

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ISPARTA İLİ ELMA BAHÇELERİNDEN TOPLANAN
***Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae)**
POPULASYONLARININ ABAMECTİN+SPİROMESİFEN
KARIŞIMINA DİRENÇ DÜZEYLERİ, ÇAPRAZ DİRENÇ VE
DİRENÇ MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ

Burcu YAMAN

Danışman
Prof. Dr. Recep AY

ISPARTA - 2024



© 2024 [Burcu YAMAN]

ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

24/05/2024

Burcu YAMAN

.....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonunun orijini ve yetiştirilmesi	22
3.1.2. Çalışmada kullanılan akarisitler	23
3.1.2.1. Spiromesifen+abamectin.....	24
3.1.2.2. Spiromesifen	24
3.1.2.3. Spirodiclofen.....	25
3.1.2.4. Abamectin	26
3.1.2.5. Milbemectin	27
3.1.2.6. Spirodiclofen+abamectin	28
3.2. Metot	28
3.2.1. Biyoassay çalışmaları.....	29
3.2.1.1. İnsektisit/Akarisit konsantrasyonlarının hazırlanması.....	29
3.2.1.2. İnsektisit/Akarisit uygulanması.....	30
3.2.2. Seleksiyon çalışmaları.....	31
3.2.3. Dirençli bahçe popülasyonlarının belirlenmesi ve çapraz direnç çalışmaları..	32
3.2.4. Sinerjistik çalışmalar	33
3.2.5. Biyokimyasal çalışmalar	34
3.2.5.1. <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonlarında esterase enzimi aktivitesinin incelenmesi.....	35
3.2.5.2. <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonlarında GST enzimi aktivitesinin incelenmesi	35
3.2.5.3. <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonlarında P450 enzimi aktivitesinin incelenmesi.....	36
3.2.6. Moleküler çalışmalar.....	37
3.2.6.1. Genomik DNA izolasyonu	37
3.2.6.2. Primerler ve problemler	38
3.2.6.3. Abamectin direnç mutasyonlarının RT-PCR ile belirlenmesi	40
3.2.6.4. Spiromesifen direnç mutasyonlarının PCR ile belirlenmesi	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. Dirençli Popülasyonların Belirlenmesi	42
4.2. Abamectin+Spiromesifen Karışımında IR Popülasyonunun Direnç Gelişimi....	43
4.3. Çapraz Direnç Çalışmaları	44
4.3.1. Bahçe popülasyonlarında çapraz direncin belirlenmesi.....	44
4.3.2. IR popülasyonunda çapraz direncin belirlenmesi	49
4.4. Sinerjistik Çalışmalarının Sonuçları.....	51
4.4.1. Bahçe popülasyonlarında sinerjistik sonuçları	51
4.5. Biyokimyasal Çalışmalar	52

4.5.1. Detoksifikasyon enzimlerinin belirlenmesi.....	52
4.5.1.1. <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonlarında esteraz enzimi aktivitesinin incelenmesi.....	52
4.5.1.2. <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonlarında GST enzimi aktivitesinin incelenmesi.....	52
4.5.1.3. <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonlarında Sitokrom P450 enzimi aktivitesinin incelenmesi.....	53
4.6. Moleküler Çalışmalar.....	54
4.6.1. Genomik DNA izolasyon sonuçları	54
4.6.2. Genomik DNA'nın PCR ile çoğaltılması.....	54
4.6.3. Dirençle ilişkili nokta mutasyonlarının belirlenmesi	55
4.6.3.1. <i>P. ulmi</i> GluCl'da nokta mutasyon tespiti	55
4.6.3.2. ACCase geni dizi karşılaştırılması sonuçları	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	82

ÖZET

Doktora Tezi

ISPARTA İLİ ELMA BAHÇELERİNDEN TOPLANAN *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae) POPULASYONLARININ ABAMECTİN+SPIROMESİFEN KARIŞIMINA DİRENÇ DÜZEYLERİ, ÇAPRAZ DİRENÇ VE DİRENÇ MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ

Burcu YAMAN

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Recep AY

Isparta ili elma bahçelerinden toplanan ve S+A karışımı ile selekte edilen *Panonychus ulmi* popülasyonlarında S+A karışım formülasyonunda direnç olup olmadığı, dirençli popülasyonlarda spiromesifen, spiroadiclofen, abamectin, milbemectin ve spiroadiclofen+abamectin için çapraz direncin varlığı ve S+A direnç mekanizmaları biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle belirlenmiştir. Bahçe popülasyonlarının S+A için direnç oranları 3.12, 4.44 ve 7.66 kat olmuştur. IR popülasyonunun LC₅₀ değeri HS popülasyona göre 23.24 kat olmuştur. G-2, M-1 ve T-2'de spiromesifen ve spiroadiclofene sırasıyla 3.92 ve 2.82; 1.03 ve 2.90; 1.40 ve 3.20 kat bulunmuştur. IR popülasyonunun spiromesifen, spiroadiclofen, spiroadiclofen+abamectin, abamectin ve milbemectin çapraz direnç oranları sırasıyla 19.16, 13.84, 10.58, 32.21 ve 61.06 kat kaydedilmiştir. M-1, IR ve HS'da LC₁₀ değeri DEM+S+A, TPP+S+A ve PBO+S+A sinerjistlerinde % etki sırasıyla 96.93, 94.15 ve 92.40; 69.76, 76.74 ve 83.72; 37.93, 42.19 ve 53.45 olarak belirlenmiştir. Esteraz en yüksek G-2 popülasyonunda, GST IR popülasyonunda ve P450 enzimi M-1 popülasyonunda bulunmuştur. GluCI 1'de G314D mutasyonu ve GluCI 3'de I321T ve G326E nokta mutasyonları HS ve bütün dirençli popülasyonlarda taranmıştır. GluCI 1'de G314D nokta mutasyonu IR ve M-1; GluCI 3'de I321T nokta mutasyonu tüm bahçe ve IR popülasyonunda belirlenmiştir. G326E mutasyonu klasik PCR ile yapılmış ve Genius programı ile analiz edilmiş ancak hiçbir popülasyonda belirlenememiştir. BC bölgesinde HS popülasyona göre IR'da N41Y ve R87M, T-2'de Y29D, R87M, A174S, M-1'de Y29D ve R87M, G-2'de R87M mutasyonları bulunmuştur. CT bölgesinde HS popülasyona göre G-2'de P1877S, T-2'de I1862M, E1864V, S1865P, S1889N ve T2030K, M-1'de T2030K mutasyonları belirlenmiştir. CT bölgesinde IR popülasyonunda hiçbir mutasyona rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Panonychus ulmi*, Spiromesifen+abamectin, Direnç, Çapraz direnç, Mutasyon

2024, 83 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Dissertation

DETERMINATION OF RESISTANCE LEVELS, CROSS RESISTANCE AND RESISTANCE MECHANISMS OF ABAMECTIN + SPIROMESIFEN MIXTURE OF *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae) POPULATIONS COLLECTED FROM APPLE ORCHARDS IN ISPARTA PROVINCE

Burcu YAMAN

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Recep AY

The presence of resistance to S+A mixture formulation in *Panonychus ulmi* populations collected from apple orchards in Isparta province and selected with S+A mixture, the presence of cross-resistance for spiromesifen, spiroticlofen, abamectin, milbemectin and spiroticlofen+abamectin in resistant populations and S+A resistance mechanisms were determined by biochemical and molecular methods. The resistance ratios of the orchards populations for S+A were 3.12, 4.44 and 7.66 fold. The LC50 value of the IR population was 23.24 times higher than the HS population. In G-2, M-1 and T-2, spiromesifen and spiroticlofen were 3.92 and 2.82; 1.03 and 2.90; 1.40 and 3.20 times, respectively. The cross-resistance rates of the IR population to spiromesifen, spiroticlofen, spiroticlofen+abamectin, abamectin and milbemectin were 19.16, 13.84, 10.58, 32.21 and 61.06 fold, respectively. LC10 values in M-1, IR and HS were 96.93, 94.15 and 92.40; 69.76, 76.74 and 83.72; 37.93, 42.19 and 53.45 % effect in DEM+S+A, TPP+S+A and PBO+S+A synergists, respectively. Esterase was highest in the G-2 population, GST in the IR population and P450 enzyme in the M-1 population. G314D mutation in GluCl 1 and I321T and G326E point mutations in GluCl 3 were screened in HS and all resistant populations. The G314D point mutation in GluCl 1 was identified in IR and M-1; the I321T point mutation in GluCl 3 was identified in all orchards and IR populations. The G326E mutation was made by classic PCR and analyzed with the Genius program but was not detected in any population. In BC domain, N41Y and R87M mutations were found in IR, Y29D, R87M, A174S in T-2, Y29D and R87M in M-1, and R87M in G-2 according to HS population. In the CT domain, P1877S mutations in G-2, I1862M, E1864V, S1865P, S1889N and T2030K mutations in T-2, T2030K mutations in M-1 were determined in the HS population. No mutation was found in the IR population in the CT domain.

Key Words: *Panonychus ulmi*, Spiromesifen+abamectin, Resistant, Cross resistant, Mutation

2024, 83 pages

TEŞEKKÜR

Tezimin yürütülmesinde ve yaşamımda desteğini ve emeğini hiçbir zaman esirgemeyen, karşılaştığım her zorlukta yardımcı olan tez danışmanım değerli sayın hocam Prof. Dr. Recep AY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme jürisinde bulunarak çalışma boyunca önemli yorum ve değerlendirmeleri ile katkı sağlayan sayın hocalarım Prof. Dr. Cengiz KAZAK ve Prof. Dr. Sibel YORULMAZ'a ve tez savunma jürisinde yer alarak katkı sağlayan sayın hocalarım Prof. Dr. İbrahim ÇAKMAK ve Prof. Dr. Bayram ÇEVİK'e tüm katkıları için teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin moleküler çalışmaları aşamasında büyük bir özveriyle yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Bayram ÇEVİK ve moleküler laboratuvarı ekibine teşekkür ederim.

İstatiksel analizler de yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ali Kemal BİRGÜCÜ'ye çok teşekkür ederim.

Tezimin gerçekleşmesinde TAGEM/BSAD/A/21/A2/P2/2395 numaralı proje ile maddi destek sağlayan Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

Tezimin yürütülmesinde desteğini esirgemeyen Eğirdir Meyvecilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü idaresine yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca tecrübe ve yardımları ile katkı sağlayan tüm mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin arazi çalışmaları aşamasında beni yalnız bırakmayan değerli arkadaşım Ziraat Yüksek Mühendisi Sinan BUTAR'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Meyvecilik Araştırma Enstitüsü Bitki Sağlığı bölümündeki değerli arkadaşlarım; Dr. M. Sedat SEVİNÇ'e, Dr. M. Murat YEŞİLIRMAK'a ve Ziraat Mühendisi Nuran KARATAĞ'a çok teşekkür ederim.

Yaşamımda desteklerini hissettiğim kıymetli dostlarım Merve KIZILDAĞ'a, H. Kübra ÖZBEK BEDEL'e Özlem KARAPINAR'a, Mehtap ÇELİKKAYA'ya ve Gökçe GÜNDÜZ ÜRÜK'e teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim kıymetli annem Z. Canan YAMAN'a, kıymetli babam Abdullah YAMAN'a ve kıymetli kardeşlerim Müge TOKDEMİR'e ve Mehmet Nur TOKDEMİR'e, N. Bilge YAMAN KANDEMİR'e ve Halil KANDEMİR'e herşey için teşekkür eder, sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Burcu YAMAN
ISPARTA, 2024

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Dünya sıralamasında en çok elma üreten ülkeler	1
Şekil 3.1. <i>Panonychus ulmi</i> 'ye ait bahçe popülasyonları.....	23
Şekil 3.2. Spiromesifen kimyasal yapısı	25
Şekil 3.3. Spirodiclofen kimyasal yapısı.....	26
Şekil 3.4. Abamectin kimyasal yapısı	27
Şekil 3.5. Milbemectin kimyasal yapısı	28
Şekil 3.6. İlaçların uygulanması.....	30
Şekil 3.7. Seleksiyon uygulamaları.....	31
Şekil 3.8. Çapraz direnç çalışmalarında biyoassay	33
Şekil 3.9. Sinerjist uygulamaları	34
Şekil 3.10. Biyokimyasal çalışmalar	34
Şekil 3.11. Enzim aktivitelerinin incelenmesi.....	37
Şekil 3.12. Genomik DNA izalasyonu	38
Şekil 3.13. Çalışmada kullanılan Real-time PCR	40
Şekil 4.1. HS, IR ve M-1 popülasyonunda LC ₁₀ değerinin sinerjistik uygulamalarındaki ölüm oranları.....	51
Şekil 4.2. IR, HS, M-1, G-2 ve T-2 popülasyonlarının GluCI 3'de G326E klasik PCR ile elde edilen jel görüntüsü	54
Şekil 4.3. ACCase enzimindeki PuACCase 1-568 ve PuACCase 5167-5828 mutasyonu içeren bölgelerin çoğaltılması	55
Şekil 4.4. <i>P. ulmi</i> 'nin HS, IR ve dirençli popülasyonlarında RT-PCR ile tarama yapılan.....	56
Şekil 4.5. <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonlarının GluCI 3'ün 326 gen bölgesi aminoasit dizisi	57
Şekil 4.6. Hassas, seleksiyon (IR), Tepeli-2, Marem-1 ve Gelendost-2 popülasyonlarının ACCase BC domain (<i>Biotin carboxylase</i>) bölgesinin aminoasit diziliminin karşılaştırılması	58
Şekil 4.7. Hassas, seleksiyon (IR), Tepeli-2, Marem-1 ve Gelendost-2 popülasyonlarının ACCase CT Domain (<i>Carboxyl tranferase</i>) bölgesinin aminoasit diziliminin karşılaştırılması	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

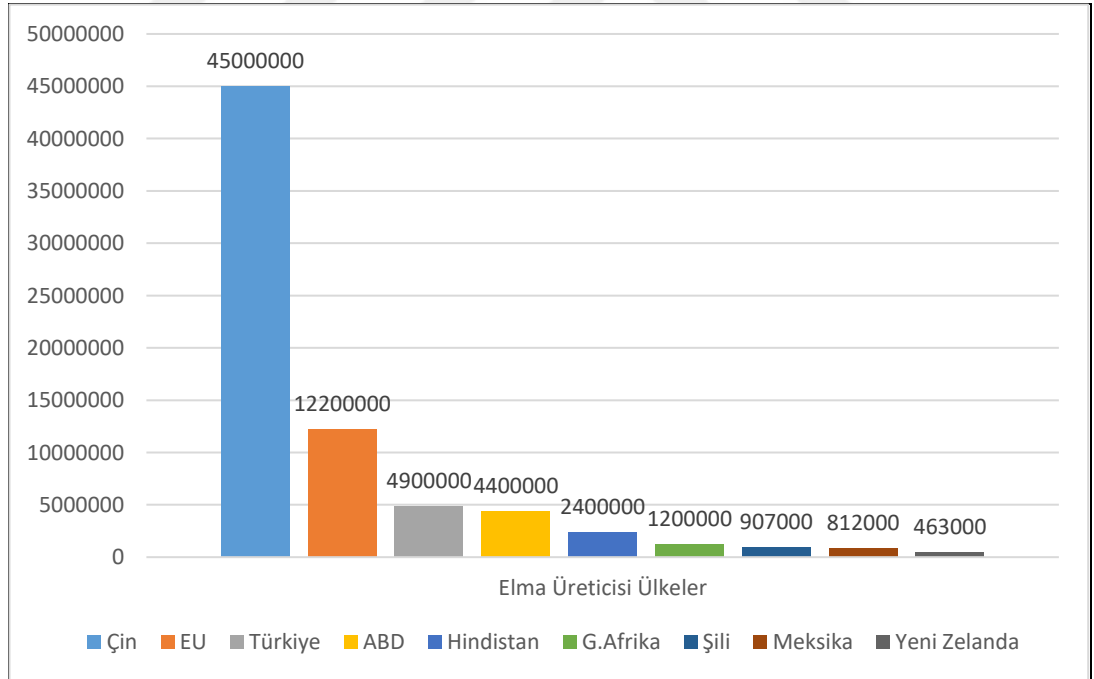
	Sayfa
Çizelge 3.1. <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonlarının isimleri, toplanma yerleri ve toplanma tarihleri	23
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan akarisitlere ait bilgiler	24
Çizelge 3.3. Seleksiyon çalışmalarında yapılan uygulama ve dozları	32
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primer isimleri, gen ve mutasyon bölgesi	39
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan probe isimleri, gen ve mutasyon bölgesi.....	39
Çizelge 4.1. <i>Panonychus ulmi</i> 'nin HS popülasyonunun S+A, spiroadiclofen+abamectin, spiromesifen, spiroadiclofen abamectin ve milbemectin'e karşı LC ₉₀ değerleri	42
Çizelge 4.2. <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonlarına ait bahçe popülasyonlarının S+A'e ait % etki değerleri	43
Çizelge 4.3. S+A'nın ayırıcı dozuna göre dirençli <i>P. ulmi</i> bahçe popülasyonlarının LC değerleri ve direnç oranları	43
Çizelge 4.4. <i>P. ulmi</i> 'nin selekte edilen dirençli IR popülasyonunun LC değerleri ve direnç oranı	44
Çizelge 4.5. G-2 popülasyonunda spiroadiclofen+abamectin, spiromesifen, spiroadiclofen, abamectin ve milbemectin'e karşı LC ₅₀ değerleri ve çapraz direnç oranları.....	46
Çizelge 4.6. M-1 popülasyonunda spiroadiclofen+abamectin, spiromesifen, spiroadiclofen abamectin ve milbemectin'e karşı LC ₅₀ değerleri ve çapraz direnç oranları.....	47
Çizelge 4.7. T-2 popülasyonunda spiroadiclofen+abamectin, spiromesifen, spiroadiclofen, abamectin ve milbemectin'e karşı LC ₅₀ değerleri ve çapraz direnç oranları.....	48
Çizelge 4.8. <i>Panonychus ulmi</i> 'nin HS ve IR popülasyonları spiromesifen, spiroadiclofen, spiroadiclofen+abamectin, abamectin ve milbemectin'e karşı LC _{50,90} değerleri ve çapraz direnç oranları.....	50
Çizelge 4.9. <i>Panonychus ulmi</i> 'nin T-2, HS, G-2, M1 ve IR popülasyonlarının estera z enzim aktivitesi	52
Çizelge 4.10. <i>Panonychus ulmi</i> 'nin T-2, HS, G-2, M1 ve IR popülasyonlarının GST enzim aktivitesi.....	53
Çizelge 4.11. <i>Panonychus ulmi</i> 'nin T-2, HS, G-2, M1 ve IR popülasyonlarının P450 enzim aktivitesi	53
Çizelge 4.12. Popülasyonlara ait DNA yoğunlukları ve saflık dereceleri	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACCCase	A karboksilaz enzimi
Buffer	Tampon çözelti
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
DEM	Diethyl maleate
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
dNTP	Deoksi-nükleotidtrifosfat
ECOD	7-ethoxycoumarin
GluCl	Glutamate-kapılı klorid kanalı
GSH	Glutasyon (reduced glutathione)
GST	Glutasyon s-transferaz (Glutathion S transferase)
IRAC	İnsektisit direnç eylem komitesi (Insecticide Resistance Action Committee)
LC ₅₀	Lethal konsantrasyon -50
LC ₉₀	Lethal konsantrasyon -90
ml	mililitre
MO	Monooksijenaz
mOD	Mili optik yoğunluk
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotid Phosphate
ng	nanogram
P450	Cytochrome P450
PBO	Piperonylbutoxide
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFU	Relative fluorescence units
RT-PCR	Real time PCR
TPP	Triphenyl phosphate
Tris	Tris Aminomethane
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
µL	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Türkiye, sahip olduğu coğrafi konumu sebebiyle yetiştiricilik açısından birçok meyve türünde olduğu gibi ılıman iklim meyvelerinin yetiştirilmesinde de uygun iklim koşullarına sahiptir. Türkiye hem bahçe bitkileri kültürünün doğuş yeri hem de dünyada yetiştiriciliği yapılan çok sayıda meyve türünün de anavatanı konumundadır (Sarı, 2011). Anadolu'yu da kapsayan Güney Kafkasya elmanın anavatanı olarak bilinmektedir. Elma, dünyanın birçok yerinde ve büyük alanlarda üretimi yapılan bir tür olarak ülkemiz için de yetiştiriciliği büyük oranda artış gösteren ve üreticiler için kayda değer tarımsal uğraşlardan biri olmuştur (Kaşka vd., 2005). Dünya elma üretimi 2023/2024 yılları veri tahminlerine göre 83.1 milyon ton'dur. Dünya elma üretim sıralamasına bakıldığında Çin 45 milyon (ton), Avrupa birliği ülkeleri 12.2 milyon (ton), Türkiye 4.9 milyon (ton), ABD 4.4 milyon (ton), Hindistan 2.4 milyon (ton), Güney Afrika 1.2 milyon (ton), Şili 907 bin (ton), Meksika 812 bin (ton) ve Yeni Zelanda 463 bin (ton)'dur (Şekil 1.1) (Anonim, 2023a).



Şekil 1.1. Dünya sıralamasında en çok elma üreten ülkeler (Anonim, 2023a)

Türkiye, elmanın anavatan konumlarından biri olup (O'Rourke, 2003) Orta Anadolu Bölgesinde yer alan Konya, Karaman ve Niğde'de, güney kısmında ise Isparta ilinde elma üretimi yoğun olarak gerçekleşmektedir.

Elma yetiştiriciliği yapılan diğer illere göre Isparta ili ekolojik koşulları açısından elma üretimi için önemli bir yere sahiptir. Elma, dekar alandan alınan ürün miktarının çok olması, çeşitlerinin fazla ve soğuk hava koşullarına dayanıklılık açısından önem arz eden ve üretici tarafından benimsenen bir meyve türüdür (Özongun vd., 2014). 1 230 000 ton üretimle Isparta 1. sırada yer almaktadır. Elma üretimi süresince yetiştiriciliğini kısıtlayan birden çok hastalık ve zararlı türü verim kaybına neden olmaktadır. Bu organizmalardan özellikle ana zararlı olan elma içkurdu ve farklı türler ciddi oranda ekonomik olarak kayıplar yaratmaktadır (Croft, 1975).

Elma bahçelerinde, ana zararlı konumunda olan Elma içkurdu'ndan sonra en fazla mücadelesi yapılan türler kırmızı örümceklerdir. *Panonychus ulmi* Koch. [(Acari: Tetranychidae), (Avrupa kırmızı örümceği)] ve *Tetranychus urticae* Koch [(Acari: Tetranychidae), (İki noktalı kırmızı örümcek)] elma üretim alanlarında ciddi tahribatlara ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Yaman vd., 2014; Van Leeuwen vd., 2015). *P. ulmi* 1940'lı yıllarda ekonomik olarak önem teşkil etmeyen bir zararlı iken (Chant, 1966), günümüzde ise kimyasal kullanımının artması ve faydalı organizmaların zarar görmesi sebebiyle elma üretimi yapılan alanlarda kayıplara neden olan zararlılarından biri olmuştur (Croft, 1975). *P. ulmi* 37 farklı bitki familyası içerisinde 151 farklı türde tespit edilmiştir. En çok tespit edildiği familyalar Fabaceae, Moraceae, Rosaceae, Rutaceae, Salicaceae, Ulmaceae ve Vitaceae'dir. Özellikle elma, bağ gibi sert ve yumuşak çekirdekli meyve türlerinde ciddi ekonomik kayıplar oluşturmaktadır (Doğan ve Sullivan, 2023). Konukçuluk eden bitkilerin öz suları ile beslenen *P. ulmi*, stiletleri ile dokulardaki parankima hücrelerinin parçalanmasına dolayısıyla klorofil seviyesinde azalmaya sebep olmaktadır (Yin vd., 2013). *P. ulmi*'nin yüksek popülasyon seviyesi, yaprakların bronzlaşmasına, erken yaprak dökülmesine ve elma ağaçlarındaki meyvelerin küçük, soluk renkli olmasına ve sonrasında ciddi ekonomik hasarlara neden olmaktadır (Rameshgar, 2019).

Ülkemizde ve dünyada zararlılarla savaşmada kimyasal mücadele uygulamasının kolay olması ve hızlı sonuç alınması en fazla tercih edilme nedenini ortaya koymaktadır. Kimyasal mücadelenin uygulamada birçok kolaylığı ile beraberinde getirdiği olumsuz etkilerinin de olduğu artık bilinmektedir. Çok sayıda çalışmada kullanılan kimyasal ürünlerin faydalı türler ve hedef dışında olan organizmaları etkilediği, zararlı türlerin direnç kazanması, birçok üründe kalıntıya ve doğa kirliliğine

sebebi olduğu bildirilmektedir (Ay vd., 2003; Ay ve Kara, 2011; Kaplan vd., 2012; İşçi ve Ay, 2013). Kırmızı örümcekler sahip oldukları kısa biyolojileri, arrhenotoki üreme şekilleri ve yüksek üreme kapasiteleri ile kullanımda olan birçok pestisitlere karşı direnç geliştirmektedir (Stumpf ve Nauen, 2001; Van Leeuwen vd., 2006, Ay ve Kara, 2011). Anonim (2023a)'a göre *T. urticae* 96 farklı aktif maddeye, *P. ulmi*'nin ise 48 farklı aktif maddeye direnç geliştirebildiği belirlenmiştir.

Dünya genelinde akarisit kullanımının %74'ü meyveler, bağ ve sebze alanları, %31'i turunçgiller, %23'ü elma ve armut, %22'ni de çay bitkisi oluşturmaktadır (Leuween vd., 2015). İnsektisitlerin ve akarisitlerin yoğun kullanımı, dünya genelinde birçok böcek ve akar türünde direnç oluşumuna neden olmuştur (Van Leeuwen vd., 2010). Yoğun kimyasal uygulamanın dezavantajlarından birisi zarara sebep olan türlere ait popülasyonlarda kullanılan bitki koruma ürünlerine direnç göstermesidir. Pestisitlerin sık uygulanması sonucunda zararlıların adaptasyonu artarak kullanılan pestisitlerde direnç gelişimine sebep olmuştur. Bu durumun genetik faktörlere dayanması ile de direnç, sonra gelen nesillere aktararak devam etmiştir (Çakır ve Yamanel, 2005). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) direnci, “normal bir popülasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin belirli bir dozuna karşı, aynı türün diğer popülasyonundaki bireylerin tolerans kazanma yeteneğinin gelişmesi şeklinde belirtmektedir” (Yorulmaz, 2008).

Son 25 yıldır dünyada zararlıların pestisitlere karşı oluşturduğu direnç mekanizmasının belirlenmesinde biyokimyasal metotlar en çok tercih edilen yöntemlerden biri olmuştur. Biyokimyasal yöntemlerin en büyük avantajları, kısa sürede sonuçlanması ve invitro koşullarda yapılmasıdır. Biyokimyasal çalışmaların sonucunda direnç daha kısa sürede tespit edilerek önlemler alınabilmektedir (Ay ve Yorulmaz, 2010).

Biyoassay yöntemler hızlı sonuç elde edilmesinden dolayı direnç çalışmalarında daha çok tercih edildiği bilinmektedir. Zararlının herhangi bir ilaca karşı direnç geliştirip geliştirmediğini belirleyebilmek için hassas bireyler ile dirençli olduğu düşünülen bireylerin laboratuvarda aynı koşullarda test edilmesi gerekmektedir. Laboratuvar koşullarında aynı türün hassas ve dirençli olduğu düşünülen bireyleri üzerinde yapılan deneme sonuçlarına göre ilaç dozları belirlenmektedir. Ölüm oranları arasındaki

ilişkiden yararlanmak için deneme sonuçlarına göre LD₅₀ ve LD₉₀ değerleri elde edilmektedir ve elde edilen değerlerin karşılaştırılması ile direnç geliştirip geliştirmediği belirlenebilmektedir. Direnç çalışmalarında, biyoassay deneylerde her bir zararlı türüne özgü bir doz-ölüm eğrisi bulunmaktadır. Uygulanan kimyasalın doz miktarı arttıkça ölüm oranı da artış göstermektedir. Doz artışı olduğunda ölüm oranındaki azalış yavaş bir şekilde seyrediyorsa organizma için uygulanan kimyasal ürüne karşı bir dayanıklılık olduğu bildirilmektedir (Toros vd., 2001).

Direnç gelişiminin nedenlerinin ortaya konulması için pestisitlerin etki mekanizmalarının bilinmesi fazlasıyla önem kazanmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda; zararlı türlerin pestisitlere karşı direnç kazanmasına sebep olan etki yeri mekanizmaları, zararlı organizmanın kimyasalı bünyesine az miktarda alması, detoksifikasyon mekanizmasının artış göstermesi ve hedef bölge yerinin duyarsız hale gelmesi ortaya konulan en önemli sebeplerdir. Direnç mekanizmalarının bilinmesinin iki önemli sebebi; çapraz direncin varlığını belirlemek ve alternatif kimyasalların seçiminde kolaylık sağlamaktır (Ay ve Kara, 2009). Meydana gelen bu direnç oluşumlarına bağlı olarak üreticiler doz artışını ya da sıklıkla kimyasal uygulama durumlarından birini seçmektedir. Bu uygulamalar doz artışına bağlı olarak ürünlerde pestisitlerin artmasıyla kalıntıya neden olmakta, faydalı türlerde yan etkilere, ekosistem kirliliğine ve ürünlerde girdi maliyetlerinin artmasına neden olmaktadır (Ay vd., 2013).

Pestisitlerin direnç mekanizmaları incelendiğinde zararlı organizmalarda yer alan iki direnç tipi vardır. Bunlar; davranışsal ve fizyolojik dirençtir. Davranışsal direnç, fizyolojik dirençle karşılaştırıldığında daha az anlaşılmaktadır. Davranışsal direnç, zararlı organizmanın ölümcül olduğunu kanıtlayan bir dozdan kaçınma yeteneğinin gelişmesi olarak tanımlanmıştır. Dolayısıyla davranışsal direnç ile fizyolojik direnç arasında bir ayrım vardır. Davranışsal direnç temel olarak uyarana bağlıdır ve aşırı duyarlılık söz konusudur. Pestisitlerin etkilerini azaltmaya veya engellemeye yönelik olarak zararlıların yaşam tarzını, beslenme alışkanlıklarını, üreme davranışlarını veya hareketlerini değiştirmelerini içerebilir. Davranışsal dirence sahip zararlılar normal zararlılara göre daha düşük pestisit konsantrasyonlarına yanıt verir, bu durum bunların pestisitleri normal zararlılardan daha iyi tespit eden reseptörleri olduğunu göstermektedir. Bu direnç tipi zararlıların pestisit uygulamalarına karşı daha az duyarlı

hale gelmesine neden olabilmektedir. Fizyolojik direnç, zararlının biyokimyasal yollarla dayanıklılık kazanması olarak tanımlanır. Fizyolojik direncin üç faktörü içerdiği bilinmektedir. Bunlar; azaltılmış penetresyon, hedef bölge duyarsızlığı ve gelişmiş detoksifikasyondur. Bu direnç faktörleri tek başına ortaya çıkmaz ve özellikle penetresyon ve metabolizma olmak üzere birbirleriyle etkileşime girerek direnci arttırdıkları bilinmektedir. Fizyolojik direnç, zararlı organizmaların pestisitlere karşı doğrudan fizyolojik veya biyokimyasal değişiklikler geliştirerek bu kimyasallara karşı daha az duyarlı hale gelmesi durumunu ifade eder. Bu tür direnç mekanizmaları genellikle enzimlerin aşırı üretimi veya değişimi, pestisit hedeflenen biyokimyasal süreçlerine karşı değişiklikler veya pestisit hücre içine girişini engellemek gibi şekillerde ortaya çıkabilir. Fizyolojik direnç, zararlı organizmaların pestisitlerin etkilerini etkili bir şekilde uzaklaştırmalarını sağlayarak pestisit uygulamalarının etkinliğini azaltabilmektedir. Azaltılmış penetresyon pestisiti kütikula içinde hapseden bir bağlayıcı protein veya lipid rezervuarı, kütikula içinde yer alan parçalayıcı bir enzim veya daha kalın ya da geçirgenliği daha az kütikula olmak üzere tanımlanmaktadır. İnsektilere karşı altı tip hedef bölge duyarsızlığı bilinmektedir. Bunlar; sinir duyarsızlığı, asetilkolinesteraz değişikliği, orta bağırsak hedef bölgesine bağlanmada azalma, mitokondriyal elektron taşıma zincirinde mutasyon, kitin sentaz ve lipid biyosentetik enzimlerdeki mutasyondur. Fizyolojik dirençte önemli rolü olan Sitokrom P450 (Monooksijenazlar), GST (Glutasyon S-transferazlar) ve Hidrolazlar detoksifikasyon mekanizmasında bulunan temel metabolik enzimlerdir (Yu, 2015).

Sitokrom P450 enzimi, böceklerde doğal savunma mekanizmalarının bir parçası olarak bulunurlar. Bu enzim böceklerde hormon, asit, steroit ya da böcek bünyesine alınan pestisit gibi maddelerin anabolizması ve katabolizmasını düzenleyen önemli metabolik bir sistemdir (Feyereisen, 1999). P450 enzimi böcek, bitki, kuş, bakteri ve memeliler gibi birçok organizmada bulunmaktadır. P450 enzim sisteminde temel oksidaz işlemi gerçekleştirilmektedir (Scott, 1999). P450'nin böcekler üzerinde büyüme, gelişme, beslenme gibi yaşamsal faaliyetler, pestisitlere karşı direnç ve tolerans gibi fonksiyonel görevleri bulunmaktadır (Pottelberge vd., 2008). Ayrıca bu enzim, 20-hidroksiekdizon ve gençlik hormonu gibi bazı böcek hormonlarının ve feromonlarının sentezi için de gerekli olmaktadır. Bu sebeple sitokrom P450 enzim engelleyicileri hormon sentezini dolaylı yoldan etkilemeleri holometabol böceklerde morfoloji, gelişme ve yaşam sürelerinde farklılıklara sebep olduğu bilinmektedir

(Soderlund, 1997). P450 enzimi, böceklerin özellikle orta barsak ve malpigi tüplerinde ve hatta dokuların birçoğunda belirlenmiştir. Bu enzim özellikle böceklerin yaşam süresince ergin oldukları dönemde yüksektir. Yumurta ve larva döneminde artan P450 enzimi pupa döneminde azalış göstermektedir (Feyereisen, 1999).

GST (Glutasyon S-transferaz) enzimi, hücrelerde bulunan bir enzim grubudur. Bu enzimler glutasyon adlı bir molekülü diğer moleküllere transfer ederek kimyasal reaksiyonlara katılırlar. GST enziminin ana görevi, hücreleri toksinlerden, zararlı bileşiklerden ve oksidatif stresten korumaktır. GST, detoksifikasyon mekanizmasında bulunan temel enzimlerden birisidir. Böceklerde bu enzim grubu insektisitlerin toksik etkilerine karşı temel bir savunma olarak bilinmektedir. Lepidoptera, Diptera, Coleoptera ve Hymenoptera takımlarının içinde bulunduğu böceklerden GST enzimi saflaştırılmıştır. Böceklerde bulunan GST enzimi 19 000 - 35 000 da moleküler ağırlığında olup, homodimer ve heterodimer olmak üzere 2 kısımdan oluşmaktadır (Yu, 2008). GST'lar glutasyon (GSH)'nın konjugasyonundan sorumlu fonksiyonel enzimler olarak bilinirler. Böceklerde bulunan GST enzimi faz I aşamasından sonra insektisit detoksifikasyonunu katalize etmektedir (Vontas vd., 2000).

Esteraz enzimleri böceklerde hayatta kalma, çevresel uyum ve üreme, feromon ve hormon metabolizması, sindirim sistemi, sinir iletimi ve insektisitlere direnç gibi birçok önemli mekanizmada rol almaktadır. Böcekler, bitkilerin savunma bileşikleri veya pestisitler gibi kimyasal maddelere maruz kalabilmektedirler. Esteraz enzimi, bu kimyasal maddelere karşı direnç geliştirmelerine yardımcı olarak detoksifikasyon sağlayabilmektedir. Enzimler, toksinleri parçalayarak etkisiz hale getirirler. Böceklerde insektisitlere karşı direnç gelişiminde özellikle asetilkolinesterazlar ve karboksilesterazlar rol oynamaktadır. Bu esteraz grupları organik fosforluların engellenmesinde önemli rol oynamaktadır (Baffi vd., 2005).

Çapraz direnç, bir zararlı organizmanın bir tür pestisite karşı geliştirdiği direncin, başka bir pestisite karşı da geçerli olması durumunu ifade eder. Yani, zararlı organizma bir pestisite karşı direnç geliştirdiğinde, bu direnç diğer benzer pestisit gruplarına da etki edebilir. Bu durum farklı pestisit gruplarından gelen kimyasalların benzer veya ortak mekanizmaları hedeflediği durumlarda ortaya çıkabilmektedir. Çapraz direnç, zararlıların kontrolü için kullanılan farklı pestisit türlerinin etkisiz hale gelmesine yol

açabilir ve pestisit yönetim stratejilerini zorlaştırabilir. Çapraz direncin üç mekanizmadan kaynaklandığı bilinmektedir. Bunlar;

- 1) Pestisit moleküllerini spesifik olmayan enzimlerin (sitokrom P450 gibi) detoksifiye etmesi,
- 2) İnsektisitlere duyarlılığın azalması, hedef bölgesindeki mutasyon
- 3) Kütikula penetrasyonu gibi fiziksel faktörlerdir (Yu, 2008).

Kimyasal savaşında genellikle pestisit sınıfları içinde ve arasında geniş bir çapraz direnç görülür ve bu da yeni pestisitlere 2-4 yıl içinde dirençle sonuçlanır (Grbic vd., 2011).

Kırmızı örümcekler ve diğer zararlılarda direnci engellemek veya geciktirmek amacı ile son yıllarda pestisit üreten firmalar farklı aktif maddeleri karıştırarak karışım formülasyonları geliştirmektedirler. Hatta yeni bir aktif maddenin bulunmasının zorlaşması, birçok aktif maddenin yasaklanması/kısıtlanması ve artan ruhsatlandırma kriterleri de bu karışım formülasyonlarının artışına neden olmuştur. Ayrıca üreticiler ve pestisit üretim firmaları bu karışım formülasyonlarını bir çözüm olarak görmektedirler. Fakat bu pestisit karışımlarının direnç oluşumunu engellemek için gerçekten çözüm olup olmadığı hatta daha karmaşık bir soruna neden olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir.

Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü Bitki Koruma Ürünleri veri tabanına göre insektisit+insektisit, akarisit+akarisit ve insektisit+akarisit karışımlarının ruhsatlı formülasyon sayısı yaklaşık 1345 adettir (Anonim, 2023).

İnsektisit ve akarisit karışımlarının temel amacı, böcekler ve akarlar aynı anda ortaya çıkabildiğinden hem uygulama yönünden hem de finansal kaynaklardan tasarruf etmektir. Son yıllarda pestisit karışımları tarımda üretim maliyetlerini en aza indirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu tür uygulamaların hedef organizmalara yönelik sonuçları halen tam olarak bilinmemektedir. İki veya daha fazla pestisit karıştırılması bazen sinerjistik etkilere yol açabilir. Bu durum hedef organizmaların daha hızlı ve etkili bir şekilde kontrol edilmesine yardımcı olabilir. Ancak hedef dışı organizmalara ve çevreye daha fazla risk de taşıyabilir. Karışım pestisitlerinin kullanımının maruz bıraktığı ekosisteme etkilerinin olmasının yanı sıra, zararlı

organizmaların bu pestisitlere karşı direnç oluşturmalarına yol açabilir. Özellikle bir kombinasyon sıkça kullanılıyorsa zararlıların bu karışıma direnç kazanması mümkündür. Karışım pestisitlerin etkileri, hangi bileşenlerin kullanıldığına, hangi oranlarda karıştırıldığına ve nasıl uygulandığına bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Bu nedenle, bu tür kimyasalların tarım uygulamalarında kullanımı yerel düzenlemelere ve sürdürülebilir tarım ilkelerine uygun bir şekilde yapılmalıdır. Ayrıca entegre zararlı yönetimi ve çevresel etkileri minimize etmeye yönelik stratejiler önem arz etmektedir. Karışım formülasyonlarının kullanımı, tarımsal zararlılarla mücadelede olumlu ve olumsuz etkilere sahip olabilmektedir. Olumlu tarafından ele alınacak olursa, farklı etken maddelerin kombinasyonu zararlılara karşı daha etkili bir kontrol sağlayarak direnç gelişimini azaltabilmekte veya geciktirebilmektedir. Farklı etken maddelerin kullanılması, tek bir etkene dayalı direnci engelleyebilmektedir. Karışım pestisitler, birden fazla zararlı türe karşı etkili olabilir. Bu durum farklı zararlı türlerin aynı anda bulunduğu durumlarda daha etkili bir mücadele sağlayabilmektedir. Farklı etken maddelerin kombinasyonu, her bir etkili maddeye tek başına gereken dozdan daha düşük dozlarda uygulanmasına izin verilebilir ve bu kimyasal kullanımını azaltarak çevresel etkileri hafifletebilmektedir. Karışım pestisitlerin düzensiz veya aşırı kullanımı, zararlı organizmalarda direnç gelişimini hızlandırabilir. Doğru doz ve uygun dönemde yapılmayan uygulamalar dirençli popülasyonların oluşmasına yol açmaktadır. Karışım pestisitler bazı durumlarda tek bir etkene dayalı ürünlere göre daha maliyetli olabilir ve bu da üreticilerin tercihlerini etkileyebilmektedir. Karışım formülasyonların kullanımı doğru şekilde planlandığında ve uygulandığında olumlu sonuçlar verebilirken dikkatsiz kullanımı olumsuz sonuçlara neden olabilmektedir. Bu nedenle, entegre zararlı yönetimi prensipleri doğrultusunda akılcı kullanım ve dikkatli planlama önem taşımaktadır (Yu, 2008).

Bazı pestisit karışımları, tek başına pestisit ile karşılaştırıldığında hedef organizma üzerindeki biyolojik etkiye müdahale etmenin yanı sıra pH'ı, elektriksel iletkenliği, sprey çözeltisi stabilitesini değiştirebilmektedir (Petter vd., 2013).

Pestisit karışımları sprey solüsyonlarının fizikokimyasal ve hatta biyolojik özelliklerini etkileyebilir (Van Leeuwen vd., 2007; Petter vd., 2013). Ürünlerin karıştırılmasıyla kimyasal değişiklikler ve moleküllerin yeniden düzenlenmesi insektisit toksisitesini değiştirmiş olabilir. Ayrıca pestisit karışımları hedef

organizmadaki metabolik detoksifikasyondan sorumlu olan enzimlerin aktivitesini de değiştirebilir ve dolayısıyla beklenen insektisit toksisitesini azaltabilir (Reffstrup vd., 2010).

Direnç, hedef bölgeye ulaşabilen pestisit dozunun azaltarak veya pestisit hedef bölgesini değiştirerek gelişmektedir. Böcekler ve akarlardaki tüm direncin %90'ından fazlası hedef bölge direnci veya detoksifikasyon enzimlerinin direnç (metabolik direnç) geliştirmesinden kaynaklanmaktadır (Van Leeuwen vd., 2009).

Ülkemizde yapılan direnç ile ilgili çalışmalar daha çok biyoassay ve biyokimyasal çalışmaları kapsamaktadır. Ancak son yıllarda dünyada bütün diğer alanlarda olduğu gibi direnç mekanizmalarının tam olarak açıklanmasında artık moleküler yöntemler de kullanılmaktadır.

Pestisitlerin, Artropodlar üzerindeki etkisinin araştırılmasında fenotipik hassasiyet belirleme çalışmalarının yanı sıra genotipik mekanizmalarının da bilinme gereksinimi ile beraber direnç mekanizmalarının belirlenmesi çalışmalarında moleküler metodların kullanımı artmıştır. Zararlı türlerde insektisit/akarisit direnç gelişiminde önemli bir etkisi olan mekanizmalardan birisi de mutasyonlar ya da tek nükleotid polimorfizmidir. İnsektisit/akarisit direncine sebep olan mutasyonlar genetik sekanstaki bir varyasyondan kaynaklandığı gibi, nükleotid değişimi kaynaklı olarak da karşımıza çıkabilmektedir (Yorulmaz vd., 2021). Mutasyonlar, insektisit veya akarisit hedef etki yerinde yapısal değişiklikler meydana getirerek toksisitenin azalmasına neden olmaktadır (Van Leeuwen ve Dermauw, 2016). Artropodlarda direnç gelişim durumlarının %90'ından fazlası hedef bölge mutasyonlarından ya da detoksifikasyon enzim seviyesi artışlarından kaynaklanmaktadır (Van Leeuwen vd., 2009; Van Leeuwen ve Dermauw, 2016).

Moleküler teknikler sayesinde zararlıların genetik yapıları ve direnç mekanizmaları daha iyi anlaşılmaktadır. Bu anlayış, tarımda kullanılan pestisitlere karşı direnç gelişimini daha iyi izlememizi ve anlamamızı sağlamaktadır. Aynı zamanda zararlı popülasyonlarındaki direnç mekanizmalarını belirlemek, çeşitli bölgelerdeki direnç durumunu değerlendirmek ve yönetim stratejileri geliştirmek için kullanılabilir.

Bu çalışmada Isparta ili elma yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı üretim merkezlerinden biridir. Elma tarımının devamlı yapıldığı bu bölgede hastalık ve zararlı organizma etmenleri karşımıza sıklıkla çıkmaktadır. Buna istinaden bölge üreticisinden gelen şikâyetler de artış göstermektedir. Özellikle üreme kapasitesinin yüksek oluşu ve çok sayıda döl vermesi sebebiyle kırmızı örümcek mücadelesi üretici taleplerinin en başında gelmektedir. Bölge üreticisine bildirilen tahmin ve erken uyarı sisteminden gelen ilanlar da dahil olmak üzere yetiştiriciliğin yapıldığı sezon boyunca *P. ulmi*'ye karşı çok sık akarisit uygulamaları yapılmaktadır. Önerilen dozun üstüne çıkılması, sık ve bilinçsiz yapılan bu uygulamalar direncin hızla gelişmesine yol açmaktadır. Son yıllarda üreme potansiyeli yüksek olan zararlılar için özellikle kırmızı örümceklerde direnci geciktirmek ve direnç oluşumunu önlemek amacıyla pestisit üretici firmalar karışım formülasyonları geliştirmişlerdir. Üretici firmaların farklı etkili maddeleri karıştırarak geliştirdikleri, çözüm olarak piyasaya sürdükleri bu karışım formülasyonlarının direnç sorununu çözüp çözmediği ile ilgili kesin bir bilgi şu ana kadar bilinmemektedir. Akarisit direnci ile ilgili literatür çalışmaları incelendiğinde spiromesifen ve abamectin bitki koruma ürünleri ile ilgili yapılan çalışma sayısı fazla iken spiromesifen+abamectin karışım formülasyonu ile ilgili çalışma sayısının çok az olduğu belirlenmiştir. Yapılan bu araştırmada, spiromesifen+abamectin (S+A) karışımı ile selekte edilen *P. ulmi* popülasyonunun (IR) ve Isparta ili elma bahçelerinden toplanan *P. ulmi* popülasyonlarında S+A karışım formülasyonuna göstermiş olduğu direnç, yine bu karışımın aynı gruptan olan milbemectin, spiromesifen, spirodiclofen, abamectin ve spirodiclofen+abamectin'e çapraz direnç direnç durumlarının ortaya konulması, direnç geliştiren popülasyonlarda metabolik direnç ile hedef bölge yeri mutasyon tespiti belirlenerek direnç mekanizmasındaki rolleri ortaya konmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tarım ürünlerinde zararlılarla mücadelede pestisitlerin sık uygulanmasının sebep olduğu temel sorunlardan biri de hedefte olan zararlı türlerde direnç gelişimidir (Ay ve Gürkan, 2005). Kullanılan pestisitler en çok direnç kazanan türler arasında kırmızı örümcek türleri bulunmaktadır. Tetranychidae familyası üzerine yapılmış direnç çalışmalarının %80'i sadece *Tetranychus* ve *Panonychus* cinslerine ait olup, "Arthropoda Resistance Data Base" göre *T. urticae* 96 adet farklı aktif maddeye ve *P. ulmi*'nin ise 48 adet farklı aktif maddeye direnç geliştirmiştir (Yalçın 2013; Anonim, 2023a).

Pree ve Wagner (1987), Güney Ontario'da 45 meyve bahçesinden cyhexatin ve dicofola maruz kalmış *P. ulmi* popülasyonları toplayarak arazide ve laboratuvar da biyoassay denemeleri yapmışlardır. Labotuvardaki biyoassay denemelerinde cyhexatine 8.5 kat direnç, dicofola da 15 kat direnç olduğunu belirlemişlerdir. Arazi popülasyonlarında ise cyhexatine aktif maddesinin popülasyonun %29'unda direnç geliştirdiğini; dicofol için ise 45 biyoassayden 2 tanesinde direnç olduğunu belirtmişlerdir.

Nauen vd. (2001), farklı *T. urticae* ve *P. ulmi* larvalarında abamectin, azocyclotin, chlorpyrifos, clofentezine, deltamethrin, fenpyroximate, hexythiazox ve pyridaben toksisitesi ve direncini tespit etmişlerdir. 1996 yılında Japonya'da toplanan *T. urticae* larva populaslarından birinde mitokondriyal taşıma inhibitörleri olan pyridaben ve fenpyroximate sırasıyla 2000->4000 kat direnç olduğunu belirlemişlerdir. Avustralya orijinli diğer *T. urticae* popülasyonunda ise clofentezine and hexythiazox >770- ve >1000 kat direnç göstermiştir. Aynı direnç durumu *P. ulmi* popülasyonunda da gözlemlenmiştir.

Stumpf ve Nauen (2002), abamectine karşı *T. urticae*'nin larva dönemi üzerinde direnç durumunu araştırmışlardır. Hassas WI popülasyonu ile diğer popülasyonları karşılaştırdıklarında (GSS, AU, Akita, NL-00 ve COL-00 popülasyonları) en yüksek 54 ve 26 kat direnç oranı ile NL-00 ve COL-00 popülasyonları bulunmuştur. Esteraz enzim seviyesinde yüksek oranda bir artış olmadığı, popülasyonların okuma değerleri hassas (GSS) ile karşılaştırıldığında birbirine yakın düzeyde olduğu belirlenmiştir.

GST enziminde artış olduğu, NL-00, COL-00 ve BR3-00 popülasyonlarında enzim değerleri sırasıyla 11, 5.80 ve 7.70 olarak belirlenmiştir. Araştırma sonunda esteraz enzim aktivitesinin abamectin direncinde çok etkili olmadığını GST enzim aktivitesinin direnç gelişiminde rol aldığını belirtmişlerdir.

Auger vd. (2003), Güney Fransa'dan elma bahçelerinden topladıkları *P. ulmi* popülasyonlarında fenazaquin'e 19.8-28.8 kat, tebufenpyrad'a 16.8 to 39.8 kat direnç belirlemişlerdir.

Sato vd. (2004), fenpyroximate dirençli *T. urticae* popülasyonunun dimethoate ve pyridabene karşı çoklu direnç geliştirdiğini; propargite, abamectin, milbemectin, fenpropathrin ve cyhexatine karşı direnç geliştirmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca fenpyroximate dirençli *T. urticae* popülasyonunda direnç kalıtımının monogenik olduğunu tespit etmişlerdir.

Van Leeuwen vd. (2005), laboratuvar koşullarında üretilen *T. urticae* hassas popülasyon LS-VL ile dirençli popülasyon MR-VL popülasyonunda bazı akarisitlerin direnç durumunu araştırmışlardır. Abamectine karşı LS-VL ile MR-VL popülasyonlarında LC₅₀ oranının 0.31 mg/l olduğu bildirilmiştir.

Kumral ve Kovancı (2007), Bursa'nın farklı elma bahçelerinden topladıkları *P. ulmi* popülasyonunun dişi bireylerinde bazı akarisitlerin duyarlılık düzeylerini belirlemişlerdir. Hassas popülasyonun dirençli popülasyona kıyasla LC₅₀ değerleri sırasıyla; amitraz, dicofol, bromopropylate ve fenpyroximate için 2.2'den 11.9'a, 0.8'den 3.6'a, 1.0'dan 22.5'a ve 0.9'dan 7.9'a yükselmiş, LC₉₀ değerleri 1.6'dan 9.8'e, 1.0'den 5.4'e, 1.0'den 47.4'e, 1.4'den 36.6'a yükseldiğini belirlemişlerdir.

Negm vd. (2009)'nin yaptıkları bir araştırmada *T. urticae* popülasyonunda abamectin'e karşı kırk döl boyunca yaprak daldırma metodu ile selekte etmişlerdir. Seleksiyon öncesi kırmızı örümceğin verileri ile karşılaştırıldığında oluşan direnç oranının 41.3 katı olduğu bildirilmiştir. Esteraz enzim seviyesinin seleksiyon öncesi 0.77 µg/akar/dakika, seleksiyon sonrası direnç gelişen popülasyonda ise 2.08 µg/akar/dakika olduğu kaydedilmiştir. Başlangıç seviyesi ile karşılaştırıldığında enzim düzeyinde 2.70 kat direnç geliştiğini belirlemişlerdir. Sitokrom P-450 enzim

aktivitesinin popülasyonun başlangıç seviyesi ile seleksiyon sonrası seviyesi sırası ile; 11.30 ile 47.90 µg/akar/dakika olarak belirlenmiştir. Popülasyonun başlangıç durumu ile karşılaştırıldığında 4.30 kat sitokrom P-450 enziminde direnç geliştiği tespit edilmiştir. Sonuçta, abamectin etken maddesine gelişen direncin P-450 enziminin sebep olabileceğini belirlemişlerdir.

Kwon vd. (2010a), *T. urticae* popülasyonlarında abamectin dirençli ve hassas olan ırklarında abamectin direncinin moleküler mekanizmasının ve genetiğinin hedef yeri duyarsızlığı ile ilişkisini araştırmışlardır. Dirençli ve hassas ırklar arasında g-amino butrik asit (GABA)-gated chloride channel geninin tam-uzun cDNA fragmentlarının klonlaması ve sekansının polimorfizminde farklılık çıkmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, *T. urticae*'nin glutamat kapılı klorid kanalı genin (*TuGluCl*) tam-uzun cDNA fragmentinin sekans kıyaslamasında abamectin direnci ile ilişkili G323D genini belirlemişlerdir.

Kwon vd. (2010b), *T. urticae* popülasyonlarında sinerjistleri uygulayarak abamectin direncine neden olan mekanizmayı belirlemeye çalışmışlardır. Uygulanan esteraaz enzim engelleyicisi TPP ve sitokrom P-450 enzim engelleyicisi PBO sinerjistlerinin abamectin direncinde bu enzimlerin metabolik olarak rol oynadıklarını belirlemişlerdir.

Kramer ve Nauen (2011), Avrupa ülkelerinden toplamış oldukları 63 adet *P. ulmi* popülasyonunda spiroadiclofene direnç geliştirip geliştirmediğini belirlemişlerdir. *P. ulmi*'in yumurtalarında direnç belirlenemezken, larva dönemlerinde popülasyonlara göre değişen oranlarda direnç saptamışlardır.

Karatolos vd. (2012), birkaç akar türünde direnç gözlemlmelerine rağmen, beyazsinek gibi bu gruba ait böceklerde spiromesifen direncine ait kayıtların olmadığını söylemişlerdir. Sera beyazsineği (*Trialeurodes vaporariorum*)'nin İngiltere ve Avrupa popülasyonlarında ölüm oranları hesaplanmış ve spiromesifene 26 kat direnç bulunmuştur. Böylelikle bu önemli zararlı için spiromesifen direncinin moleküler mekanizmalarının açıklanmasının altı çizilerek vurgulanmıştır. Tam uzunlukta olan A Karboksilaz enzimi geni çeşitli *T. vaporariorum* popülasyonları için dizili olarak ve spiromesifen direnci ile arasında güçlü bir ilişki olduğunu hatta bir

glutamik asit ikamesi olan bu genin 645 (E645K) konumundaki lisin olduğunu bulmuşlardır. TaqMan yöntemi ile alel ayrımı denemelerinin bulgularının doğrulandığını saptamışlardır.

Ilias vd. (2012), Yunanistan'dan alınan spirodiclofen ve spiromesifen dirençli *T. urticae* ve *Bemisia tabaci* popülasyonlarında diğer pestisitlere göre çeşitli direnç seviyelerini ve her iki zararlı için direnç yönetim stratejilerinde potansiyel rol oynadığını değerlendirmek için araştırmışlardır. *T. urticae* popülasyonlarında spirodiclofen'e karşı direncin gözlenmediğini tespit etmişlerdir. 10 tane *T. urticae* popülasyonundan 9 adedinin pirimifos-metil (23 kata kadar), piridaben (39 kata kadar) ve fenazaquine (42 kata kadar) orta derecede direnç gösterdiğini, bifentrin (RR $\frac{1}{4}$ 81, 351) ve fenbutatin okside (RR $\frac{1}{4}$ 146) de yüksek direnç oranları (RR) olduğunu saptamışlardır. Üstelik bu 9 popülasyonun spirodiclofene karşı çapraz dirençli olmadığını da belirtmişlerdir (RR <5). *B. tabaci*'de de spiromesifen denemelerine cevap olarak varyasyon 11 arazi popülasyonu arasında çok düşük olduğunu bulmuşlardır. Bunların çoğunun da imidacloprid ve alphacypermethrine karşı yüksek direnç gösterdiğini, spiromesifenin LC₅₀'sinin 4.5 ila 14 mg / l arasında ve karşılık gelen LC₉₅ değerlerinin de genel olarak önerilen arazi dozlarının altında olduğunu bulmuşlardır.

Çağatay vd. (2014), Isparta'da elma bahçelerinden toplanan *P. ulmi* popülasyonlarında abamectin, chlorpyrifos ethyl ve bifenthrin'e karşı direnç düzeylerini incelemişlerdir. LC₅₀ değerlerine bakıldığında, bahçelerden toplanan *P. ulmi* popülasyonlarının abamectin, chlorpyrifos ethyl ve bifenthrin'e karşı göstermiş olduğu direnç oranları sırasıyla 0.75-2.25, 0.57-1.76 ve 1.19- 3.78 kat arasında değiştiği belirtilmiştir.

Ferreira vd. (2014), 4 farklı *T. urticae* popülasyonunda abamectin direncini değerlendirmek için çalışmalar yapmışlardır. Aynı zamanda, dokuz akariste karşı çapraz direnç değerlendirilmiş ve abamectin direncinin genetik temellerini belirlemişlerdir. Direnç kalıtımını belirlemek için dirençli ve hassas popülasyonlar arasında karşılıklı geçişler yapıldığını belirtmişlerdir. Bonito ve Brejo (Pernambuco eyaleti, Brezilya) popülasyonları, abamectine ve METI grubu dahil test edilen diğer akarisitlere karşı oldukça dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Milbemectinin sahada kullanılmadığını ve aynı etki mekanizmasına sahip olduğu için abamectin ile

milbemectin arasında çapraz direnç geliştiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın kalıtım bulgularının, Bonito ve Brejo popülasyonlarında abamectine karşı direncin, otozomal, eksik resesif ve çok faktörlü olduğunu tanımlamışlardır.

Yaman vd. (2014), Isparta ili elma bahçelerinden alınan *P. ulmi* popülasyonlarında etoxazole, spiroticlofen, hexythiazox'a karşı direnç ve detoksifikasyon (esteraz, GST, P450 ve asetilkolinesteraz) enzim seviyelerini belirlemişlerdir. Bu popülasyonların spiroticlofen'e karşı direnç seviyeleri <1-1.95 kat, hexythiazox'a <1-2.36 kat ve etoxazole <1-7.30 kat arasında değiştiği bildirilmiştir. Tüm popülasyonlarda detoksifikasyon enzim seviyeleri farklı substratlarla biyokimyasal olarak incelemiş olup, detoksifikasyon enzimlerinin düzeylerinin popülasyonlara göre değiştiğini tespit etmişlerdir.

Demaeght vd. (2014), *T. urticae*'de etoxazole direncinin kitin sentezi 1(CHS1) mutasyonla ilişkili olduğunu ve hexythiazox dirençli *T. urticae* popülasyonunda hexythiazox, clofentezine ve etoxazole aktiflerinden herbirine karşı direncin resesif ve monogenik olduğunu belirlemişlerdir. Her üç akar site karşı direnç gelişiminin genetik temelini bulk segregant analiz yöntemi ile incelemişlerdir. Hexythiazox dirençli *T. urticae* popülasyonunda test edilen her üç akar site karşı olan direnci CHS1 geninde olan mutasyonla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bajda vd. (2015), *Panonychus* ve *Tetranychus* cinslerinin farklılaşmasının ardından detoksifikasyon gen ailelerine yönelik çalışma yapmışlardır. Direnç ile ilişkili gen ekspresyonu değişikliklerini tanımlamak için spiroticlofene duyarlı ve dirençli popülasyonlardan alınan replike edilmiş RNA sekansı verilerini kullanmışlardır. Sitokrom P450 enziminin yanı sıra çoklu karboksilkolinesterazlar, duyarlı ve dirençli popülasyonlar arasında farklı şekilde eksprese edilmiş ve *P. ulmi* popülasyonlarını kontrol etmek için yaygın olarak kullanılan spiroticlofene direnci anlamak için moleküler çalışmalar adına bir giriş noktası sağlamışlardır.

Ilias vd. (2016), *T. urticae*'de avermectin direnç mutasyonları GluCl G314D ve G326E, pyrethroid direnç mutasyonları voltaj kapılı sodyum kanalında F1538I olarak rapor etmişlerdir. *T. urticae* arazi popülasyonlarında bu mutasyonların varlığını ve sıklığını izlemek için TaqMan moleküler tanı deneylerini geliştirmişlerdir.

Abamectinde direnç gelişimine sebep olan G314D ve G326E mutasyonlarının sıklığı iki popülasyonda sabitlenmiş (G314D için > % 97.50 ve G326E içinse % 100) bir mutasyon oranı olduğunu tespit etmişlerdir. Üç popülasyonda ise düşük sıklıkta olduğu (%5 – 12.50) belirlenmiş diğer altı popülasyonda ise tespit edilmediğini belirlemişlerdir.

Çağatay vd. (2018)'nin yapmış oldukları bu çalışmada Antalya ve Muğla illerinden toplanan 3 farklı *T. urticae* popülasyonunda abamectin direncinin karakterizasyonu ve tanımlanmasını ortaya koymuşlardır. Toplanan bu popülasyonlarda hassas popülasyona kıyasla 223 ve 404 kat arasında değişen yüksek direnç seviyeleri belirlenmiştir. Bazı sinerjistlerle (PBO, DEM ve IBP) abamectin etkileşiminin 3 popülasyondaki dirençlerde esterazların olası etkisini gösterdiğini analiz etmişlerdir. Tüm arazi popülasyonlarında ise esteraz, glutathione S-transferaz ve P450 aktivitesinin hassas popülasyona göre yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Abamectin direncinin varlığının bilinmesi amacıyla hedef bölge mutasyonlarının (G314D ve G326E) GluCl üzerinde araştırma yapmışlardır. Fakat 3 popülasyonda hedef bölge mutasyonlarının olmadığı tespit edilmiştir.

İnanıcı ve Ay (2018), *P. ulmi*'nin milbemectin'e karşı oluşturduğu direnç gelişimi, direnç kalıtımı ve biyokimyasal direnç mekanizmasını araştırmışlardır. *P. ulmi* hassas popülasyonunda milbemectinin LC₅₀ ve LC₇₀ dozları sırasıyla 0.117 ve 0.264 µl/ 100 ml su, hassas popülasyon 5 seleksiyon sonunda LC₅₀ değeri 0.870 µl/ 100 ml su ve direnç oranı da 7.43 kat arttığı tespit edilmiştir. Direnç kalıtım çalışmalarında, M5 ♂ X GSS ♀ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F₁ dişilerinde, D = 0.56; GSS ♂ X M5 ♀ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F₁ dişilerinde ise, D = 0.06 olarak bulunmuştur. Biyokimyasal çalışmalarda ise esteraz, GST enzimi ve P450 enzimleri sırasıyla α-naftyl asetat, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ve 7-ethoxycoumarin (7-EC) substratları ile belirlenmiştir. Seleksiyon popülasyonunda esteraz, GST ve P450 enzimleri sırasıyla başlangıç popülasyona göre 1.67, 0.57 ve 2.09 kat arttığını bildirmişlerdir.

Farahani vd. (2018) Karaj (KrS) ve Mahallat (MhR)' dan toplanan 2 hassas *T. urticae* popülasyonunda spiroadiclofeni karşılaştırmışlardır. KrS ve MhR popülasyonlarının LC₅₀ değerleri arasında önemli fark bulmuşlar ve direnç oranlarını 22.19 olarak

saptamışlardır. Sinerjist çalışmaları sonucunda ise spirodiclofen ile spirodiclofen + PBO ve spirodiclofen + TPP MhR popülasyonunda LC₅₀ değerleri arasında önemli fark bulmuşlardır. En iyi sinerjist etkisi PBO ile ilişkili MhR popülasyonunda belirlenmiştir. MhR popülasyonunda KrS popülasyonuna oranla en fazla aktivitenin sitokrom P450 (3.02) ile ilişkili olduğunu ve en düşük oran aktivitesinin de GST (1.40) ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, bu sonuçların esterase ve sitokrom P450'nin muhtemelen *T. urticae* spirodiclofen direncinde rol oynadığını bildirmişlerdir.

Rameshgar vd. (2019a), İran *P. ulmi* popülasyonlarında direnç karakterini incelemişler ve çoklu metabolik mekanizmaların abamectin direncinde rol oynadığını saptamışlardır.

Rameshgar vd. (2019b), Marand (direnç oranı, RR:149), Marağh (RR:90) ve Mianeh2 (RR:71) *P. ulmi* popülasyonları, daha hassas Shahin Dej popülasyonuna kıyasla fenpropratre karşı yüksek düzeyde direnç belirlemişlerdir. Direnç oranı 2 ile 20 kat arasında değişen fenvalerate için de direnç gözlenmiştir. Sinerjist ve enzim aktivitesi sonuçlarının detoksifikasyon enzimleri için küçük bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Daha önce piretroid direnci sağladığı gösterilen VGSC, L1024V mutasyonlar ve F1538I'deki iki amino asit ikamesi, üç dirençli *P. ulmi* popülasyonunun hepsinde tespit edilmiş ve hedef bölge duyarsızlığı olduğunu bildirmişlerdir. Direnç mutasyonları ve VGSC kopya sayısı varyasyonu arasındaki bağlantının bu alanda *P. ulmi*'nin piretroid direncini izlemek için moleküler göstergeleri geliştirmek için kullanılabileceğinden, gelecekteki çalışmaların konusu olduğunu belirtmişlerdir.

Yu vd. (2019), Brown planthopper'ın (BPH) beş ticari insektisiti (permetrin, klorpirifos, imidacloprid, clothianidin ve thiamethoxam) ve bu insektisit karışımlarının toksisitesini araştırmışlardır. Permetrin / klorpirifos karışımının sinerjik etki mekanizmasının, sitokrom P450 ve esterase aktivitesinin inhibisyonundan kaynaklanabileceğini bulmuşlardır. 50 ppm permetrin +50 ppm klorpirifos karışımının tek başına permetrin veya tek başına klorpirifostan ziyade saha kontrol etkinliğini arttırdığını gösterdiğini vurgulamışlardır. Sonuç olarak bu çalışmanın permetrin ve

klorpirifos karışımının 1: 1 oranında karıştırılmasının çeltik alanındaki BPH kontrolü için etkili bir yöntem olabileceğini göstermişlerdir.

Badieinia vd. (2020), Urmia ve Shahin Dej *P. ulmi* popülasyonu, duyarlı Ahar *P. ulmi* popülasyonuna kıyasla en yüksek spiroadiclofen direnç oranını 150 kattan fazla olduğunu belirlemişlerdir. Spiromesifen ve spiroadiclofen arasında orta derecede çapraz direnç varlığını ortaya koymuş, etoxazole karşı çapraz direnç bulunmamıştır. PBO uygulaması Urmia ve Shahin Dej popülasyonlarında spiroadiclofen toksisitesi hassas Ahar popülasyonundan daha yüksek ölçüde sinerjistik etki göstermiştir. Ayrıca, enzim aktiviteleri dirençli popülasyonlarda nispeten daha yüksek detoksifiye edici enzim aktivitesi göstermiştir. Artan detoksifikasyonun büyük olasılıkla spiroadiclofen direncinden ve spiromesifen'e sınırlı çapraz dirençten kaynaklandığını göstermişlerdir.

Gorzka vd. (2020), *P. ulmi* kontrolü için fenpyroximate etkinliğini değerlendirmişlerdir. *P. ulmi* etken maddeye duyarlılığı laboratuvar koşullarında belirlenmiştir. Polonya'da bulunan elma bahçelerinde bu akarın incelenen altı popülasyonun üçünde *P. ulmi*'nin fenpyroximate duyarlılığının azaldığını bulmuşlardır.

Xue vd. (2020), *T. urticae* popülasyonlarında milbemectin ve abamectin direnci üzerine yapmış oldukları daha önceki araştırmada GluCl kanallarındaki G314D ve G326E mutasyonları ile ilişkili olduğu görüşüne varmışlardır. İncelenen popülasyonlarda G314D ve G326E mutasyonlarının IT2 popülasyonunda görüldüğünü, G326E mutasyonunun ise UK6 popülasyonunda görüldüğünü tespit etmişlerdir. Araştırmada, GluCl 3 bölgesi I321T dirençle ilişkili yeni bir mutasyon olarak tanımlanmıştır.

Papapostolou vd. (2021), Yunanistan'da süs bitkisi seralarından alınan *T. urticae* popülasyonlarının bazı akarisitlere karşı direnç durumlarını incelemişlerdir. Sinerjist uygulamalarında cyflumetofen ve spiroadiclofen hariç abamectinin detoksifikasyon enzimlerinin rol aldığını belirlemişlerdir. RNAseq analizlerinde detoksifikasyon enzimlerini kodlayan özellikle P-450 ve UDP-glikoziltransferaz genlerinde aşırı çoğalma görülmüş ve bunlarında akarisit direncinde rol aldığını gösteren pek çok

Çalışma olduğunu bildirmişlerdir. Hedef bölge direncinde, bilinen direnç mutasyonlarından asetilkolinesteraz, kitin sentez1 ve PSST gibi bölgelerde hedef yeri direncine rastlanıldığını ve GluCl 3. alt ünitesinde yeni direnç mutasyonunun tespit edildiği bildirmişlerdir. Fakat dönüşümlü kullanılan etken maddelerin pestisit baskısını ortadan kaldırdığını, pyrethroid ve bifenazate karşı herhangi bir mutasyonun tespit edilemediği bildirmişlerdir.

Yaghoobi vd. (2021), İran elma bahçelerinden toplanan *P. ulmi* popülasyonlarında fenpyroximate'ye karşı direnç durumlarını incelemişlerdir. Popülasyonlar arasında orta ve yüksek düzeyde direnç tespit etmişlerdir. Bu popülasyonlarda MET11 direnci ile ilişkili 2 tane mutasyon (H92R, A94V) noktası taranmıştır. Yalnız popülasyonların hiçbirinde PSST mutasyonlarının varlığı saptanmamıştır. Esteraz ve P450 enzim aktivitelerinin ise dirençli popülasyonlarda önemli derecede yüksek olmadığını belirlemişlerdir. *P. ulmi* popülasyonlarında orta ila yüksek seviyelerde fenpyroximate direnci gözlemlenmiş ve büyük olasılıkla fenpyroximate direncinin altında yatan artan GST detoksifikasyon enzimi olduğunu belirtmişlerdir.

Alsay ve Ay (2022), *T. urticae*'nin hassas ve spiromesifen + abamectin karışım ile selekte ettikleri popülasyonlarda direnç gelişimini ve spiroadiclofen, milbemectin ve spiroadiclofen + abamectin'e karşı çapraz direnç oranları belirlemişlerdir. *T. urticae* HS popülasyonu için spiromesifen+abamectine karşı LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerini sırasıyla 0.53 mg a.i./l ve 2,66 mg a.i./l olarak belirlemişlerdir. IR popülasyonu için LC₅₀ değeri 640.50 mg a.i./l ve direnç oranının 1199 kat arttığını belirtmişlerdir. IR popülasyonu abamectin'e 1759 kat, karışımın etken maddelerinden biri olan spiromesifen'e ise 25 8874 kat direnç geliştirdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, apraz direnç çalışmalarında LC₅₀ direnci spiroadiclofen, milbemectin ve spiroadiclofen + abamectin direnç oranları sırasıyla 224, 40 ve 1069 kat arttığını bildirmişlerdir. Zararlı türlerinin direnç gelişimini geciktirmek veya önlemek amacıyla kullanılan pestisit karışımlarının kullanımının yeniden değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Ulukaya ve Ay (2022), Isparta ilinde elma üretimi yapılan alanlardan alınan 10 farklı *T. urticae* popülasyonunun spiromesifen+abamectin, spiroadiclofen ve milbemectin'e karşı direnç durumlarını araştırmışlardır. Ayırıcı doza göre spiromesifen + abamectin karışımına elma bahçelerinden alınan 10 *T. urticae* popülasyonundan spiroadiclofene

6, milbemectine ise 3 popülasyon direnç geliştirmiştir. Toplanan bahçe popülasyonlarının LC₅₀ değerleri spiromesifen + abamectin karışımına 1.01-168.35 mg a.i. l⁻¹, spiroadiclofene 0.43-3.32 mg a.i. l⁻¹ ve milbemectine 1.41-2.79 mg a.i. l⁻¹ arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Direnç oranlarının spiromesifen + abamectin karışımına 1.89-315.31 kat, spiroadiclofene 6.49-13.01 kat, milbemectin' e 2.98-5.89 kat arasında olduğunu belirlemişlerdir. Çalışma sonucuna göre spiromesifen+abamectin karışımına bazı popülasyonlarda direnç gelişiminin başladığını ve bazılarında ise direnç geliştiğini belirlemişlerdir. Spiromesifen+abamectin karışımına direnç gelişen popülasyonlarda spiroadiclofen ve milbemectine de çapraz direnç geliştiğini bildirmişlerdir.

Yaman ve Ay (2023), Isparta ili elma üretim alanlarından alınan *P. ulmi* popülasyonlarında acequinocyl ve bifenazate için direnç oranlarını belirlemişlerdir. Elma bahçelerinden toplanan Yalvaç, Gelendost 1, Gelendost 2, Gelendost 3, Marem, Tepeli, Balkırı ve Çünür popülasyonlarının hassas popülasyona kıyasla bifenazate karşı direnç düzeyleri sırasıyla; <1, 1.34, 1.67, 2.24, 1.30, 1.46, <1, <1 olarak tespit etmişlerdir. Popülasyonların aynı sıraya göre acequinocyl direnç düzeyleri sırasıyla; 1.72, <1, 1.44, <1, 1.14, 1.18, 1.03, <1 olarak tespit edilmiştir. Tüm bahçe popülasyonlarının her iki akarisit için hassas popülasyonla aynı derecede ya da düşük seviyede direnç gösterdiğini belirlemişlerdir.

Joshi vd. (2023), zeta-cypermethrin + avermectin B1 + %1 bahçe yağı ve abamectin + %1 bahçe yağı karışımı içeren iki profilaktik uygulama ile avcı akar popülasyonlarını azaltmadan sezon boyunca *P. ulmi* popülasyonlarını kontrol etmişlerdir. Buna karşılık, tavsiye edilen 3-5 akar/yaprak ekonomik eşiğinde uygulanan sekiz uygulama, *P. ulmi* popülasyonlarını baskılamada etkili olmamış ve avcı akarların çoğunun azalmasına neden olmuştur. Etoxazole uygulamasının diğer tüm uygulamalarla karşılaştırıldığında daha fazla sayıda kışlayan *P. ulmi* yumurtasının olduğunu etkisinin yeterli olmadığını belirtmişlerdir.

Ay vd (2024), spiromesifen+abamectin karışım formülasyonu ile selekte edilen *T. urticae* popülasyonunda esterase, GST ve P450 enzimlerinde sırası ile 1.77, 2.57 ve 2.58 kat hassas popülasyona kıyasla seleksiyon popülasyonunda artış olduğunu

belirlemişlerdir. Ayrıca bu enzimlerin inhibitörü olan TTP, DEM ve PBO sinerjistleri için seleksiyon popülasyonunda önemli bir sinerjistik etki gösterdiğini vurgulamışlardır. Moleküler çalışmalarda, daha önce tespit edilen G314D ve G326E mutasyonlarının bu çalışmada qPCR TaqMan protokolü ile tarandığını ve bu mutasyonların tespit edilemediğini ve aynı şekilde ACCase geninde koenzim A-karboksilaz CTD domaininde mutasyon olmadığını belirlemişlerdir. Olası genetik mutasyonlar ACCase geninin hedef bölgesinde biotin karboksilaz (BCD) ve karboksil transferaz (CTD) domaninde dizilendiğini belirlemişlerdir. Tek aminoasit mutasyonu G37D'nin seleksiyon 1 ve seleksiyon 2 popülasyonlarında ACCase geninin BCD bölgesinde tespit edildiğini fakat bu mutasyonun spiromesifen ile ilişkisinin onaylanmadığını vurgulamışlardır. Seleksiyon 1 ve seleksiyon 2 popülasyonlarında S+A direnci için detoksifikasyon mekanizması ve muhtemel hedef bölge mutasyonlarının sorumlu olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini Isparta ili elma bahçelerinden toplanan *P. ulmi* popülasyonları ve *P. ulmi*'nin hassas (HS) popülasyonu spiromesifen+abamectin spiromesifen, abamectin, spiroadiclofen, milbemectin ve spiroadiclofen+abamectin etkili maddelerine sahip akarisitler, *P. ulmi* için konukçu bitki elma ve erik fidanları oluşturmuştur. Çalışmalarda karşılaştırma popülasyonu olarak kullanılan *P. ulmi* HS popülasyonu 2010 yılında Bayer CropScience (Almanya)'den sağlanmıştır. Bu popülasyon 1990 yılından bu yana pestisitlere maruz kalmadan üretimi devam ettirilmiştir.

Biyoassay çalışmaları esnasında, plastik petriler, ince uçlu fırça, farklı hacimlere sahip mikropipetler, stereo-mikroskop gibi malzemeler kullanılmıştır.

Biyokimyasal ve moleküler çalışmalarda ise, fotometrik ve florometrik mikrolaka okuyucu, PCR, real time PCR, hassas terazi, manyetik karıştırıcı, tek ve çok kanallı mikropipetler, farklı devirlerde çalışan soğutmalı santrifüj, pH metre, buz makinesi, derin dondurucu, değişik cam ve plastik malzemeler gibi materyaller kullanılmıştır.

3.1.1. *Panonychus ulmi* popülasyonunun orijini ve yetiştirilmesi

P. ulmi'nin HS ve bahçe popülasyonları içi su dolu küvetler içerisindeki 2-3 adet elma (*Malus domestica* Borckhausen) ve erik (*Prunus domestica* Angeleno ve *Prunus domestica* Brompton) fidanlarında iklim odalarında üretilmiştir. İklim odaları 25±1°C sıcaklık, % 60-65 nem ve 16:8 aydınlık: karanlık koşullarına ayarlanmıştır.

Isparta ili ve çevresinde bulunan farklı elma üretim alanlarından 13 popülasyon toplanmıştır (Şekil 3.1). *P. ulmi* popülasyonlarının isimleri, toplanma yerleri ve tarihleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Panonychus ulmi* popülasyonlarının isimleri, toplanma yerleri ve toplanma tarihleri

Tür	Popülasyon ismi	Toplanma yeri	Tarih
<i>P. ulmi</i>	Sevinçbey	Sevinçbey köyü-Eğirdir	21.07.2020
	Tepeli	Tepeli köyü-Eğirdir	17.05.2021
	Eyüpler	Eyüpler köyü-Eğirdir	25.05.2021
	Marem-1	Marem-Eğirdir	05.07.2021
	Balkırı-1	Balkırı köyü-Eğirdir	05.07.2021
	Tepeli-1	Tepeli köyü-Eğirdir	06.07.2021
	Tepeli-2	Tepeli köyü-Eğirdir	07.07.2021
	Yalvaç	Gülbudak bahçesi-Yalvaç	26.07.2021
	Gelendost-1	Gelendost merkez-Gelendost	26.07.2021
	Gelendost-2	Hacılar köyü-Gelendost	03.08.2021
	Gelendost-3	Yeşilköy-Gelendost	04.08.2021
	Serpil	Serpil köyü-Eğirdir	16.08.2021
	Çay köy	Çay köyü-Eğirdir	16.08.2021



Şekil 3.1. *Panonychus ulmi*'ye ait bahçe popülasyonları

3.1.2. Çalışmada kullanılan akarisitler

Çalışmada kullanılan akarisitlere ait etken madde oranları, ticari isimleri, formülasyon şekilleri, ruhsat tarihleri ve etki mekanizmaları aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan akarisitlere ait bilgiler

Etken madde	Etken madde oranı	Ticari isim	Formülasyon şekli	Ruhsat tarihi	Etki mekanizması
Abamectin	18 g/l	Agrimec	EC	1991	Glutamat kapılı klor kanalı allosterik düzenleyicisi
Milbemectin	9.3 g/l	Milbeknock	EC	2007	
Spirodiclofen	240 g/l	Envidor	SC	2004	Asetil CoA karboksilaz inhibitörleri
Spiromesifen	240 g/l	Arabus	SC	2005	
Spirodiclofen+abamectin	222 g/l spirodiclofen+ 18 g/l abamectin	Envidor Speed	SC		Glutamat kapılı klor kanalı allosterik düzenleyicisi-Asetil CoA karboksilaz inhibitörleri
Spiromesifen+abamectin	228.6 g/l Spiromesifen + 11.4 g/l Abamectin	İnterrupt	SC	2014	

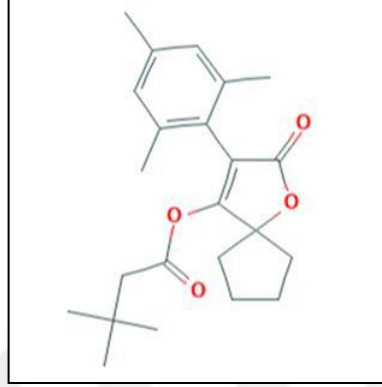
3.1.2.1. Spiromesifen+abamectin

Bayer CropScience tarafından 2014 yılında ruhsatlandırılan karışım bir akarisittir. Etki mekanizması sınıflandırmasına göre Grup 23; 6 olarak sınıflandırılmış bir insektisit-akarisittir. 228.6 g/l Spiromesifen ve 11.4 g/l Abamectin ihtiva etmektedir. Farklı etki mekanizmaları sayesinde kırmızı örümceklerin her döneminde etkilidir. Spiromesifen kontak etkilidir. Abamectin ise hem kontak hem de mide yoluyla etki etmektedir. Spiromesifen sistemik olarak taşınmazken, abamectin translaminar olarak yaprağın alt yüzeyine ulaşabilir (Anonim, 2023e). Spiromesifen yağ biyosentezini engellemekte, ölüm yumurta ve nimf döneminde kısa sürede gerçekleşirken, ergin bireyin önce hareketi yavaşlamakta ve beslenme sonrasında durmaktadır. Beslenemeyen ergin sonunda ölür. Abamectin etki mekanizmasına göre Grup 6 olarak sınıflandırılmış bir insektisit-akarisittir. Kontakt ve mide zehiri etkilidir (Anonim, 2023b). Farklı etki mekanizmaları sayesinde kırmızı örümceklerin her döneminde etkilidir. Glutamat kapılı klorid kanallarını bozarak sinir sistemine etki eder. Çalışmada insektisit+akarisit olan karışım formülasyonu “İnterrupt” (228.6 g/l Spiromesifen + 11.4 g/l Abamectin, Bayer) kullanılmıştır.

3.1.2.2. Spiromesifen

Bayer CropScience tarafından keşfedilen *T. urticae* ve beyaz sinek kontrolünde etkili bir insektisit-akarisittir. Kontakt etkili olup akarların tüm evrelerinde etkilidir. Etki

mekanizmasına göre tetronik asitler türevlerinden ikincisi olup Grup 23 sınıfındadır. Biyokimyasal mekanizması bakımından diğer akarisitlerden farkı zararlı bünyesinde lipit sentezini engelleyerek etki etmektedir (Nauen vd., 2003). Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Çalışmada spiromesifen etken maddeli “Arabus SC240” etken maddeli bitki koruma ürünü kullanılmıştır (240 g/l spiromesifen, Bayer).



Şekil 3.2. Spiromesifen kimyasal yapısı

Moleküler formül: C₂₃H₃₀O₄

Formülasyon: Süspansiyon Konsantre (SC)

Renk: Gri, Beyaz

Koku: Hafif, Karakteristik

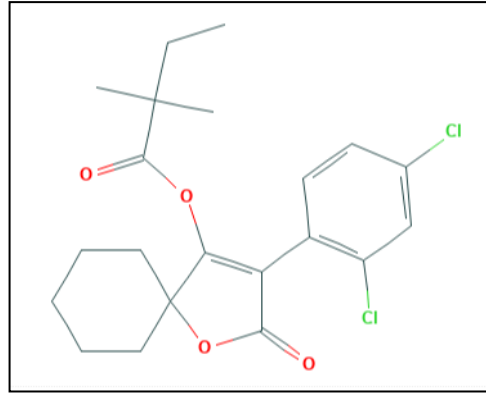
pH: 4.0-5.5

Toksisitesi: LD₅₀ > 2.500 mg/kg (sıçan)

Biyoakümülyasyon yapmaz. Toprakta hareketli değildir. Kalıcı ve zehirli kabul edilmemiştir. Biyolojik birikim yapmaz (Anonim, 2020c).

3.1.2.3. Spirodiclofen

Tetronik asit türevlerinden seçici bir akarisit. 2000 yılında Bayer CropScience tarafından tanıtılmıştır (Nauen vd., 2003). Akarlar için önemli olan yağ asitleri oluşturmaya izin veren asetil-koenzimA karboksil enzimini bloke etmektedir. Şekil 3.3’de gösterilmiştir (Anonim, 2023c). Çalışmada spirodiclofen etken maddeli “Envidor SC240” kullanılmıştır (240 g/l spirodiclofen, Bayer).



Şekil 3.1. Spirodiclofen kimyasal yapısı

Moleküler formül: C₂₁H₂₄Cl₂O₄

Formülasyon: Süspansiyon Konsantre (=akışkan konsantre) (SC)

Renk: Beyaz - Açık bej arası

Koku: Hafif, Karakteristik

pH: 4.5 – 5.5

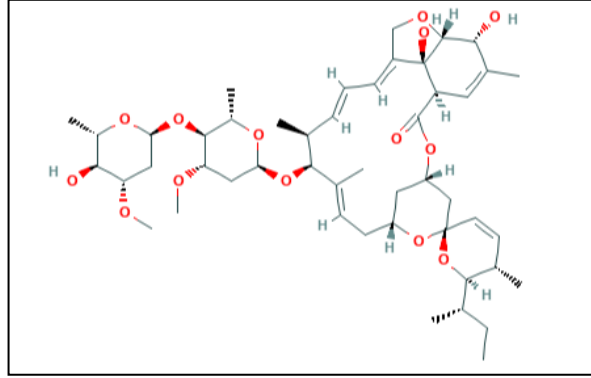
Toksisitesi: LD₅₀ > 2.500 mg/kg (sıçan)

Biyoakümülyasyon yapmaz. Toprakta hareketli değildir. Bu madde, kalıcı ve zehirli olarak kabul edilmemektedir (Anonim, 2016a).

3.1.2.4. Abamectin

Abamectin, toprak kökenli bir aktinomiset bakterisi olan *Streptomyces avermitilis* (Burg) (Actinomycetales: Streptomycetaceae)'in fermantasyon ürünü olan bir biyopestisit (Öncüler ve Durmuşoğlu, 2008). Etki mekanizmasına göre klorid kanalı aktivatörü Grup 6 olarak sınıflandırılmış bir insektisit-akarisit. Kimyasal yapısı makrosiklik laktondur. Bu gruptaki akarisitler kontakt ve mide zehiri etkilidir (Öncüler ve Durmuşoğlu, 2008; İnak ve Çobanoğlu, 2016). Klorid kanalları hücrenin uyarı sonrası dinlenme durumuna geçmesinde rol oynar. Bu gruptaki akarisitler, klorid kanallarının yüksek dozda aktivasyonuna neden olarak, sinir iletim dengesini bozar. Sinir sistemi sürekli dinlenme durumunda kalan akar, paralyze olur, beslenemez ve ölüm gerçekleşir. Abamectinin, özellikle kırmızı örümceğin larva dönemine karşı çok etkili olduğu bildirilmiştir (Stumpf ve Nauen, 2002; İnak ve Çobanoğlu, 2016). Abamectin, translaminar etkiye de sahiptir, yani yaprağın üst yüzüne uygulandığında hücreler arasından alt yüzüne geçmektedir (Cloyd, 2010; İnak ve Çobanoğlu, 2016). Kimyasal yapısı Şekil 3.4'te gösterilmiştir (Anonim, 2023c). Çalışmada insektisit-

akarisit abamectin etken maddeli “Agrimec EC” bitki koruma ürünü kullanılmıştır (18 g/l abamectin, Syngenta).



Şekil 3.4. Abamectin kimyasal yapısı

Moleküler Formül: C₄₈H₇₂O₁₄

Formülasyon: Sıvı

Renk: Soluk sarıdan kahverengine değişir

Koku: Aromatik

pH: 3.2 %1 ağı./hacim

Toksisitesi: LD₅₀ 891 mg/kg (dişi-erkek fare)

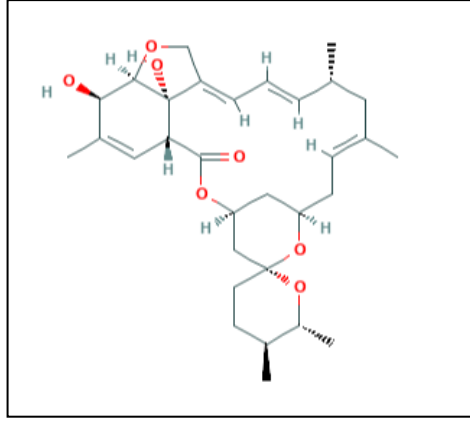
Sudaki Stabilité: Abamectin: Parçalanma yarı ömrü 1.7 gün, kalıcı değil

Topraktaki Stabilité: Abamectin: Parçalanma yarı ömrü 12-52 gün, kalıcı değildir.

Biyobirikim yapmaz. Toprakta yayılma hızı yavaştır (Anonim, 2016b).

3.1.2.5. Milbemectin

Milbemisiner ise *Streptomyces hygroscopicus* (Jensen) (Actinomycetales: Streptomycetaceae) bakterisinin bir fermantasyon ürünüdür. GABA-kapılı ve glutamat-kapılı klorid kanallarına etki eder (Clark vd., 1995; İnak ve Çobanoğlu, 2016). Klorid kanalları hücrenin uyarı sonrası dinlenme durumuna geçmesinde rol oynar. Bu gruptaki akarisitler, klorid kanallarının yüksek dozda aktivasyonuna neden olarak, sinir iletim dengesini bozar. Sinir sistemi sürekli dinlenme durumunda kalan akar, paralyze olur, beslenemez ve ölüm gerçekleşir (Stumpf ve Nauen, 2002; İnak ve Çobanoğlu, 2016). Şekil 3.5’de gösterilmiştir (Anonim, 2023c). Çalışmada milbemectin etken maddeli “Milbeknock EC” bitki koruma ürünü kullanılmıştır (9.3 g/l milbemectin, Sumi Agro). Moleküler Formül: C₃₁H₄₄O₇ (Anonim, 2021a)



Şekil 3.5. Milbemectin kimyasal yapısı

3.1.2.6. Spirodiclofen+abamectin

Bayer CropScience tarafından geliştirilen 2013 yılında ruhsatlandırılan karışım bir akarisitlerdir. Etki mekanizmasına göre grup 23;6 olarak sınıflandırılmış bir akarisitlerdir. 222 g/l Spirodiclofen+18 g/l Abamectin içermektedir. Akarların tüm biyolojik dönemlerinde etkilidir. Çalışmada kullanılan diğer bir karışım formülasyonu “Envidor Speed SC” bitki koruma ürünüdür (222 g/l spirodiclofen+18 g/l abamectin, Bayer).

Formülasyon: Süspansiyon Konsantre (SC)

Renk: Beyaz - Açık bej arası

Koku: Hafif, Karakteristik

pH: 5.3 – 5.7

Yoğunluk: 1.08 g/cm³ nin 20°C (yaklaşık)

Toksosite: LD₅₀ > 300 - 2.000 mg/kg (sıçan)

Biyoakümülyasyon yapmaz. Toprakta hareketli değildir (Anonim, 2016a).

3.2. Metot

Çalışmalar üç aşamalı olarak yürütülmüştür. Birinci aşamada öncelikli olarak biyoassay çalışmaları ile HS popülasyonun S+A, spiromesifen, abamectin, spirodiclofen, milbemectin ve spirodiclofen+abamectin etkili maddelerine sahip akarisitlere karşı LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri belirlenmiştir. Bu akarisitlerin HS popülasyonda belirlenen LC₉₀ dozu ayırıcı doz olarak kabul edilmiştir. İlaçların HS popülasyonda belirlenen LC₉₀ değeri uygulanarak ve Abbott (1925)’e göre %80’den

az ölüm olan popülasyonlarda dirençli kabul edilmiştir. Dirençli kabul edilen popülasyonlarda başlık 3.2.1. belirtilen metot ile LC değerleri belirlenmiştir.

Abbot (1925) formülü (Denklem 3.1);

$$\text{Düzeltilmiş \% ölüm} = \frac{X-Y}{X} \times 100 \quad (3.1)$$

X: Kontrol gruplarındaki canlılık yüzdesi

Y: İlaç uygulanan gruptaki canlılık yüzdesi

Bu çalışmalara paralel olarak HS popülasyondan oluşturulan yeni kültürlerde S+A ile seleksiyona başlanmıştır. Daha sonra Isparta da bulunan elma bahçelerinden *P. ulmi* popülasyonları toplanmış ve bunlara spiromesifen+abamectin HS popülasyonda belirlenen LC₉₀ değeri uygulanarak spiromesifen+abamectin dirençli dirençli popülasyonlar belirlenmiştir. Daha sonra bu popülasyonlarda diğer akarisitlere çapraz direnç gelişip gelişmediği belirlenmiştir. Bunlara ilaveten seleksiyon (IR) ve en dirençli iki popülasyonda ilaçlar ve sinerjistler uygulanarak, sinerjistlerin sinerjistik oranları belirlenmiştir.

İkinci aşama da biyokimyasal çalışmalar yapılmıştır. Bu aşamada popülasyonların detoksifikasyon enzimleri; esteraz, GST (gluthation – S – transferaz) (GST) ve P450 (sitokrom P450 monooksijenaz) enzimlerinin aktiviteleri belirlenmiştir.

Üçüncü aşamada ise dirençli ve HS popülasyonlarda moleküler yöntemlerle hedef yeri mutasyonlarının olup olmadığı incelenmiştir.

3.2.1. Biyoassay çalışmaları

3.2.1.1. İnseksitist/Akarisit konsantrasyonlarının hazırlanması

Panonychus ulmi'nin inseksitist/akarisitlere karşı LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerini belirlemek için öncelikle denemede kullanılan bitki koruma ürünleri ile ön çalışmalar yaparak yaklaşık %90-99 ölüm veren dozlar belirlenmiştir. Belirlenen bu doz her seferinde 1/2 oranında seyreltilerek en az 6 doz elde edilmiştir. LC değerlerinin belirlendiği çalışmalarda bu dozların popülasyonlarda %10 ve %95-99 ölüm veren dozlar arasında

dağılım göstermesi sağlanmıştır. Denemeler her bir dozdan ve kontrol (saf su uygulanan) de 3'er tekerrür olacak şekilde kurulmuştur.

3.2.1.2. İnsektisit/Akarisit uygulanması

İnsektisit/akarisit uygulanmasında *P. ulmi* yaprak disk daldırma yöntemi kullanılmıştır. Daldırma yöntemi de standart bir pestisit uygulama yöntemidir (Nazemi vd., 2016; IRAC, 2019; Rameshgar vd., 2019).

LC değerlendirilmesinde *P. ulmi* için öncelikle en az 6 farklı insektisit/akarisit konsantrasyonu hazırlanmış ve bu konsantrasyonlara hazırlanan 4 cm çapındaki erik yaprağı diskleri 5 saniye daldırılmıştır. Kontrol için kullanılacak yaprak diskler saf suya daldırılmıştır. Yaklaşık 30 dk. kurumaya bırakılan yaprak diskler %1'lik hafif sıcak agar üzerine alt yüzü üste olacak şekilde yerleştirilmiştir ve her bir yaprak disk üzerine 20-25 ergin *P. ulmi* dişi bir fırça yardımı ile aktarılmıştır. Petriler daha sonra $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, %60-65 nem ve 16:8 fotoperiyodik koşullarına sahip iklim kabinlerine aktarılmıştır. Ölü canlı değerlendirmesi 48 saat sonra yapılmıştır (Şekil 3.6).

Panonychus ulmi popülasyonlarının 48 saat sonra belirlenen ölüm verilerinden yararlanılarak POLO bilgisayar paket programında (LeOra Software, 1994) LC_{50} ve LC_{90} değerleri belirlenmiştir. Denemede kullanılan bütün popülasyonlar için LC_{50} ve LC_{90} değerlerinin HS popülasyona ait LC_{50} ve LC_{90} değerine oranlanması ile her bitki koruma ürünü için popülasyonların direnç oranları elde edilmiştir.



Şekil 3.6. İlaçların uygulanması

3.2.2. Seleksiyon çalışmaları

Panonychus ulmi HS popülasyonunda S+A LC değerleri belirlendikten sonra, zararlı üretiminin yapıldığı konukçu bitkilere önce o türün HS popülasyonunda belirlenen S+A LC₅₀ değeri el spreyi ile uygulanmıştır ve pestisit uygulanan bitkiler üzerine hassas popülasyondan alınan farklı dönemdeki canlı akar bireyleri konukçu bitki yaprağı ile aktarılmıştır. Canlı kalan bireylere ve popülasyon artışlarına bağlı olarak yaklaşık 1 hafta sonra tekrar LC₅₀ değeri türlere göre konukçu bitkilere uygulanmış ve daha önceki pestisit uygulanan bitkilerin yanına konulmuştur. Uygulama yapılan bitkilerde canlı kalan bireylerin oranında artış görüldüğünde yeni ilave edilen bitkilere uygulanan doz LC değerinin 2 katı olmuştur. İşlem doz artışı 10 kata ulaşınca kadar devam edilmiştir. Doz artışı 10 kata ulaştığında LC₅₀ değeri belirlenerek direnç oranı tam olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7 ve Çizelge 3.3).



Şekil 3.7. Seleksiyon uygulamaları

Çizelge 3.3. Seleksiyon çalışmalarında yapılan uygulama ve dozları

spiromesifen+ abamectin	Dozlar (µl/l)	Uygulama tarihleri
1. Seleksiyon (4 kez uygulandı)	10	01.03.2022 14.03.2022 28.03.2022 08.04.2022
2. Seleksiyon (2 kez uygulandı)	20	19.04.2022 29.04.2022
3. Seleksiyon (2 kez uygulandı)	40	02.05.2022 09.05.2022
4. Seleksiyon (1 kez uygulandı)	80	16.05.2022
5. Seleksiyon (1 kez uygulandı)	80	24.05.2022
6. Seleksiyon (1 kez uygulandı)	80	02.06.2022
7. Seleksiyon (1 kez uygulandı)	80	10.06.2022

3.2.3. Dirençli bahçe popülasyonlarının belirlenmesi ve çapraz direnç çalışmaları

Yukarıda açıklanan yöntemle göre önce S+A karışım formülasyonunun HS popülasyonda belirlenen LC₉₀ değerlerindeki dozu elma bahçelerinden toplanan *P. ulmi* popülasyonlarına uygulanarak dirençli popülasyonlar belirlenmiştir. Denemeler en az dört tekerrürlü olarak kurulmuş ve her bir tekerrürde en az 25 ergin dişi *P. ulmi* bireyi kullanılmıştır. Kontrolde sadece saf su uygulanmıştır. Abbott (1925)'e göre % etki belirlenmiş ve etkinin %80'den az olduğu popülasyonlar S+A dirençli olarak kabul edilmiştir. Bu popülasyonlarda LC değerleri ve direnç oranları başlık 3.2.1'deki yöntemle göre belirlenmiştir. Yukarıda açıklanan biyoassay yöntemine göre önce S+A'e dirençli bulunan bahçe popülasyonlarında spiromesifen, abamectin, spiroadiclofen, milbemectin ve spiroadiclofen+abamectin insektisit/akarisitlere gösterdikleri LC değerleri belirlenmiştir. Çapraz direnç oranları için her insektisit/akarisit için bahçe popülasyonlarında belirlenen LC₅₀ değeri, HS popülasyonunun LC₅₀ değerine oranlama yapılarak bulunmuştur (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Çapraz direnç çalışmalarında biyoassay

3.2.4. Sinerjistik çalışmalar

Sinerjistler tek başlarına toksik etkileri olmasa da herhangi bir insektisit/akarisit ile karıştırıldığında toksisite etkisini artıran bileşikler olarak tanımlanır (Yu, 2015). HS ve dirençli popülasyonlarda bazı sinerjistlerin S+A karışımına olan etkisi incelenmiştir. Sinerjistlerin uygulanması Namin vd. (2020)'den alınan metoda göre yapılmıştır. Sinerjist çalışmalarında piperonyl butoxide (PBO), triphenyl phosphate (TPP) ve diethylmaleate (DEM) kullanılmıştır. Sinerjistler 1:1 oranında aseton: saf su içerisinde çözündürülmüştür.

Panonychus ulmi için sinerjistler TPP, PBO ve DEM, 2000 mg/L dozlarında hazırlanmış ve bu hazırlanan sinerjist konsantrasyonlarına 4 cm çapındaki erik yaprakları daldırılmıştır. Her bir sinerjist çözeltisine 3 yaprak daldırılmıştır. Yaprak diskler 30 dk kurumaya bırakılmış ve bu yapraklar yine %1'lik agar üzerine alt yüzeyi üste gelecek şekilde yerleştirilerek herbirinin üzerine 25-30 adet dişi *P. ulmi* bırakılmıştır. Ergin dişiler bu yaprak diskler üzerinde 2 saat kalmaları sağlanmış ve daha sonra her popülasyon için (HS, IR, M-1) sırası ile S+A'nin LC₁₀ 0.034 µl, 0.95 µl ve 0.17 µl değeri 12 petriye uygulanmıştır (Şekil 3.9). S+A'nin LC₁₀ değeri uygulanmış bu petrilerin 3 adedine TPP uygulanmış, 3 adedine PBO, ve 3 adedine DEM uygulanmış petrilerdeki bireyler aktarılmıştır. Ayrıca üç petriye ise stok kültürden *P. ulmi* bireyleri aktarılmıştır. Kontrolde ise sadece su+aseton (1:1) karışımı kullanılmıştır. Ölü-canlı değerlendirmeleri 48 saat sonra yapılmıştır. Elde edilen ölüm verilerinden yararlanılarak Abbott (1925)'e göre % ölüm oranları belirlenmiştir.

Sadece insektisit/akarisit ile sinerjist+insektisit/akarisit kullanımı her popölasyon için ayrı ayrı t testi ile karşılaştırılmış ve sinerjist uygulamalarının etki artırıp artırmadığı belirlenmiştir.



Şekil 3.9. Sinerjist uygulamaları

3.2.5. Biyokimyasal çalışmalar

Biyokimyasal çalışmalarda esteraz ve GST enzim aktivitesinin belirlenmesinde fotometrik mikropłaka okuyucu, P450 enzim aktivitesinin belirlenmesinde ise florimetrik mikropłaka okuyucu kullanılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Biyokimyasal çalışmalar

3.2.5.1. *Panonychus ulmi* popülasyonlarında esteraz enzimi aktivitesinin incelenmesi

Kinetik esteraz aktivitesinin belirlenmesinde Stumpf ve Nauen, (2002)'in geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. *P. ulmi* popülasyonlarının esteraz enzimi belirlenmesinde substrat olarak α – naphtyl acetate kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikli olarak 20 adet ergin dişi %0.1 Triton X-100 içeren 100 μ l sodyum fosfat buffer (0.1M, pH 7.5) içinde eppendorf tüplerde homojenize edilmiştir. Bu homojenat 10 000 g ve +4°C'da 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Esteraz enziminin kinetik olarak belirlenmesi için supernatant 10 kez sulandırılarak kullanılmıştır. Düz tabanlı 96 hücreli mikrolakanın her bir hücresine 10 kez seyreltilen supernatant + 0.2 M, pH 6 fosfat buffer' dan 25'er μ l konulmuştur. Çalışma 200 μ l substrat solüsyonunun eklenmesiyle başlatılmıştır. Substrat solüsyonu 30 mg Fast blue RR tuzunun 50 ml 0.2 M sodyum fosfat buffer' da çözülmesi ve bu karışıma 500 μ l 100 mM α – naphtyl acetate'ın ilavesiyle elde edilmiştir. Enzim aktivitesi 23°C ve 450 nm'de 10 dakika süreyle mikrolaka okuyucuda okunmuştur. Kontrol hücreleri ise homojenatsız olarak okunmuştur. Enzim okumaları en az dört tekrerrülü olacak şekilde yapılmıştır.

3.2.5.2. *Panonychus ulmi* popülasyonlarında GST enzimi aktivitesinin incelenmesi

GST enziminin kinetik olarak belirlenmesinde Stumpf ve Nauen (2002)'in geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. 50 ergin *P. ulmi* dişisi 500 μ l Tris HCL buffer (0.05M, pH 7.5) içinde eppendorf tüplerde homojenize edilmiştir. Bu homojenat daha sonra 10 000g ve +4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. *P. ulmi* popülasyonlarının GST enzim aktivitelerinin belirlenmesi için düz tabanlı 96 hücreli mikrolakanın her bir hücresine 100 μ l supernatant, 100 μ l 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ve 100 μ l reduced glutathione (GSH) konulmuştur. CDNB %0.1 (v/v) etanolde çözdürülmüş ve final konsantrasyonda 0.4 mM CDNB olmuştur. Reduced glutathione (GSH) Tris HCL bufferda hazırlanmış ve final konsantrasyonda 4 mM GSH bulunmuştur. Kontrol hücrelerinde ise sadece CDNB ve GSH homojenatsız okunmuştur. Absorvanstaki değişim 340 nm de 25°C de 5 dk'da fotometrik olarak okunarak belirlenmiştir. Denemeler 4 tekrerrülü olarak yürütülmüştür.

3.2.5.3. *Panonychus ulmi* popülasyonlarında P450 enzimi aktivitesinin incelenmesi

Sitokrom P450 (P450) aktivitesi Rauch ve Nauen (2002)'ye göre florometrik olarak belirlenmiş ve substrat olarak 7-ethoxycoumarin O-deethylation (7-EC) kullanılmıştır. Bu amaçla 100 ergin *P. ulmi* dişi 200 µl 0.1 M (pH:7.6) sodyum fosfat buffer da homojenize edilmiş, 10 000 g 4°C de 5 dk. santrifüj edilmiş ve enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. P450 aktivitesini ölçmek amacı ile öncelikle siyah düz tabanlı 96 hücreli mikrolakanın herbir hücresine 50 µl homojenat + 40 µl sodyum fosfat buffer + 2 µl 7-EC (aseton içinde) + 10 µl suda çözündürülmüş NADPH konulmuştur. Final konsantrasyonda 7- EC ve NADPH çözeltileri sırasıyla 0.4 mM 7-EC ve 1 mM NADPH olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan mikrolaka 30°C'de 30 dk. çalkalanmıştır.

Bu sürenin sonunda NADPH'yi uzaklaştırmak için herbir mikrolaka hücresine 10 µl oxidase glutation (su içinde 100 mM) ve 13 µl glutathione reductase (1.3 U) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika beklendikten sonra reaksiyonu durdurmak için 125 µl Trizma-base buffer (0.05 M, pH:10)'la hazırlanan %50'lik acetonitrile eklenmiş ve hemen serbest kalan 7-hydroxycoumarin miktarını ölçmek için mikrolaka okuyucu florimetride 390 nm emission 465 exiting dalga boyunda endpoint okuma yapılmıştır. Denemeler en az dört tekerrürlü olmuştur. Kontrol hücresine ise homojenat konulmamıştır (Şekil 3.11).

Bütün enzim denemelerinde toplam protein miktarının belirlenmesinde Bradford (1976) yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 3.11. Enzim aktivitelerinin incelenmesi

3.2.6. Moleküler çalışmalar

3.2.6.1. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu Qiagen DNeasy Blood ve Tissue Kit (Hilden, Almanya) protokolüne göre yapılmıştır. Bu protokole göre öncelikli olarak dirençli ve hassas popülasyonlardan elde edilen yaklaşık 50 adet dişi birey 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpte -80°C saklanmıştır. Daha sonra bu her bir örnek için tüplere kit içerisinde bulunan ATL bufferdan 180 μl her bir örneğe eklenmiştir. 20 μl Proteinase K solusyonu eklendikten sonra vorteksle 5-10 saniye karıştırılmış ve 56°C de 3 saat dokular tamamen çözülünceye kadar inkübe edilmiştir. Inkübe edilen örnekler her bir yarım saatte 15 saniye vorteks çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Bu dokular çözüldükten sonra 200 μl Buffer AL eklenmiştir. Buffer AL eklendikten sonra 5-10 sn vorteks çalkalayıcıda çalkalanmış ve üzerine 200 μl %96'lık ethanol eklenmiştir ve tekrar çalkalanmıştır. Bu örnekler DNeasy mini spin kolonlara pipet yardımıyla aktarılmıştır. Elde edilen örnekler 60 000 g (8000 rpm) de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra kit içerisindeki columnda bulunan toplama tüpü uzaklaştırılmış ve yerine tekrar toplama tüpünden yerleştirilmiştir. 500 μl AW1 bufferdan eklemiş 1 dk. 6000 g (8000 rpm) de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü uzaklaştırıp yerine tekrar toplama tüpü yerleştirildikten sonra 500 μl AW2 bufferı eklenmiş ve 3 dk. 20 000 g (14 000 rpm) de santrifüj edilmiş ve toplama tüpü uzaklaştırılmıştır. Mini spin column temiz 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 100 μl AE buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edildikten sonra 1 dk. 6000 g (8000 rpm) de santrifüj edilmiştir. Elde

edilen DNA'nın varlığı nanodrop kullanılarak kontrol edilmiştir. Elde edilen genomik DNA örnekleri kullanılmak üzere -20°C saklanılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Genomik DNA izalasyonu

3.2.6.2. Primerler ve proplar

Glutamate-kapılı klorid (GluCl) kanallarının çoğaltılması amacıyla geliştirilen ve abamectin direncinin belirlenmesinde kullanılan primerler Ilias vd. (2017) ve Rameshgar vd. (2019)'nin yaptıkları çalışmadan kullandıkları primerlerden ve proplardan yararlanılmış ve I321T gen bölgesinin hem forward hem de reverse primerleri bu çalışmada tasarlanmıştır (Papapostolou vd., 2020) (Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5).

Spiromesifen dirençli popülasyonlarda A karboksilaz (ACCCase) enziminin daha önceki çalışmalarda hedef bölgesindeki mutasyonların primerleri Karatolos vd. (2012) ve Bajda vd. (2015)'den yararlanarak tasarlanmıştır (Çizelge 3.5). *P. ulmi*'nin gen bankasında genom ya da ilgili bölgenin primeri olmadığı için ona en yakın tür olan *P. citri*'nin primerlerinden yararlanılmıştır.

Elde edilen popülasyonların DNA'ları (-20°C) sipariş verilen primerler, proplar, ürün ve mix koşulları üretici firmanın kullanım önerisi doğrultusunda veya değiştirilerek PCR yapılmıştır. PCR görüntüleri iyi olan ürünler Sanger sekans analizi için sentebiolab firmasına gönderilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primer isimleri, gen ve mutasyon bölgesi

Gen adı	Mutasyon	Primer adı	Primer dizilişi (5'-3')	Parça uzunluğu (bp)
Glutamate-kapılı klorid kanal 1(PuGluCl1)	G314D	BC795 PuGluCl1 G314D FP	CTACCACCGGTCAGTTATACCAA	534
		BC796 PuGluCl1 G314D RP	TCAGTTCGAGAAACATAATTGAC	
Glutamate-gated klorid channel 3(PuGluCl3-A)	G326E	BC789 PuGluCl3-AB I321T-G326E FP	ATCCGGTATTAATGCCTCACTTCC GCATAATTACAAAGGGCAAACCTC	537
Glutamate-gated klorid channel 3(PuGluCl3-B)	I321T	BC790 PuGluCl3-AB I321T-G326E RP		537
Glutamate-gated klorid channel 3(PuGluCl3-A)	G326E*	PuGluC3 1526-47	GTACTTCCCGAACAACACAGG	537
		PuGluC3 1971-92	ACCAGGATTACCAAATCCACCG	
ACCCase		BC781 PuACCCase 1-568 FP	GTGGACCCAATCTTTGCTCAC	675
		BC782 PuACCCase 1-568 RP	CTCAAGACCTTCATCTTCATC	
		BC783 PuACCCase 5167-5828 FP	ATTCTTGTGATACTTGATTGGC	
		BC784 PuACCCase 5167-5828 RP	TTCTGGTTCAATAACACCACC	

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan probe isimleri, gen ve mutasyon bölgesi

Gen adı	Mutasyon	Probe	Probe dizilişi (5'-3')
Glutamate-kapılı klorid kanal 1(PuGluCl 1)	G314D	BC797 PuGluCl1 G314D Probe FAM	GGATGTTTGGACAGGATGTTGTTTAATCT
		BC798 PuGluCl1 G314D Probe HEX	GGATGTTTGGACAGATTGTTGTTTAATCT
Glutamate-gated klorid channel 3(PuGluCl 3-A)	G326E	BC793 PuGluCl3-A G326E Probe FAM	TTGATGTTTGGACCGGAGTTTGCCTTTTTC
		BC794 PuGluCl3-A G326E Probe HEX	TTGATGTTTGGACAGAGTTTGCCTTTTTC
Glutamate-gated klorid channel 3(PuGluCl3-B)	I321T	BC791 PuGluCl3-B I321T Probe FAM	TTACATTAAAGCAATTGATGTTTGGACCG
		BBC792 PuGluCl3-B I321T Probe HEX	TTACATTAAAGCAACTGATGTTTGGACCG

3.2.6.3. Abamectin direnç mutasyonlarının RT-PCR ile belirlenmesi

Abamectin'in hedef yeri sinir sistemin GluCl kanalı bölgesidir. Dirençli popülasyonlarda daha önceki çalışmalarda hedef bölgedeki mutasyonlar Ilias vd. (2017)'nin uyguladığı "TaqMan diagnostik deneyler" ile taranmıştır. Bu diagnostik deneyler için 2 primer ve 3 prob kullanılmıştır. Abamectin direncinde rol oynayan glutamate-kapılı klorid kanalın daha önceden belirlenen GluCl 1'de G314D ve GluCl 3'de I321T ve G326E mutasyonlarını belirlemek için G314D_F + G314D_R, I321T_F+ I321T_R, G326E_F + G326E_R primerleri kullanılmıştır. Prob olarak HS popülasyon alleli için özelleşmiş FAM işaretli prob, dirençli popülasyonlar için ise HEX işaretli prob kullanılmıştır. Akarlarda abamectinin direncine neden olan G314D, G326E ve I321T mutasyonlarını belirlemek için G314D_ HEX C + G314D_FAM, G326E_ HEX + G326E_FAM ve I321T_HEX+ I321T_FAM problemleri kullanılmıştır. Genel olarak PCR karışımlarına her bir örnek için 12.5 µl 2X prob mix, 3.5'er µl prob FAM, prob HEX, Primer_F, Primer_R ve 8 veya 10.5 µl *P. ulmi* DNA'sı eklenmiştir. Daha sonra bu karışımlar PCR da koşturulmuştur. PCR sıcaklığı 95°C 5 dk., 95°C 15 sn. ve 55°C 30 saniye ve 40 döngüde tamamlanmıştır. GluCl 3'de G326E hedef bölge mutasyonu belirlenememiştir ve başlık 3.2.6.4'deki yöntemle klasik PCR ile yeniden incelenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Çalışmada kullanılan Real-time PCR

3.2.6.4. Spiromesifen direnç mutasyonlarının PCR ile belirlenmesi

Spiromesifen dirençli populasyonlarda hedef bölgesi Biotin carboxylase (BC) ve Carboxyl tranferase (CT) bölgelerinde bir mutasyon olup olmadığını belirlemek için ACCase geninin 2 bölgesi PCR ile incelenmiştir. Bu amaçla PCR karışımı hazırlanmıştır. Herbir örnek için karışıma 10 µl 5Xfusion buffer, 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer, 1 µl 10 mM DNTP, 1 µl enzim, 5 µl örnek DNA'sı ve 31 µl H₂O eklenmiştir. Daha sonra bu karışım PCR da koşturulmuştur. PCR sıcaklığı 95°C 10 dk., 92°C 15 sn.'de 40 devir ve 60°C 1 dk'dır. Elde edilen PCR ürünü Sanger sekans analizi için Sentebiolab firmasına sekans için analize gönderilmiştir. Daha sonra sekans analizinden elde edilen veriler Genious Prime programında karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Dirençli Popülasyonların Belirlenmesi

P. ulmi'nin HS popülasyonunun S+A, spiroadiclofen+abamectin, spiromesifen, spiroadiclofen, abamectin ve milbemectin'e karşı LC₉₀ değerleri sırası ile; 0.893, 2.589, 1.798, 2.431, 0.160 ve 0.594 kat arasında değişmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Panonychus ulmi*'nin HS popülasyonunun S+A, spiroadiclofen+abamectin, spiromesifen, spiroadiclofen abamectin ve milbemectin'e karşı LC₉₀ değerleri

İlaç	n*	Eğim	LC ₁₀ (µl/100 ml su)	LC ₅₀ (µl/100 ml su)	LC ₉₀ (µl/100 ml su)
Spiromesifen+ Abamectin	449	1.80±0.19	0.034 0.005-0.074	0.174 0.082-0.291	0.893 0.500-2.861
Spiroadiclofen+Abamectin	417	1.39±0.18	0.038 0.002- 0.108	0.312 0.110-0.639	2.589 1.122 -22.579
Spiromesifen	473	2.31±0.23	0.139 0.089-0.191	0.501 0.402-0.606	1.798 1.422-2.452
Spiroadiclofen	406	1.96±0.19	0.121 0.055-0.194	0.542 0.381-0.731	2.431 1.666-4.343
Abamectin	383	2.81±0.35	0.020 0.002-0.038	0.056 0.024-0.091	0.160 0.098-0.619
Milbemectin	493	5.26±1.18	0.193 0.069-0.267	0.339 0.227-0.405	0.594 0.493-0.938

Bahçe popülasyonlarında S+A'in ayırıcı dozda (doz) % etkisine bakıldığında %80'den az ölüm olan G-2, M-1, T-2 popülasyonları dirençli ve %80'den fazla ölüm olan Sevinçbey, Tepeli, Eyüpler, Balkırı-1, Gelendost-1, Gelendost-3, Tepeli-1, Yalvaç, Çay köy ve Serpil popülasyonları hassas kabul edilmiştir. Toplanan *P. ulmi* popülasyonlarına S+A'in % etkisi Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Panonychus ulmi* popülasyonlarına ait bahçe popülasyonlarının S+A'e ait % etki değerleri

Toplanan Popülasyonlar	% Etki
Sevinçbey köyü (SK)	% 80.65
Tepeli köyü (TK)	% 100
Eyüpler köyü (EK)	% 90.09
Balkırı-1 köyü (B-1)	% 94.21
Gelendost-1 (G-1)	% 94.64
Gelendost-2 (G-2)	% 75.45
Gelendost-3 (G-3)	% 97.59
Tepeli-1 (T-1)	% 96.31
Yalvaç (Y-1)	% 92.78
Çay köy (ÇK)	% 98.77
Marem-1 (M-1)	% 5.96
Serpil köyü (SEK)	% 98.77
Tepeli-2 (T-2)	% 70.46

Ayırıcı dozda %80'den daha az ölüm gösteren dirençli bahçe popülasyonları G-2, M-1 ve T-2 popülasyonlarının LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri sırasıyla 0.55, 1.33 ve 0.79 µl/100 ml su; 2.11, 4.62 ve 1.95 µl/100 ml su olmuştur. S+A'e karşı göstermiş oldukları direnç oranları 3.120-7.661 kat arasında değişmiştir. S+A karışımına karşı en yüksek direnç oranı M-1 popülasyonunda, en düşük direnç oranı G-2 popülasyonunda belirlenmiştir. *P. ulmi*'nin dirençli bahçe popülasyonlarının S+A karışımına karşı belirlenen LC değerleri ve direnç oranları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. S+A'nın ayırıcı dozuna göre dirençli *P. ulmi* bahçe popülasyonlarının LC değerleri ve direnç oranları

Popülasyon	n*	Eğim±SH	X ² /P*	LC ₅₀ (µl/100 ml su)	LC ₉₀ (µl/100 ml su)	Direnç Oranı (LC ₅₀) (BP/HS)
HS	449	1.802±0.189	9.4102/0.051	0.174 0.082-0.291	0.893 0.500-2.861	
Gelendost-2	443	2.213±0.200	3.372/0.497	0.557 0.469-0.657	2.113 1.660-2.916	3.120 2.347-4.149
Tepeli-2	349	3.270±0.384	3.1477/0.369	0.793 0.586-1.024	1.957 1.440-3.454	4.446 3.365-5.873
Marem-1	265	2.367±0.403	0.832/0.841	1.330 0.0.972-1.709	4.626 3.312-8.291	7.661 5.261-11.155

*P değerleri P<0.5'e göre verilmiştir.

4.2. Abamectin+Spiromesifen Karışımında IR Popülasyonunun Direnç Gelişimi

Panonychus ulmi HS popülasyonu direnç kazandırılmak amacıyla 12 kez spiromesifen+abamectin ile seleksiyon yapılmıştır (Çizelge 4.4). Uygulama sonucu elde edilen bu popülasyon IR olarak adlandırılmıştır. *P. ulmi* HS popülasyonu LC₅₀

değeri 0.174 µl/100 ml su'dan 12 kez seleksiyon sonucunda 4.044 µl/100 ml suya yükselmiştir. *P. ulmi* HS popülasyonu LC₉₀ değeri 0.893 µl/100 ml su'dan 12 kez seleksiyon sonucunda 17.204 µl/100 ml suya yükselmiştir. IR popülasyonu S+A LC₅₀ değerine göre HS popülasyona oranla 23.24 kat direnç geliştirdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *P. ulmi*'nin selekte edilen dirençli IR popülasyonun LC değerleri ve direnç oranı

Popülasyon	n*	Eğim±SE	LC10 (µl/100 ml su) (% 95 CL*)	LC50 (µl/100 ml su) (% 95 CL)	LC90 (µl/100 ml su) (% 95 CL)	RR** (LC ₅₀)
HS	449	1.80±0.19	0.034 0.005-0.074	0.174 0.082-0.291	0.893 0.500-2.861	-
IR	262	2.038±0.282	0.950 0.092-2.017	4.044 1.828-6.719	17.204 9.614-84.122	23.24 16.23-4.25

*Güven aralığı, RR** LC₅₀ değerine göre direnç oranı= IR popülasyonun LC₅₀/ HS popülasyonun LC₅₀

4.3. Çapraz Direnç Çalışmaları

4.3.1. Bahçe popülasyonlarında çapraz direncin belirlenmesi

Ayırıcı doz ile belirlenen ve %80'den az ölümün gerçekleştiği popülasyonlar dirençli bahçe popülasyonları olmuştur. Bu dirençli popülasyonlar G-2, M-1 ve T-2'dir. *P. ulmi*'nin S+A dirençli bahçe popülasyonlarında spiromesifen, abamectin, spiroadiclofen milbemectin ve spiroadiclofen+abamectin'e karşı çapraz direnç gelişip gelişmediği belirlenmiştir. G-2 popülasyonu diğer insektisit/akarisitlere çapraz dirençlerinin LC₅₀ değeri Çizelge 4.5'te verilmiştir. G-2 popülasyonunda spiroadiclofen+abamectin, spiromesifen, spiroadiclofen, abamectin ve milbemectin'e karşı LC₅₀ değerleri sırasıyla 0.255, 1.856, 1.504, 0.029 ve 0.190 µl/100 ml su olarak belirlenmiştir. G-2 popülasyonu spiromesifen ve spiroadiclofen'e 3.92 ve 2.82 kat çapraz direnç göstermiştir. Bu popülasyon spiroadiclofen+abamectin, abamectin ve milbemectin'e çapraz direnç göstermemiştir. M-1 popülasyonunda bu karışım için LC₅₀ değeri ve diğer insektisit/akarisitlere çapraz dirençlerinin LC₅₀ değeri Çizelge 4.6'da verilmiştir. M-1 popülasyonu spiromesifen ve spiroadiclofen'e 1.03 ve 2.90 kat çapraz direnç göstermiştir. M-1 popülasyonunda spiroadiclofen+abamectin, abamectin ve milbemectin'e karşı çapraz direnç oluşmamıştır.

T-2 popülasyonu için bu karışımın LC₅₀ değeri ve diğer insektisit/akarisitlere çapraz dirençlerinin LC₅₀ değeri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Bu popülasyonda spiromesifen ve spiroadiclofen’e 1.40 ve 3.20 kat çapraz direnç göstermiştir. M-1 popülasyonu spiroadiclofen+abamectin, abamectin ve milbemectin’e karşı çapraz direnç göstermemiştir.



Çizelge 4.5. G-2 popülasyonunda spiroadiclofen+abamectin, spiromesifen, spiroadiclofen, abamectin ve milbemectin'e karşı LC₅₀ değerleri ve çapraz direnç oranları

İlaç	Popülasyon	n*	Eğim±SH	X ² /P*	LC ₅₀ (µl/100 ml su)	Direnç Oranı (LC ₅₀) (BP/HS)
S+A*	G-2	406	2.275±0.240	3.0237/0.387	0.255 0.182-0.335	-
	HS	246	0.089±0.042	3.0768/0.379	0.312 0.193-0.466	
Spiromesifen	G-2	582	2.189±0.200	5.0365/0.411	1.856 1.434-2.322	3.921 2.811-5.469
	HS	473	2.307±0.231	0.391/0.983	0.501 0.402-0.606	
Spiroadiclofen	G-2	433	2.866±0.299	3.5578/0.313	1.504 1.089-1.952	2.82 2.118-3.766
	HS	480	1.965±0.187	4.4532/0.348	0.542 0.381-0.731	
Abamectin	G-2	383	2.321±0.256	2.248/0.522	0.029 0.023-0.034	-
	HS	483	1.803±0.176	11.767/0.191	0.056 0.030-0.111	
Milbemectin	G-2	376	3.037±0.349	4.3250/0.228	0.190 0.131-0.255	-
	HS	473	1.629±0.166	22.400/0.000	0.339 0.198-0.552	

P değerleri P<0.005'e göre verilmiştir. (S+A: spiroadiclofen+abamectin)

Çizelge 4.6. M-1 popülasyonunda spiroadiclofen+abamectin, spiromesifen, spiroadiclofen abamectin ve milbemectin'e karşı LC₅₀ değerleri ve çapraz direnç oranları

İlaç	Popülasyon	n*	Eğim	X ² /P*	LC ₅₀ (µl/100 ml su)	Direnç Oranı (LC ₅₀) (BP/HS)
S+A*	M-1	396	2.287±0.243	2.526/0.470	0.248 0.203-0.295	-
	HS	492	1.394±0.178	8.9310/0.062	0.312 0.110-0.639	
Spiromesifen	M-1	577	2.269±0.214	2.724/0.742	0.518 0.416-0.625	1.035 0.775-1.382
	HS	473	2.307±0.231	0.391/0.983	0.501 0.402-0.606	
Spiroadiclofen	M-1	508	2.246±0.217	2.620/0.623	1.597 1.289-1.920	2.9 2.205-3.946
	HS	480	2.246±0.217	4.4532/0.348	0.542 0.381-0.731	
Abamectin	M-1	371	2.761±0.308	3.7835/0.285	0.035 0.023-0.048	-
	HS	483	1.803±0.176	11.767/0.019	0.056 0.030-0.111	
Milbemectin	M-1	377	3.506±0.439	1.131/0.769	0.202 0.170-0.235	-
	HS	473	1.629±0.166		0.339 0.198-0.552	

P değerleri P<0.005'e göre verilmiştir. (S+A: spiroadiclofen+abamectin)

Çizelge 4.7. T-2 popülasyonunda spiroadiclofen+abamectin, spiromesifen, spiroadiclofen, abamectin ve milbemectin'e karşı LC₅₀ değerleri ve çapraz direnç oranları

İlaç	Popülasyon	n*	Eğim	X ² /P*	LC ₅₀ (µl/100 ml su)	Direnç Oranı (LC ₅₀) (BP/HS)
S+A*	T-2	380	2.389±0.250	2.160/0.539	0.262 0.219-0.309	-
	HS	492	1.394±0.178	8.9310/0.062	0.312 0.110-0.639	
Spiromesifen	T-2	584	2.119±0.172	4.464/0.484	0.749 0.630-0.883	1.4 1.107-1.947
	HS	473	2.307±0.231	0.391/0.983	0.501 0.402-0.606	
Spiroadiclofen	T-2	572	2.068±0.184	1.625/0.898	1.746 1.436-2.089	3.2 2.338-4.431
	HS	480	1.965-0.187	4.4532/0.348	0.542 0.381-0.731	
Abamectin	T-2	377	2.800±0.304	3.4971/0.321	0.036 0.026-0.048	-
	HS	483	1.803±0.176	11.767/0.019	0.056 0.030-0.111	
Milbemectin	T-2	386	4.154±0.501	2.250/0.522	0.214 0.186-0.242	-
	HS	473	1.629±0.166	22.400/0.000	0.339 0.198-0.552	

P değerleri P<0.05'e göre verilmiştir. (S+A: spiroadiclofen+abamectin)

4.3.2. IR popülasyonunda çapraz direncin belirlenmesi

Panonychus ulmi'nin S+A'e dirençli IR popülasyonunun (23.24 kat) 5 farklı akarisine karşı çapraz direnç geliştirip geliştirmediği incelenmiştir. Bu insektisit/akarisitlere karşı belirlenen LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri ve direnç oranları Çizelge 4.8'de belirtilmiştir.

Dirençli IR popülasyonunda spiromesifenin LC₅₀ ve LC₉₀ değeri sırasıyla 5.055 µl/100 ml ve 34.459 µl/100 ml su olarak gerçekleşmiştir. LC₅₀ ve LC₉₀ direnç oranları sırası ile 10.410 ve 19.164 kat olmuştur. Dirençli IR popülasyonunda spirodiclofen'in LC₅₀ ve LC₉₀ değeri sırasıyla 6.131 µl/100 ml ve 33.649 µl/100 ml su olarak, LC₅₀ ve LC₉₀ direnç oranları sırası ile 11.321 ve 13.841 kat olarak saptanmıştır. Dirençli IR popülasyonunda spirodiclofen+abamectin'in LC₅₀ ve LC₉₀ değeri sırasıyla 6.729 µl/100 ml ve 27.400 µl/100 ml su olarak bulunmuştur. LC₅₀ ve LC₉₀ direnç oranları sırası ile 21.574 ve 10.583 kat olarak belirlenmiştir. Dirençli IR popülasyonunda abamectinin LC₅₀ ve LC₉₀ değeri sırasıyla 1.562 µl/100 ml ve 10.781 µl/100 ml su olarak bulunmuştur. LC₅₀ ve LC₉₀ direnç oranları sırası ile 23.986 ve 32.212 kat olarak belirlenmiştir. Dirençli IR popülasyonunda milbemectinin LC₅₀ ve LC₉₀ değeri sırasıyla 5.210 µl/100 ml ve 34.459 µl/100 ml su olmuştur. LC₅₀ ve LC₉₀ direnç oranları sırası ile 56.489 ve 61.060 kat olmuştur (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. *Panonychus ulmi*'nin HS ve IR popülasyonları spiromesifen, spiroadiclofen, spiroadiclofen+abamectin, abamectin ve milbemectin'e karşı LC_{50,90} değerleri ve çapraz direnç oranları

Popülasyon	n*	X2 /P*	Eğim±SE	LC ₅₀ (µl/100 ml su) (%) 95 CL)	LC ₉₀ (µl/100 ml su) (%) 95 CL)	RR** (LC ₅₀)	RR** (LC ₉₀)
HS/spiromesifen	473	0.391/0.983	2.307±0.231	0.501 0.402-0.606	1.798 1.422-2.542		
IR/spiromesifen	354	3.077/0.688	1.551±0.173	5.055 3.795- 6.631	34.459 23.052-61.741	10.410 7.259-14.928	19.164 11.038-33.2770
HS/ spiroadiclofen	406	4.4532/0.348	1.965±0.187	0.542 0.381-0.731	2.431 1.666-4.343		
IR/ spiroadiclofen	352	2.316/0.803	1.733±0.204	6.131 4.473-8.055	33.649 23.643-55.605	11.321 7.895-16.236	13.841 8.240-23.249
HS/ S+A*	417	8.9310/0.06	2.102±0.237	0.312 0.110-0.639	2.589 1.222-22.579		
IR/ S+A*	309	0.396/0.982	1.394±0.178	6.729 5.248-8.402	27.400 20.473-41.250	21.574 14.113-32.981	10.583 5.534-20.240
HS/abamectin	383	11.767/0.191	2.813±0.348	0.056 0.024-0.091	0.335 0.184-1.168		
IR/abamectin	311	2.907/0.573	1.528±0.218	1.562 1.097-2.136	10.781 6.774-22.877	23.986 16.003-35.952	32.212 16.6009-62.4770
HS/ milbemectin	966	2.199/0.699	1.763±0.157	0.157 0.126- 0.190	0.564 0.237-11.999		
IR/ milbemectin	354	1.990/0.850	1.562±0.182	5.210 3.813-6.929	34.459 23.052-61.741	56.489 37.998-83.979	61.060 33.326-111.874

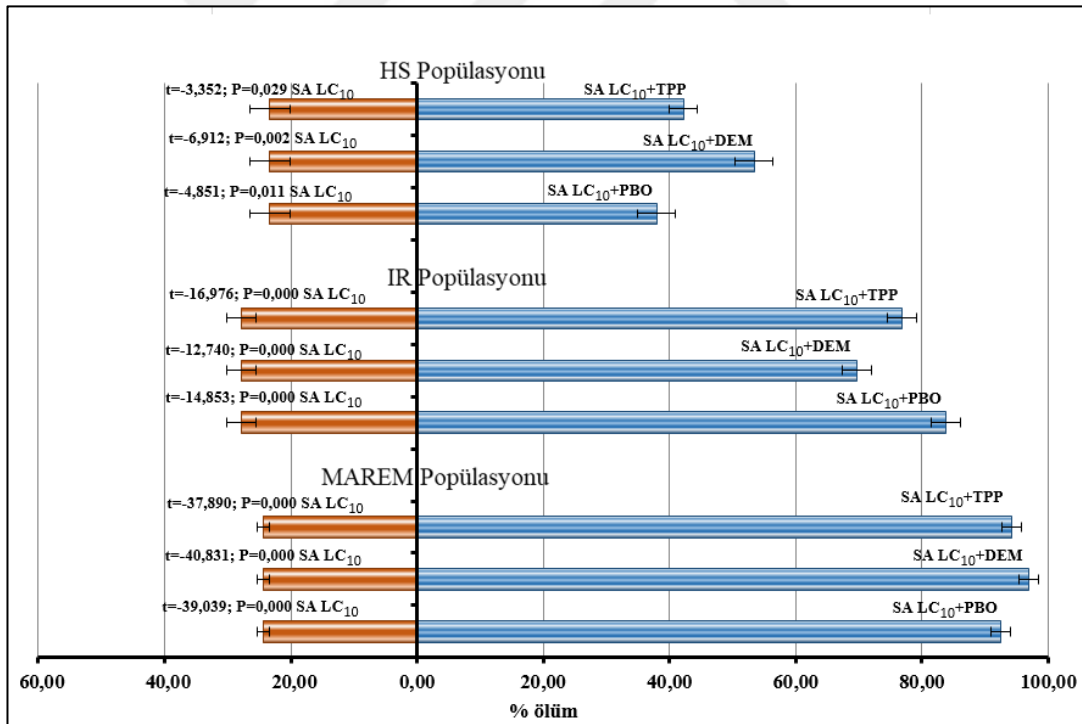
P değerleri P<0.05'e göre verilmiştir, S+A: spiroadiclofen+abamectin, RR*(LC₅₀ ve LC₉₀): direnç oranı

4.4. Sinerjist Çalışmalarının Sonuçları

4.4.1. Bahçe popülasyonlarında sinerjist sonuçları

Sinerjist çalışmaları sadece M-1 popülasyonunda yapılmıştır. Bunun nedeni S+A'e karışımına sadece M-1 popülasyonunda 5 katın üzerinde direnç oranı belirlenmiştir. Diğer 2 popülasyonda ise S+A'e 5 katın altında bir direnç oranı belirlendiği için sinerjist çalışmalarında güvenilir sonuç verme olasılığı azaldığı için sinerjist çalışması yapılmamıştır.

S+A'e dirençli HS, IR ve M-1 popülasyonlarında sırasıyla LC₁₀ 0.034 µl, 0.95 µl ve 0.17 µl değerine göre "DEM+S+A", "TPP+S+A" ve "PBO+S+A" sinerjistlerinin etki oranları verilmiştir (Şekil 4.1). Her üç popülasyonda da sinerjistler önemli derecede sinerjistik etki göstermiştir (P<0.05).



Şekil 4.1. HS, IR ve M-1 popülasyonunda LC₁₀ değerinin sinerjistik uygulamalarındaki ölüm oranları

4.5. Biyokimyasal Çalışmalar

4.5.1. Detoksifikasyon enzimlerinin belirlenmesi

4.5.1.1. *Panonychus ulmi* popülasyonlarında esteraz enzimi aktivitesinin incelenmesi

T-2, HS, G-2, M-1 ve IR popülasyonlarının esteraz enzim aktiviteleri 25.15, 34.97, 15.75, 34.93 ve 16.53 mOD/min/mg olmuştur (Çizelge 4.9). T-2 ve M-1 popülasyonlarının enzim düzeyleri hassasa göre aynı önem seviyesinde olduğu istatistiki olarak belirlenmiştir. G-2 ve IR popülasyonları HS popülasyona göre istatistiki olarak farklı önem seviyelerinde olduğu görülmüştür (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *Panonychus ulmi*'nin T-2, HS, G-2, M1 ve IR popülasyonlarının esteraz enzim aktivitesi

Popülasyon	n*	Enzim Aktivitesi** mOD/min/mg protein	R/S***
T-2	4	25.15 (± 3.54)ab	1.52
G-2	4	34.97 (± 5.64) b	2.11
M-1	4	15.75 (± 1.47) a	0.95
IR	4	34.93 (± 0.95) b	2.11
HS	4	16.53 (± 2.35) a	

* Tekerrür sayısı

** Farklı olan harflerin gruplar arasında farklılıkların istatistiki olarak önemli olduğunu gösterir ($P < 0.05$)

***Tepeli-2, Gelendost-2, Marem-1 ve Seleksiyon (IR) popülasyonlarının spesifik enzim aktivitesi /Hassas popülasyonunun spesifik enzim aktivitesi

4.5.1.2. *Panonychus ulmi* popülasyonlarında GST enzimi aktivitesinin incelenmesi

T-2, HS, G-2, M-1 ve IR popülasyonlarının GST enzim aktiviteleri 12.62, 10.16, 12.31, 19.75 ve 11.33 mOD/min/mg olmuştur (Çizelge 4.10). GST enzim aktivitesinin G-2, T-2 ve M-1 popülasyonlarında enzim aktiviteleri hassasa göre aynı önem seviyesinde olduğu istatistiki olarak belirlenmiştir. IR popülasyonu HS popülasyona göre istatistiki olarak farklı önem seviyesinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. *Panonychus ulmi*'nin T-2, HS, G-2, M1 ve IR popülasyonlarının GST enzim aktivitesi

Popülasyon	n*	GST enzim aktivitesi** mOD/min/mg protein	R/S***
T-2	4	12.62 (± 1.12)b	1.11
G-2	4	10.16 (± 1.04) a	0.89
M-1	4	12.31 (± 0.93) b	1.08
IR	4	19.75 (± 1.70) c	1.74
HS	4	11.33 (± 1.18) ab	

* Tekerrür sayısı

** Farklı olan harflerin gruplar arasında farklılıkların istatistiki olarak önemli olduğunu gösterir ($P < 0.05$)

***Tepeli-2, Gelendost-2, Marem-1 ve Seleksiyon (IR) popülasyonlarının spesifik enzim aktivitesi /Hassas popülasyonunun spesifik enzim aktivitesi

4.5.1.3. *Panonychus ulmi* popülasyonlarında Sitokrom P450 enzimi aktivitesinin incelenmesi

T-2, HS, G-2, M-1 ve IR popülasyonlarının Sitokrom P450 enzim aktiviteleri 1.42, 1.55, 3.21, 0.98 ve 1.03 RFU/30min/mg protein olmuştur (Çizelge 4.11). Sitokrom P450 enzim aktivitesinin T-2, G-2 ve IR popülasyonlarında enzim aktiviteleri hassasa göre aynı önem seviyesinde olduğu istatistiki olarak belirlenmiştir. M-1 popülasyonu HS popülasyona göre istatistiki olarak farklı önem seviyesinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. *Panonychus ulmi*'nin T-2, HS, G-2, M1 ve IR popülasyonlarının P450 enzim aktivitesi

Popülasyon	n*	P450 Enzim Aktivitesi** RFU/30min/mg protein	R/S***
T-2	4	1.42 (± 0.043)a	1.37
G-2	4	1.55 (± 0.44) a	1.50
M-1	4	3.21 (± 0.03) b	3.11
IR	4	0.98 (± 0.07) a	0.95
HS	4	1.03 (± 0.05) a	

* Tekerrür sayısı

** Farklı olan harflerin gruplar arasında farklılıkların istatistiki olarak önemli olduğunu gösterir ($P < 0.05$)

***Tepeli-2, Gelendost-2, Marem-1 ve Seleksiyon (IR) popülasyonlarının spesifik enzim aktivitesi /Hassas popülasyonunun spesifik enzim aktivitesi

4.6. Moleküler Çalışmalar

4.6.1. Genomik DNA izolasyon sonuçları

Genomik DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen DNA'ların, nanometrede yoğunluklarına bakılarak her bir örnek için 50 ng olacak şekilde 100 µl hacme uygun DNA miktarları tespit edilmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Popülasyonlara ait DNA yoğunlukları ve saflık dereceleri

Popülasyon	Yoğunluk ng/µl	Nükleik asit/Protein Oranı
T-2	3.7	2.26
G-2	13.6	2.15
M-1	3.2	2.35
IR	321	2.08
HS	4.1	2.38

4.6.2. Genomik DNA'nın PCR ile çoğaltılması

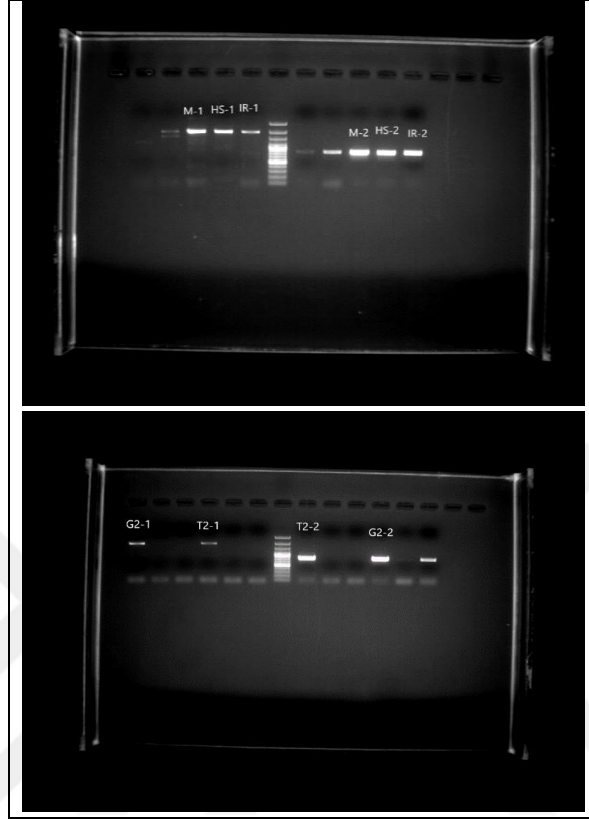
Abamectin direncinin hedef yeri GluCl kanalları olup bu kanallarda daha önceden belirlenen mutasyonları tespit etmek amacıyla bu bölgelere spesifik olarak dizilen primerler kullanılarak bu hedef bölgeler çoğaltılmıştır. Abamectin dirençli popülasyonlarda GluCl 1'de G314D mutasyonu ve GluCl 3'de I321T nokta mutasyonları RT-PCR ile tarandığı için jel görüntüsü elde edilmemiştir. GluCl 3'de G326E klasik PCR ile tarandığı için jel görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. IR, HS, M-1, G-2 ve T-2 popülasyonlarının GluCl 3'de G326E klasik PCR ile elde edilen jel görüntüsü

Spiromesifen için A karboksilaz (ACCCase) enzimindeki PuACCase (Biotin carboxylase; BC) 1-568 ve PuACCase (Carboxyl tranferase; CT) 5167-5828

bölgeleride PCR ile çoğaltılmış ve UV altında görüntülenen agaroz jel görüntüsü Şekil 4.3'te verilmiştir.

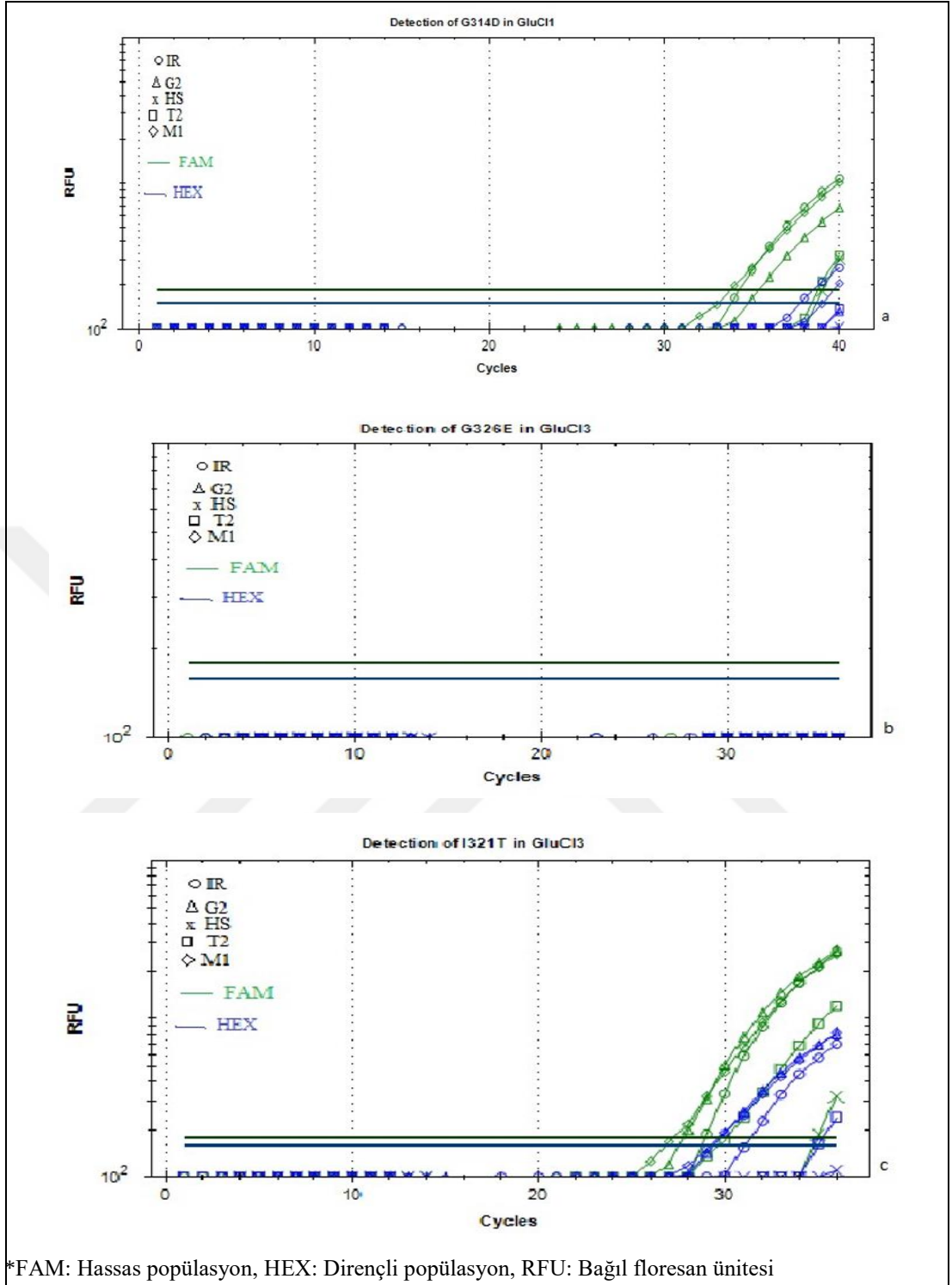


Şekil 4.3. ACCase enzimidaki PuACCase 1-568 ve PuACCase 5167-5828 mutasyonu içeren bölgelerin çoğaltılması

4.6.3. Dirençle ilişkili nokta mutasyonlarının belirlenmesi

4.6.3.1. *P. ulmi* GluCI'da nokta mutasyon tespiti

Elde edilen sonuçlara göre GluCI 1 kanalında G314D nokta mutasyonu seleksiyon popülasyonu IR ve M-1 popülasyonunda, GluCI 3 kanalında I321T nokta mutasyonu bütün bahçe popülasyonlarında ve IR popülasyonunda belirlenmiştir (Şekil 4.4). GluCI 3'de G326E'de nokta mutasyonu RT-PCR belirlenememiştir. Bu duruma ek olarak, G326E mutasyonu klasik PCR ile yapılmış ve Genius programı ile analiz edilmiştir, ancak hiçbir popülasyonda belirlenememiştir (Şekil 4.5).



*FAM: Hassas popülasyon, HEX: Dirençli popülasyon, RFU: Bağlı floresan ünitesi

Şekil 4.4. *P. ulmi*'nin HS, IR ve dirençli popülasyonlarında RT-PCR ile tarama yapılan

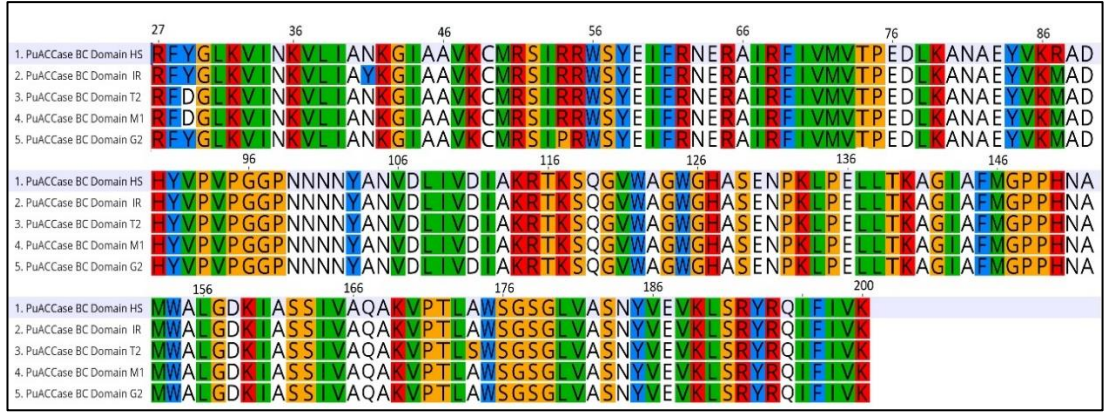
PuGluCl3_HS	T	GVCLFFV	FGALLEFALV
PuGluCl3_IR	T	GVCLFFV	FGALLEFALV
PuGluCl3_T2	T	GVCLFFV	FGALLEFALV
PuGluCl3_M	T	GVCLFFV	FGALLEFALV
PuGluCl3_G2	T	GVCLFFV	FGALLEFALV

Şekil 4.5. Panonychus ulmi popülasyonlarının GluCl 3'ün 326 gen bölgesi aminoasit dizisi

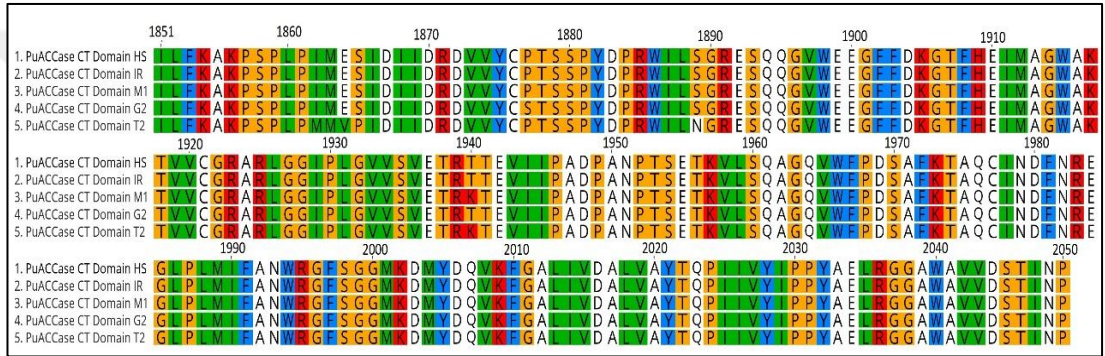
4.6.3.2. ACCase geni dizi karşılaştırılması sonuçları

ACCase geninde BC bölgesinde hassas popülasyona göre IR popülasyonunda N41Y ve R87M, T-2 popülasyonunda Y29D, R87M, A174S, M-1 popülasyonda Y29D ve R87M, G-2 popülasyonunda R87M mutasyonları tespit edilmiştir.

ACCase geninde CT bölgesinde hassas popülasyona göre G-2 popülasyonunda P1877S, T-2 popülasyonunda I1862M, E1864V, S1865P, S1889N ve T2030K, M-1 popülasyonunda T2030K mutasyonları tespit edilmiştir. CT bölgesinde IR popülasyonunda hiçbir mutasyona rastlanmamıştır. ACCase genin BC bölgesinde R87M mutasyonu bütün S+A dirençli popülasyonlarda belirlenmiştir. Bunun dışında ACCase genin BC ve CT bölgelerinde farklı noktalarda mutastonlar bulunmuştur. Fakat bu bütün mutasyonların spiromesifen direnci ile ilişkili olup olmadığına karar vermek için ek çalışmaların yapılması gerekmektedir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



Şekil 4.6. Hassas, seleksiyon (IR), Tepeli-2, Marem-1 ve Gelendost-2 popülasyonlarının ACCase BC domain (*Biotin carboxylase*) bölgesinin aminoasit diziliminin karşılaştırılması



Şekil 4.7. Hassas, seleksiyon (IR), Tepeli-2, Marem-1 ve Gelendost-2 popülasyonlarının ACCase CT Domain (*Carboxyl transferase*) bölgesinin aminoasit diziliminin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tetranychidae familyası içinde yer alan *P. ulmi* dünya genelinde ekonomik anlamda yoğun zarara neden olan akar türlerinden biridir. *P. ulmi* konukçusuna özelleşmiş olup en fazla elma ve erik ağaçlarında zarara neden olmaktadır. Bu çalışmada kullanılan akarisitler bölgede elma bahçelerinde *P. ulmi* mücadelesinde sık uygulama yapılan bitki koruma ürünleridir. Özellikle son yıllarda bölge üreticisinin bir çözüm olarak gördüğü ve kimyasal mücadelede yaygın kullanılan S+A karışımının direnç oluşturup oluşturmadığı, çalışmada kullanılan diğer insektisit/akarisitler ile olan çapraz direnç durumları, direncin biyokimyasal mekanizması ve dirence sebep olan hedef bölge mutasyonları moleküler yöntemler ile çalışılmıştır. Piraneo vd. (2015) yapmış oldukları çalışmada direnç düzeyini; düşük direnç (Direnç oranı < 10), orta düzeyde direnç ($10 > \text{Direnç oranı} > 100$) ve yüksek direnç (direnç oranı > 100) olarak sınıflandırmıştır.

Bu araştırmanın biyoassay çalışmaları kapsamında Isparta'nın farklı bahçelerinden 13 popülasyon toplanmış ve spiromesifen+abamectin'e dirençli bahçe popülasyonları elde edilmiştir. Bahçe popülasyonlarında S+A'nın hassas popülasyonda belirlenen LC₉₀ değeri uygulandığında G-2, M-1, T-2 popülasyonları dirençli Sevinçbey, Tepeli, Eyüpler, Balkırı-1, Gelendost-1, Gelendost-3, Tepeli-1, Yalvaç, Çay köy ve Serpil popülasyonları ölüm oranlarına göre hassas olarak değerlendirilmiştir. S+A'ya dirençli kabul edilen ve ayırıcı dozda %80'den daha az ölüm gösteren M-1 7.66 kat, T-2 4.44 ve G-2 3.12 kat dirençli bulunmuştur. Çalışmada üç dirençli bahçe popülasyonlarına ait direnç oranları Piraneo vd. (2015)'nin belirledikleri direnç düzey skalasına göre düşük dirençli popülasyonlar olarak kaydedilmiştir. Çalışmanın diğer bir adımı olan S+A karışımı ile 12 defa seleksiyon sonucunda dirençli hale getirilen IR popülasyonu bu karışıma gösterdiği LC₅₀ direnç oranı 23.41 kat olarak belirlenmiştir. Bu 3 bahçe popülasyonunda (Gelendost-2, Tepeli-2, Marem-1) S+A karışımı dışında uygulanan diğer insektisit/akarisitlerin (spirodiclofen+abamectin, spiromesifen, spirodiclofen, abamectin ve milbemectin) çapraz direnç oranları belirlenmiştir. İnsektisit-akarisit olan spiromesifen ve seçici bir akarisit olan spirodiclofen sırasıyla; G-2 popülasyonunda 3.92 ve 2.82 kat, M-1 popülasyonunda 1.03 ve 2.90 kat ve T-2 popülasyonunda 1.40 ve 3.20 kat çapraz direnç göstermiştir. Bu 3 bahçe popülasyonunun abamectin, milbemectin ve spirodiclofen+abamectin'e çapraz direnç

oluşturmadığı belirlenmiştir. IR popülasyonunun spiroadiclofen+abamectin, spiromesifen, spiroadiclofen, abamectin ve milbemectin'e sırasıyla 21.57 kat, 10.41 kat, 11.32 kat, 23.98 kat ve 56.48 kat çapraz dirençli olduğu bulunmuştur. Elma yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı bu bölgelerdeki *P. ulmi* bahçe popülasyonlarında, spiromesifen ve spiroadiclofen için Piraneo vd. (2015) direnç ölçeğine göre düşük direnç belirlenmişken; abamectin, milbemectin ve spiroadiclofen+abamectin için herhangi bir direnç gelişimi tespit edilememiştir. Dünyada ve ülkemizde kırmızı örümceklerin akarisit ve insektisitlere gösterdiği duyarlılık düzeyi ve bunların mekanizması ile birçok çalışma yapılmıştır. Ancak Avrupa kırmızı örümceği özelinde S+A karışımı veya başka karışım formülasyonlarına direnç gelişimi hakkında çalışma bulunmamaktadır. *P. ulmi* ile aynı familyadan olan diğer kırmızı örümcekler ile bu araştırma konusunda yer alan tek aktif maddeli insektisit/akarisitler ile ilgili diğer araştırmacıların çalışmaları karşımıza çıkmaktadır. Ancak bu çalışmada kullanılan aktif maddelere karşı *P. ulmi*'de direnç gelişimi ile ilgili bazı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın yapıldığı bölgede *P. ulmi*'ye ait abamectin ve spiroadiclofene karşı yapılmış iki adet çalışma bulunmaktadır. Çağatay vd. (2014), Isparta bölgesindeki elma bahçelerinden toplanan *P. ulmi* popülasyonlarında abamectin'e karşı 0.75- 2.25 kat direnç belirlemişlerdir. Yaman vd. (2016) ise Isparta ili elma bahçelerinden toplanan *P. ulmi* popülasyonlarının spiroadiclofen'e karşı direnç düzeyleri <1-1.95 kat olarak belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmalara göre bu akarisitlere karşı Isparta ili elma bahçelerinde zararlı olan *P. ulmi* popülasyonlarında önemli bir direnç gelişimi olmamıştır. Ayrıca bu akarisitlere karşı bu türün direnç gelişimi ile ilgili ülkemizde ve dünyada yapılmış bazı çalışmalar da vardır. İnanıcı ve Ay (2018), 5 kez selekte ettikleri *P. ulmi* popülasyonunda milbemectin'e karşı 7.43 kat direnç geliştirdiğini bildirmişlerdir. Kramer ve Nauen (2011), spiroadiclofen ile selekte ettikleri *P. ulmi* popülasyonunda abamectine erginde 1.7 kat, spiromesifen'e larva ve yumurtada 30.4 ve 4 kat direnç gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu popülasyonda abamectin'e karşı çapraz direnç göstermediğini de tespit etmişlerdir. Rameshgar vd. (2019), *P. ulmi* popülasyonlarının abamectin'e karşı 11 ile 46 kat arasında direnç geliştirdiğini belirlemişlerdir. Pree vd. (2005), *P. ulmi*'ye karşı spiroadiclofen'in yumurta dönemine toksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca kullanılan diğer akarisitlere karşı çapraz direnç geliştirmedeğini de belirlemişlerdir. Kramer ve Nauen (2011), spiroadiclofen ile selekte ettikleri *P. ulmi* popülasyonunda spiromesifen'e larva ve yumurtada 30.4 ve 4 kat direnç geliştirdiğini belirlemişlerdir. Aynı bölgede Sökeli

vd. (2007), elma bahçelerinden toplamış oldukları diğer kırmızıörümcek türü *T. urticae* popülasyonlarının abamectin'e 1.0-1.4 kat direnç geliştirdiğini belirlemişlerdir. Kwon vd. (2010)'nin meyve ağaçlarından topladıkları *T. urticae* popülasyonlarından PTF ve AbaR popülasyonlarının direnç oranlarını sırasıyla 239 ve 4753 kat olarak belirlemişlerdir. Ullah vd. (2011), *T. kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae) türünün hassas ve tarla popülasyonunda milbemectine ait LC₅₀ konsantrasyonları sırasıyla 0.08 ve 0.56 mg/l olarak belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, 7 kat direnç olduğunu saptamışlardır. Papapostolou vd. (2020), *T. urticae* tarla popülasyonlarında abamectin için 89 kat, clofentezine için >1000 kat, etoxazole için >5000 kat, fenpyroximate ve pyridaben için 27 kat, spiroadiclofen ve spirotetramat için sırasıyla 20 ve 36 kat ve cyenopyrafen ve cyflumetofen için sırasıyla 116 ve >500 kat direnç belirlemişlerdir. İnak vd. (2022), Türkiye'de çilek alanlarından topladıkları dokuz *T. urticae* popülasyonunun ikisinde spiromesifene karşı direnç oluştuğunu ve direnç oranının 60 ile 140 kat arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Yaman ve Ay (2023), Isparta elma bahçelerinden topladıkları *P. ulmi* popülasyonlarının hassas popülasyona göre bifenazate ve acequinocyl'e karşı direnç düzeylerini saptamışlardır. Bifenazate karşı direnç oranları sırasıyla; <1, 1.34, 1.67, 2.24, 1.30, 1.46, <1, <1; acequinocyl için direnç oranları sırasıyla; 1.72, <1, 1.44, <1, 1.14, 1.18, 1.03, <1 olarak bulunmuştur. Bütün bahçe popülasyonlarının her iki akarısitede de ya hassas popülasyonla aynı derecede ya da düşük oranda direnç gösterdiğini belirlemişlerdir.

Karışım akarisitlere direnç gelişimi ile ilgili diğer kırmızı örümcek türlerinde de sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Alsay ve Ay (2022), 13 kez selekte edilen *T. urticae* hassas popülasyonunda spiromesifen+abamectin'e karşı LC₅₀ direnç oranına göre 1199.6 kat direnç geliştirdiğini belirlemişlerdir. Aynı çalışmada seleksiyon popülasyonunda abamectin için 1759 spiromesifen için ise 258.874 kat çapraz direnç, spiroadiclofen, milbemectin ve spiroadiclofen+abamectin için sırasıyla 224, 40 ve 1069 kat çapraz direnç tespit etmişlerdir. Ulukaya ve Ay (2022), Isparta elma bahçelerinden topladıkları *T. urticae*'nin popülasyonlarında spiromesifen+abamectine 1.89-315.31 kat direnç geliştirdiğini ve milbemectine 2.98-5.89 kat, spiroadiclofene 1.03-13.00 kat çapraz direnç geliştirdiğini belirlemişlerdir. Badeinia vd. (2020)'nin İran'da yaptıkları çalışmada spiroadiclofene karşı dirençli *P. ulmi* popülasyonların hassas popülasyona göre 150 kattan fazla direnç oluşturduğunu ve spiroadiclofen ile spiromesifen arasında çapraz direnç olduğunu saptamışlardır. Yapılan çalışmalarda abamectin ve

milbemectin, spiromesifen ve spirotetramat arasında çapraz direnç diğer akar türlerinde de belirlenmiştir. Rauch ve Nauen (2002), İtalyadan topladıkları *T. urticae* popülasyonlarında 21 ay 37 seleksiyon döngüsünden sonra direncin oluştuğunu, abamectin ve hexythiazox gibi akarisitlere de çapraz direnç göstermediğini bulmuşlardır. Sato vd. (2005), 5 kez selekte edilen abamectin dirençli *T. urticae* popülasyonunda abamectine karşı 342 kat direnç geliştiğini bildirmişlerdir. Koh vd. (2009), 10 elma bahçesinden toplanan *T. urticae* popülasyonlarının abamectine düşük oranlarda, milbemectine ise 6.4 kat direnç geliştirdiğini belirtmişlerdir. Nicastro vd. (2010), milbemectin ile 6 kez selekte ettikleri *T. urticae* popülasyonunda 409 kat direnç gösterdiğini, milbemectin ve abamectin arasında çapraz direnç oluştuğunu saptamışlardır. Yu vd. (2011), *Panonychus citri* (McGregor)'yi spirotetramat ile selekte etmişler ve 51.2 kat direnç geliştiğini bulmuşlardır. Spirotetramat dirençli seleksiyon popülasyonunda çapraz direnç çalışmalarında spirotetramat, abamectin, hexythiazox, pyridaben, fenprothrin, fenbutatinoxide, fenpyroximate, clofentezine, chlorfenapyr, bifenthrin ve amitraz'a sırasıyla; 29.5, 2.3, 1.2, 3.7, 1.6, 0.9, 4.7, 1.8, 2.1, 1.8 ve 2.7 kat direnç gösterdiğini saptamışlardır. Xue vd. (2020b), *T. urticae* popülasyonlarında abamectin ve milbemectin direnci arasında açık bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Demaght vd. (2013)'nin Belçika'da yaptıkları çalışmada *T. urticae* popülasyonlarında spirotetramat direncinin 680 kata kadar yükseldiğini ve spirotetramat grubundan spiromesifen'e karşı çapraz direnç oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

IR popülasyonu, S+A'e 5 kattan fazla dirençli olan M-1 ve HS popülasyonunda direnç mekanizmasını belirlemek için esterase inhibitörü TPP, GST inhibitörü DEM ve P450 inhibitörü PBO ile de çalışmalar yapılmıştır. Her üç sinerjiste IR, M-1 ve HS popülasyonunda S+A ile önemli derecede yüksek sinerjistik etki göstermiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise S+A karışımına direnç geliştiren IR ve bahçe popülasyonlarında detoksifikasyon enzim düzeyleri incelenmiştir. Esteraz enzim aktivitesi G-2 (2.11 kat) ve IR (2.11 kat) popülasyonlarında HS popülasyona göre önemli derecede yüksek çıkmıştır. T-2 (1.52 kat) ve M-1 (0.95 kat) popülasyonlarının esterase aktivitesi ise hassas popülasyonla aynı derecede çıkmıştır. GST enzim aktivitesi IR popülasyonunda, HS popülasyona göre önemli derecede yüksek çıkmıştır. IR popülasyonuna göre S+A'ya göre daha düşük dirençli bahçe popülasyonlarının

GST aktivitesi ise HS popülasyonun enzim seviyesi ile aynı düzeyde çıkmıştır. Sitokrom P450 enzim aktivitesi M-1 popülasyonunda HS popülasyonuna göre önemli derecede yüksek olarak belirlenmiştir. T-2, G-2 ve IR popülasyonlarında ise P450 enzim aktivitesi HS popülasyon ile aynı düzeyde olmuştur. *P. ulmi*'de karışım formülasyonlarının direnç artışı ile ilişkili detoksifikasyon enzimleri ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Ancak Ay vd. (2024)'nin S+A dirençli *T. urticae*'de yaptıkları çalışmada TPP, DEM ve PBO'nun S+A ile önemli derecede sinerjistik etki gösterdiğini ve esteraz, GST ve P450 enzim aktivitelerinin önemli derecede arttığını saptamışlardır. Bu çalışmada ise S+A ile selekte edilen IR popülasyonunda her üç sinerjiste önemli derecede sinerjistik etki göstermiştir, esteraz ve GST enzim aktiviteleri önemli derecede yüksek çıkmıştır. Ancak IR popülasyonunun P450 enzim aktivitesi hassas popülasyonun enzim düzeyi ile aynı olmuştur. Bu iki çalışma arasındaki farklı sonuçların türlerin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. S+A karışımını oluşturan abamectin ve spiromesifenin biyokimyasal direnç mekanizması *P. ulmi* ve yakın akraba bir tür olan *T. urticae*'de birçok çalışmada incelenmiştir. İnak vd. (2023), Karanfil serasından topladıkları *T. urticae* popülasyonunu spirodiclofen ve spiromesifen ile ayrı ayrı, yüksek direnç düzeylerine ulaşılana kadar selekte etmişlerdir. Dirençte P450 enziminin ve daha az ölçüde karboksil/kolinesterazların rol oynadığını göstermişlerdir. Bu ketoenoller ile selekte edilen popülasyonların gen ekspresyon analizi, tarladan toplanan popülasyon ve hassas popülasyon ile karşılaştırıldığında, ketoenollere karşı dirençte P450'nin rol oynadığı hipotezini desteklediğini bildirmişlerdir. Yorulmaz vd. (2013), abamectin ile aynı etki mekanizmasına sahip olan milbemectini Isparta'da elma bahçelerinden topladıkları üç *Neoseiulus californicus* McGregor (1954), (Acari: Phytoseiidae) popülasyonuna etkinliğini araştırmışlardır. Eğirdir, Eyüpler ve Gelendost'tan toplanan üç popülasyonda sırasıyla 7.20, 6.52 ve 7.35 kat direnç geliştiğini bildirmişlerdir. Esteraz spesifik enzim aktivitesinin en yüksek Eğirdir popülasyonunda görüldüğü; GST enzim aktivitesinin ise en yüksek Eyüpler popülasyonunda kaydedildiği, fakat istatistiki olarak fark bulunmadığını belirlemişlerdir. Kwon vd. (2010)'nin abamectin dirençli *T. urticae* popülasyonlarında Esteraz ve karışık fonksiyonlu oksidaz (MFO)'ın metabolik faktörler olarak abamectin direnciyle ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, Esteraz bantlarının TPP tarafından spesifik olarak inhibe edildiğini ve bu durumun da dirençle ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Sinerjist çalışmalarında verapamil ile uygulamanın abamectine karşı LT₅₀'yi azaltmadığını bu durumun da ABC taşıyıcısının dirençle ilgili

olmadığını bildirmişlerdir. Kramer ve Nauen (2011), spiroadiclofen ile selekte ettikleri *P. ulmi* popölasyonunda 7000 kattan fazla direnç belirlemişlerdir. Bu popölasyonda spiroadiclofenle en iyi sinerjistik etkiyi PBO'nun gösterdiğini DEM sinerjisinin de hiçbir etkisi olmadığını belirlemişlerdir. Çağatay vd. (2018), abamectin dirençli sera popölasyonlarında esteraz, GST ve P450 enzim aktiviteleri hassas popölasyona (GSS) kıyasla daha yüksek çıkmıştır. Alsay ve Ay (2024), spiromesifen+abamectin karışımı ile selekte ettikleri *T. urticae* popölasyonunda hassas popölasyonuna göre esteraz, GST ve P450 enzimleri sırasıyla 1.77, 2.57 ve 2.58 kat artış göstermiştir. Yaman vd., (2016), *P. ulmi* popölasyonlarının spiroadiclofen'e karşı direnç düzeyleri <1-1.95 kat, hexythiazox'a <1-2.36 kat ve etoxazole <1-7.30 kat arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *P. ulmi* popölasyonlarının esteraz enzim aktivitelerine bakıldığında en az esteraz enzim düzeyi hassas popölasyonda tespit edilmiştir. GST, AChE ve P450 enzim aktiviteleri popölasyonlara göre farklılık göstermiş bazı popölasyonlarda bu detoksifikasyon enzimlerinden bazılarının yüksek olmasının direnç oluşturabileceğine işaret etmişlerdir. Badeinia vd. (2020), spiroadiclofen dirençli popölasyonlarda nispeten daha yüksek detoksifikasyon enzim aktivitesi göstermiştir. Ayrıca araştırmacılar artmış detoksifikasyonun enzim aktivitesinin spiroadiclofen direnci ile spiromesifene karşı sınırlı çapraz direne neden olduğunu belirlemişlerdir. Vechia vd. (2019), yaptıkları çalışmada akarisit phosmet tek başına veya phosmet+spiroadiclofen uygulanan *Brevipalpus californicus*'da, P450 aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir. Phosmet ve spiroadiclofen karışımı uygulamasında ölümlerde herhangi bir antagonistik etki gözlenmemiştir. Aynı çalışmada imidacloprid tek başına veya spiroadiclofen ile kombinasyon halinde maruz kalan *B. californicus* popölasyonunda P450'lerin, karboksilkolinesterazların (CCE) ve GST aktivitesinde bir artış gözlemlenmiştir. İnancı ve Ay (2018), milbemectin ile seleksiyon yaptıkları *P. ulmi* popölasyonunda esteraz ve P450 enzim aktivitelerinin sırasıyla başlangıç popölasyona göre 1.67 ve 2.09 kat arttığını belirtmişlerdir. Milbemectin ile seleksiyon yapılan *P. ulmi* popölasyonunda hassas popölasyona göre esteraz enzimi ve P450 enzimi önemli derecede artarken, GST enzimin önemli derecede azaldığını bildirmişlerdir. Kumral vd. (2009), Bursa ilinden topladıkları *P. ulmi* popölasyonlarında chlorpyrifos ve lambda-cyhalothrin'e karşı 6.0-35.6 ve 0.7-5.7 kat direnç belirlemişler ve direncin esteraz ve GST ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Papapostolou vd. (2020), *T. urticae* popölasyonunda (Trz) spiroadiclofen'e 20 kat direnç geliştirdiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada DEM sinerjisinin Trz

popülasyonunda spirodiclofen toksisitesini az oranda sinerjize ettiğini ancak tüm sinerjistlerin (PBO, DEM, DEF) ise spirodiclofen toksisitesini özellikle artırmadığını belirlemişlerdir.

Çalışmada karışım formülasyonu oluşturan spiromesifen ve abamectin'in akarların etki yerlerinde dirençli *P. ulmi* popülasyonlarında bir mutasyon olup olmadığı da incelenmiştir. Abamectin akarların sinir sisteminde GluCl kanallarında etkili olmaktadır. Spiromesifen ise lipid biyosentezindeki ilk adımın bir parçası olan asetil koenzim A karboksilazı inhibe ederek böcek ölümüne yol açmaktadır (IRAC, 2024). Bu çalışmada abamectin direnç mekanizması için diğer akarlarda belirlenen GluCl 1'de G314D mutasyonu ve GluCl 3'de I321T ve G326E nokta mutasyonları taranmıştır. RT-PCR sonuçlarına göre GluCl 1 kanalında G314D nokta mutasyonu IR ve M-1 popülasyonunda, GluCl 3 kanalında I321T nokta mutasyonu bütün bahçe popülasyonlarında ve IR popülasyonunda belirlenmiştir. Diğer akar gruplarında belirlenen GluCl 3'de G326E nokta mutasyonu *P. ulmi*'nin hiçbir popülasyonunda belirlenmemiştir. *P. ulmi* popülasyonlarında bu mutasyonlar ilk defa incelenmiştir. Ancak diğer akar türlerinde bu mutasyonlar incelenmiştir. Ay vd. (2024), spiromesifen+abamectin ile selekte ettikleri dirençli *T. urticae* popülasyonunda daha önceden belirlenen GluCl kanalları ile ilişkili G314D ve G326E mutasyonlarını taramışlar fakat bu mutasyonları tespit edememişlerdir. ACCase geni BCD bölgesinde tek aminoasit mutasyonu G37D'yi belirlemiş olmalarına rağmen spiromesifen ile ilişkili olup olmadığının doğrulanması gerektiğini belirtmişlerdir. İnak vd. (2023), Karanfil serasından topladıkları *T. urticae* popülasyonunda metabolik dirence ek olarak, hedef bölge direncini de araştırmışlar ancak incelenen popülasyonlarda ketoenollerin hedef bölgesi olan asetil-CoA karboksilazın (ACCase) karboksil-transferaz (CT) alanında hiçbir amino asit süstitüsyonunu tespit edememişlerdir. Bununla birlikte, ACCase gen ekspresyonundaki artış spiromesifen ile selekte edilen popülasyonda bulunurken, spirodiclofen ile selekte edilen popülasyonda bulunmadığını belirtmişlerdir. Mavridis vd. (2021), Girit'te topladıkları abamectin ve etoxazole dirençli *T. urticae* tarla popülasyonlarında moleküler ve fenotipik direnç taraması yapmışlardır. Ayrıca hem çoklu direnç hem de duyarlı popülasyonları tespit etmişlerdir. 12 Taqman qPCR testi yaparak [G314D (GluCl1), G326E, I321T (GluCl3), G119S, F331W (Ace-1), H92R (PSST), L1024V, F1538I (VGSC), I1017F (CHS1), G126S, S141F, P262T Sanger dizilimine göre doğrulamışlardır.

Spiromesifen direnci ile ilişkili olarak bütün popülasyonlarda yapılan PCR taramalarına göre farklı bölgelerde nokta mutasyonlar bulunmuştur. Ancak bunların spiromesifen direnci ile ilişkili olup olmadığının farklı çalışmalarla doğrulanması gerektiğini bildirmişlerdir. Karatolos vd. (2012), Sera beyazsineğinin Avrupa ve İngiltere popülasyonlarında spiromesifene karşı 26 kat direnç belirlemişler ve bu direncin altında yatan moleküler mekanizmayı incelemişlerdir. PBO ile uygulama spiromesifende sinerjistik etki göstermediğini bu durumun da bir hedef bölge direnç mekanizması olduğunu bildirmişlerdir. Tam uzunluktaki ACCase geni bir dizi Sera beyazsineği *T. vaporariorum* popülasyonu için dizilenmiş ve spiromesifen direnci ile bu genin 645. pozisyonunda (E645K) lizin ile glutamik asit ikamesi arasında güçlü bir ilişki bulunduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, TaqMan allelik ayırım testinin bu bulguları doğruladığını bildirmişlerdir. Bu direncin spiromesifen'in tarla performansını tehlikeye atmak için yeterli olmadığı düşünülse de, E645K'nın dirençle olan bu ilişkisi, bir eklembacaklı türünde bir ACCase inhibitörünü etkileyen potansiyel bir hedef bölge mekanizmasının ilk raporu olduğunu belirtmişlerdir. Bajda vd. (2015), spirodiclofene duyarlı ve dirençli popülasyonlardan elde ettikleri *P. ulmi* için kapsamlı, diziye özgü RNA dizilimi bazlı bir transkriptom kaynağı sağlamışlardır. *P. ulmi* transkriptomunun yeni bir birleşiminden, detoksifikasyon enzim ailelerini, yaygın olarak kullanılan akarisitlerin hedef bölgelerini ve bitki akar etkileşimlerini ve pestisit direncinde yer alan yatay olarak aktarılan genleri açıklamışlardır. *Panonychus citri*, *T. urticae* ve böcekler için mevcut dizileri içeren karşılaştırmalı bir analizde, *Panonychus* ve *Tetranychus* cinslerinin farklılaşmasını takiben detoksifikasyon gen ailelerine yönelik radyasyonları belirlemişlerdir. Ayrıca, dirençle ilişkili gen ekspresyonu değişikliklerini tanımlamak için spirodiclofene duyarlı ve dirençli popülasyonlardan alınan replike edilmiş RNA sekansı verilerini kullanmışlardır. Sitokrom P450 enziminin yanı sıra çoklu karboksilkolinesterazlar, duyarlı ve dirençli popülasyonlar arasında farklı şekilde eksprese edildiğini ve *P. ulmi* popülasyonlarını kontrol etmek için yaygın olarak kullanılan spirodiclofen direncini anlamak için moleküler olarak bir giriş noktası sağlandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada *P. ulmi* için sunulan yeni genomik kaynaklar ve veriler, akarisit direncinde yer alan altta yatan mekanizmaların moleküler çalışmalarını büyük ölçüde kolaylaştıracağını vurgulamışlardır. Kwon vd. (2010), *T. urticae*'nin hassas ve abamectin dirençli popülasyonunu karşılaştırarak GABA kapılı klorür kanal genlerinin tam uzunluktaki cDNA parçalarının klonlanması ve dizilenmesi, iki popülasyon arasında polimorfizm olup olmadığını ortaya

koymuşlardır. *T. urticae*'de glutamat kapılı klorür kanalı geninin (TuGluCl) tam uzunluktaki cDNA parçasının dizi karşılaştırması, abamectin direnci ile geçici olarak ilişkili olan bir (G323D) nokta mutasyonunu tanımlamışlardır. Karşılıklı çaprazlamalardan elde edilen döllerin kullanıldığı biyoanalizler, TuGluCl duyarsızlığından kaynaklanan abamectin direnci özelliğinin tam olarak resesif olduğunu ortaya koymuşlardır. Dermauw vd. (2012), *T. urticae* genomunun böceklerle karşılaştırıldığında çok sayıda glutamat ve histamin kapılı klorür kanalı genini (GluCl ve HisCl) kodladığını belirtmişlerdir. Ayrıca, *T. urticae*'de abamectin direnciyle ilişkili farklı GluCl kanallarının alt birimlerinde (Tu_GluCl1 ve Tu_GluCl3) bilinen ve yeni mutasyonların olduğunu, bu alt birimlerin *T. urticae*'de abamectinin ana hedef bölgeleri olduğunu belirtmişlerdir. Daha önce belirledikleri mutasyon olan G326E direnç mutasyonunun Tu_GluCl3 kanalında yüksek seviyelerde abamectin direnci ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Tu_GluCl1'de daha önce tanımlanan G323D mutasyonu ile yeni tanımladıkları (G314D) mutasyonu eşdeğer olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak, Tu_GluCl3 kanalında G326E mutasyonu yerine ikame yeni mutasyonlar (E114 V235 L256 V60, R101 ve P299S) tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Bu mutasyonların abamectin duyarlılığına dahil olduğu bilinen diğer tüm pozisyonlarda hem duyarlı hem de dirençli popülasyonlarda aynı ipuçlarını bulduklarını bildirmişlerdir. Ilias vd. (2016), *T. urticae* tarla popülasyonlarında G314D ve G326E mutasyonlarının varlığını ve sıklığını izlemek için üç TaqMan moleküler tanı testi geliştirmişlerdir. Bu abamectin direnç mutasyonlarının (G314D ve G326E) sıklığı da popülasyonlar arasında değişiklik göstermiş toplam 11 popülasyonun 6'sında tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Çağatay vd. (2018), abamectin dirençli (223-440 kat) 3 sera popülasyonunda *T. urticae* popülasyonunda glutamat kapılı klorür kanallarında bilinen abamectin direnci hedef bölge mutasyonlarının (G314D ve G326E) belirleyememişlerdir. *T. urticae* sera popülasyonlarında abamectin direncinde hedef bölge yoğunluğunun olmamasına rağmen detoksifikasyon enzimlerinin rol oynadığını bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar abamectin direncinde birden çok neden ileri sürmüşlerdir. Bunlar detoksifikasyona neden olan enzimlerde artışın olması ve hedef bölge direnç mutasyonlarının görülmemesi şeklindedir (Rameshgar vd., 2019). Papapostolou vd. (2020), abamectin dirençli (89 kat) *T. urticae*'nin Trz popülasyonunda PBO'nun abamectinin toksik etkisini artırdığını, abamectin direncinde P450 enziminin rol oynadığını belirtmişlerdir. Buna ilaveten aynı popülasyonda daha önce tanımlanan abamectin direnci ile ilişkili GluCl 1'de G314D

GluCl 3'de I321T ve G326E nokta mutasyonlarını belirlediklerini bildirmişlerdir. Xue vd. (2020a), *T. urticae*'de abamectin direncinde GluCl 3'de yeni bir mutasyon olan I321T nokta mutasyonunun rol oynadığını ancak bunun tek başına her zaman yüksek dirence neden olmayacağını rapor etmişlerdir.

Xue vd. (2020b)'nin Avrupada 9 farklı ülkeden açık alan ve seralardan dan topladıkları *T. urticae* popülasyonlarının üçte birinde yüksek düzeylerde abamectin direnci bulurken birçok popülasyonda düşük seviyede milbemectin direnci bulmuşlardır. En dirençli popülasyonlarda GluCl 1'de G314D ve GluCl 3'te G326E nokta mutasyonları belirlenirken ayrıca üç dirençli popülasyonda da GluCl3'te I321T nokta mutasyonu ve bir popülasyonda GluCl3'de V327G ve L329F mutasyonları bulunmuştur. *T. urticae*'nin Avrupa popülasyonlarında abamectin direncinde metabolik mekanizmanın (P450 ve UDP glikosiltransferaz) da yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Papapostolou vd. (2020), *T. urticae*'nin spirodiclofen dirençli popülasyonunda ACCase geninde A1079T mutasyonunu tespit etmişlerdir. CCE04 ve CYP392E10 genlerinde spirodiclofen'e karşı bir direnç olduğunu belirlemişler ve sinerjist analizleri ile paralellik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. İnak vd. (2022), spiromesifen ile selekte ettikleri popülasyonda spiromesifenin hedef bölgesi olan asetil-CoA karboksilazın (ACCase) daha yüksek bir ifadesinin olduğunu kaydetmişlerdir. Ayrıca, ACCase'in CT alanının korunmuş bölgesinde bir F1640L mutasyonu olduğunu en dirençli tarla popülasyonlarında belirlemiş ancak bu mutasyonun spiromesifen direncindeki rolünün daha fazla doğrulanması gerektiğini vurgulamışlardır.

Sonuç olarak, çalışmamızda S+A karışımı ile selekte edilen *P. ulmi* popülasyonunun S+A karışımına direnç oluşturduğu, yine çalışmada kullanılan aynı grup içinde yer alan spiromesifen, spirodiclofen, milbemectin ve spirodiclofen+abamectin'e de çapraz direnç oluşturduğu bulunmuştur. Isparta ili elma bahçelerinden toplanan S+A karışımına dirençli *P. ulmi* popülasyonlarında spiromesifen ve spirodiclofen için direnç oranı düşük belirlenmişken; abamectin, milbemectin ve spirodiclofen+abamectin için herhangi bir direnç gelişimi tespit edilememiştir. *P. ulmi*'de karışım formülasyonlarının direnç artışı ile ilgili detoksifikasyon mekanizmasına ilişkin herhangi bir araştırma karşımıza çıkmamıştır. Fakat bu çalışmada direnç gelişiminde detoksifikasyon enzimlerinin (esteraz, sitokrom P450 ve GST) rol oynama potansiyeli olduğu belirlenmiştir. IR ve en dirençli bahçe

popülasyonu M-1’de S+A ile TPP, DEM ve PBO yüksek derecede sinerjistik etki göstermiştir. Direnç gelişiminin detoksifikasyon mekanizmasına bakıldığında esterase enzimi en yüksek G-2 popülasyonunda, GST enzimi IR popülasyonunda ve P450 enzim aktivitesi de M-1 popülasyonunda bulunmuştur. Dirençli bahçe popülasyonlarında direnç oranlarının düşük görülmesine paralel olarak enzim aktivitelerinin de düşük seviyede bulunması beklenen bir sonuç olarak görülmektedir.

Direnç mekanizmalarının tam olarak açıklanmasında metabolik dirence ek olarak, moleküler düzeyde direnci tanımlamak ve doğrulamak daha hızlı, güvenilir sonuçlar vermektedir. Çalışmada GluCl1 kanalında daha önce belirlenen nokta mutasyonu G314D, IR ve M-1 popülasyonunda; GluCl3 kanalında daha önce belirlenen nokta mutasyonlarından I321T tüm bahçe ve IR popülasyonlarında belirlenirken G326E belirlenememiştir. Diğer kısımda ise spiromesifenin etki ettiği ACCase geninde BC ve CT bölgeleri çoğaltılmış ardından muhtemel mutasyonların taranması için sekans analizi yapılmıştır. ACCase geninde BC bölgesinde hassas popülasyona göre IR popülasyonunda N41Y ve R87M, T-2 popülasyonunda Y29D, R87M, A174S, M-1 popülasyonda Y29D ve R87M, G-2 popülasyonunda R87M mutasyonları tespit edilmiştir. ACCase geninde CT bölgesinde hassas popülasyona göre G-2 popülasyonunda P1877S, T-2 popülasyonunda I1862M, E1864V, S1865P, S1889N ve T2030K, M-1 popülasyonunda T2030K mutasyonları tespit edilmiştir. CT bölgesinde IR popülasyonunda hiçbir mutasyona rastlanmamıştır. Bu genin BC ve CT bölgelerinde farklı noktalarda mutasyonlar bulunmuştur. Fakat bu mutasyonların spiromesifen direnci ile ilişkili olup olmadığına karar vermek için ek çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bu çalışma ile elde edilen dirençli bahçe popülasyonlarında S+A’ye düşük direnç görülse de S+A karışımı ile selekte edilen IR popülasyonu, bu karışım formülasyonuna ve aynı gruptan diğer aktif maddelere direnç geliştirmiştir. Özellikle insektisit/akarisit olan abamectin aktif maddesi üreticiler tarafından Isparta bölgesinde kırmızı örümcek mücadelesinde kullanım sıklığı fazla olan bitki koruma ürünüdür. Bu çalışmada S+A’ye dirençli bahçe popülasyonlarında abamectine karşı bir çapraz direnç oluşmamış ve abamectinin kırmızı örümcekler üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Dirençli bahçe popülasyonlarının S+A’ye karşı düşük direnç göstermesi aynı alanda farklı bitki koruma ürünlerine maruz kalması durumundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kırmızı örümcekler polifag bir tür olup farklı alanlarda ve çeşitli kültür bitkilerinde beslendiklerinden dolayı farklı alanlara taşınmaktadırlar. Kırmızı örümcekler yaşayışları ve beslenmeleri gereği birçok farklı alana taşındıklarından dolayı başka zararlılara karşı kullanılan farklı ve aynı etki mekanizmasına sahip insektisit/akarisit gruplarına da maruz kalmaktadır.

Son yıllarda karışım formülasyonlar direnç yönetiminde çözüm olarak görülen bir adım olsa da karışım formülasyonlara da direnç gelişebilmektedir. Ayrıca karışım formülasyonu oluşturan aktif maddelere ve bu aktif maddelerle aynı grupta olan diğer aktif maddelere de direnç gelişebilmektedir (Alsay vd., 2023; Ay vd., 2024). Bu nedenle karışım formülasyonlar kullanıldıkları organizmanın mücadelesi için ard arda uygulanmalıdır. Ayrıca bu durum direnç yönetim stratejisi olarak rotasyonda sık uygulama yapılan bitki koruma ürünlerinin sayısını da azaltmış olacaktır. Direnç yönetim programları içinde etkili direnç yönetimi, direnç mekanizmalarının tam olarak bilinmesini önemli kılmaktadır. Detoksifikasyon mekanizmalarının ve hedef bölge yerlerinin değişikliğe uğraması, moleküler yöntemlerin daha da fazla kullanılarak bu durumun detaylı açıklanmasını desteklemektedir.

Uygulamasının kolay, işgücü ve girdi masraflarının az olması sebebiyle üreticiler tarafından en çok tercih edilen mücadele yöntemi kimyasal mücadeledir. Kimyasal mücadelede kullanılan bir veya birden fazla aktif maddeli pestisitler, hedef organizma odağında etkili dozda ve etki süreleri dikkate alınarak uygulanmalıdır. Ayrıca kimyasal mücadele yapılırken özellikle üreme gücü yüksek olan kırmızı örümcek gibi zararlılarda popülasyonların direnç seviyelerinin belirlenmesi gerekir. Bu duruma bağlı olarak; uygun olmayan pestisit seçimi gibi bilinçsiz uygulamaları bertaraf etmek dirence sebep olan problemlerin önüne geçilebilir.

Entegre zararlı yönetimi doğrudan insan ve çevre sağlığını dikkate alarak entegre mücadele adımlarının birarada yürütülmesi ile mümkündür. Entegre zararlı yönetiminde kimyasal mücadele kullanılmaması fikri her zaman doğru değildir. Ancak popülasyon yoğunluğu baskın olan zararlı türlerle mücadelede bu durumu ekonomik zarar eşiği altında tutmak üzere ruhsatlı kimyasal ürün kullanımı da entegre mücadele kapsamında son sıralarda yer almaktadır. Entegre mücadele yöntemlerinin uygulandığı herhangi bir zararlıya karşı bu tekniklerle mücadele yetersiz kalırsa, önerilen

insektisit/akarisitinin etkili en düşük dozu doğru tekniklerle uygulanabilir. Fakat kimyasal mücadeleye başvurulmadan önce entegre mücadele uygulamalarının üreticiler arasında farkındalık ve uygulama çalışmaları yönüyle konu uzmanları tarafından yaygınlaştırılması mücadelenin sürdürülebilir olması açısından önemli bir adımdır.

Kimyasal mücadele gerekli olduğunda; uzun süredir kullanım sebebiyle direnç gelişimine sebep olduğu bilinen insektisit/akarisitler için direnç gelişimini azaltmak/bertaraf etmek/geciktirmek amacıyla kimyasal grupların değiştirilmesi yararlı olacaktır. Aynı zamanda zararlıların dönemlerine göre uygun ürünler seçilmeli ve pestisit uygulamaları az sıklıkta yapılmalıdır. Seçilen bu ürünler toksisitesi az, hedef dışı organizmaları etkilemeyen selektif ürünler olmalıdır. Zira bu çalışmada da olduğu gibi karşımıza sıklıkla çıkan akar avcısı böcekler ve avcı akar türlerinin mevcudiyetinin korunması önceliğimiz olmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265-267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Alsay, S., & Ay, R. (2022). Development of resistance to a mixture of spiromesifen and abamectin and cross resistance in *Tetranychus urticae*. *Systematic & Applied Acarology*, 27(10), 1857-1866. <https://doi.org/10.11158/saa.27.10.1>
- Anonim (2016a). Envidor Sc 240-Güvenlik Bilgi Formu pdf <http://www.royalagrosience.com/tr/bayer2/envidor-sc-240.html>. (Son erişim tarihi: 06 Haziran 2021)
- Anonim (2016b). Agrimec abamectin-Güvenlik Bilgi Formu. https://www.syngenta.com.tr/sites/g/files/kgtney1481/files/media/document/2018/03/30/agrimec_ec_malzeme_guvenlik_bilgi_formu.pdf (Son erişim tarihi: 06 Haziran 2021)
- Anonim (2020). Arabus SC 240 Güvenlik Bilgi Formu. https://www.cropscience.bayer.com.tr/tr-tr/products/product-detail-page.label.html/insecticides/arabus_sc_240.html (Son erişim tarihi: 06 Haziran 2020)
- Anonim (2023a). Fresh Apples, Grapes, and Pears: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service.
- Anonim (2023b). Integrated Pest Management Online. <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/ipm> (Son erişim tarihi: 27 Mart 2023)
- Anonim (2023c). Interrupt Broşür. <https://www.cropscience.bayer.com.tr/content/dam/bayer-crop-science/turkey/bcs/tr-brochures/Interrupt%20Pamuk%20Bro%C5%9F%C3%BCr.pdf> (Son erişim tarihi: 27 Mart 2023)
- Anonim (2023d). Agrimec Broşür. <https://agrimac.com.tr/wp-content/themes/agrimac/assets/agri-yedek-parca-24.pdf> (Son erişim tarihi: 27 Mart 2023)
- Anonim (2023e). National Center For Biotechnology Information Online. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Son erişim tarihi: 27 Mart 2023)
- Ay, R., & Gürkan, M. O. (2005a). *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'nin değişik populasyonlarının iki selektif akarısit karşı duyarlılıkları ve duyarlılık mekanizmaları üzerinde araştırmalar. *A.Ü. Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 11(2), 217-223.

- Ay, R., & Gürkən, M. O. (2005b). Resistance to bifenthrin and resistance mechanisms of different strains of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) from Turkey. *Phytoparasitica*, 33(3), 237-244.
- Ay, R., & Kara F. E. (2011). Toxicity, inheritance of fenpyroximate resistance, and detoxification enzyme levels of in a laboratory-selected fenpyroximate-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Crop Protection*, 30, 605-610.
- Ay, R., & Kara, F. E. (2009). Amitraz'a dirençli *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de çoklu direnç, kalıtım, sinerjizm ve detoksifikasyon mekanizmaları. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 15(2), 148-156.
- Yorulmaz, S. (2008). *Tetranychus urticae* (Acarına: Tetranychidae)'nin Üç Farklı İnsektisit-Akarisit ile Seleksiyonundan Sonra Çoklu Direnç ve Bazı Enzim Düzeylerinin İncelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Ay, R., & Yorulmaz, S. (2010). Akar ve böceklerde pestisitlerin detoksifikasyonunda rol oynayan enzimler. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24(2), 137-148.
- Ay, R., Çevik, B., & Alsay, S. (2024). The roles of the biochemical and molecular changes in resistance of *Tetranychus urticae* populations selected with spiromesifen+abamectin mixture. *Systematic & Applied Acarology*, 29(1), 30-44. <https://doi.org/10.11158/saa.29.1.3>
- Ay, R., Karaca, İ., & Seçilmiş, H. (2003). Isparta ilindeki elma bahçelerinde yaygın kullanılan chlorpyrifos ve diazinon'un kalıntı düzeylerinin HPLC ile belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 27(4), 293-304.
- Ay, R., Yorulmaz Salman, S., İşçi, M., & Yaman Y. (2013). Böceklerde İnsektisit Direnç Yönetimi. 1. Bitki Koruma Ürünleri ve Makineleri Kongresi. 2-5 Nisan, Antalya, 86-89.
- Badieinia, F., Khajehali, J., Nauen, R., Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2020). Metabolic mechanisms of resistance to spiromesifen and spiromesifen in Iranian populations of *Panonychus ulmi*. *Crop Protection*, 134, 105166.
- Baffi, M. A., Pereira, C. D., Souza, G. R., Bonetti, A. M., Ceron, C. B., & Gourelart, L. R. (2005). Esterase profile in a pyrethroid-resistant Brazilian strain of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae). *Genetics and Molecular Biology*, 28(4), 749-753.
- Bajda, S., Dermauw, W., Greenhalgh, R., Nauen, R., Tirry, L., Clark, R. M., & Van Leeuwen, T. (2015). Transcriptome profiling of a spiromesifen susceptible and resistant strain of the European red mite *Panonychus ulmi* using strand-specific RNA-seq. *BMC Genomics*, 16, 1-26.

- Chant, D. C. (1966). *Integrated Control Systems. Scientific Aspects of Pest Control*. Washington D.C. Natural Academy Scientific Publications.
- Clark, J. M., Scott, J. G., Campos, F., & Bloomquist, J. R. (1995). Resistance to avermectins: extent, mechanisms, and management implications. *Annual Review of Entomology*, 40(1), 1-30.
- Cloyd, R. A. (2010). Pest management, Broad mites. http://www.oardc.ohio-state.edu/floriculture/images/10-10_Mites.pdf (Son erişim tarihi: 12 Mart 2016)
- Croft, B. A. (1975). Integrated control of apple mites. Michigan state university extension service bulletin. https://archive.lib.msu.edu/DMC/extension_publications/e825/e825.pdf (Son erişim tarihi: 10 Şubat 2024)
- Çağatay, N. S., Menault, P., Riga, M., Vontas, J., & Ay, R. (2018). Identification and characterization of abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch populations from greenhouses in Turkey. *Crop Protection*, 112, 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.05.016>
- Çağatay, N. S., Yorulmaz Salman, S., Yaman, Y., & Ay, R. (2014). Isparta elma bahçelerinden toplanan *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae) populasyonlarının abamectin, chlorpyrifos ethyl ve bifenthrin'e karşı direnç düzeylerinin belirlenmesi. *Türk Entomoloji Bülteni Dergisi*, 4(4), 203-209. <https://doi.org/10.16969/teb.22076>
- Çakır, Ş., & Yamaner, Ş. (2005). Böceklerde insektisidlere direnç. *Ahi Evran Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6(1), 21-29.
- Demaeght, P., Dermauw, W., Tsakireli, D., Khajehali, J., Nauen, R., Tirry, L., Vontas, J., Lümme, P., & Van Leeuwen, T. (2013). Molecular analysis of resistance to acaricidal spirocyclic tetrone acids in *Tetranychus urticae*: CYP392E10 metabolizes spiropdiclofen, but not its corresponding enol. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(6), 544-554. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.03.007>
- Dermauw, W., Ilias, A., Riga, M., Tsagkarakou, A., Grbic, M., Tirry, L., Van Leeuwen, T., & Vontas, J. (2012). The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Tetranychus urticae*: implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(7), 455-465.
- Devine, G. J., & Ogusku, D. (2009). Adaptability is key when monitoring insecticide resistance. *Bulletin of the World Health Organization*, 87, 887-887. <https://doi.org/10.2471/BLT.09.073502>
- Doğan, S., & Sullivan-Özman, S. K. (2023). *Genel Akaroloji*. Nobel Akademik Yayıncılık.

- Ferreira, C. B., Andrade, F. H., Rodrigues, A. R., Siqueira, H. A., & Gondim Jr, M. G. (2015). Resistance in field populations of *Tetranychus urticae* to acaricides and characterization of the inheritance of abamectin resistance. *Crop Protection*, 67, 77-83.
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44, 507-533.
- Grbić, M., Van Leeuwen, T., Clark, R. M., Rombauts, S., Rouzé, P., Grbić, V., & Van de Peer, Y. (2011). The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479(7374), 487-492.
- Ilias, A., Vassiliou, V. A., Vontas, J., & Tsagkarakou, A. (2016). Molecular diagnostics for detecting pyrethroid and abamectin resistance mutations in *Tetranychus urticae*. *Pesticide biochemistry and Physiology*, 135, 9-14. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.07.004>
- IRAC (2019). Insecticide Resistance Action Committee. <https://www.irac-online.org/methods/> (Son erişim tarihi: 07 Ocak 2024)
- İnak, E., & Çobanoğlu, S. (2016). Akarisitler ve etki mekanizmaları. *Türk Entomoloji Bülteni*, 6(4), 371-382. <http://doi.org/10.16969/teb.27402>
- İnak, E., Alpkent, Y. N., Çobanoğlu, S., Toprak, U., & Van Leeuwen, T. (2022). Incidence of spiromesifen resistance and resistance mechanisms in *Tetranychus urticae* populations collected from strawberry production areas in Turkey. *Crop Protection*, 160, 106049.
- İnak, E., Demirci, B., Vandenhoe, M., Söylemezoğlu, G., Van Leeuwen, T., & Toprak, U. (2023). Molecular mechanisms of resistance to spiroticlofen and spiromesifen in *Tetranychus urticae*. *Crop Protection*, 172, 106343.
- İnanıcı, M. A., & Ay, R. (2018). Milbemectin ile seleksiyon yapılmış *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae) popülasyonunda direnç, direnç kalıtımı ve bazı detoksifikasyon enzimlerinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(1), 17-26.
- İşçi, M., & Ay, R. (2013). Resistance of *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) to thiacloprid and activities of some detoxification enzymes collected from an apple orchard in Isparta. *IOBC-WPRS Bulletin*, 91, 191-192.
- İşçi, M., & Ay, R. (2017). Determination of resistance and resistance mechanisms to thiacloprid in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) populations collected from apple orchards in Isparta province, Turkey. *Crop Protection*, 91, 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.09.015>
- Joshi, N. K., Phan, N. T., & Biddinger, D. J. (2023). Management of *Panonychus ulmi* with various miticides and insecticides and their toxicity to predatory mites conserved for biological mite control in Eastern USA. apple orchards. *Insects*, 14, 228. <https://doi.org/10.3390/insects14030228>

- Kaplan, P., Yorulmaz, S., & Ay, R. (2012). Toxicity of insecticides and acaricides to the predatory mite *Neoseiulus californicus* (McGregor)(Acari: Phytoseiidae). *International Journal of Acarology*, 38(8), 699-705.
- Karatolos, N., Williamson, M. S., Denholm, I., Gorman, K., Ffrench-Constant, R., & Nauen, R. (2012). Resistance to spiromesifen in *Trialetrodes vaporariorum* is associated with a single amino acid replacement in its target enzyme acetyl-coenzyme A carboxylase. *Insect Molecular Biology*, 21(3), 327-334.
- Kaşka, N., Güleriyüz, M., Kaplankıran, M., Kafkas, S., Ercişli, S., Eşitken, A., Aslantaş, R., & Akçay, E. (2005). Türkiye Meyveciliğinde Üretim Hedefleri. *Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi*. 3-7 Ocak, Ankara, 519-549.
- Kim, S. S., & Yoo, S. S. (2002). Comparative toxicity of some acaricides to the predatory mite, *Phytoseiulus persimilis* and the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *BioControl*, 47, 563-573.
- Kim, Y. J., Lee, S. W., Cho, J. R., Park, H. M., & Ahn, Y. J. (2007). Multipleresistance and biochemical mechanisms of dicofol resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 10(2), 165-170. [https://doi.org/10.1016/S1226-8615\(08\)60348-9](https://doi.org/10.1016/S1226-8615(08)60348-9).
- Koçak, Ö. (1998). *Zararlı Savaşımı*. Hacettepe Üniversitesi Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, İnsektisid Test Üretim Birimi, Ankara.
- Koh, S. H., Ahn, J., Im, J. S., Jung, C., Lee, S. H., & Lee, J. H. (2009). Monitoring of acaricide resistance of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from 37. Korean apple orchards. *Journal of Asia- Pacific Entomology*, 12(1), 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2008.10.004>
- Kramer, T., & Nauen, R. (2011). Monitoring of spiroadiclofen susceptibility in field populations of European red mites, *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae), and the cross-resistance pattern of a laboratory-selected strain. *Society of Chemical Industry*, 67, 1285-1293.
- Kwon, D. H., Seong, G. M., Kang, T. J., & Lee, S. H. (2010b). Multiple resistance mechanisms to abamectin in the two-spotted spider mite. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(3), 229-232.
- Kwon, D. H., Yoon, K. S., Clark, J. M., & Lee, S. H. (2010a). A point mutation in a glutamate - gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Insect Molecular Biology*, 19(4), 583-591.
- LeOra Software (1994). Polo-pc: a user's guide to probit or logit analysis, Leora Software, 1119 Shattuck Avenue, Berkeley.
- Marcic, D., Prijovic, M., Drobnjakovic, T., Medjo, I., Peric, P., & Milenkovic, S. (2015). Greenhouse and field evaluation of two biopesticides against

Tetranychus urticae and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Phytomed*, 27(4), 313-320.

- Mohammadzadeh, M., Bandani A. R., & Sabahi Q. (2014). Comparison of susceptibility of two populations of *Tetranychus urticae* Koch to two acaricides, abamectin and propargite. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(17), 2112-2123. <http://doi.org/10.1080/03235408.2013.869890>
- Nauen, R., Bretschneider, T., Elbert, A., Fischer, R., & Tieman, R. (2003). Spirodiclofen and spiromesifen. *Pesticide Outlook*, 14(6), 243-246. <https://doi.org/10.1039/b314855f>
- Nazemi, A., Khajehali, J., & Van Leeuwen, T. (2016). Incidence and characterization of resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides in Thrips tabaci (Thysanoptera: Thripidae) in onion fields in Isfahan, Iran. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 129, 28-35.
- Negm, S., Saleh, A., El-Hady, A., Bekheat, H., & El-Wahab, A. (2009). Metabolic resistance mechanisms of different pesticides in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Tetranychidae: Acari). *Acarines: Journal of the Egyptian Society of Acarology*, 3(1), 45-53.
- Nicastro, R. L., Sato, M. E., & Da Silva, M. Z. (2010). Milbemectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): selection, stability and cross-resistance to abamectin. *Experimental and Applied Acarology*, 50, 231-241.
- O'Rourke, D. (2003). World production, trade, consumption and economic outlook for apples. In *Apples: Botany, Production and Uses*. (pp. 15-29)
- Öncüler, C., & Durmuşoğlu, E. (2008). *Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları*. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları.
- Özongun, Ş., Dolunay, E., Öztürk, G., & Pektaş, M. (2014). Eğirdir (Isparta) şartlarında bazı elma çeşitlerinin performansları. *Meyve Bilimi*, 1(2), 21-29.
- Papapostolou, K. M., Riga, M., Charamis, J., Skoufa, E., Souchlas, V., Ilias, A., Dermauw, W., Ioannidis, P., Van Leeuwen T., & Vontas J. (2021). Identification and characterization of striking multiple-insecticide resistance in a *Tetranychus urticae* field population from Greece. *Pest Management Science*, 77(2), 666-676. <https://doi.org/10.1002/ps.6136>
- Petter, F. A., Segate, D., de Almeida, F. A., Neto, F. A., & Pacheco, L. P. (2013). Incompatibilidade física de misturas entre inseticidas e fungicidas. *Comunicata Scientiae*, 4(2), 129-138.
- Piraneo, T. G., Bull, J., Morales, M. A., Lavine, L. C., Walsh, D. B., & Zhu, F. (2015). Molecular mechanisms of *Tetranychus urticae* chemical adaptation in hop fields. *Scientific Reports*, 5(1), 1-12.

- Van Pottelberge, S., Van Leeuwen, T., Van Amermaet, K., & Tirry, L. (2008). Induction of cytochrome P450 monooxygenase activity in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and its influence on acaricide toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91(2), 128-133.
- Pree, D. J., Whitty, K. J., & Van Driel, L. (2005). Baseline susceptibility and cross resistances of some new acaricides in the european red mite, *Panonychus ulmi*. *Experimental & Applied Acarology*, 37(3-4), 165-171. <https://doi.org/10.1007/s10493-005-1423-3>
- Rameshgar, F., Khajehali, J., Nauen, R., Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2019). Characterization of abamectin resistance in Iranian populations of European red mite, *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae). *Crop Protection*, 125, 104903. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104903>
- Rauch, N., & Nauen, R. (2002). Spirodiclofen resistance risk assessment in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): a biochemical approach. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 74(2), 91-101. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(02\)00150-5](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(02)00150-5)
- Reffstrup, T. K., Larsen, J. C., & Meyer, O. (2010). Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regulatory toxicology and Pharmacology*, 56(2), 174-192.
- Sarı, Ö. (2011). *Avrupa Kırmızıörümceği Panonychus ulmi (Koch)'nin Farklı Elma Çeşitleri Üzerindeki Biyolojisinin Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Sato, M. E., Silva, M. Z. D., Raga, A., & Souza Filho, M. F. D. (2005). Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance. *Neotropical Entomology*, 34, 991-998. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000600016>
- Scott, J. G. (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 757-777.
- Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1990). Molecular mechanisms of insecticide resistance. In *Pesticide Resistance in Arthropods*. (pp. 58-96)
- Sökeli, E., Ay, R., & Karaca, İ. (2007). Determination of the resistance level of two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) (Koch) populations in apple orchards in Isparta province against some pesticides. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 13(4), 326-330. https://doi.org/10.1501/Tarimbil_0000000395
- Stumpf, N., & Nauen, R. (2001). Cross-resistance, inheritance and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 94(6), 1577-1583. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-94.6.1577>

- Stumpf, N., & Nauen, R. (2002). Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72(2), 111-121.
- Şanlı Y. (1998). *Veteriner İlaçları Rehberi ve Bilinçli İlaç Kullanım El Kitabı*. ICC Yayınevi.
- Tirello, P., Pozzebon, A., Cassanelli, S., Van Leeuwen, T., & Duso, C. (2012). Resistance to acaricides in Italian strains of *Tetranychus urticae*: toxicological and enzymatic assays. *Experimental and Applied Acarology*, 57(1), 53-64. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9536-y>
- Toros, S., Maden, S., & Sözeri, S. (2001). *Tarımsal Savaşım Yöntem ve İlaçları*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Ullah, M. S., Moriya, D., Kongchuensin, M., Konvipasruang, P., & Gotoh, T. (2011). Comparative toxicity of acaricides to *Tetranychus merganser* Boudreaux and *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*, 37(6), 535-543.
- Ulukaya, K., & Ay, R. (2022). Isparta elma bahçelerinde zararlı *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) popülasyonlarının spiromesifen+abamectin, spiroadiclofen, milbemectin direnç düzeylerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(3), 632-643. <https://doi.org/10.33462/jotaf.1057434>
- Van Leeuwen, T., & Dermauw, W. (2016). The molecular evolution of xenobiotic metabolism and resistance in chelicerate mites. *Annual Review of Entomology*, 61, 475-498. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023907>
- Van Leeuwen, T., Van Pottelberge, S., & Tirry, L. (2005). Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 61(5), 499-507.
- Van Leeuwen, T., Tirry, L., & Nauen, R. (2006). Complete maternal inheritance of bifentazate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: tetranychidae) and 78 its implications in mode of action considerations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 869-877.
- Van Leeuwen, T., Tirry, L., Yamamoto, A., Nauen, R., & Dermauw, W. (2015). The economic importance of acaricides in the control of phytophagous mites and an update on recent acaricide mode of action research. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.009>
- Van Leeuwen, T., Van Pottelberge, S., Nauen, R., & Tirry, L. (2007). Organophosphate insecticides and acaricides antagonise bifentazate toxicity through esterase inhibition in *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 63(12), 1172-1177. <https://doi.org/10.1002/ps.1453>

- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., & Tirry, L. (2009). Mechanisms of acaricide resistance in the twospotted spider mite *Tetranychus urticae*. In *Biorational Control of Arthropod Pests*. (pp. 347-393)
- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W., & Tirry, L. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 563-572.
- Vechia, J. F. D., Andrade, D. J. D., Azevedo, R. G. D., & Ferreira, M. D. C. (2019). Effects of insecticide and acaricide mixtures on *Diaphorina citri* control. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41, e-076. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019076>
- Vontas, J. G., Enayati, A. A., Small, G. J., & Hemingway, J. (2000). A simple biochemical assay for glutathione S-transferase activity and its possible field application for screening glutathione S-transferase-based insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68(3), 184-192. <https://doi.org/10.1006/pest.2000.2512>
- Xue, W., Mermans, C., Papapostolou, K. M., Lamprousi, M., Christou, I. K., Inak, E., Douris, V., Vontas, J., Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2020a). Untangling a Gordian knot: the role of a GluCl3 I321T mutation in abamectin resistance in *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science*, 77, 1581-1593.
- Xue, W., Snoeck, S., Njiru, C., Inak, E., Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2020b). Geographical distribution and molecular insights into abamectin and milbemectin cross-resistance in European field populations of *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science*, 76(8), 2569-2581.
- Yaghoobi, R., Khajehali, J., Alavijeh, E. S., Nauen, R., Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2021). Fenpyroximate resistance in Iranian populations of the European red mite *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 83(1), 69-79.
- Yaman, A., & Ay, R. (2023). Isparta ili elma bahçelerinden toplanan *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae) popülasyonlarının acequinocyl ve bifenazate direnç oranlarının belirlenmesi. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(2), 94-99.
- Yaman, Y., Yorulmaz Salman, S., & Ay, R. (2014). Isparta ili elma bahçelerinden toplanan *Panonychus ulmi* Koch'nin bazı akarisitlere karşı duyarlılık ve detoksifikasyon enzim düzeyleri. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 22(2), 249-260.
- Yin, W. D., Qiu, G. S., Yan, W. T., Sun, L. N., Zhang, H. J., Ma, C. S., & Adaobi, U. P. (2013). Age-stagetwo-sex life tables of *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae), on different apple varieties. *Journal of Economic Entomology*, 106(5), 2118-2125.
- Yorulmaz, S. S., Yaman, Y., Aydınli, F., & Ay, R. (2013). Avcı Akar *Neoseiulus californicus* McGregor (Acari: Phytoseiidae) popülasyonlarının milbemectin'e

karşı direnç düzeyleri sinerjistleri ve detoksifikasyon enzimlerinin belirlenmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 19, 207-218.

Yorulmaz, S., İnak, E., Albayrak, T., & Selvioğlu, Z. (2021). İki Noktalı Kırmızıörümcek *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de Diflovidazin Direnci ve I1017F Mutasyonu. *COMU Journal of Agriculture Faculty*, 9(2), 393-398. <https://doi.org/10.33202/comuagri.910489>

Yu, S. J. (2008). *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. CRC Press Taylor-Francis Group.

Yu, S. J. (2015). *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. CRC Press Taylor-Francis Group.



ÖZGEÇMİŞ



