

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MILBEMECTİN İLE SELEKSİYON YAPILMIŞ
PANONYCHUS ULMI KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE)
POPÜLASYONUNDA DİRENÇ, DİRENÇ KALITIMI VE BAZI
DETOKSİFİKASYON ENZİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

Mehmet Ali İNANICI

**Danışman
Prof. Dr. Recep AY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2017**



©2017 [Mehmet Ali İNANICI]

TEZ ONAYI

Mehmet Ali İNANICI tarafından hazırlanan "**Milbemectin ile Seleksiyon Yapılmış *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae) Popülasyonunda Direnç, Direnç Kalıtımı ve Bazı Detoksifikasyon Enzimlerinin Belirlenmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Bitki Koruma Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Prof. Dr. Recep AY
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Bülent YAŞAR
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Enver DURMUŞOĞLU
Ege Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yasin TUNCER



TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Mehmet Ali İNANICI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM	8
3.1. Materyal.....	8
3.1.1. <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonunun orijini ve yetiştirilmesi.....	8
3.1.2. Denemede kullanılan milbemectin akarisitinin özellikleri.....	8
3.2.1. Biyoassay çalışmaları	10
3.2.1.1. İlaç konsantrasyonlarının hazırlanması	10
3.2.1.2. İlaçların uygulanması.....	11
3.2.2. Seleksiyon çalışmaları.....	12
3.2.3. Biyokimyasal çalışmalar.....	12
3.2.3.1. Microplate assay ile toplam esterase enzimi aktivitesinin incelenmesi.....	13
3.2.3.2. Microplate assay ile glutathione S- transferaz (GST) enzimi aktivitesinin incelenmesi	13
3.2.3.3. Sitokrom (P450) enzimi aktivitesinin incelenmesi	14
3.2.4. Direnç kalıtım çalışmaları.....	14
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	16
4.1. Bioassay Sonuçları.....	16
4.1.1. Seleksiyon sonuçları	16
4.2. Biyokimyasal Çalışma Sonuçları	17
4.2.1. Esteraz enzim aktivitesi sonuçları.....	18
4.2.2. GST enzim aktivitesi sonuçları.....	19
4.2.3. Sitokrom P450 enzimi aktivitesi sonuçları.....	20
4.3. Direnç Kalıtım Çalışmaları.....	21
5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER	22
KAYNAKLAR	25
ÖZGEÇMİŞ.....	29

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MILBEMECTİN İLE SELEKSİYON YAPILMIŞ *PANONYCHUS ULMI* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE) POPÜLASYONUNDA DİRENÇ, DİRENÇ KALITIMI VE BAZI DETOKSİFİKASYON ENZİMLERİNİN BELİRLENMESİ

Mehmet Ali İNANICI

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Recep AY

Bu tez çalışmasında *Panonychus ulmi* (Koch)' de milbemectin' e direnç gelişimi, direnç kalıtımı ve biyokimyasal direnç mekanizması incelenmiştir. Bu amaçla hassas popülasyon HS' de milbemectin ile seleksiyon yapılmıştır. Çalışmada ilaçlama kulesi-yaprak disk yöntemi kullanılmıştır. Öncelikli olarak HS popülasyonunda milbemectin LC₅₀ ve 70 değerleri belirlenmiştir. İlk seleksiyon dozu olarak LC₇₀ dozu kullanılmıştır. Daha sonraki seleksiyon dozları ise her seferinde 1.5 kat artırarak uygulanmıştır. Beşinci seleksiyon sonunda, dirençli popülasyonda direnç kalıtım çalışmaları ve biyokimyasal çalışmalar yapılmıştır. *Panonychus ulmi* hassas popülasyonunda milbemectin LC₅₀ ve 70 dozları sırasıyla 0.117 ve 0.264 µL / 100 mL su olarak bulunmuştur. HS popülasyonun 5 seleksiyon sonunda LC₅₀ değeri 0.870 µL / 100 mL suya ve direnç oranında 7.43 kata artmıştır. 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 estera, glutathion S- transferaz (GST) enzimi ve cytochrome P450 (P450) enzimleri sırasıyla α-naftyl asetat, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ve 7-ethoxycoumarin (7-EC) substratları ile belirlenmiştir. Seleksiyon popülasyonunda (M5) estera, GST ve P450 enzimleri sırasıyla başlangıç popülasyona göre 1.67, 0.57 ve 2.09 kat artmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Panonychus ulmi*, milbemectin, direnç, estera, GST, P450

2017, 29 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINATION OF RESISTANCE, INHERITANCE AND SOME DETOXIFICATION ENZYMES IN *PANONYCHUS ULMI* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE) POPULATION SELECTED WITH MILBEMECTIN

Mehmet Ali İNANICI

Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Recep AY

In this study, development of resistance, resistance inheritance and biochemical resistance mechanism of milbemectin in *Panonychus ulmi* (Koch) have been investigated. For this aim, the susceptible population HS was also selected with milbemectin. LC₅₀ and 70 values of milbemectin in the HS population were determined primarily. As first selection dose LC₇₀ value was used. Subsequent selection dose has been increased 1.5-fold each time. At the end of the fifth selection, resistance inheritance studies and biochemical studies were carried out in resistant populations. In the susceptible *Panonychus ulmi* population, LC₅₀ and 70 doses of milbemectin were found as 0.117 and 0.264 µl / 100 mL water, respectively. At the time of 5 selection in HS populations, the LC₅₀ value increased to 0.870 µl / 100 mL water and the resistance rate increased to 7.43 fold. In resistance inheritance studies, in F1 females obtained from M5 ♂ x GSS ♀ and GSS ♂ x M5 ♀ reciprocal crossing were found as D = 0.56, D = 0.06, respectively. In biochemical studies, enzymes of esterase, glutathione S-transferase (GST) and cytochrome P450 (P450) were identified by α-naphthyl acetate, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and 7-ethoxycoumarin (7-EC) substrates. In the selection population (M5), esterase, GST and P450 enzymes increased by 1.67, 0.57 and 2.09 fold, respectively, compared to the parental population.

Keywords: *Panonychus ulmi*, milbemectin, resistance, ezterase, GST, P450

2017, 29 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Recep AY'a,

Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Özgür KOŞKAN'a,

Tezimin yürütülmesinde benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Ziraat Mühendisi Erdem SOLMAZ ve Gülsüm KIVRAK'a teşekkür ederim.

4528-YL1-15 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Mehmet Ali İNANICI
ISPARTA, 2017

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonlarının yetiştirildiği saksıya alınmış elma fidanları.....	8
Şekil 3.2. <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Jensen) (Actinomycetales: Streptomycetaceae) bakterisi.	9
Şekil 3.3. Milbemectin'in kimyasal yapısı.....	10
Şekil 3.4. İlaç konsantrasyonlarının hazırlanması.....	11
Şekil 3.5. İlaçlama kulesi	12
Şekil 4.1. Hassas ve M5 popülasyonların esteraz enzim aktiviteleri	18
Şekil 4.2. Hassas ve M5 popülasyonların GST enzim aktiviteleri.....	19
Şekil 4.3. Hassas ve M5 popülasyonların sitokrom P450 enzim aktiviteleri.....	20

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Milbemectin'in moleküler formülü ve ağırlığı.....	10
Çizelge 4.1. Hassas <i>Panonychus ulmi</i> popülasyonuna uygulanan seleksiyon dozları.....	17
Çizelge 4.2. Hassas popülasyonun milbemectin ile seleksiyonu sonucu $LC_{50,90}$ değerleri ve direnç oranları.....	17
Çizelge 4.3. <i>Panonychus ulmi</i> 'nin hassas ve seleksiyon popülasyonun esterase enzim aktiviteleri	18
Çizelge 4.4. <i>Panonychus ulmi</i> 'nin hassas ve seleksiyon popülasyonun GST enzim aktiviteleri.....	19
Çizelge 4.5 <i>Panonychus ulmi</i> 'nin hassas ve seleksiyon popülasyonun Sitokrom P450 enzim aktiviteleri.....	20
Çizelge 4.6. Resiprokal F1 dişilerinde milbemectin'e karşı belirlenen LC_{50} değerleri, direnç oranları ve dominantlık dereceleri	21

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AChE	Asetilkolinesteraz
BSA	Bovine Serum Albumin
CDNB	1-chloro -2,4-dinitrobenzene
DEM	Diethyl maleate
EST	Esteraze
GSH	Reduced glutathione
GST	Glutathione S-transferase
IBP	S-Benzyl-O,O-diisopropyl phoshoctrithioate
LC ₅₀	Lethal konsantrasyon -50
LC ₇₀	Lethal konsantrasyon -70
LC ₉₀	Lethal konsantrasyon -90
METI	Mitokondrial elektron taşıma inhibitörü
µL	Mikrolitre
MO	P-450 monooxygenaz
PBO	Piperonylbutoxide
R	Resistant (dayanıklı)
S	Sensitive (hassas)

1. GİRİŞ

Kırmızıörümcekler elma üretiminde önemli derecede kayıplara neden olan zararlılardandır. *Panonychus ulmi*, Rosaceae familyasına ait elma, armut, erik, şeftali gibi ekonomik değeri yüksek olan meyve ağaçlarında zararlı olmaktadır (Croft, 1975). Kırmızıörümcekler yapraklar üzerinde styletleri ile sokup emme suretiyle yaprak dokusunda bronzlaşmalara, solmalara ve bitkinin fotosentez yapabilmesi için gerekli yaprak alanını azalmasına neden olmaktadır (Kramer ve Nauen, 2011; van Leeuwen vd., 2005).

Zararlılarla savaşmada uygulanan entegre mücadele programları içerisinde alternatif savaşım yöntemleri kimyasallar ile desteklenmediğinde verim ve ürün kalitesinde azalma meydana gelmektedir (Tirello vd., 2012, Yorulmaz Salman vd., 2013). Günümüzde üreticiler zararlılarla savaşmada uygulamasının kolay olması ve kısa sürede etki göstermesinden dolayı genellikle kimyasal savaşımı tercih etmektedir. Ancak fitofag akar mücadelesinde yoğun akarisit kullanılması sonucunda zararlı kimyasala direnç geliştirmektedir. Akarisitler, kırmızıörümceklerle savaşmada önemli bir rol oynamaktadır. Kırmızıörümceklerin yüksek üreme yetenekleri, kısa hayat döngüleri ve aynı grup akarisitlerin sık kullanılmaları direnç oluşumunu kolaylaştırmaktadır (Van Leeuwen vd., 2005). Kimyasal savaşımın en önemli olumsuz yönlerinden biri de zararlı popülasyonlarının kullanılan ilaçlara direnç geliştirmesidir. İnsektisitlerin yaygın kullanılması sonucunda böceklerin adaptasyon göstererek bu insektisitlere direnç kazanmalarına sebep olmuştur. Bu kazanımların genetik kökenli olması sebebiyle direnç sonraki döllere de aktarılmaktadır (Çakır ve Yamanel, 2005). Direnç, tarla koşullarında aynı ilacın uygulama dozunun seleksiyon baskısına maruz kalan popülasyonunun aynı dozda canlı kalma yeteneğini geliştirmesi ya da popülasyonda meydana gelen genetik değişim olarak tanımlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ise 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 (Brown, 1958'e atfen Yorulmaz vd.,2009). Aynı sınıf veya mekanizmaya sahip pestisitlerin art arda ve

bilinçsizce kullanılması sonucunda fizyolojik, çapraz, davranışsal, çok yönlü ve morfolojik olarak 5 tip direnç oluşumu gözlenmektedir. Üreticiler bu durumda ya doz artırımını ya da sık ilaçlama yöntemlerinden birini tercih etmektedir. Bu uygulamalarda ürün üzerinde kalan pestisit miktarında artışa neden olmakta, hedef dışı organizmalarda (doğal düşmanlar ve nötr organizmalar) yan etkilere, çevre kirliliğine, üründe maliyet artışına neden olmaktadır (Ay vd., 2013).

Popülasyonlarda direnç geliştikten sonra direnci kırmak, geriye döndürmek zordur ve geriye dönüşümü zaman alacaktır. Bu nedenle, zararlılarda savaşmada direnç gelişmeden önce direnç gelişimini engellemek veya geciktirmek daha önemlidir. Direncin biyokimyasal temelleri ortaya konarak hızlı direnç belirleme yöntemlerinin geliştirilmesi ve ortaya konmasında yarar vardır. Direnç yönetiminde sadece direncin belirlenmesi yeterli olmamaktadır. Direncin önlenmesi veya geciktirilmesi için uygun strateji ve yöntemler oluşturulmalıdır. Bunun için, öncelikle zararlıların direnç mekanizmalarının, ilaçların etki yollarının ve uygulama faktörleri tespit edilmelidir (Ay vd., 2013). Böceklerde direnç mekanizmasını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Kırmızıörümceklerde de böceklerde olduğu gibi estera, monooksijenaz ve glutathione S-transferaz gibi enzimlerin detoksifikasyonu sonucunda direnç gelişmektedir (Tsagkarakou vd. 1999 ; Ay ve Yorulmaz, 2009).

Elma bahçelerinde elma içkurdundan sonra en fazla savaşım yapılan zararlılar arasında kırmızıörümcekler yer almaktadır. Milbemectin, *P.ulmi* ile savaşmada yeni ruhsat almış bir akarisit ve direnç mekanizması bilinmemektedir. Zararlılarla savaşmada direnç kalıtım tipinin ve direnç mekanizmasının bilinmesi kimyasal savaşmada bu problemlerin ortadan kalkmasını ve ilaçlama maliyetinin düşmesine olanak sağlayacaktır. Bu bilgiler dikkate alındığında zararlılarla kimyasal savaşım da petisitlere direnç gelişiminin geciktirilmesi, engellenmesi hatta direnç problemlerinin ortadan kaldırarak üretim maliyetinin minimum seviyeye indirilmesi ancak direnç mekanizmasının bilinmesi ile sağlanacağından bu çalışmada milbemectin ile seleksiyon yapılmış *Panonychus ulmi* popülasyonlarının direnç, direnç kalıtımı ve detoksifikasyon enzimleri üzerine araştırmalar yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sato vd. (2000), yaptıkları laboratuvar çalışmasında methidathion ile 4 kez seleksiyona maruz bıraktıkları *Amblyseius womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae)'de direnç düzeyini 311 kat olduğunu belirlemiştir.

Vontas vd. (2000), kısıtlayıcı Glutasyon (GSH) ve 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) gibi substratlar kullanarak böceklerdeki (GST) enzim aktivitesini spektrofotometrik kinetik ölçümlerle hesaplamışlardır. Bu çalışmada GSH ve CDNB kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda GST enziminin böcek direncinde rol oynayabileceği bulunmuştur.

Stumpf ve Nauen (2001), *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'nin METI (Mitokondrial Elektron Taşıma İnhibitörü) akarisit dirençli iki popülasyonunda 2.4 ve 1.7 kat P450 enzim aktivitesi belirlemiştir.

Nauen vd. (2001), *T. urticae* ve *P. ulmi*'de abamectin, azocyclotin, chlorpyrifos, clofentezine, deltamethrin, fenpyroximate, hexythiazox ve pyridaben direnç düzeylerini araştırmışlardır. *T. urticae*'nin AU ırkında clofentezine ve hexythiazox'a 770-1000 kat, *T. urticae*'nin AK ırkında pyridaben ve fenpyroximate'e 2000-4000 kat direnç düzeyi belirlemiştir. *P. ulmi* laboratuvar ırkında ise hexythiazox'a karşı 1000 kat direnç geliştiğini belirtmişlerdir.

Auger vd. (2003), Fransa'nın güneyinde bazı elma bahçelerinde bulunan *P. ulmi* popülasyonlarının fenazaquin ve tebufenpyrad'a karşı direnç gelişimlerini laboratuvar koşullarında araştırmışlar ve direnç oranlarının hassas popülasyona kıyasla sırasıyla 19.8'den 28.8'e ve 16.8'den 39.8'e yükseldiğini belirlemiştir.

Sato vd. (2004), Brezilya'nın Sao Paulo eyaletinde bulunan ticari bir çilek tarlasından 1999 yılında toplanan *T. urticae* popülasyonunu fenpyroximate ile direnç gelişimi için 5 kez, duyarlılık için 3 kez geri seleksiyona maruz tutarak

dirençli (R) ve duyarlı (S) popülasyonlarını elde etmişlerdir. LC₅₀ ve LC₉₅ direnç oranlarını (R/S) sırasıyla 2.910 ve 2.280 kat olarak belirlemişlerdir. Fenpyroximate ile sekiz akarisit arasında çapraz direnç ilişkileri dirençli ve duyarlı popülasyonlar kullanılarak değerlendirilmiştir. Pyridaben ve dimethoate akarisitlerine çapraz direnç tespit edilmiş, abamectin, milbemectin, propargite, fenpropathrin ve cyhexatin akarisitlerine ise direnç tespit edilmemiştir. Direnç kalıtımı üzerine yapılan çalışmalar fenpyroximate direncinin bir ana eksik dominant karakter tarafından kontrol edildiğini göstermiştir.

Kim vd. (2006), pyridaben ile 20 kez selekte ettikleri *T. urticae* popülasyonunda LC₅₀ değeri direnç oranını 240 kat olarak belirlemişlerdir.

Sato vd. (2006), yaptıkları laboratuvar çalışmasında *Amblyseius womersleyi* Schicha'nın hassas ve dirençli popülasyonlarında P450-monoxigenaz enzim aktivitelerini araştırmışlardır. *A. womersleyi* methidathion ile seleksiyon sırasında Kanaya R, Kanaya S, Ishigaki S popülasyonları LC₅₀ değerleri sırasıyla 816 mg/L, 4.61 mg/L ve 1.59 mg/L olarak belirlenmiştir. *A. womersleyi* monoxigenaz enzim aktivitesi O-deethylation of 7-ethoxycoumarin (7-EC) ile belirlenmiştir. Kanaya R popülasyonu ergin dişilerinde belirlenen monoxigenaz enzim aktivitesi 51.1 pmol/30min/mg protein olarak belirlenmiş ve monoxigenaz enzim aktivitesinde Kanaya S ve Ishigaki S popülasyonlarına kıyasla 3.60 ve 5.42 kat arttığı belirlenmiştir.

Sökeli vd. (2007), Isparta ilindeki elma bahçelerinde zararlı olan iki noktalı kırmızıörümcek popülasyonlarında propargite, chlorpyrifos ve abamectine karşı direnç düzeylerini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada tarla popülasyonlarının chlorpyrifos'a karşı dirençli, propargite ve abamectine karşı duyarlı olduğunu belirlemişlerdir.

Susurluk (2008), *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de piretroit insektisitlere karşı oluşan direncin moleküler karakterizasyonu incelemiştir. Sekiz seleksiyon sonunda elde edilen direnç oranları hassas popülasyona oranla

LC₅₀ ve LC₉₀'a göre sırasıyla lambdacyhalothrin ve bifenthrin için 18.24 ve 8.15 kat ve 74.23 ve 134.07 kat direnç belirlemiştir. Çalışmaların lambdacyhalothrin ve bifenthrin direncinde esterase ve monooksijenaz enzimlerinin önemli rol oynadığını, glutation S-transferaz enzimlerinin ise dirençte rol oynamadığını göstermiştir.

Ay ve Kara (2009), Antalya ilindeki fasulye seralarından topladıkları *T. urticae* (BEŞ) popülasyonunu 15 kez amitraz ile seleksiyon yaparak AMT 15 popülasyonunu elde etmişlerdir. Seleksiyon sonrasında AMT 15 popülasyonun hassas (GSS) popülasyona göre direnç oranını 32.02 kat olarak belirlemişlerdir. AMT 15 popülasyonunun direnç kalıtımı üzerine yapılan çalışmalarda amitraz direncinin eksik dominant karakterli olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan kinetik okumalarda AMT 15 popülasyonun BEŞ popülasyonuna göre esterase enziminde 2.19 kat, glutation S-transferaz enziminde 1.07 kat, sitokrom P450 monooksijenaz enzimi aktivitesinde 29.24 kat artış belirlemişlerdir.

Ay ve Yorulmaz (2009), bifenthrin ile 20 kez selekte ettikleri *T. urticae* popülasyonunda 21.84 kat direnç geliştiğini bulmuşlardır. Bifenthrin ile 20 kez selekte edilen popülasyonunun LC₅₀ 984.49 µL l⁻¹'su'dan 11914.40 µL l⁻¹'su'ya yükseldiğini tespit etmişlerdir.

Sato vd. (2009), Brezilya'nın Sao Paulo eyaletinde bir ticari krizantem alanından topladıkları *T. urticae* popülasyonunu milbemectin ile direnç için altı kez seleksiyona, duyarlılık için beş kez seleksiyona maruz tutarak *T. urticae*'nin duyarlı(S) ve dirençli(R) popülasyonlarını elde etmişlerdir. LC₅₀ direnç oranını (R/S) 409 kat olarak belirlemişlerdir.

Van Pottelbergevd. (2009), *T. urticae*'nin dirençli ve hassas popülasyonları üzerinde spirodiclofen'in üremeye olan etkilerini araştırmışlardır. İlk olarak dişi bireyler 6, 12 ve 24 saat boyunca spirodiclofen konsantrasyonlarına (200 ve 1000 mg/L) maruz bırakılmıştır. Spirodiclofenin üreme üzerinde hassas ve dirençli bireyler arasında istatistiki olarak bir fark bulunmamıştır.

Ay ve Yorulmaz (2010), *T. urticae* popülasyonunu chlorpyrifos ile 20 kez selekte ederek LC₆₀ değerin 8.58 µL l⁻¹'su'dan 91.45 µL l⁻¹'su'ya yükseldiğini tespit etmiştir. Çalışmalarında esteraz enzim aktivitesi 19.35'den 33.59 mOD/dak/mg proteine yükselerek chlorpyrifos direncinde önemli rol oynadığını, GST ve P450 enzimlerinin ise dirençte rol oynamadığını belirtmiştir. Ayrıca chlorpyrifos'un direnç kalıtım modeli cinsiyete bağlı olmayan eksik dominant olduğunu belirtmiştir.

Yorulmaz vd. (2010), Isparta elma bahçelerinden topladıkları *T. urticae* popülasyonlarının LC₅₀ değerine göre cyhexatin'e karşı göstermiş olduğu direnç oranları 1.24 - 3.36, propargite karşı ise 1.23 - 3.18 kat arasında değiştiğini bildirmiştir.

Yorulmaz vd. (2012), Isparta ili elma bahçelerinden 2010 yılında topladıkları avcı akar, *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) popülasyonlarının direnç mekanizmalarını biyokimyasal enzim assayleri ve PBO, IBP ve DEM sinerjistleri kullanılarak incelenmiştir. Toplanan sekiz farklı *N. californicus* popülasyonundan spiromesifen'e karşı 4.35-7.09 kat; hexythiazox'a karşı 3.75-8.01 arası kat ve spiroticlofen'e karşı 5.07 - 8.48 kat direnç belirlemişlerdir. Biyokimyasal enzim assayleri için popülasyonlarda glutathion S-transferaz (GST) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzimleri kinetik yöntemle, esteraz enzimi elektroforez ve kinetik yöntemlerle belirlemişlerdir. Esteraz, glutathion S-transferaz (GST) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktiviteleri sırasıyla 7.748 - 10.211; 1.23 - 1.74 ve 0.010 - 0.045 mOD/min/mg protein olarak belirlenmiştir.

Yorulmaz-Salman vd. (2013), *N. californicus*'un Eğirdir, Eyüpler ve Gelendost popülasyonlarında milbemectin'e karşı sırasıyla 7.20, 6.52 ve 7.35 kat direnç oranlarını belirlemişlerdir. *N. californicus* popülasyonlarında glutathion S-transferaz (GST), monooksijenaz (P450) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzimleri kinetik yöntemle, esteraz enzimi elektroforez ve kinetik yöntemlerle belirlemişlerdir. *N. californicus* popülasyonlarının esteraz, glutathion S-transferaz (GST), monooksijenaz (P450) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzim

seviyeleri sırasıyla 8.86 - 11.64, 2.11 - 3.82, 0.02 - 0.05 ve 0.01 - 0.02 mOD min⁻¹ mg⁻¹ protein arasında değişmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. *Panonychus ulmi* popölasyonunun orijini ve yetiştirilmesi

Denemelerde, 1990 yılından bu yana ilaçsız ortamda yetiştirilen *P. ulmi* 'nin hassas (HS) popölasyonu Bayer CropScience firmasından 2011 yılında sağlanmış ve halen üretimi devam ettirilmektedir. *Panonychus ulmi* popölasyonları içi su dolu küvetler içerisindeki elma (*Malus domestica* Brockhausen) ve erik (*Prunus domestica* Angeleno) fidanlarında yetiştirilmiştir. *Panonychus ulmi* popölasyonlarının yetiştirildiği iklimlendirme odası $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, $\%60 \pm 5$ nem ve 16:8 fotoperiyot koşullarına ayarlanmıştır. Erik ağaçlarının üretimleri de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve 16:8 fotoperiyot koşullarının sağlandığı iklim odasında yapılmıştır.



şekil 3.1. *Panonychus ulmi* popölasyonlarının yetiştirildiği saksıya alınmış elma fidanları

3.1.2. Denemede kullanılan milbemectin akarisitinin özellikleri

Bu çalışmada milbemectin (9.3 g/L) etkili maddeye sahip Milbeknock EC® (Sumi Agro Turkey) kullanılmıştır. Milbemectin, macrocycliclactone ailesinin milbemis grubu içinde yer alan bir akarısittir. Milbemisler, *Streptomyces hygroscopicus* (Jensen) (Actinomycetales: Streptomycetaceae) bakterisinin bir fermantasyon ürünüdür (Şekil 3.2.). GABA-kapılı ve glutamat-kapılı klorid kanallarına etki eder (Clark vd., 1995 atfen İnak ve Çobanoğlu.,2016). Milbemectin akar ve akar yumurtalarına karşı akarisidal, *Caenorhabditis elegans*' a karşı nematosidal etkinliğe sahip milbemis A3 (%30) ve milbemis A4 (%70) karışımı bir ilaçtır Anonim, (2013).

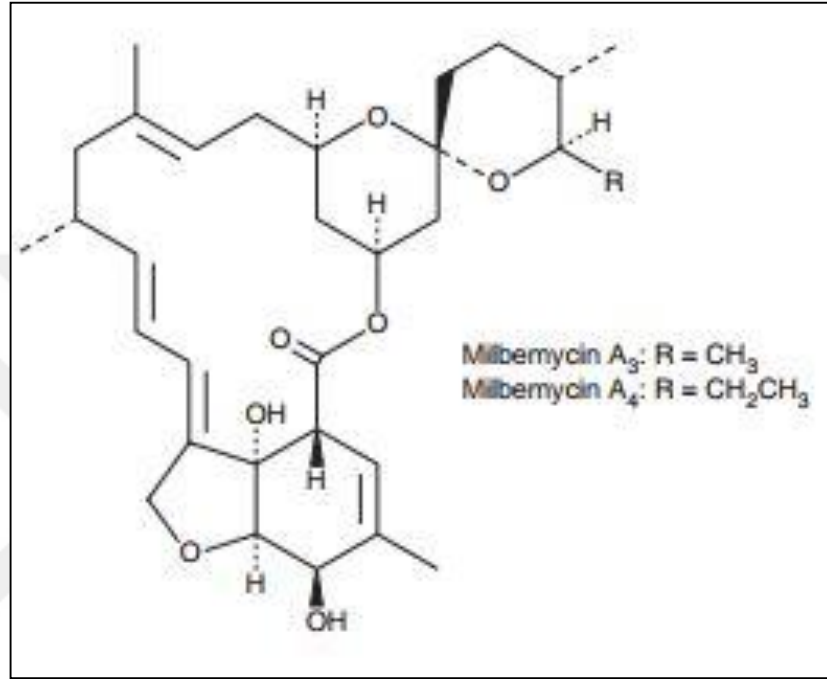


Şekil 3.2. *Streptomyces hygroscopicus* (Jensen) (Actinomycetales: Streptomycetaceae) bakterisi, Anonim(2013).

Milbemectin, milbemycin A3 (M.A3) ve milbemycin A4 (M.A4) karışımı bir maddedir. Kimyasal Yapısı: M.A3: $R=CH_3$, M.A4: $R=C_2H_5$ dir. Milbemectin'in moleküler formülü ve ağırlığı Çizelge 3.1'de, kimyasal yapısı Şekil 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Milbemectinin moleküler formülü ve ağırlığı

	M.A₃	M.A₄
Moleküler Formülü	C ₃₁ H ₄₄ O ₇	C ₃₂ H ₄₆ O ₇
Moleküler Ağırlığı	528.68	542.71



Şekil 3.3. Milbemectin'in kimyasal yapısı (Anonim,2013)

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyoassay çalışmaları

3.2.1.1. İlaç konsantrasyonlarının hazırlanması

Panonychus ulmi' nin insektisite karşı LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerini belirlemek için öncelikle deneme ilacının ön çalışmalarla yaklaşık %90-99 ölüm veren dozlar saptanmıştır. 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 göstermesine özen gösterilmiştir. Denemeler her bir dozda ve kontrol (saf su uygulanan)'de üçer tekerrür olacak şekilde kurulmuştur.



Şekil 3.4. İlaç konsantrasyonlarının hazırlanması

3.2.1.2. İlaçların uygulanması

Tabanı ıslatılmış pamukla kaplı 9 cm çapındaki petriler üzerinde hazırlanan yaprak üzerine yaklaşık 25 adet *P. ulmi* ergin dişileri binoküler altında bir fırça yardımı ile aktarılmıştır. Bu petriler hazırlanan ilaç konsantrasyonları ile ilaçlama kulesinde 1 bar basınç altında ilaçlanmıştır. Her petriye 2 mL ilaç püskürtülmüştür. Kontrole sadece saf su uygulanmıştır. Petriler yaklaşık 30 dk. havalandırılarak, $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, %60-65 nem ve 16:8 fotoperiyodik koşullarına sahip iklim odasına aktarılmıştır. Ölü canlı değerlendirmesi 72 saat sonra yapılmıştır. *P. ulmi* popülasyonlarının 72 saat sonra belirlenen ölüm verilerinden yararlanılarak POLO bilgisayar paket programında (LeOra Software, 1994) LC_{50} ve LC_{90} değerleri belirlenmiştir. Direnç geliştiren seleksiyon popülasyonlarının LC_{50} değerlerinin hassas popülasyona ait (başlangıç popülasyonu) LC_{50} değerine oranlanması ile ilaç için popülasyonların direnç oranları elde edilmiştir.



Şekil 3.5. İlaçlama kulesi

3.2.2. Seleksiyon çalışmaları

Popülasyonların LC değerleri belirlendikten sonra LC₇₀ değerleri ilaçların uygulanması bölümünde anlatılan metoda göre yaklaşık 40 petride ıslak pamuk üzerindeki yaprak üzerine aktarılan ergin bireylere uygulanmıştır. Uygulama yapılan her bir petriye de yaklaşık 40-50 ergin dişi birey olmasına özen gösterilmiştir. Uygulamadan 72 saat sonra canlı kalan bireyler uygulama yapılmamış erik yapraklarına aktarılmıştır ve üremeye bırakılmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanarak popülasyonun hızlı bir şekilde artması sağlanmıştır. Popülasyon yeterli birey sayısına ulaşıncaya hassas popülasyonun LC₇₀ değeri 1.5 kat arttırılarak yeni seleksiyon dozu olarak belirlenmiştir. Her seleksiyonda bir önceki seleksiyon dozu 1.5 kat arttırılarak uygulanmıştır.

3.2.3. Biyokimyasal çalışmalar

Microplate assay ile toplam esterase, glutathion S-transferaz (GST) ve monoksijenaz (P450) enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.3.1. Microplate assay ile toplam esteraz enzimi aktivitesinin incelenmesi

Kinetik esteraz aktivitesinin belirlenmesinde α - naphtylacetate kullanılarak 96 hücreli düztabanlı mikrolakada Stumpf ve Nauen (2002)'in geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. 20 adet ergin dişi %0.1 Triton X-100 içeren 100 μ L sodyum fosfat buffer (0.1M, pH 7.5) içinde eppendorf tüplerde ezilmiştir. Bu homojenat 10000 g ve +4°C'da 5 dakika santrifüj edildikten sonra 10 kez seyreltilerek supernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Supernatant ve 0.2 M fosfat buffer (pH:6)'dan 25'er μ L mikrolakanın hücrelerine konulmuştur. Çalışma 200 μ L substrat solüsyonunun eklenmesiyle başlatılmıştır. Substrat solüsyonu 30 mg Fastblue RR tuzunun 50 mL 0.2 M sodyum fosfat bufferda çözülmesi ve bu karışıma 500 μ L 100 mM α - naphtylacetate'ın ilavesiyle elde edilmiştir. Enzim aktivitesi 25 °C ve 450 nm' de 10 dakika süreyle okunmuştur. Kontrol hücreleri ise homojenatsız olarak okunmuştur.

3.2.3.2. Microplate assay ile glutathione S- transferaz (GST) enzimi aktivitesinin incelenmesi

Panonychus ulmi popülasyonlarında GST enziminin kinetik olarak belirlenmesinde Stumpf ve Nauen (2002)' in geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. 30 ergin dişi 300 μ L Tris HCL buffer (0.05M, pH7.5) içinde eppendorf tüplerde ezilmiştir. 100 μ L supernatant 10000 g ve +4 °C' da 5 dakika santrifüj edilmiştir. 100 μ L supernatant, 100 μ L 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ve 100 μ L reduced glutathione (GSH) oluşan toplam hacim mikrolate hücrelerine konulmuştur. CDNB % 0.1 (v/v) ethanolde hazırlanmıştır ve final konsantrasyonda 0.4 mM CDNB olması ve reduced glutathione (GSH) Tris HCL buffer de hazırlanmış ve final konsantrasyonda 4 mM GSH olması sağlanmıştır. Kontrol hücrelerinde ise sadece CDNB ve GSH homojenatsız olarak okunmuştur. Absorvanstaki değişim 340 nm de 25 °C de 5 dk' da okunarak belirlenmiştir.

3.2.3.3. Sitokrom (P450) enzimi aktivitesinin incelenmesi

P450 enziminin florimetrik belirlenmesinde Rauch ve Nauen (2002) uygulamış olduğu metot uyarlanarak kullanılmıştır. *P. ulmi*'nin 100 adet dişisi, 200 µL sodyum fosfat buffer (0.1 M, PH:7.6) içerisinde homojenize edilmiştir. Bu homojenattan 50 µL alınarak mikrolaka hücresine koyulmuş ve üzerine 40 µL sodyum fosfat buffer eklenmiştir. Sonrasında her bir hücreye 2 µL 7-ethoxycoumarin (7-EC) ve 10 µLsulu NADPH eklenerek, final konsantrasyonda 0.4 mM 7-EC ve 1 mM NADP olması sağlanmıştır. Daha sonra bu karışım 30 °C' de 30 dakika 44 g de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Chauret vd. (1998), tanımladığı gibi NADPH uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla 10 µL glutathionoksidaz (100 mM su içerisinde) ve 13 µL glutathionredüktaz (1.3 U) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra bu reaksiyon % 50'lik 125 µL asetonitril [Trizma-basebuffer (0.05 M PH:10) içerisinde] kullanılarak durdurulmuştur. Florimetre'de enzim okuması 390 nm ve 465 nm boyunda okunarak 4 tekrerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Kontrole ise homojenatsız olarak okunmuştur.

Enzim aktivitelerinin istatistiksel analizi: Enzim aktiviteleri Bradford (1976) yöntemiyle BSA (bovine serum albumin) kullanılarak mOD/min/mg protein veya RFU/30min/mg protein olarak hesaplanmıştır. Elde edilen RFU/30min/mg protein değerleri SAS, (1999) programında GLM (General Linear Model) prosedürü kullanılarak analiz edilmiştir. Ortalamalar arasındaki fark T testi ile belirlenmiştir.

3.2.4. Direnç kalıtım çalışmaları

Direncin döllere aktarımını ve geriye dönüşümünü belirlemek için dirençli ve hassas popülasyonlar arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır. Çalışma için öncelikle hassas ve dirençli popülasyonların pestisitlere karşı duyarlılıkları belirlenmiştir. Daha sonra 9 cm çapındaki petrilerin tabanına pamuk konulmuş ve ıslatılmıştır. Tabanı pamukla kaplı petrilere temiz erik yaprağı alt yüzeyi yukarı gelecek şekilde konulmuştur. Dirençli popülasyonda resiprokal

aprazlamalar için 20 adet petri hazırlanmıştır. Her bir petrideki yaprağın üzerine dirençli popülasyondan 20 adet deotonimf dişi birey ve hassas popülasyondan 30 adet ergin erkek birey aktarılmıştır. Ayrıca dirençli popülasyondan erkek birey ve hassas popülasyondan dişi birey aktararak işlemin tam tersi yapılmıştır. Bu süreçte diploid dişiler haploid erkekler tarafından döllenmesi sağlanmıştır. 5 gün sonra yapraklar üzerindeki ergin bireyler uzaklaştırılmış ve dişi bireylerin bırakmış oldukları yumurtalar açıldıktan sonra yeni nimfler saksılardaki erik bitkileri üzerine aktarılmıştır. Bu şekilde F1 dölleri elde edilmiştir. Bireyler ergin olduğunda LC₅₀ değerleri belirlenmiş ve hassas popülasyonun LC₅₀ değeri ile karşılaştırılmıştır (Van Leeuwen vd., 2004). Her iki çaprazlamadan sonra F1 dişilerinde direncin kalıtımı;

$D = (2X_2 - X_1 - X_3) / (X_1 - X_3)$ formülü ile hesaplanmıştır (Stone 1968' e atfen Sato vd., 2004).

X₁= Dirençli ırkın LC₅₀ değerinin log₁₀' u,

X₂= F1 dişilerinin LC₅₀ değerinin log₁₀' u,

X₃= Hassas ırkın LC₅₀ değerinin log₁₀' u, ifade etmektedir.

Baskınlık derecesi -1 ile +1 arasında değişmektedir.

- -1<D>0: eksik çekinik karakter,
- 0: Baskınlık yok (nötr),
- 0<D>+1: eksik dominant karakter anlamına gelmektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışma 2015-2017 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünde yapılmıştır. Milbemectin ile selekte edilen dirençli popülasyon (M5) 2011 yılında Almanya Bayer Crop Science firmasından getirilen hassas (HS) popülasyondan elde edilmiştir. Zaman kaybı yaşanmaması için popülasyon yeterli birey sayısına ulaşınca HS popülasyonun LC₇₀ dozu 1.5 kat artırılarak seleksiyon çalışmaları tamamlanmıştır. Direnç oranı son seleksiyon ile hassas popülasyon karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Direncin kalıtımını belirlemek için popülasyonlar arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır. Dirençli popülasyonlarda milbemectin direncinde rol oynayan enzimler biyokimyasal yöntemlerle belirlenmiştir.

4.1. Bioassay Sonuçları

Panonychus ulmi'nin milbemectine göstermiş olduğu direnç seviyesi selekte edilen popülasyonun LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerinin HS popülasyonun LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerinin karşılaştırılması ile belirlenmiştir.

4.1.1. Seleksiyon sonuçları

Panonychus ulmi hassas popülasyonu milbemectin ile 5 kez seleksiyon yapılarak direnç gelişimi ve direnç mekanizması belirlenmiştir. Elde edilen popülasyon bireyleri M5 olarak adlandırılmıştır. *P. ulmi* hassas popülasyonu LC₅₀ değeri 0.117 µL / 100ml su'dan, 5 kez seleksiyon sonucunda 0.870 µL / 100ml su'ya yükselmiştir. LC₉₀ değeri ise 0.851 µL / 100ml su'dan 3.888 µL / 100ml su'ya yükselmiştir. Hassas popülasyondan elde edilen LC₇₀ dozu baz alınarak her seleksiyon için 1.5 kat doz artırılarak, seleksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1.).

Direnç oranı 5. seleksiyon popülasyonun hassas popülasyon LC₅₀ değerine oranlanması ile belirlenmiştir. Hassas popülasyon ile dirençli popülasyon (M5) karşılaştırıldığında milbemectine karşı 7.43 kat direnç elde edilmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.1. Hassas *Panonychus ulmi* popülasyonuna uygulanan seleksiyon dozları

Popülasyon	Dozlar (µL / 100ml su)
Hassas popülasyonun LC ₇₀ değeri	0.264
1. seleksiyon dozu	0.264
2. seleksiyon dozu	0.264x1.5=0.396
3. seleksiyon dozu	0.396x1.5=0.594
4. seleksiyon dozu	0.594x1.5=0.891
5. seleksiyon dozu	0.891x1.5=1.336
6. seleksiyon dozu	1.336x1.5=2.004
7. seleksiyon dozu	2.004x1.3=2,605

Çizelge 4.2. Hassas *Panonychus ulmi* popülasyonun milbemectin ile seleksiyonu sonucu belirlenen LC_{50,90} değerleri ve direnç oranları

Popülasyon	n*	Eğim±SE	LC ₅₀ (µL/100ml su)	LC ₉₀ (µL/100ml su)	RR** (LC ₅₀)	RR*** (LC ₉₀)
HS	505	1.490±0.259	0.117 (0.065-0.173)	0.851 (0.549-1.795)	-	-
M5	440	1.971±0.463	0.870 (0.532-1.148)	3.888 (2.552-10.797)	7.43	4.56
M7 (M5) ¹	442	1.598±0.230	0.448 (0.307-0.603)	2.840 (1.897-5.397)	3.82	3.33

¹M7'de direnç oranı artmadığı için popülasyon ismi M5 olarak kabul edilmiştir.

*denemede kullanılan birey sayısı

**LC₅₀ göre direnç oranı

***LC₉₀ göre direnç oranı

4.2. Biyokimyasal Çalışma Sonuçları

Biyokimsayal çalışmalar sırasında esterase, GST ve P450 enzimlerini mikropate yöntemiyle belirlenmiştir. Enzim sonuçlarından elde edilen veriler Minitab tek yönlü varyans analizi tekniği (One-Way ANOVA) ile analiz edilmiş ve popülasyonlar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde T testi kullanılmıştır. Analiz sonucunda grup farkları ortaya konmuştur.

4.2.1. Esteraz enzim aktivitesi sonuçları

Popülasyonların mikropate assay ile toplam esteraz enzim aktivitesi α -naftyl asetat ile girdiği reaksiyonda 10 dakika süreyle kinetik olarak belirlenmiştir. Esteraz enzim aktivitesi mOD/min/mg protein olarak hesaplanmıştır. Hassas ve M5 popülasyonlarının esteraz enzimlerinin microplate okuyucuda kinetik olarak okunması sonucuna göre esteraz enzim aktivitesi 1.67 kat artmış ve aralarındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$), (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.1).

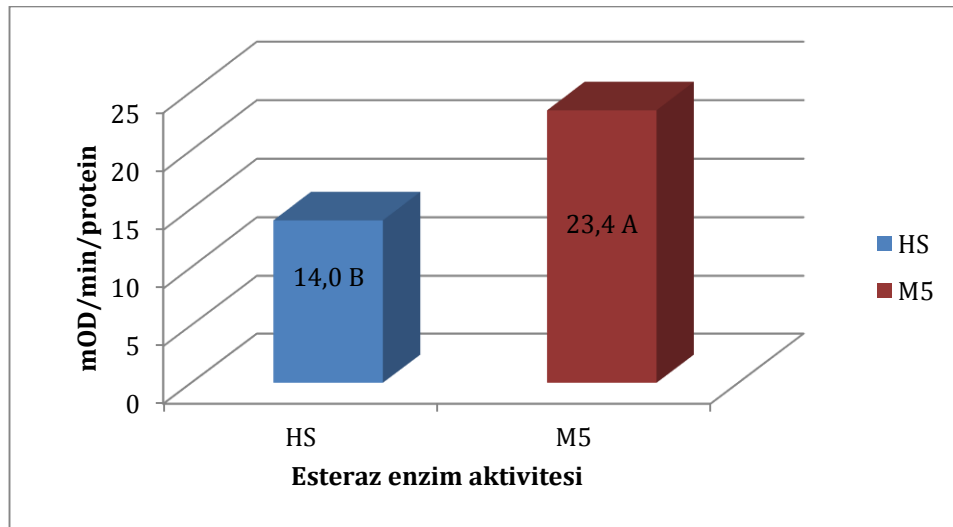
Çizelge 4.3. *Panonychus ulmi*'nin hassas ve seleksiyon popülasyonun esteraz enzim aktiviteleri

Popülasyon	N*	Enzim aktivitesi ** mOD/min/mg protein	R/S***
HS	8	14.0 B	-
M5	8	23.4 A	1.67

*Tekerrür sayısı

** Aynı sütunda aynı harfi gösteren gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($P < 0.05$).

***M5 popülasyonunun enzim aktivitesi/Hassas popülasyonun enzim düzeyi aktivitesi



Şekil 4.1. Hassas ve M5 popülasyonların esteraz enzim aktiviteleri

4.2.2. GST enzim aktivitesi sonuçları

Popülasyonların mikropate denemeler ile GST enzim aktivitei CDNB ile girdiği reaksiyonda 5 dakika kinetik olarak belirlenmiştir. GST enzim aktivitesi mOD/min/mg protein olarak belirlenmiştir. Hassas ve M5 popülasyonu 4 tekerrürlü olacak şekilde GST enzimlerinin kinetik okuması yapılmıştır. Hassas popülasyonun GST enzim aktivitesi 4.46 mOD/min/mg protein bulunurken M5 popülasyonun ki 2.36 mOD/min/mg protein olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre GST enzim aktivitei M5 popülasyonunda hassas popülasyona göre yaklaşık % 50 azalmıştır ve aradaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$) (Çizelge 4.4. ve şekil4.2.). *Panonychus ulmi*'nin seleksiyon popülasyonunda esteraz enzimi artarken GST enzim aktivitesi azalmıştır.

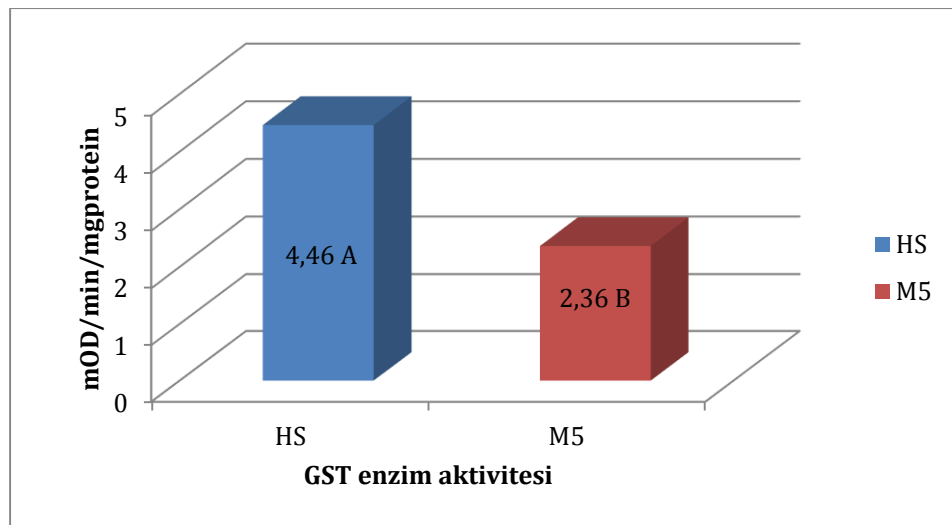
Çizelge 4.4. *Panonychus ulmi*'nin hassas ve seleksiyon popülasyonun GST enzim aktivitei

Popülasyon	N*	Enzim aktivitesi** mOD/min/mg protein	R/S***
HS	4	4.46 A	-
M5	4	2.36 B	0.57

*Tekerrür sayısı

** Aynı sütunda aynı harfi gösteren gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($P<0.05$).

***M5 popülasyonunun GST enzim aktivitesi/ Hassas popülasyonun GST enzim düzeyi aktivitesi



şekil 4.2. Hassas ve M5 popülasyonların GST enzim aktivitei

4.2.3. Sitokrom P450 enzimi aktivitesi sonuçları

P450 enzim aktivitesi 7-ethoxycoumarin (7-EC) ile girdiği reaksiyonda microplate assay ile florometrik olarak belirlenmiştir. P450 enzim aktivitesi RFU/30min/mg protein olarak hesaplanmıştır. *P. ulmi* hassas popülasyonunda P450 enzim aktivitesi 5.seleksiyon sonucunda 2.09 kat artarak, 0.349 RFU/30min/mg protein'den 0.731 RFU/30min/mg proteine çıkmış ve aralarındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$), (Çizelge 4.5. ve Şekil4.3.).

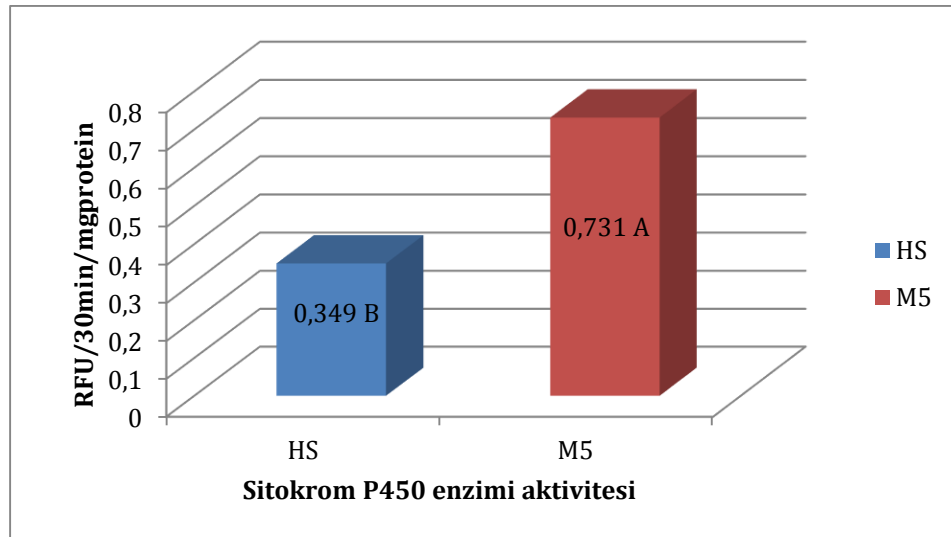
Çizelge 4.5. *Panonychus ulmi*'nin hassas ve seleksiyon popülasyonun Sitokrom P450 enzim aktiviteleri

Popülasyon	N*	Enzimaktivitesi** RFU/30min/mg protein	R/S***
HS	4	0.349 B ($\pm 0,04$)	-
M5	4	0.731 A ($\pm 0,04$)	2,09

*Tekerrür sayısı

**Aynı sütunda aynı harfi gösteren gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($P<0.05$).

***M5 popülasyonunun P450 enzim aktivitesi/Hassas popülasyonun P450 enzim düzeyi aktivitesi



Şekil 4.3. Hassas ve M5 popülasyonların sitokrom P450 enzim aktiviteleri

4.3. Direnç Kalıtım Çalışmaları

Milbemectin dirençli M5 popülasyonu ile GSS (hassas) popülasyon arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır. Çaprazlamalar sonucunda elde edilen F1 dölleri LC₅₀ değerleri ve direnç oranları çizelge 4.6.'da verilmiştir. M5 ♂ x GSS ♀ çaprazlamasından elde edilen F1 dölleri direnç oranı 2.86 kat olarak bulunmuştur. GSS ♂ x M5 ♀ çaprazlamasından elde edilen F1 dölleri direnç oranları 2.03 kat olarak belirlenmiştir. Çaprazlama popülasyonlarının milbemectin direnç oranlarının başlangıç popülasyonuna göre önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Her iki çaprazlamadan sonra, M5 ♂ x GSS ♀ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F1 dişilerinde, D= 0.56; GSS ♂ x M5 ♀ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F1 dişilerinde, D= 0.06 olarak bulunmuştur. Her iki çaprazlamadan da belirlenen D değerleri 0<D< 1 değerleri arasında bulunmuştur. Bu sonuçlara göre M5 ♂ x GSS ♀ çaprazlamasına milbemectin için direnç kalıtımının eksik dominant olduğu, GSS ♂ x M5 ♀ çaprazlamasına göre ise nötr olduğu belirlenmiştir. Bunlara ilaveten bu sonuçlara göre milbemectin direncinin erkekler dişilere göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Resiprokal F1 dişilerinde milbemectin'e karşı belirlenen LC₅₀ değerleri, direnç oranları ve dominantlık dereceleri

Popülasyon	n	Eğim±se	LC ₅₀ (µL / 100ml su) 0.95 güven aralığı	LC ₅₀ direnç oranı	D*
M5	440	1.971±0.46	0,448 (0.532-1,148)	3,83	-
F1(M5♂ x HS ♂)	396	1.44±0.28	0.335 (0.193-0.479)	2.86	0,56
F1(HS♂ x M5 ♂)	682	1.056±0.12	0.238 (0.128-0.456)	2.03	0,06
Hassas	505	1.490±0.26	0.117 (0.065-0.173)	-	

*D: dominantlık derecesi

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Panonychus ulmi elma bahçelerinde ekonomik kayıplara neden olan önemli zararlılardan birisidir. Üreticiler diğer akarlar ve zararlılarda olduğu gibi bu zararlıya karşıda savaşında kimyasal savaşımı tercih etmektedirler. *P. ulmi*'de diğer akarlar gibi kısa sürede döl vermeleri ve yüksek üreme güçleri nedeniyle kullanılan tarım ilaçlarına karşı kısa sürede direnç geliştirebilmektedirler. Yapılan bu çalışmada milbemectin ile 5 kez selekte edilen hassas *P. ulmi* popülasyonunda LC₅₀ değeri 0.117µL / 100ml su'dan 0.870µL / 100ml su'ya çıkarak 7.43 kat direnç kazanmıştır. Nauen vd. (2001) yapmış oldukları çalışma *P. ulmi*'nin iki farklı ırkında hexythiazox, clofentezine, azocyclotin, deltamethrin, chlorpyrifos, pyridaben, fenpyroximate ve abamectin ilaçlarına karşı 0.23 - >4300 kat arasında değişen oranlarda direnç geliştirdiğini belirtmişlerdir. Pree ve Wagner (1987), Güney Ontario'da 1984 yılında 45 bahçeden topladıkları *P. ulmi* popülasyonunun %29'unun cyhexatin'e 2 popülasyonunda dicofol'a direnç geliştirdiğini rapor etmişlerdir. Kramer ve Nauen 2009 ve 2010 yıllarında Avrupa'dan farklı ülkelerden topladıkları 60'dan fazla *P. ulmi* popülasyonunda spirodiclofen'e duyarlılığı belirlemişler, bazı popülasyonlarda 60 kata direnç belirlemişlerdir. Ayrıca spirodiclofen ile seleksiyon yaptıkları bir tarla popülasyonunda da 7000 kata kadar direnç geliştirdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada kullanılan milbemectin' in insektisit ve akarisit özelliği vardır ve ülkemizde kırmızı örümceklere karşı ruhsatlıdır. Bu akarisin *P. ulmi*'de direnci ile ilgili bir çalışma yoktur ancak *T. urticae* ile ilgili birçok çalışma vardır. Nicastro vd. (2010), milbemectin ile 5 kez selekte ettikleri *T. urticae*'de LC₅₀ değerinin 7.33 mg/L'den 184 mg/L'ye arttığını ve direnç oranının da 25 kata çıktığını belirtmişlerdir. Lee vd. (2003), 6 farklı kesme çiçek serasından topladıkları *T. urticae* popülasyonunda milbemectin'e karşı erginlerde 1.8 - 14.6 kat, yumurtalarda ise 0.4 - 17.2 kat arasında direnç geliştiğini bildirmişlerdir. Yorulmaz-Salman vd. (2013), elma bahçelerinden topladıkları 3 avcı akar *Neoseiulus californicus* popülasyonlarında milbemectin'e karşı 6.52 - 7.25 kat direnç bulmuşlardır.

Zararlılarla etkili bir kimyasal savaşım için direnç kalıtım tipinin ve direnç mekanizmalarının bilinmesi çok önemlidir. Direnç kalıtım çalışmalarında elde edilen verilere göre M5 ♂ x HS ♀ çaprazlamasına milbemectin için direnç kalıtımının eksik dominant olduğu, HS ♂ x M5 ♀ çaprazlamasına göre ise nötr olduğu belirlenmiştir. Yani *P. ulmi*'de direnç kalıtımında erkeklerde eksik dominant taşındığı belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada seleksiyon dışı bireylerden yapıldığı için direnç artışı yavaş olmuştur. Stumpf ve Nauen (2001) yaptıkları çalışmada *T. urticae*'de pyradaben ve fenpyroximate direnç kalıtımının her iki cinsiyetinde rol oynadığını ancak dişilerin daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ay ve Yorulmaz (2010), *T. urticae* chlorpyrifos kalıtımının ebeveynin cinsiyetine bağlı olmadığını ve eksik dominant karakterli olduğunu belirtmişlerdir.

Direnç yönetim programlarında etkili bir direnç yönetimi için direnç mekanizmalarının analiz edilmesi gerekir. Tarım ürünlerinde zararlı böcek akarlarda genel olarak dört tip direnç mekanizması vardır. Bunlar sırasıyla morfolojik (penetrasyon) direnç, davranışsal direnç, metabolik direnç ve hedef yeri mutasyonu şeklinde özetlenebilir. Özellikle bu mekanizmalardan son ikisi önemlidir ve geriye dönüşümü daha zordur (Yu, 2008). Yapılan bu çalışmada milbemectin ile seleksiyon yapılan *P. ulmi* popülasyonunda hassas popülasyon HS' ye göre esteraz enzimi ve p450 enzimi önemli derecede artarken, GST enzimi önemli derece de azalmıştır. Ay ve Yorulmaz (2009), abamectin ile 15 defa selekte ettikleri *T. urticae*' de benzer bir sonuç bulmuşlardır. Bu çalışmada abamectin ile selekte edilen *T. urticae* popülasyonunda direnç oranı 35 kata çıkarken, esteraz P450 enzimlerinin aktiviteyi dirençli popülasyonda artmış, ancak GST enzim aktivitesi ise azalmıştır. Yorulmaz-Salman vd. (2013), elma bahçelerinden topladıkları 3 avcı akar *N. Californicus* popülasyonlarında milbemectine karşı düşük oranda dirençli olduklarını ve esteraz, GST ve P450 enzimlerinin dirençli popülasyonlarda önemli derecede yüksek çıktığını bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarına GST aktivitesi hariç benzemektedir. Ancak bu çalışmada incelenen popülasyonlar tarla popülasyonlarıdır ve başka ilaçlarda maruz kalmış olabilirler. Bu çalışmanın dışında milbemectin'in direnç mekanizması ile ilişkin çalışma

bulunamamıştır. Özellikle üretiminin zor olması nedeniyle *P. ulmi*' de ilaçların direnç mekanizması ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Ancak aynı familyadan *T. urticae* ile ilgili birçok ilacın biyokimyasal ve moleküler direnç mekanizması çalışılmıştır. Tirello vd. (2012), kesme çiçek seralarında topladıkları üç *T.urticae* popülasyonunda tebufenpyrad (Resistant Ratio—RR, $RR_{50}=48.4$ ve 163.6), fenpyroximate ($RR_{50} = 74.1$ ve 25.9), abamectin (bir popülasyonda, $RR_{50} = 1,294.1$)' e karşı yüksek oran da direnç belirlemişler ve bu popülasyonlarda detoksifikasyon enzimleri esteraz, GST ve P450'nin hassas popülasyona göre yüksek oranda bulunduğunu ve potansiyel direnç mekanizması olabileceğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak elde edilen bu verilere göre, *P. ulmi*' de milbemectin direnç kalıtımı erkek bireyler ile eksik dominant olarak taşınmakta ve direnç mekanizmasında ise esteraz ve P450 enzimi rol oynama potansiyeli olduğu belirlenmiştir.

Öneriler;

- Zararlılarla etkili bir kimyasal savaşım için mutlaka direnç yönetim programları oluşturulmalı,
- Agroekosistemlerde kullanılan ve kullanılacak ilaçların etki mekanizmaları ve zararlılardaki direnç mekanizmaları, direnç kalıtım tipleri belirlenmeli,
- Doğal düşmanlara yan etkisi olmayan ilaçlar belirlenmeli,
- IPM programlarına uyulmalı,
- Zararlılarla kimyasal savaşımda en uygun zamanda en uygun dozda ilaç uygulanmalı.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2013. <http://www.philagro.co.za/wp-content/uploads/2013/08/milbeknock-info.pdf> Erişim Tarihi: 05/10/2017.
- Anonim b. 2017. <http://www.irac-online.org/modes-of-action/>Erişim Tarihi:01.11.2017
- Auger, P., Bonafos R., Guichou S., Kreiter S., 2003. Resistance to fenazaquin and tebufenpyrad in *Panonychus ulmi* Koch(Acari: Tetranychidae) populations from South of Franceapple orchards. Crop Protection 22 (2003), 1039–1044
- Ay R., Kara F. E., 2009. Amitraz'a Dirençli *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de Çoklu Direnç, Kalıtım, Sinerjizm ve Detoksifikasyon Mekanizmaları.Tarım Bilimleri Dergisi 2009, 15 (2), 148-156.
- Ay, R. ve Yorulmaz, S. 2009. Bifenthrin'e dirençli *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de çoklu direnç, direnç kalıtımı ve Sitokrom P450 aktivitesinin belirlenmesi- Bitki Koruma Bülteni 2009, 49 (2), 67-78
- Ay R., Yorulmaz S., 2010. Inheritance and detoxification enzyme levels in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) strain selected with chlorpyrifos. J Pest. Sci.(2010) 83, 85-93
- Ay, R., Yorulmaz Salman, S., İşçi, M., ve Yaman Y., 2013. Böceklerde İnsektisit Direnç Yönetimi- I. Bitki Koruma Ürünleri ve Makineleri Kongresi.2-5 Nisan 2013. Antalya.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein – dye b inding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.
- Croft, B. A., 1975. Integrated control of apple mites.Michigan state university extension service bulletin e-825, 12.
- Çakır, Ş., ve Yamanel, Ş. 2005. Böceklerde insektisidlere direnç.Ahi Evran Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi, 6(1).
- İnak E., Çobanoğlu S., 2016. Akarisitler ve etki mekanizmaları. Türk.Entomol.Bült., 2016, 6(4), 371-382
- Kim Y. J., Park H. M., Cho J. R., Ahn Y.J., 2006. Multiple Resistance and Biochemical Mechanisms of Pyridaben Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology, 99(3), 954-958.
- Kramer, T. ve Nauen, R., 2011. Monitoring of spirodiclofen susceptibility in field populations of European red mites, *Panonychus ulmi* (Koch)(Acari:

- Tetranychidae), and the cross-resistance pattern of a laboratory-selected strain. *Pest management science*, 67(10), 1285-1293.
- Lee, Y. S., Song, M. H., Ahn, K. S., Lee, K. Y., Kim, J. W., Kim, G. H., 2003. Monitoring of acaricide resistance in two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) populations from rose greenhouses in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 6(1), 91-96.
- LeOra Software, 1994. *POLO-PC: A User's Guide to Probit Logit Analysis* LeOra Software, 28 p., Berkeley, CA.
- Nauen, R., Stumpf, N., Elbert, A., Zebitz, C. P. W., Kraus, W., 2001. Acaricide toxicity and resistance in larvae of different strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). *Pest management science*, 57(3), 253-261.
- 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(3), 231-241.
- Pree, D. J., Wagner, H. W., 1987. Occurrence of cyhexatin and dicofol resistance in the European red mite, *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae), in southern Ontario. *The Canadian Entomologist*, 119(3), 287-290.
- Rauch, N. ve Nauen, R. 2002. Spirodiclofen resistance risk assessment in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): A biochemical approach. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74(2), 91-101.
- Sato, M. E., Miyata, T., Kawai, A., Nakano, O., 2000. Selection for resistance and susceptibility to methidathion and cross resistance in *Amblyseius womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae). *Applied Entomology and Zoology*, 35(3), 393-399.
- Sato M. E., Miyata T., Da Silva M., Raga A., De Souza Filho M.G., 2004. Selections for fenpyroximate resistance and susceptibility, and inheritance, cross-resistance and stability of fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Appl. Entomol. Zool.* 39 (2): 293–302 (2004)
- Sato, M. E., Tanaka, T., Miyata, T., 2006. Monooxygenase activity in methidathion resistant and susceptible populations of *Amblyseius womersleyi* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology*, 39(1), 13-24.
- 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. *Tarım Bilimleri Dergisi* 2007, 13 (4), 326-330.

- Stumpf, N., ve 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.
- Stumpf, N. ve Nauen, R., 2002. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72, 111-121.
- Susurluk, H., 2008. İki Benekli Kırmızıörümcek *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae)'de Piretroid İnsektisitlere Karşı Oluşan Direncin Moleküler Karakterizasyonu- Ankara Üniversitesi, Doktora Tezi, 153s, Ankara.
- 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.
- Tsagkarakou, A., Navajas M., Rousset F., Pasteur N., 1999. Genetic differentiation in *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae) from greenhouses in France. *Exp. Appl. Acarol.* 23, 365-378.
- Van Leeuwen, T., Stillatus, V., Tirry, L., 2004. Genetic analysis and cross-resistance spectrum of a laboratory-selected chlorfenapyr resistant strain of two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 32(4), 249-261.
- Van Leeuwen, T., Van Pottelberge, S., ve Tirry, L., 2005. Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychusurticae*. *Pest management science*, 61(5), 499-507.
- Van Pottelberge, S., Khajehali, J., Van Leeuwen, T., Tirry, L., 2009. Effects of spiroadiclofen on reproduction in a susceptible and resistant strain of *Tetranychusurticae* (Acari: Tetranychidae). *ExperimentalandAppliedAcarology*, 47(4), 301-309.
- 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.
- Yorulmaz, S., Ay, R., 2009. Multiple resistance, detoxifying enzyme activity, and inheritance of abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33(4), 393-402.

Yorulmaz, S., Kaplan, P., Boztürk D., Çobanoğlu S., Ay R., 2010. Isparta Elma Bahçelerinden Toplanan *Tetranychus urticae* Koch. (Acarina: Tetranychidae) Popülasyonlarının Propargite ve Cyhexatin'e Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi- Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 5 (1), 17-23, 2010

Yorulmaz S., Ay R., 2012. Isparta İli Elma Bahçelerinden Toplanan Avcı Akar *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) Popülasyonlarının Bazı Akarisitlere Karşı Direnç Düzeyleri ve Direnç Mekanizmaları. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 16(2),(2012), 122-132

Yorulmaz Salman, S., Yaman, Y., Aydın F. ve Ay, R., 2013. Avcı Akar *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) Popülasyonlarının Milbemectin'e Karşı Direnç Düzeyleri, Sinerjistleri ve Detoksifikasyon Enzimlerinin Belirlenmesi-Tarım Bilimleri Dergisi – Journal of Agricultural Sciences 19(2013), 207-218

Yu S. J., (2008). The Toxicology and Biochemistry of Insecticides. CRC Press. 276, New York.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet Ali İNANICI

Doğum Yeri ve Yılı : Yalvaç, 1992

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : mehmetali_283@hotmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Yalvaç Atatürk Lisesi, 2010

Lisans : SDÜ, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 2014

Yayınları

Balcı, M. H., İnanıcı, M. A., Ay, R., 2016. Bazı Pestisitlere *Tetranychus urticae* ve Avcı Akar *Phytoseiulus persimilis*'in Tepkileri. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi, Bildiri Kitabı sayfa: 284, 5-8 Eylül 2016, KONYA.