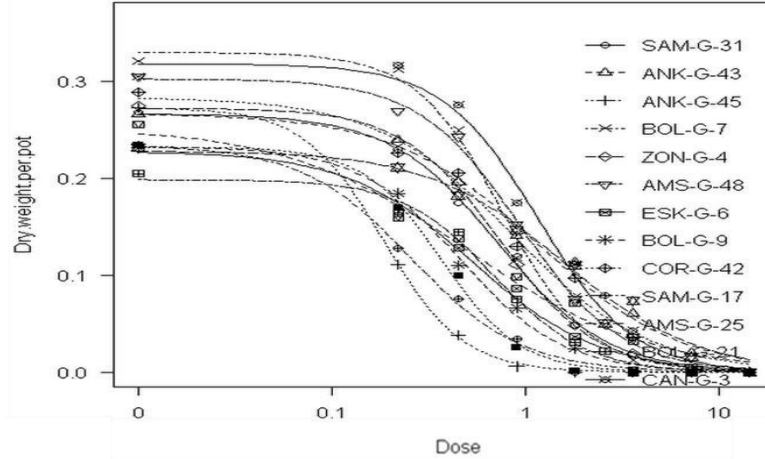
Populasyon No	Tahmin edilen ED <sub>90</sub>	Standart hata	ED <sub>90</sub> alt limit	ED <sub>90</sub> üst limit	Dayanıklılık Katsayısı
AMS-G-25	9.095	1.167	6.802	11.388	8.8
AMS-G-48	3.556	0.319	2.930	4.182	3.4
ANK-G-43	7.425	0.864	5.727	9.123	7.2
ANK-G-45	0.524	0.060	0.406	0.641	0.5
BOL-G-21	2.314	0.290	1.745	2.884	2.2
BOL-G-7	2.400	0.186	2.034	2.766	2.3
BOL-G-9	1.771	0.210	1.358	2.185	1.7
CAN-G-3	4.004	0.310	3.395	4.613	3.9
COR-G-42	5.025	0.535	3.972	6.077	4.9
ESK-G-6	2.749	0.350	2.060	3.437	2.7
SAM-G-17	1.093	0.145	0.145	1.378	1.1
SAM-G-19*	1.034	0.102	0.834	1.234	1.0
SAM-G-20	5.385	0.821	3.772	6.999	5.2
SAM-G-31	2.963	0.298	2.378	3.548	2.9
ZON-G-4	2.634	0.254	0.254	3.133	2.5

\*Duyarlı populasyon ED<sub>90</sub>; Effective dose %90 (%90 etkili doz)

Doz-etki çalışmalarında *G. aparine*'nin değişik populasyonlarına uygulanan farklı

tribenuron-methyl dozlarının SAM-G-19 duyarlı populasyonu referans alınarak oluşturulan doz-

etki eğrisinde populasyonlar arasında aktif maddeye farklı tepkiler gelişmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** *Galium aparine* populasyonlarına uygulanan farklı tribenuron-methyl dozlarının oluşturduğu doz-etki eğrisi

**Figure 1.** Dose-response curve of *Galium aparine* populations treated with different tribenuron-methyl doses

Bu aktif maddeye karşı 1987 yılından bu yana farklı yabancı ot türlerinde toplamda 91 dayanıklılık olgusu rapor edilmiş olup, çalışmamızdaki en yüksek dayanıklılık oranıyla bu durum desteklenmiştir (Heap, 2017). Aktif maddeler bazlı değerlendirildiğinde mesosulfuron methyl+iodosulfuron methyl sodium'a 16

populasyonun, thifensulfuron methyl+tribenuron methyl'e 15, aminopyralid+florasulam ve flumetsulam+florasulam'a ise 13 'er populasyonun dayanıklılık gösterdiği saptanmıştır. Amidosulfuron+iodosulfuron-methyl sodium+ mefenpyr diethyl (Safener)'e sadece bir populasyon dayanıklılığı mevcuttur (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** Buğday ekim alanlarından illere göre toplanan, testlenen ve aktif maddelere göre dayanıklı bulunan populasyon sayısı

**Table 1.** The number of resistant populations according to active ingredients tested and collected from wheat fields

İl Adı	Populasyon sayısı			Dayanıklı populasyonların aktif maddelere göre dağılımı					
	Toplanan	Şüpheli	Dayanıklı	A	B	C	D	E	F
Samsun	145	29	2	2	2	2	-	-	-
Amasya	117	14	1	1	1	1	-	1	-
Sinop	19	2	-	-	-	-	-	-	-
Çorum	220	55	1	1	1	-	1	-	1
Kastamonu	49	3	-	-	-	-	-	-	-
Çankırı	53	5	1	1	-	-	-	-	-
Bartın	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Zonguldak	14	2	-	-	-	-	-	-	-
Karabük	14	1	-	-	-	-	-	-	-
Kırıkkale	123	26	1	1	1	1	1	1	-
Ankara	390	118	9	9	9	9	9	9	-
Bolu	43	5	-	-	-	-	-	-	-
Eskişehir	169	18	2	2	2	2	2	2	-
<b>Toplam</b>	<b>1359</b>	<b>278</b>	<b>23</b>	<b>17</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>1</b>

-Dayanıklılık şüphesi/dayanıklılık yoktur.

**A:** tribenuron-methyl, **B:** mesosulfuron methyl+iodosulfuron methyl sodium, **C:** thifensulfuron methyl+tribenuron methyl, **D:** aminopyralid+florasulam, **E:** flumetsulam+florasulam, **F:** amidosulfuron+iodosulfuron-methyl sodium+mefenpyr-diethyl (safener)

İllere göre dayanıklılık durumu değerlendirildiğinde Sinop ilinden toplanan 19 populasyonun 2'si doz-etki çalışmasına alınmıştır. Bu ilde polikültür tarımın yapılması ve herbisit kullanımının yaygın olmaması nedeniyle doz-etki çalışmasına alınan populasyonlarda herhangi bir risk ortaya çıkmamıştır. Benzer durum Kastamonu ilinde ortaya çıkmış doz-etki denemesine alınan 3 populasyonda herhangi bir dayanıklılığa rastlanmamış ancak sadece bir populasyonda etki kaybından söz edilebilmiştir (Çizelge 1). Buğday ekim alanının az olduğu illerden olan Bartın, Karabük ve Zonguldak illerinde herbisite karşı etki kaybı gözlemlenmemiştir (Çizelge 1). Ancak buradaki populasyonlarda herbisitlere olan hassasiyetin azaldığı ve kontrol için tavsiye edilen dozun fazlasına gerek duyulduğu anlaşılmıştır. Kırıkkale, Ankara ve Eskişehir illerinde dayanıklı populasyonların 5 farklı aktif maddeye de (flumetsulam+florasulam, mesosulfuron methyl + iodosulfuron methyl sodium, aminopyralid + florasulam, thifensulfuron methyl + tribenuron methyl, tribenuron methyl) dayanıklılık gösterdikleri dikkat çekmiştir. Yine benzer durum olarak dayanıklılığın yayılım durumu iller bazında benzerlik göstermiştir (Çizelge 1). Oksin tipi herbisitlerden fluroxypyr ve mecoprop'a karşı değişik ülkelerde uygulama dozunun iki veya üç katı oranında duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir (Hubner ve ark. 2003)

Ayrıca Zand ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada ALS inhibitörü olan chlorsulfuron'un *G. aparine*'ye %90 'lık etkisi ancak 20 gr ha<sup>-1</sup> dozda sağlandığı tespit edilmiştir. Buda tavsiye edilen dozun 2 katına denk gelmektedir. Bu durum dayanıklılık başlangıcı olarak adlandırılabilir.

### 3.2. ALS Gen Bölgesinin Sekans (Baz Dizisi) Analizi

Baz dizisi analizi yapılan 10 dayanıklı (SAM-G-53, SAM-G-141, KIR-G-102, ANK-G-37,

ANK-G-142, ANK-G-412, AMS-G-89, ÇOR-G-21, ÇOR-G-195 ve ESK-G-69) ve 2 duyarlı (SİN-G-11, ZON-G-11) olmak üzere toplam 12 örnekte yorumlanabilir sekans sonuçları elde edilebilmiştir. Dizi analizi sonucu *G. aparine* populasyonlarında 1 740 bp'lik baz dizilerinin kıyaslanması sonucu elde edilen aminoasit ve nükleik asit sekansları Çizelge 4 'de verilmiştir.

Mutasyon tespitinde dünyada birçok araştırmada olduğu gibi yabancı ot çalışmalarında da model bitki olarak *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.kullanılmaktadır. *A. thaliana* standart alınarak daha önce yapılan gen sekans çalışmaları 6 doğal ALS gen mutasyonunu rapor etmektedir (Boutsalis ve ark. 1999). Buna göre mutasyonun gerçekleştiği aminoasit bölgeleri şu şekildedir. Treonin (Thr) ile Alanin 122 (Ala) arasında, çeşitli aminoasitler ile Prolin 197 (Pro) arasında, Valin (Val) ile Alanin 205 arasında, Glutamin (Glu) ile Aspartik asit 376 (Asp), Lösin ile (Leu) Triptofan 574 (Trp) ve Treonin ya da Asparajin ile Serin 653 (Ser) arasında gerçekleşmektedir (Tranel ve Wright 2002; Milliman ve ark. 2003; Preston ve ark. 2006; Whaley ve ark. 2007). ALS inhibitörü herbisitlere dayanıklılık mekanizması karmaşık bir olgu olup dayanıklılığın Ala122, Pro197, Ala205, Trp574 ve Ser653 aminoasit zincirlerindeki nokta mutasyonlarından meydana geldiği bildirilmektedir (Wright ve ark. 1998; Devine ve Preston 2000; Park ve Mallory-Smith 2004; Tranel ve ark. 2009). Çalışma bulgularında ise Ala122, Pro 197 ve Trp 574 mutasyon noktaları başta olmak üzere *A. thaliana* ALS gen bölgesindeki aminoasit dizilimlerinin kıyaslanması neticesinde Ala 122 aminoasidini kapsayan 364-366 nükleotid pozisyonu, Pro 197 aminoasidini kapsayan 589-591 nükleotid pozisyonu ve Trp 574 aminoasidini kapsayan 1721-1723 nükleotid pozisyonlarında herhangi bir mutasyona rastlanılmamıştır.

**Çizelge 4.** *Galium aparine*'ye ait nükleotid ve aminoasit dizilimleri  
**Table 4.** *Nucleotide and amino acid sequences of Galium aparine*

D 361	GAT	GCG	CCC	AGA	AAG	GGC	TGC	GAT	GTG	CTC	GTG	GAA	GCC	CTC	GAA	CGG	GAA	GGC	GTA	ACG	420
D 121	D	A	P	R	K	G	C	D	V	L	V	E	A	L	E	R	E	G	V	T	140
H 361	GAT	GCG	CCC	AGA	AAG	GGC	TGC	GAT	GTG	CTC	GTG	GAA	GCC	CTC	GAA	CGG	GAA	GGC	GTA	ACG	420
H 121	D	A	P	R	K	G	C	D	V	L	V	E	A	L	E	R	E	G	V	T	140
D 541	TAC	GCA	CGC	GCC	GCC	GGT	GTT	CCC	GGC	GTC	TGC	ATC	GCC	ACC	TCC	GGC	CCC	GGA	GCC	ACC	600
D 181	Y	A	R	A	A	G	V	P	G	V	C	I	A	T	S	G	P	G	A	T	200
H 541	TAC	GCA	CGC	GCC	GCC	GGT	GTT	CCC	GGC	GTC	TGC	ATC	GCC	ACC	TCC	GGC	CCC	GGA	GCC	ACC	600
H 181	Y	A	R	A	A	G	V	P	G	V	C	I	A	T	S	G	P	G	A	T	200
D 601	AAT	CTC	GTC	AGC	GCA	TTG	GCC	GAC	GCA	ATG	CTG	GAC	AGC	GTT	CCT	CTG	GTG	GCA	ATC	ACC	660
D 201	N	L	V	S	A	L	A	D	A	M	L	D	S	V	P	L	V	A	I	T	220
H 601	AAT	CTC	GTC	AGC	GCA	TTG	GCC	GAC	GCA	ATG	CTG	GAC	AGC	GTT	CCT	CTG	GTG	GCA	ATC	ACC	660
H 201	N	L	V	S	A	L	A	D	A	M	L	D	S	V	P	L	V	A	I	T	220
D1681	GTG	GAT	ATA	GAC	GGA	GAT	GGC	AGT	TTC	ATG	ATG	AAT	GTT	ACA	GAG	CTG	GCC	ACC	ATT	CGT	1740
D561	V	D	I	D	G	D	G	S	F	M	M	N	V	T	E	L	A	T	I	R	580
H1681	GTG	GAT	ATA	GAC	GGA	GAT	GGC	AGT	TTC	ATG	ATG	AAT	GTT	ACA	GAG	CTG	GCC	ACC	ATT	CGT	1740
H561	V	D	I	D	G	D	G	S	F	M	M	N	V	T	E	L	A	T	I	R	580

D: Dayanıklı popülasyon, H: Duyarlı popülasyon

#### 4. Sonuç

Birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de buğdayda yabancı ot mücadelesi doğrudan herbisitlere bağımlı olarak sürdürülmektedir. Kullanılan herbisitlere karşı dayanıklılık kaydı her geçen gün artmaktadır. Herbisitlere yönelik etki kaybı şikayetleri doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmada buğday ekim alanlarında sorun olan *G. aparine*'nin ALS grubu herbisitlere dayanıklılığı araştırılmıştır. Toplam 1359 popülasyonun denemeye alındığı çalışmada 23 popülasyon dayanıklı bulunmuş ve bu durumun türün ekolojik toleransının yüksek olmasından dolayı ALS inhibitörü ve diğer herbisitlere farklı düzeylerde tolerans gösterdiği yargısına varılmıştır. Çalışma sonucunda dicamba+triasulfuron ve pyroxsulam+cloquintocet mexyl (Safener)'e karşı herhangi bir dayanıklı popülasyon tespit edilmemiş ancak etki kaybının olduğu ortaya konmuştur. Dayanıklılığın yayılım durumu gözden geçirildiğinde sorunun çalışma alanını kapsayan her iki bölgede var olduğu ancak iller bazında değerlendirildiğinde ise Sinop,

Kastamonu, Bartın, Zonguldak ve Bolu'da bu herbisitlere karşı herhangi bir dayanıklılık riskinin bulunmadığı görülmüştür.

Çalışma bulguları ele alındığında *G. aparine* için dayanıklılık sorunun yaygınlık kazanmadığı ancak etkinlik azalmasına birçok popülasyonda rastlanıldığı bu türlerin dayanıklılık meyli taşıdığını işaret etmektedir.

Çalışılan yabancı otta yapılan baz dizisi analiz sonuçlarına göre herbisitlere dayanıklılığın mutasyon varlığından kaynaklanmadığı ortaya konmuştur. Bu da bizde herbisit bitki içerisindeki aktivitesinin azalmasından kaynaklı bir metabolik dayanıklılığın olabileceği kanaati uyandırmıştır. Bu çalışma ilerleyen süreçlerde biyokimyasal olarak enzimatik aktivasyonunun da çalışmalara dahil edilmesi gerekliliğini gündeme taşımıştır.

#### Teşekkürler

Bu çalışma TÜBİTAK TOVAG tarafından desteklenen 109O521 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

**Kaynaklar**

- Boutsalis P, Karotam J and Powles S.B (1999). Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. *Pesticide Science*, 55: 507–516.
- Corbett CL and Tardif FJ (2006). Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: A review. *Pest Management Science*, 62: 584–597.
- Danquash ET, Johnson DE, Riches C, Arnold GM and Karp A (2002). Genetic diversity in *Echinochloa* spp. collected from different geographic origins and within rice fields in Cote d'Ivoire. *Weed Research*, 42: 394.
- Davis PH (1965-1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Island*. At the University Press, Edinburg, Vol. 1-10.
- Defelice MS (2002). Catchweed bedstraw or cleavers, *Galium aparine* L.-a very sticky subject. *Weed Technology*, 16: 467–472.
- Devine MD and Preston C (2000). The molecular basis of herbicide resistance. In: Cobb, A.H. and Kirkwood, R. C. (Eds). *Herbicides and Their Mechanisms of Action*. Boca Raton, FL: CRC Press., s.71–104.
- Duhoux A, Carrère S, Duhoux A and Dély C (2017). Transcriptional markers enable identification of ryegrass (*Lolium* sp.) plants with non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase. *Plant Science*, 257: 22-36.
- Heap I (2017). *The International Survey of Herbicide Resistant Weeds*. www.weedscience.org (Accessed to web: 10.10.2017).
- Hubner RH, Fykse K, Hurle S and Klemsdal S (2003). Morphological differences, molecular characterization, and herbicide sensitivity of catchweed bedstraw (*Galium aparine*) populations. *Weed Science*, 51: 214–225.
- Kadioğlu İ, Üremiş İ, Uluğ E, Boz Ö ve Uygur FN (1998). Researches on the economic thresholds of wild oat (*Avena sterilis* L.) in wheat fields in Çukurova Region of Turkey. *Türkiye Herboloji Dergisi*, 1: 18-24.
- Letouzé A and Gasquez J (2003). Enhanced activity of several herbicide-degrading enzymes: A suggested mechanism responsible for multiple resistance in black grass (*Alopecurus myosuroides* Huds). *Agronomie*, 23: 601–608.
- Mennan H (2003). The effects of depth and duration of burial on seasonal germination, dormancy and viability of *Galium aparine* and *Bifora radians* seeds. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 189: 304-309.
- Mennan H and Ngouajio M (2006). Seasonal cycles in germination and seedling emergence of summer and winter populations of catchweed bedstraw (*Galium aparine*) and wild mustard (*Brassica kaber*). *Weed Science*, 54: 114–120.
- Mennan H and Zandstra BH (2005). Effect of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars and seedling rate on yield loss from cleavers (*Galium aparine*). *Crop Protection*, 24:1061-1067.
- Milliman LD, Riechers DE, Wax LM and Simmons EW (2003). Characterization of two biotypes of imidazolinone-resistant eastern black nightshade (*Solanum ptycanthum*). *Weed Science*, 51: 139-144.
- Moss SR, Clarke JH, Blair AM, Culley TN, Read MA, Ryan PJ and Turner M (1999). The occurrence of herbicide-resistant grass-weeds in the United Kingdom and a new system for designating resistance in screening assays. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference on Weeds*. p.179–184 Hampshire, UK: BCPC.
- O'donovan JT, Hark Clayton KN and Hall LM (2000). Wild oat (*Avena fatua*) interference in barley (*Hordeum vulgare*) is influenced by barley variety and seeding rate. *Weed Technology*, 14: 624–629.
- Park KW and Mallory-Smith CA (2004). Physiological and molecular basis for ALS inhibitor resistance in *Bromus tectorum* biotypes. *Weed Research*, 44:71–77.
- Prado MD, De Prado R and Franco AR (2004). Design and optimization of degenerated universal primers for the cloning of the plant acetolactate synthase conserved domains. *Weed Science*, 52: 487–491.
- Preston C and Mallory-Smith CA (2006). Biochemical mechanisms, inheritance, and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. Powles, S. and Shaner, D. (Eds). *Herbicide resistance and world grains*, Boca Raton, FL: CRC Press, Inc, s.23-60.
- Ritz C and Streibig JC (2005). Bioassay analysis using R. *J. Statistical Software* 12, 1–22.
- Santaella JPR, Heredia A and de Prado R (2006). Basis of selectivity of cyhalofop-butyl in *Oryza sativa* L. *Planta*, 223:191–199.
- Savary S, Willocquet L, Elazegui FA, Castilla NP and Teng PS (2000). Rice pest constraints in tropical Asia: quantification of yield losses due to rice pests in a range of production situations. *Plant Disease*, 84: 357–369.
- Sibony M and Rubin B (2003). The ecological fitness of *Amaranthus retroflexus* and *A. blitoides* resistant to acetolactate synthase (ALS) inhibitors and atrazine. *Weed Research*, 43: 40-47.
- Taştan R (1988). Orta Anadolu buğday ekim alanlarında sorun olan kokar ot (*Bifora radians* Bieb.)'un yayılışı, biyolojisi ve mücadele metotları. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. p.137, Erzurum.
- Tranel PJ and Wright TR (2002). Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned. *Weed Science*, 50: 700-712.
- Tranel PJ, Wright TR and Heap IM (2009). ALS mutations from herbicide-resistant weeds. <http://www.weedscience.com> (Erişim tarihi: 10.08.2016).
- Tranel PJ, Wu C and Sadeque A (2017). Target-site resistances to ALS and PPO inhibitors are linked in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Science*, 65: 4-8.
- Uygur FN, Kadioğlu İ, Boz Ö ve Mennan H (1999). Yabancı otların ekonomik zarar eşiği ve dünya ile Türkiye'deki uygulamaları. *Bitki Korumada Ekonomik Zarar Eşiği Modelleri ve Uygulaması Workshop'u Bildirileri*, s.170-225, Samsun.
- Vencill WK, Girayda LJ and Langdole GW (1993). Soil moisture relations and critical period of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Coastal bermudagrass) competition in conservation-tillage cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Weed Research*, 33: 89-92.



- Whaley CM, Wilson HP and Westwood JH (2007). A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. *Weed Science*, 55: 83- 90.
- Wright TR, Bascomb NF, Sturmer SF and Penner D (1998). Biochemical mechanism and molecular basis for ALS-inhibiting herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*) somatic cell selections, *Weed Science*, 46: 13-23.
- Zand E, Baghestani MA, Bitarafan M and Shimi P (2007). A guide for herbicides registered in Iran, Jihad-e-Agriculture Press, Mashhad, Iran. Pp. 110.