

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Tetranychus urticae KOCH (ACARI:TETRANYCHIDAE)'DE
SPIRODICLOFEN DİRENCİ VE ENDOSİMBİYONT
WOLBACHIA ARASINDAKİ İLİŞKİ

Betül BAL

Danışman
Prof. Dr. Sibel YORULMAZ

ISPARTA - 2022



© 2022 [Betül BAL]

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM	8
3.1. <i>Tetranychus urticae</i> Orjini ve Yetiştirilmesi	8
3.2. <i>Tetranychus urticae</i> 'de Endosimbiyontların Moleküler Olarak Belirlenmesi.....	8
3.3. Akarisit.....	10
3.4. Antibiyotik Uygulaması	10
3.5. Spiroclufen Seleksiyonu	11
3.6. Seleksiyon Popülasyonlarında <i>Wolbachia</i> Endosimbiyontunun Moleküler Yöntemle Belirlenmesi	13
3.7. Esteraz, Glutathion S-transferaz (GST) ve P450 Monoksigenaz Enzim Aktiviteleri	13
4. BULGULAR.....	16
4.1. <i>Tetranychus urticae</i> 'de Endosimbiyontların Moleküler Olarak Belirlenmesi....	16
4.2. Seleksiyon Sonuçları	16
4.3. Seleksiyon Popülasyonlarında <i>Wolbachia</i> Endosimbiyontunun Moleküler Yöntemle Belirlenmesi	19
4.4. Esteraz, Glutathion S-transferaz (GST) ve P450 Monoksigenaz Enzim Aktiviteleri	22
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	26
KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	36

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Tetranychus urticae* KOCH (ACARI:TETRANYCHIDAE)'DE SPIRODICLOFEN DİRENCİ VE ENDOSİMBİYONT *WOLBACHIA* ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Betül BAL

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sibel YORULMAZ

İki noktalı kırmızıörümcek, *Tetranychus urticae* Koch (Acari:Tetranychidae) dünyada birçok kültür bitkisi çeşidinde ekonomik kayıplara neden olan önemli bir zararlıdır. *T. urticae*'nin mücadelesinde, uygulamasının kolay olması ve kısa sürede etki göstermesi nedeniyle kimyasal mücadele ilk sırada tercih edilmektedir. Ancak *T. urticae*'nin fitofag yapısı, üreme potansiyelinin yüksek ve yaşam döngüsünün kısa olması gibi faktörler birkaç uygulamadan sonra akarisitlere direnç geliştirmesini kolaylaştırmaktadır. Endosimbiyont *Wolbachia* akarlarında içinde bulunduğu birçok zararlıda bulunmaktadır. Zararlıda insektisit direnci ile endosimbiyont arasındaki etkileşimlerin altında yatan mekanizma, hala net olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada *T. urticae*'de gelişen spirodiclofen direnci ile *Wolbachia* varlığı arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle *T. urticae*'nin *Wolbachia* enfekteli ve enfektesiz iki popülasyonunda eş zamanlı olarak spirodiclofen seleksiyonu yapılmıştır. *T. urticae*'de LC değerlerinin belirlenmesi amacıyla kuru rezidü yöntemi kullanılmıştır. Bioassay denemeler 7 doz +1 kontrol olacak şekilde ve 3 tekerrürlü olarak kurulmuş ve bu işlem için akarinen hassas dönemi olan larva dönemi kullanılmıştır. Ölü-canlı sayımları 7. günün sonunda yapılmış ve direnç oranları belirlenmiştir. *T. urticae*'nin *Wolbachia* enfekteli en son seleksiyonunda 23 kat, *Wolbachia* enfektesiz son seleksiyonunda ise 103 kat spirodiclofen direnci belirlenmiştir. Her iki seleksiyon popülasyonunda *Wolbachia* varlığı ve frekans yoğunluğu kontrol edilmiştir. Ayrıca akarda spirodiclofen direncinin detoksifikasyon enzimleri ile olan ilişkisi de incelenmiştir. Sonuç olarak, *Tetranychus urticae*'de spirodiclofen direnci ve endosimbiyont *Wolbachia* arasında negatif bir ilişki olabileceği, bu ilişki kapsamında direnç gelişimi üzerinde de esteraz enziminin etkisinin bulunabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Tetranychus urticae*, *Wolbachia*, Spirodiclofen, Direnç, Enzim

2022, 36 sayfa

ABSTRACT

Master's Thesis

THE RELATIONSHIP BETWEEN SPIRODICLOFEN RESISTANCE AND WOLBACHIA ENDOSYMBIONT IN *Tetranychus urticae* KOCH (ACARI:TETRANYCHIDAE)

Betül BAL

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

Supervisor: Prof. Dr. Sibel YORULMAZ

Tetranychus urticae Koch (Acari:Tetranychidae) is an important pest that causes economic losses in many varieties of cultivated plants in the world. In the fight against *T. urticae*, insecticides and acaricides are effectively used. But *T. urticae* are able to rapidly develop resistance to chemicals due to some of their biological properties. It is an endosymbiont species found in many pests in *Wolbachia* mites. In pests, the mechanism underlying the interactions between insecticide resistance and endosymbiont is still not decisively understood. In this study, it was aimed to determine the relationship between spiroadiclofen resistance in *T. urticae* and the presence of *Wolbachia*. Therefore, simultaneous selection of spiroadiclofen was performed in both *Wolbachia* infected (GSS) and uninfected (GSSN) populations of *T. urticae*. Dry residue method was used to determine LC values in *T. urticae*. Bioassay experiments were applied to the larval stage of the mite. LC studies were established as 7 doses +1 control and 3 replications. Dead-alive counts were made at the end of the 7th day and resistance rates were determined. In the last selection of *T. urticae* with *Wolbachia* infection, 23-fold spiroadiclofen resistance was determined, and in the last selection without *Wolbachia* infection, 103-fold resistance was determined. The presence of *Wolbachia* and frequency density were checked in both selection populations. The presence of *Wolbachia* was found to be quite low in all *Wolbachia*-infected selection populations compared to *Wolbachia*-infected populations. In addition, the relationship between spiroadiclofen resistance and detoxification enzymes in mites was also investigated. As a result, it is thought that there may be a negative relationship between spiroadiclofen resistance and *Wolbachia* endosymbiont in *T. urticae*, and that esterase enzyme may have an effect on the development of resistance within the scope of this relationship.

Key Words: *Tetranychus urticae*, *Wolbachia*, Spiroadiclofen, Resistance, Enzyme

2022, 36 pages

TEŞEKKÜR

Tezimin yürütülmesinde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sibel YORULMAZ'a,

Tez çalışmamın savunma sınavında bana verdikleri emek için sınav jürileri Sayın Prof. Dr. İbrahim ÇAKMAK ve Prof. Dr. İsmail KARACA'ya teşekkür ederim.

1200959 nolu Hızlı Destek Programı ile çalışmayı maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK-TOVAG)'a teşekkür ederiz. Tez çalışması sırasında moleküler analaizler konusunda yardımlarını esirgemeyen Dr. Emre İNAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam Adem BAL, annem Şule BAL ve abim Muammer BAL'a teşekkür eder, sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Betül BAL
ISPARTA, 2022

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Fasulye bitkisi üzerinde <i>Tetranychus urticae</i> popülasyonunun üretilmesi	8
Şekil 3.2. Antibiyotik uygulaması.....	11
Şekil 3.3. İlaçlama kulesi	12
Şekil 3.4. Seleksiyon denemeleri	13
Şekil 4.1. <i>Tetranychus urticae</i> 'nin GSS popülasyonunda endosimbiont varlıkları..	16
Şekil 4.2. Antibiyotiksiz GSS ve seleksiyon popülasyonlarındaki <i>Wolbachia</i> jel görüntüleri	20
Şekil 4.3. Antibiyotikli GSSN ve seleksiyon popülasyonlarındaki <i>Wolbachia</i> jel görüntüleri	20
Şekil 4.4. Antibiyotikli ve antibiyotiksiz popülasyonlardan elde edilen <i>Wolbachia</i> aminoasit dizilimlerinin karşılaştırılması	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 4.1. <i>Tetranychus urticae</i> 'nin <i>Wolbachia</i> enfekteli GSS ve seleksiyon popülasyonlarında spirodiclofene karşı belirlenen LC, df, x^2 değerleri ve direnç oranları	17
Çizelge 4.2. <i>Tetranychus urticae</i> 'nin <i>Wolbachia</i> enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında spirodiclofene karşı belirlenen LC, df, x^2 değerleri ve direnç oranları	18
Çizelge 4.3. Spirodiclofen seleksiyon popülasyonlarında <i>Wolbachia</i> frekansı değişimi.....	19
Çizelge 4.4. <i>Tetranychus urticae</i> 'nin <i>Wolbachia</i> enfekteli GSS, <i>Wolbachia</i> enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında esterase enzim aktiviteleri	23
Çizelge 4.5. <i>Tetranychus urticae</i> 'nin <i>Wolbachia</i> enfekteli GSS, <i>Wolbachia</i> enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında GST enzim aktiviteleri	24
Çizelge 4.6. <i>Tetranychus urticae</i> 'nin <i>Wolbachia</i> enfekteli GSS, <i>Wolbachia</i> enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında P450 monooksijenaz enzim aktiviteleri	25

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

cm	Santimetre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Evolutions Per Minute
w/v	Hacimde Ağırlıkça Yüzde
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece



1. GİRİŞ

İki noktalı kırmızıörümcek, *Tetranychus urticae* Koch (*Acari:Tetranychidae*) dünyada birçok kültür bitkisi çeşidinde ekonomik kayıplara neden olan önemli bir zararlıdır (Helle ve Sabelis, 1985). *T. urticae*'nin dünyada 150'den fazlası ekonomik öneme sahip, yaklaşık 1200 bitkide zarar yaptığı belirlenmiştir (Zhang, 2003). İki noktalı kırmızıörümcek bitki özsuğunu sokup emme suretiyle yapraklarda sararma, kuruma ve dökülmeyle doğrudan zarar yaparken, fotosentezin azalması ve virüs hastalıklarının nakliyle de dolaylı zarar meydana getirmektedir (Jeppson vd., 1975). *T. urticae*'nin mücadelesinde, uygulamasının kolay olması ve kısa sürede etki göstermesi nedeniyle kimyasal mücadele ilk sırada tercih edilmektedir (Van Leeuwen vd., 2005). Zararının mücadelesinde akarisit kullanımı oldukça yaygın olup, 2013 yılında dünya akarisit pazar değerinin 900 milyon Euro olduğu bildirilmiştir (Van Leeuwen vd., 2015). Ancak *T. urticae*'nin fitofag yapısı, üreme potansiyelinin yüksek ve yaşam döngüsünün kısa olması gibi faktörler birkaç uygulamadan sonra akarisitlere direnç geliştirmesini kolaylaştırmaktadır (Stumpf ve Nauen, 2001; Van Leeuwen vd., 2006). *T. urticae*'nin dünyada 60 ülkede 80'den fazla akarSITE karşı direnç geliştirdiği belirlenmiştir (Miresmailli vd., 2006). Özellikle *T. urticae* dünya genelinde en fazla aktif maddeye karşı direnç geliştirilen tür olarak bilinmekte (Van Leeuwen vd., 2010) ve “direnç şampiyonu” olarak tanımlanmaktadır (Dermauw vd., 2013).

Simbiyozis ilk olarak 1877 yılında Albert Frank tarafından “iki farklı türden birinin diğesinde bulunması veya içinde yaşaması” olarak tanımlanmış, daha sonra 1879'da Anten de Bary simbiyozu “farklı iki organizmanın birlikte yaşaması” şeklinde tanımlayarak, literatüre girmesini sağlamıştır (Sapp, 1994). Böcek türlerinin yaklaşık %10-20'si canlılığını sürdürmek ve üreyebilmek için obligat bakterilere bağımlıdır (Douglas, 1989). Böceklerde bulunan simbiyontlar konukçularına çeşitli avantajlar sağlayabilmektedir. Bu avantajlar arasında besin takviyesi, çevresel olumsuzluklara tolerans, konukçu-bitki uyumunu sağlamak, böceklerde bağışıklık sistemini güçlendirmek sayılabilmektedir (Oliver vd., 2010; Weiss ve Aksoy, 2011). Böceklerde oldukça yaygın olan simbiyotik bakteriler konukçularında çok değişik etkiler göstermektedir. Evrimsel sürece bağlı olarak konukçu simbiyont ilişkileri obligat ya da fakültatif olabilmektedir. Obligat olan primer simbiyontlar bitki

özsuyunda bulunmayan temel aminoasitleri, vitaminleri ve faydalı pek çok bileşiği konukçusu olan böceklerle sağlamaktadır. Besin sağlamalarının yanı sıra simbiyontların beslenmeyle ilgili bileşiklerin hatta insektisitlerin detoksifikasyonundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bazı böceklerde doğal düşmanlara karşı gösterilen farklı savunma reaksiyonları fakültatif olan sekonder simbiyontlar ile ilişkilendirilirken bazı simbiyontların sıcaklığa karşı tolerans gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca bazı endosimbiyontlar vektör böceklerin virüs taşıma yeteneklerini de etkileyebilmektedir (Güz vd., 2015). Sekonder simbiyontlar (S-simbiyont); obligat simbiyontların aksine konukçusunun hayatını devam ettirmesi için gerekli değildir. Sekonder simbiyotik ilişkisi fakültatif bir ilişki olup konukçu açısından faydalı ya da zararlı olabilir (Buchner, 1965; Baumann, 2005; Harris vd., 2010). S-simbiyontlar konukçu vücudunda dağınık olarak ya da spesifik dokulara özelleşmiş halde bulunabilirler (Brumin vd., 2012). Bu simbiyontlar deneysel olarak enfekte olmamış konukçulara aktarılarak bu konukçulara yerleşmeleri sağlanabilir. S-simbiyontlar genellikle anneden yavruya aktarılırlar. Bu özellikleri simbiyotik bakterilerin böceklerle mücadelede kullanılmasını kolaylaştırır (Güz vd., 2015).

Wolbachia ilk kez 1924 yılında Herting ve Wolbachia tarafından sivrisineğin üreme dokularında saptanmıştır. Bunun ilk tanımlanması aynı sinek türünde 1936 yılında *Wolbachia pipientis* olarak Herting tarafından yapılmıştır (Hertig ve Wolbach, 1924; Lo vd., 2007). Bu bakteri obligat, hücre içi organizma olup, bazı artropod ve nematodlarda kütikula altında hipodermis hücrelerin içinde buna ilaveten dişilerde ovaryum, ookist ve uterustaki embriyonik gelişim devrelerinde bulunur (Werren, 1997; Cordaux, 2001). Bu durum bakterinin vertikal olarak taşınabildiğini de göstermektedir (Werren, 1997). Kokoid veya basilliform şeklinde olan bu bakteri, çift membranlı, ribozomal granüllü ve ortalama 0.8-1.3 µm uzunluğunda olup dünya genelinde çok yaygındır. Yapılan araştırmalarda 63 artropod türünden (Aracnida 2, Insecta 61) 48'inde (%76), 20 nematod türünün 18'inde (%90) *Wolbachia* tespit edilmiştir (Stouthamer, 1999; Sinkins, 2000). *Wolbachia* böcek türlerinin en az %20'sini (Werren vd., 1995; Jeyaprakash ve Hoy, 2000; Bordestein vd., 2003), nematodların ise neredeyse tamamını enfekte eder (Bandi vd., 2001). Akarlar ve *Wolbachia* endosimbiyontu arasındaki ilişki hala net olarak bilinmemesine rağmen, Tetranychidae familyası içerisinde yer alan bazı fitogaf akar türlerinde *Wolbachia* varlığı çalışmalarda bildirilmiştir (Vala vd., 2002; Gotoh vd., 2003; Zang vd., 2013;

Zeleva vd., 2018; Pina vd., 2020). *Wolbachia*, *ftsZ* (hücre bölünmesi geni), *groEL* (bakteriyel ısı şok proteini), *gltA* (sitratsentaz) ve *dnaA* gen sekanslarına bağlı olarak A'dan H'ye kadar altı gruba ayrılmıştır. *Wolbachia*'nın A ve B genotipleri artropodların büyük bir kısmını, C ve D genotipleri nematodları, E genotipi springtailleri (Sıçrarkuyruklular), F genotipi bazı artropod ve nematodları, G genotipi örümcekleri ve H genotipi de termitleri enfekte etmektedir (Stouthamer, 1999; Lo vd., 2007; Merçot ve Poinot, 2009). *Wolbachia* hem canlı parazitlerden hem de parazitlerin doğal ölümü, mikrofilarial yıkımlanma ve farmakolojik müdahale sonrası ölen parazitlerden salınmaktadır (Taylor vd., 2001). Bireyler arasındaki *Wolbachia* yatay olarak geçebilir. Bunun bir yolu da avcılıktır. Böcek türlerinin %52'sinin *Wolbachia* ile enfekte olmasına rağmen, çoğu türün enfeksiyon sıklığının %50'nin çok altında olduğu gösterilmektedir (Sazama vd., 2019). Arthropodların %80'ine yakın bir kısmında rastlanan *Wolbachia*; konukçusunda sitoplazmik uyumsuzluk, erkek bireylerin ölümü, dişileşme (feminizasyon) ve partenogenik bireylerde telytokinin artışı gibi bir takım üreme değişimlerine yol açmaktadır (Breeuwer vd., 1992; Stouthamer vd., 1999). Akarlarda ise sitoplazmik uyumsuzluk şimdiye kadar sadece *Wolbachia* için kanıtlanmıştır (Perotti, 2004). *Wolbachia*'nın saptandığı böcek takımları Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera, Lepidoptera ve Orthoptera olarak belirtilmiştir (Dedeine vd., 2001). Bakteriyel endosimbiontların böceklerde beslenmenin iyileştirmesi (Zientz vd., 2004), termal tolerans (Dunbar vd., 2007) veya artmış patojen/parazitoit direnci (Kaltenpoth, 2009) gibi çeşitli sağlık avantajları sağladığı da gösterilmiştir. Özellikle tarımsal ürünlerde zararlı olan böceklerin ve diğer arthropodların endosimbiontlar ile kurdukları ilişkinin tam olarak aydınlatılması büyük önem arz etmektedir. Çünkü zararlılar ile mücadelede yeni, çevreye duyarlı ve daha etkili yöntemler gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda aynı tür böceğin farklı bölge ve/veya ülke popülasyonlarında, endosimbiont kompozisyonu farklılaşmaktadır. Aynı tür böceğin farklı bölge ve/veya ülke popülasyonlarında, endosimbiont kompozisyonun farklılaştığı da bilinmektedir. Özellikle sekonder endosimbiont olan bakterilerin bu önemli özelliklerinden faydalanarak yeni, çevreye duyarlı ve daha etkili zararlı mücadelesi yapılabilir.

Zararlılarda insektisit direnci ile endosimbiont arasındaki etkileşimlerin altında yatan mekanizma, hala net olarak anlaşılamamıştır. Simbiyontların detoksifikasyon yetenekleri ve hızlı evrim süreçleri göz önüne alındığında konukçularında oluşan

insektisit direncine katkı sağlayabilecekleri düşünülmektedir (Su vd., 2013). Endosimbiyontların konukçu durumunu modüle etmede, toksik bileşikler detoksifiye etmede ve konukçularının gen ifadesini değiştirmede rollerinin önemli olabileceği tahmin edilmektedir. Aromatik ester hidrolaz, glukozidaz, fosfataz ve glutasyon transferaz gibi detoksifiye edici enzimlerin endosimbiyontlar tarafından aktive edilebileceği ve bunun da zararlıda gelişen insektisit direncinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Örneğin, *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae)'de *Burkholderia* simbiyotik bakterisinin organofosforlu pesitisitlere karşı koruma sağladığı tespit edilmiştir (Kikuchi vd., 2012). Başka bir çalışmada, *Bacillus thuringiensis*'in *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvalarını simbiyont *Enterobacter* sp. olmadan öldüremediği bildirilmiştir (Broderick vd., 2006). İnsektisit direnci ile simbiyontlar arasındaki etkileşimler hakkında bilinmeyen pek çok şey olmasına rağmen, fakültatif endosimbiyontların zararlılarda insektisit direncinde koşullu değişikliklere yol açabileceği çalışmalarda bildirilmiştir. Endosimbiyontlar ve zararlıda gelişen insektisit direnci arasında pozitif, negatif veya nötr etki olabileceği ve bu durumun da araştırılmaya değer olduğu düşünülmektedir. Özellikle Tetranychidae familyasında varlığı tespit edilen *Wolbachia* endosimbiyontunun kimyasallara karşı hızlı direnç geliştirme yeteneğine sahip olan *T. urticae* üzerindeki etkisinin bilinmesi zararlının mücadelesinde yeni yaklaşımların geliştirilebilmesi açısından son derece önemlidir. Bu nedenle, çalışmada *T. urticae*'de spirodiclofen direnci ve *Wolbachia* endosimbiyontu arasındaki olası pozitif, negatif veya nötr etki ilişkisi araştırılmıştır. *T. urticae*'nin *Wolbachia* enfekteli ve enfektesiz iki popülasyonunda spirodiclofen direnç gelişimi belirlenmiştir. Her iki popülasyonda da spirodiclofen direnci ile *Wolbachia* endosimbiyont varlığı, yoğunluğu ve bazı detoksifikasyon enzim miktarları arasındaki ilişki incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Vala vd. (2002), *T. urticae*'de *Wolbachia*'nın ömür uzunluğunu etkilemediğini, hayatta kalma eğrilerinde bir değişikliğe neden olduğunu belirlemişlerdir.

Gotoh vd. (2003), Japonya'daki 42 Tetranychidae türünün yedisinin (%16.7) *Wolbachia* ile enfekte olduğunu belirlemişlerdir.

Ghanim ve Kontsedalov (2009), *Rickettsia* ile enfekteli *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) popülasyonunun enfekte olmayan beyazsinek popülasyonuna göre tiametoksam, imidacloprid, acetamiprid, piriproksifen ve spiromesifene daha fazla direnç geliştirdiğini bildirmişlerdir.

Kikuchi vd. (2012), *Riptortus pedestris*'e (Hemiptera:Alydidae) ait *Burkholderia* simbiyotik bakterisinin organofosforlu pestisitlere karşı direnç gelişiminde etkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Zang vd. (2013), Çin'de *Tetranychus* türlerinde (*Tetranychus truncatus*, *Tetranychus urticae*, *Tetranychus pueraricola* ve *Tetranychus phaselus*) *Wolbachia* endosimbiyontunu incelemişlerdir. Tüm *Tetranychus* türlerinin *Wolbachia* ile enfekteli olduğu belirlenmiştir.

Zélé vd. (2018), Tetranychidae familyasında en yaygın endosimbiyont kombinasyonunun *Wolbachia* ve *Cardinium* olabileceğini bildirmişlerdir.

Pina vd. (2020), *T. truncatus*'da *Wolbachia* ve *Cardinium* veya *Spiroplasma* ve *Rickettsia* kombinasyonlarını gösterdiğini, *T. evansi*, *T. ludeni* ve *T. urticae*'nin ise sadece *Wolbachia* ve *Cardinium* kombinasyonlarını gösterdiğini bildirmişlerdir.

Xie vd. (2011), *Tetranychus urticae*'de *Wolbachia* ile enfekteli olmayan dişilere kıyasla, enfekteli olan dişilerin artan doğurganlık gösterdiğini bildirmiştir.

Breeuwer (1996), *Wolbachia*'nın, *Tetranychus urticae* ve *T. turkestanii*'de enfekteli ve enfekteli olmayan bireyler arasındaki çaprazlamalarda sitoplazmik uyumsuzluğu ortaya çıkardığını bildirmiştir.

Koçak vd. (2019), *Sitophilus oryzae* populasyonları toplam 12 lokasyondan toplanmış ve moleküler yöntemler ile *Wolbachia* varlığı araştırılmıştır. Zararlı için toplanan 120 örnekten 118 (%98.33)'inde *Wolbachia* tespit edilmiştir.

Karaman vd. (2020), *Eurygaster integriceps* populasyonları toplam 15 ilden (Adıyaman, Ağrı, Bingöl, Bursa, Çanakkale, Diyarbakır, Edirne, Kahramanmaraş, Kırklareli, İçel, Sakarya, Siirt, Şırnak ve Tunceli) toplam 150 adet erkek süne bireyi toplanmıştır. *Wolbachia* bulunma oranının bölgeler düzeyinde %85-98 düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, *Wolbachia*'nın *E. integriceps* türünde yaygın olarak (%94.6) bulunduğu görülmüştür.

Liu vd. (2019), *Wolbachia*'nın *Bemisia tabaci*'de acetamiprid ve spiromesifen direncini artırdığını, ancak diafenthiurona olan direncini artırmadığını tespit etmişlerdir.

Vala vd. (2004), *Tetranychus urticae*'de *Wolbachia* simbiyontu ile enfekte olmayan dişiler tercihen enfekte olmamış erkeklerle çiftleşirken, enfekte dişilerin yavrularını bir araya getirerek kardeş çiftleşmesini teşvik ettiğini belirlemişlerdir.

Ünal vd. (2019), Adana, Konya, İzmir, Samsun ve İstanbul illerindeki hububat depolarından 10 adet *C. ferrugineus* populasyonu toplanmışlardır. Toplam 10 populasyondan üçünde *Wolbachia*, altısında *Rickettsia* ve bir populasyonda ise *Spiroplasma* belirlenmiştir. Türkiye genelinde 10 populasyondan yedisinin (%70) bir endosimbiyontla bulaşık olduğu görülmüştür.

Koçak vd. (2019), *Oryzaephilus surinamensis* L. populasyonunda endosimbiyont ile Türkiye genelinde %49 oranında bir bulaşma yoğunluğu olduğu; bu oranın ise %28'i *Wolbachia*, %14'ü *Rickettsia* ve %7'sinin *Spiroplasma*'ya ait olduğu saptanmıştır.

Yaman vd. (2019), *Sitophilus oryzae* (L.) popülasyonlarında *Rickettsia* endosimbiontunun enfeksiyon yüzdesinin %55.5 olduğu belirlenmiştir. *Wolbachia*'nın enfeksiyon yüzdesinin %22.2 ve *Spiroplasma*'nın ise enfeksiyon yüzdesinin %8.3 olarak olduğu belirlenmiştir.

Li vd. (2018), *Laodelphax striatellus*'de buprofezene duyarlı populasyon ve dirençli popülasyondaki endosimbiontların türlerini ve enfeksiyon oranı incelemişlerdir. *Wolbachia* enfeksiyon oranlarının hem dirençli popülasyonda hem de duyarlı popülasyonda %100 olduğunu, ancak dirençli popülasyondaki *Wolbachia* yoğunluğunun duyarlı popülasyonunkinden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *Tetranychus urticae* Orjini ve Yetiştirilmesi

Çalışmada 2001 yılından itibaren herhangi bir pestisite maruz kalmadan iklim odasında üretimi yapılan *T. urticae*'nin hassas (GSS) popülasyonu kullanılmıştır. GSS popülasyonunda yapılan ön çalışmalar sonucunda *Wolbachia* endosimbiyontu ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. GSS popülasyonuna antibiyotik uygulanması sonucunda elde edilen *Wolbachia* enfektesiz popülasyon ise GSSN olarak adlandırılmıştır. GSS ve GSSN popülasyonları spiroadiclofen seleksiyonları için başlangıç popülasyonları olarak kullanılmıştır. *T. urticae* popülasyonlarının üretimi $26\pm2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, $\%60\pm5$ orantılı nem ve 16 saat aydınlatma koşulları sağlanan iklim odalarında ve fasulye (*Phaseolus vulgaris* L. var. Barbunia) bitkisi üzerinde yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Fasulye bitkisi üzerinde *Tetranychus urticae* popülasyonunun üretilmesi

3.2. *Tetranychus urticae*'de Endosimbiyontların Moleküler Olarak Belirlenmesi

T. urticae'nin GSS popülasyonunda endosimbiyont varlıklarını belirlemek için 50 adet dişi ergin akardan toplu bir şekilde DNA izolasyonu yapılmıştır. Endosimbiyont frekansını belirlemek için ise DNA, akarlardan bireysel olarak izole edilmiştir. Frekans belirlemek için 10-20 akar kullanılmıştır. Total DNA izolasyonu QiagenDNeasy Blood & Tissue Kit ile firmanın talimatlarına uyularak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, yaklaşık 50 adet ergin dişi akar (bireysel izolasyon için

tek akar) 1.5 ml'lik tüpe aktarılmıştır. Ardından üzerine 180 µl Buffer ATL ve 20 µl Proteinaz K eklenip önceden otoklavlanmış plastik eziciler ile ezilmiştir. Daha sonra tüpler gece boyunca 56°C'de inkübe edilmiştir. Tüplere, 200 µl Buffer AL ve 200 µl %96-100'lük ethanol eklenmiştir. Bütün aşamalarında arasında örnekler vortekslenmiştir. Elde edilen tüm sıvı, kit içerisinde hazır halde DNeasy Mini spincolumn isimli filtreli tüplere aktarılmış ve 8000 rpm'de 1 dakika süresince santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası filtreden alta geçen sıvı atılmıştır. Sonrasında, örnekler sırasıyla 500 µl Buffer AW1 (yıkama sonrası 8000 rpm'de 1 dakikasanztrifüj) ve 500 µl Buffer AW2 (yıkama sonrası 13 000 rpm'de 3 dakika santrifüj) sıvıları ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında DNeasy Mini spincolumn filtresi, 2ml'lik steril tüplere yerleştirilmiş, 100-200 µl elüsyon sıvısı (tek akar için 50 µl) ile yıkanmış, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve DNA elde edilmiştir. PCR çalışmaları için kullanmak üzere elde edilen DNA'ların kalitesi spektrofotometre aracılığıyla belirlenmiştir.

Wolbachia, *Cardinium*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* Tetranychidae familyasında belirlenmiş endosimbiyontlardır (Zeleva vd., 2018). Bu nedenle GSS popülasyonunda bu endosimbiyotların varlığı kontrol edilmiştir. Endosimbiyont bakterilerin varlığını saptamak amacıyla aşağıdaki primerler kullanılmıştır;

<i>Wolbachia</i> wsp-F TGGTCCAATAAGTGATGAAGAACTAGCTA AAAAATTAAACGCTACTCCAGCTTCTGCAC	(Jeyaprakash ve Hoy, 2000)
<i>Cardinium</i> CLO_F1_16S GGA ACC TTA CCT GGG CTA GAA TGT ATT CLO_R1_16S GCC ACT GTC TTC AAG CTC TAC CAA C	(Pina vd., 2020)
<i>Rickettsia</i> Rb_F GCT CAG AAC GAA CGC TAT C Rb_R GAA GGA AAG CAT CTC TGC	(Pina vd., 2020)
<i>Spiroplasma</i> Spoul-F GCT TAA CTC CAG TTC GCC Spoul-R CCT GTC AAT GTT AAC CTC	(Pina vd., 2020)

PCR reaksiyonu için toplu izole edilen akarlardan 2 µl DNA kullanılıp 35 döngü gerçekleştirilirken, tek akardan izole edilen DNA'dan ise 5 µl DNA kullanılmış ve 40 PCR döngüsü gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu için SolisDyne PCR MasterMix kullanılmıştır. Bu mix içerisinde dNTP, MgCl₂ gibi PCR için gerekli olan diğer bileşenleri bulundurmaktadır. PCR reaksiyonları yukarıda belirtilen referans

Çalışmalardaki gibi yapılmıştır. Yapılan ön denemeler sonrası referans yayınlardaki reaksiyonlar, çalışmada kullanılacak mastermix ile uyumlu bir şekilde çalışmıştır.

PCR reaksiyonu sonrası, endosimbiyont varlığını tespit etmek amacıyla %2'lik (TAE buffer kullanarak) jel hazırlanmış ve 45-60 dakika süresiyle elektroforezde koşturulmuştur. Son olarak jel UV ışık altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır. Tespit edilen bantlar bireysel dişi akarlarda endosimbiyont varlığını göstermiştir.

3.3. Akarisit

Çalışmada IRAC etki mekanizması listesinde 23. grupta yer alan Spirodiclofen etken maddeli ticari bir preparat (ENVIDOR 240 SC) kullanılmıştır. Spirodiclofen tetronikasit türevleri içerisinde bulunan selektif, sistemik olmayan son dönemde yaygın olarak kullanılan bir akarisit (Van Pottelberge vd., 2009). Bu akarisit zararlılarda lipid biyosentezini engelleyerek ve karboksilesteraz enzim aktivitesini inhibe ederek etki göstermektedir (Bretschneider vd., 2007).

3.4. Antibiyotik Uygulaması

Wolbachia, *Cardinium*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* Tetranychidae familyasında belirlenmiş endosimbiyontlardır (Zeleva vd., 2018). Bu nedenle GSS popülasyonunda bu endosimbiyotların varlığı kontrol edilmiştir. Yapılan ön çalışmalarda GSS popülasyonunun bu dört endosimbiyonttan yalnızca *Wolbachia* endosimbiyontu ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Çalışmada *Wolbachia* endosimbiyontu bulunmayan *T. urticae* popülasyonunu elde etmek amacıyla Tetrasiklin antibiyotiğı GSS popülasyonuna uygulanmıştır. 9 cm petri kaplarına %0.05 (w/v) antibiyotikle ıslatılmış pamuklar yerleştirilmiştir. Pamuk üzerine fasulye yaprak diskleri konmuştur. 24 saat sonra aynı yaştaki 50 adet *T. urticae* yumurtası fasulye yaprak diskleri üzerine aktarılmıştır (Şekil 3.2). Petri içerisindeki pamuk antibiyotiğın pamuğa geçişinin devam edebilmesi amacıyla hergün ıslatılmıştır. Daha sonra yumurtadan yeni çıkan larvalar yaprak yeni yaprak diskler üzerine yerleştirilmiş ve pamuğu ıslak tutmak için her gün saf su eklenmiştir. Böylece akarlar bir nesil boyunca antibiyotik altında yetiştirilmiştir (Gotoh vd., 1995). 3 gün ara ile pamuk ve üzerindeki yaprak diskler yenilenmiştir. Antibiyotiğın ışık ile teması geçmesini

engellemek amacıyla petriler ışısız ortamda tutulmuştur. Petri içerisindeki larvalar ergin hale ulaştıktan sonra antibiyotik bulunmayan pamuk ve yaprak diskler üzerine alınmıştır. Yaklaşık bir ay sonra (en az 3 generasyon geçtikten sonra) bu popülasyonun *Wolbachia* ile enfekteli olup olmadığı PCR çalışmaları ile belirlenmiştir. Antibiyotik uygulaması sonucunda *T. urticae*'nin GSS popülasyonunda *Wolbachia* endosimbiyontu ile enfektesiz olan bir popülasyon elde edilmiştir. Bu popülasyona GSSN popülasyonu adı verilmiştir. Böylece *T. urticae*'de *Wolbachia* enfekteli ve *Wolbachia* enfektesiz iki popülasyonu ile eş zamanlı olarak spirodiclofen seleksiyonuna başlanmıştır.



Şekil 3.2. Antibiyotik uygulaması

3.5. Spirodiclofen Seleksiyonu

Tetranychus urticae'nin *Wolbachia* enfeksiyonlu (GSS) ve *Wolbachia* enfeksiyonsuz (GSSN) iki popülasyonu spirodiclofen seleksiyonları için başlangıç popülasyonları olarak kullanılmıştır. Seleksiyon işlemleri için öncelikle her iki akar popülasyonundada spirodiclofen için LC₅₀ belirlenmiştir. Her iki akar popülasyonu için de tüm LC₅₀ denemelerinde *T. urticae*'nin larva dönemine spirodiclofen uygulamaları yapılmıştır. Denemeler 1 kontrol+7 doz, her doz için 3 tekerrür olacak şekilde kurulmuştur. Spirodiclofen uygulama dozu belirlenirken ilk dozda %90'dan az kontrol grubunda ise %10'dan fazla ölüm olmaması dikkate alınmıştır. Her tekerrür için petri içerisine 25 adet akar larvası eklenmiştir. Her doz için %50 seyreltilerek hazırlanan spirodiclofen konsantrasyonları ile petriler ilaçlama kulesi

yardımıyla yaprak yüzeyine 1 bar basınçta 2 mL ilaç gelecek şekilde ilaçlama yapılmıştır (Şekil 3.3). Ölü-canlı sayımları 7. gün sonunda yapılarak LC₅₀ ve LC₆₀ değerleri belirlenmiştir. Her iki akar popülasyonu için seleksiyon dozu olarak spirodiclofen için belirlenen LC₆₀ değerleri kullanılmıştır. LC₅₀ değeri ise seleksiyon popülasyonlarında spirodiclofen direnç katlarının belirlenebilmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla seleksiyon popülasyonlarının belirlenen LC₅₀ değerleri başlangıç popülasyonlarının belirlenen LC₅₀ değerlerine oranlanması ile spirodiclofen direnç katları belirlenmiştir. Seleksiyon işlemi için 9 cm. çapındaki petriler içerisinde bulunan yaprak diskleri üzerine 50 adet akar larvası aktarılmıştır (Şekil 3.4). Seleksiyon işlemi 15 tekrerrür olarak yürütülmüştür. LC₆₀ dozu petrilere ilaçlama kulesinde 1 bar basınç altında yaprak üzerine 2 mL olacak şekilde uygulanmıştır. Petriler 26±1°C sıcaklıkta %60-65 nem ve 16:8 (A/K) fotoperiyot koşullarında 7 gün bırakılmıştır. Uygulamadan 7 gün sonra canlı kalan bireyler temiz bitki üzerine aktarılmıştır. LC₆₀ dozu her seleksiyon popülasyonu için yeniden belirlenerek popülasyonlar seleksiyon baskısına maruz bırakılarak direnç kazandırılmıştır. Spirodiclofen seleksiyonları iki *T. urticae* popülasyonu için eş zamanlı olarak yürütülmüştür. *T. urticae*'nin GSS ve GSSN popülasyonlarında seleksiyon çalışmaları 10. seleksiyona kadar devam ettirilmiştir.



Şekil 3.3. İlaçlama kulesi



Şekil 3.4. Seleksiyon denemeleri

3.6. Seleksiyon Popülasyonlarında *Wolbachia* Endosimbiyontunun Moleküler Yöntemle Belirlenmesi

T. urticae'nin GSS ve GSSN popülasyonlarında spirodiclofen ile seleksiyon gerçekleştirilirken iki seleksiyon aralıklı *Wolbachia* varlığı ve frekansı belirlenmiştir. DNA izolasyonu ve frekans belirlenmesi 3.2 kısmında bahsedildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle toplu akardan bakteri varlığı belirlenmiş, tespit edilmesi durumunda 10-20 ergin dişi akar kullanılarak frekans belirlenmiştir. Böylece *T. urticae*'de spirodiclofen direnç artışı ile *Wolbachia* frekansı arasındaki ilişki ortaya koyulmaya çalışılmıştır.

Seleksiyon sonunda ve başında bireysel olarak izole edilen akarlardan, *Wolbachia* tespit edilmesi halinde, en çok 10 adet olacak şekilde nükleotit dizilimi belirlenmiştir. Bu sayede, spirodiclofen dirençli ve dirençsiz bireylerde, *Wolbachia* frekansının yanında, dizilimde gerçekleşebilecek değişimler tespit edilmiştir.

3.7. Esteraz, Glutathion S-transferaz (GST) ve P450 Monoksigenaz Enzim Aktiviteleri

T. urticae'nin GSS ve GSSN popülasyonlarında spirodiclofen ile seleksiyon gerçekleştirilirken iki seleksiyon aralıklı esteraz, GST ve P450 monoksigenaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Esteraz aktivitesinin kinetik olarak belirlenmesinde substrat olarak α -naphthylacetate ve Stumpf ve Nauen (2002)'in geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. 20 adet ergin dişi 100 μ l sodyum fosfat buffer (0.1M, pH:7.5) (%0.1 Triton X-100 içeren) içinde homojenize edilmiştir. Bu homojenat 10 000 g, +4°C'de ve 5 dk santrifüj edildikten sonra enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzim kaynağı olarak kullanılan supernatant 10 kat seyreltilmiştir. Mikroplaka hücrelerine 25 μ l supernatant + 25 μ l fosfat buffer (0.2 M, pH:6) konulmuştur. Çalışma hücrelere 200 μ l substrat solüsyonunun eklenmesiyle başlatılmıştır. Substrat solüsyonu 30 mg fastblue RR tuzunun 50 ml 0.2 M sodyum fosfat buffer'da çözülmesi ve bu karışıma 500 μ l 100 Mm α - naphthylacetate'ın eklenmesiyle elde edilmiştir. Enzim aktivitesi 23°C, 450 nm'de 10 dk süreyle okunmuştur.

GST enziminin kinetik olarak belirlenmesinde Stumpf ve Nauen (2002)'in geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. 30 ergin dişi 300 μ l Tris HCL buffer (0.05M, pH:7.5) içinde homojenize edilmiştir. Supernatant 10 000g, +4°C'de 5 dksantrifüj edilmiştir. 100 μ l supernatant, 100 μ l 1-chloro-2,4- dinitrobenzene (CDNB) ve 100 μ l reduced glutathione (GSH)'dan oluşan toplam hacim mikroplaka hücrelerine konulmuştur. CDNB %0.1 ethanolde hazırlanmış ve final konsantrasyonda hücrelerde 0.4 mM CDNB bulunmuştur. Absorbanstaki değişim 340 nm, 25°C'de ve 5 dk'da okunmuştur.

Sitokrom P450 monooksijenaz enziminin belirlenmesinde substrat olarak *p*-nitroanisole (PNOD) ve Rose vd. (1995), yöntemi uyarlanarak kullanılmıştır. 50 adet dişi birey 100 μ l homojenizasyon buffer'da (0.05 MTris-HCl + %1.15 KCl + 1mM EDTA pH (7.7) plastik ezici ile ezilmiş +4°C 10 000 g'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Mikroplaka hücrelerine 45 μ L homojenizasyon buffer + 45 μ L supernatant+100 μ L 2mM PNOD eklenerek karışım 30°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon mikroplaka hücrelerine 10 μ L 9.6 mM NADPH eklenerek başlatılmıştır. P450 enzim aktivitesi Versamax kinetik mikropate okuyucuda (Molecular Devices) 405 nm 30°C'de 15 dk süreyle ölçülmüştür.

Biyokimyasal çalışmalarda, kontrol hücreleri ise homojenatsız olarak okunmuştur. Enzim okumaları dört tekerrürlü olarak yapılmıştır. Tüm enzim aktiviteleri Softmax

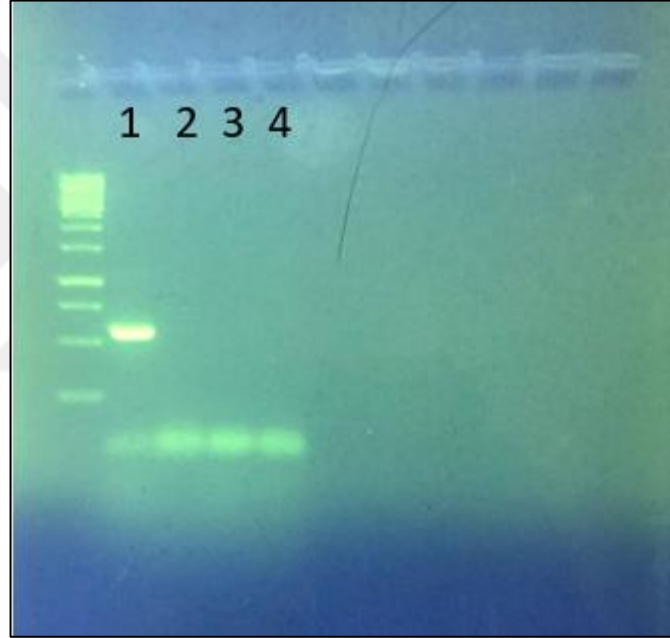
PRO software programında analiz edilerek sonuçlar mOD min⁻¹ mg⁻¹ protein olarak verilmiştir. Örneklerin toplam protein miktarlarının belirlenmesinde Bradford (1976)'un total protein tayin yöntemi kullanılmış ve Bovine Serum Albumine (BSA) standart olarak alınmıştır. Enzim sonuçlarından elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi tekniği ile (One-Way ANOVA) analiz edilmiş ve popülasyonlar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Tukey testi kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. *Tetranychus urticae*'de Endosimbiyontların Moleküler Olarak Belirlenmesi

Orijin olarak kullanılan *T. urticae*'nin GSS popülasyonunda artropodlarda yaygın olarak bulunan 4 endosimbiyont bakterinin varlığı araştırılmıştır. *Wolbachia*(1), *Cardinium*(2), *Rickettsia*(3) ve *Spiroplasma*(4) bakterileri arasından başlangıç popülasyonunda sadece *Wolbachia* tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Böylece GSS popülasyonunun amacımız olan *Wolbachia* – akarisit ilişkisinin tespit edilmesine oldukça uygun bir popülasyon olduğu ortaya koyulmuştur.



Şekil 4.1. *Tetranychus urticae*'nin GSS popülasyonunda endosimbiyont varlıkları

4.2. Seleksiyon Sonuçları

T. urticae'nin *Wolbachia* ile enfekteli GSS popülasyonunda spirodiclofen seleksiyonu sonucunda belirlenen LC değerleri ve LC₅₀ değerine göre direnç oranları Çizelge 4.1'de verilmektedir. GSS popülasyonu ile spirodiclofen ile on seleksiyon yapılmıştır. Seleksiyon popülasyonları S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9 ve S10 olarak adlandırılmıştır. Seleksiyon çalışmaları sonucunda seleksiyon popülasyonlarında spirodiclofene karşı belirlenen direnç oranları 0.8 ile 27 kat

arasında değişmektedir. Spirodiclofen ile on seleksiyon baskısı sonucunda elde edilen S10 popülasyonunda sonucunda 27.0 kat direnç belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *Tetranychus urticae*'nin *Wolbachia* enfekteli GSS ve seleksiyon popülasyonlarında spirodiclofene karşı belirlenen LC, df, x^2 değerleri ve direnç oranları

Popülasyon	n*	Eğim±SE	LC ₅₀ (mg a.i. L ⁻¹) (95% CL)	LC ₆₀ (mg a.i. L ⁻¹) (95% CL)	Df	x^2	R**
GSS	598	1.180±0.110	0.036 0.028-0.045	0.060 0.045-0.076	6	2.8	-
S1	603	1.611±0.146	0.038 0.024-0.048	0.043 0.033-0.052	6	2.5	1.0
S2	605	1.630±0.129	0.062 0.038-0.093	0.088 0.057-0.139	6	1.8	1.7
S3	582	1.427±0.137	0.151 0.096-0.218	0.228 0.156-0.328	6	2.0	4.2
S4	598	1.506±0.318	0.208 0.158-0.261	0.252 0.199-0.316	5	2.8	5.8
S5	578	1.398±0.134	0.258 0.184-0.295	0.318 0.212-0.395	5	2.5	7.1
S6	591	1.881±0.142	0.326 0.223-0.460	0.441 0.307-0.640	6	1.4	9.0
S7	602	1.486±0.186	0.578 0.196-0.956	0.856 0.384-1.490	6	1.9	16.0
S8	565	2.266±0.159	0.765 0.662-1.121	0.991 0.856-1.154	6	2.9	21.2
S9	584	1.848±0.168	0.919 0.645-1.233	1.260 0.924-1.706	5	2.3	25.5
S10	596	1.480±0.126	0.972 0.777-1.200	1.440 1.166-1.800	6	2.5	27.0

*: Toplam birey sayısı

**: Direnç oranı

T. urticae'nin *Wolbachia* ile enfektesiz GSSN popülasyonunda spirodiclofen seleksiyonu sonucunda belirlenen LC değerleri ve LC₅₀ değerine göre direnç oranları Çizelge 4.2'de verilmektedir. GSSN popülasyonu ile spirodiclofen ile on seleksiyon yapılmıştır. Seleksiyon popülasyonları SN1, SN2, SN3, SN4, SN5, SN6, SN7, SN8,

SN9 ve SN10 olarak adlandırılmıştır. Seleksiyon çalışmaları sonucunda seleksiyon popülasyonlarında spirodiclofene karşı belirlenen direnç oranları 2 ile 103 kat arasında değişmektedir. Spirodiclofen ile on seleksiyon baskısı sonucunda elde edilen SN10 popülasyonunda sonucunda 103.05 kat direnç belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. *Tetranychus urticae*'nin *Wolbachia* enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında spirodiclofene karşı belirlenen LC, df, x² değerleri ve direnç oranları

Popülasyon	n*	Eğim±SE	LC ₅₀ (mg a.i. L ⁻¹) (95% CL)	LC ₆₀ (mg a.i. L ⁻¹) (95% CL)	df	x ²	R**
GSSN	598	2.102±0.165	0.019 0.014-0.024	0.024 0.019-0.031	6	1.2	-
SN1	575	1.822±0.151	0.038 0.028-0.050	0.052 0.040-0.069	6	1.8	2.0
SN2	592	1.463±0.335	0.158 0.115-0.206	0.187 0.141-0.249	6	1.6	8.3
SN3	578	1.639±0.140	0.163 0.086-0.172	0.189 0.127-0.230	6	2.2	8.5
SN4	565	1.162±0.113	0.195 0.122-0.213	0.273 0.211-0.355	5	2.5	10.2
SN5	563	1.589±0.215	0.583 0.353-1.020	0.842 0.336-1.521	5	2.8	30.6
SN6	585	1.480±0.130	1.032 0.751-1.423	1.528 1.120-1.956	6	1.5	54.3
SN7	603	1.754±0.140	1.063 0.806-1.384	1.780 1.140-1.968	6	2.8	55.9
SN8	592	1.962±0.167	1.221 1.000-1.464	1.944 1.370-2.275	6	2.4	64.2
SN9	576	1.778±0.140	1.392 1.072-1.773	2.232 1.514-2.496	5	1.7	73.2
SN10	569	1.985±0.180	1.958 1.652-2.320	2.965 2.456-3.201	6	2.5	103.05

*: Toplam birey sayısı

**: Direnç oranı

4.3. Seleksiyon Popülasyonlarında *Wolbachia* Endosimbiontunun Moleküler Yöntemle Belirlenmesi

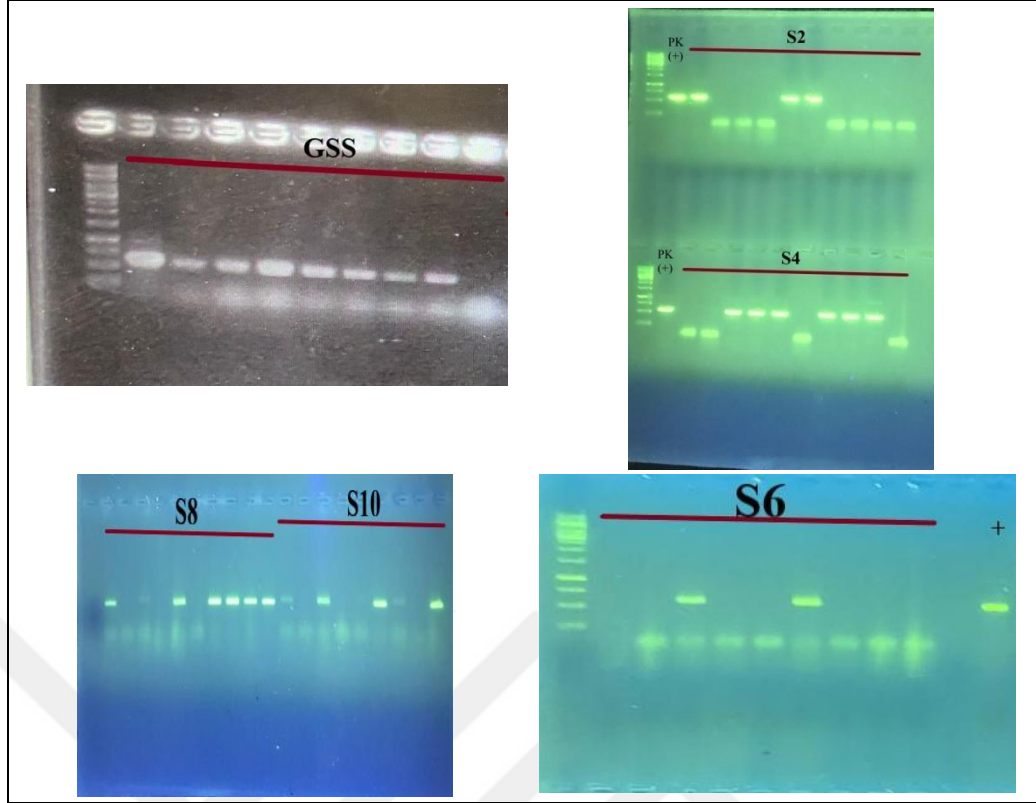
Tetranychus urticae popülasyonlarında her 2 seleksiyon aralıkları ile *Wolbachia* frekansı 10 birey üzerinden belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Tablo incelendiğinde antibiyotik uygulanmamış GSS ve seleksiyon popülasyonlarının tamamında *Wolbachia* frekansının, antibiyotik uygulaması yapılmış olan GSSN ve seleksiyon popülasyonlarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, spirodiclofen uygulaması sonunda antibiyotiksiz popülasyonun *Wolbachia* frekansında bir miktar düşüş görülse de S8 gibi ileri popülasyonlarda *Wolbachia* frekansının tekrar artış gösterdiği görülmektedir.

Antibiyotik uygulamaları sonucunda *Wolbachia* bakterisi popülasyonun büyük çoğunluğunda başarıyla elemine edilmiştir. Sonraki jenerasyonlarda popülasyonda *Wolbachia* frekansının önemli ölçüde artmadığı gözlemlenmiştir.

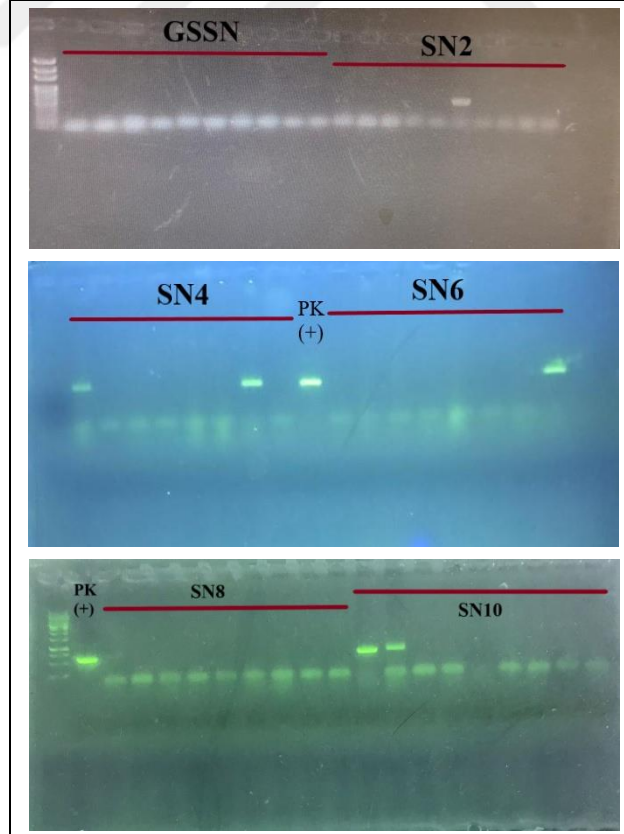
Çizelge 4.3. Spirodiclofen seleksiyon popülasyonlarında *Wolbachia* frekansı değişimi

Seleksiyon popülasyonları	Antibiyotiksiz	Seleksiyon popülasyonları	Antibiyotikli
GSS	9/10	GSSN	0/10
S2	3/10	SN2	1/10
S4	6/10	SN4	2/10
S6	3/10	SN6	1/10
S8	7/10	SN8	0/10
S10	5/10	SN10	2/10

Frekans belirlemede kullanılan jel görüntüleri aşağıdaki verilmektedir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

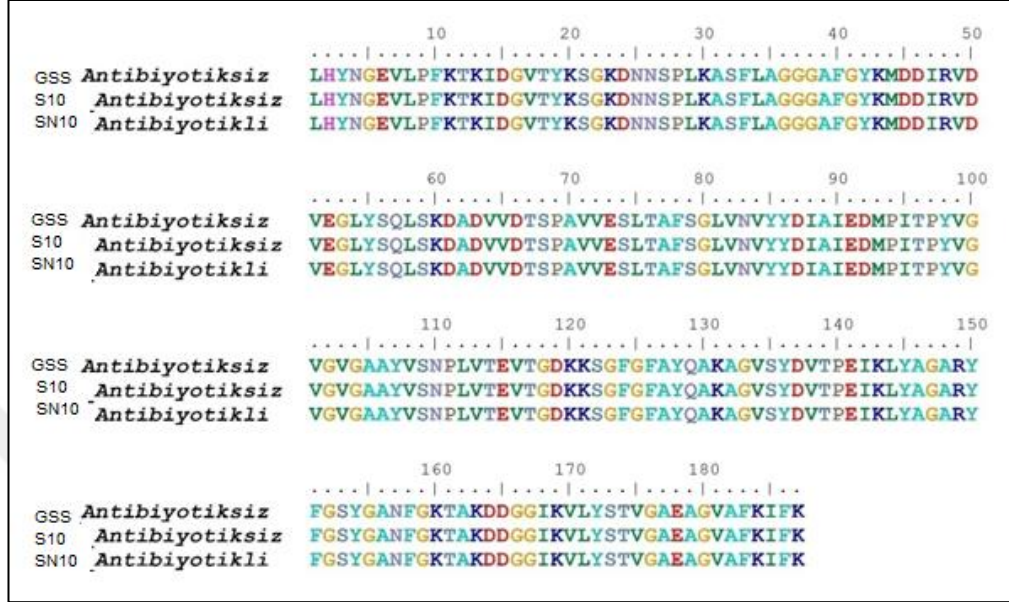


Şekil 4.2. Antibiyotiksiz GSS ve seleksiyon popülasyonlarındaki *Wolbachia* jel görüntüleri



Şekil 4.3. Antibiyotikli GSSN ve seleksiyon popülasyonlarındaki *Wolbachia* jel görüntüleri

Ayrıca *T. urticae*'de spirodiclofen seleksiyon öncesi ve seleksiyon sonrası *Wolbachia* gen dizilimlerinin belirli parçalarının dizilimleri ortaya çıkarılmıştır. Ancak gen dizilimlerinde herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Antibiyotikli ve antibiyotiksiz popülasyonlardan elde edilen *Wolbachia* aminoasit dizilimlerinin karşılaştırılması

Karşılaştırılan *Wolbachia* dizilimlerinin nükleotit dizimleri aşağıdaki gibidir:

> GSS Antibiyotiksiz

```
TTGCATTATAATGGTGAAGTTTTACCTTTTAAAACAAAGATTGATGGTGT
TACATATAAATCAGGTAAGGACAACAATAGTCCCTTAAAAGCATCTTTTC
TAGCTGGAGGTGGTGCATTTGGTTATAAAATGGATGATATTAGGGTTGAT
GTTGAAGGACTTTACTCACAATTGAGTAAAGATGCAGATGTAGTAGATAC
TTCTCCAGCAGTTGTAGAAAGTTTAAACAGCATTTTCAGGACTAGTTAATG
TTTATTACGATATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGT
GTTGGTGTGGTGCAGCGTATGTAAGCAATCCTTTAGTAACAGAGGTTAC
TGGTGATAAAAAATCTGGATTTGGTTTTGCTTATCAAGCAAAAGCTGGTG
TTAGTTATGATGTAACCCCAAGAAATCAAGCTTTATGCTGGTGCTCGTTATT
TTGGTTCTTATGGTGCTAATTTTGGTAAGACAGCTAAAGATGATGGCGGA
ATCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGCAGAAGCTGGAGTAGCGTTTAA
AATTTTAA
```

S10 _Antibiyotiksiz

TTGCATTATAATGGTGAAGTTTTACCTTTTAAAACAAAGATTGATGGTGT
TACATATAAATCAGGTAAGGACAACAATAGTCCCTTAAAAGCATCTTTTC
TAGCTGGAGGTGGTGCATTTGGTTATAAAAATGGATGATATTAGGGTTGAT
GTTGAAGGACTTTACTCACAATTGAGTAAAGATGCAGATGTAGTAGATAC
TTCTCCAGCAGTTGTAGAAAAGTTTAAACAGCATTTTCAGGACTAGTTAATG
TTTATTACGATATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGT
GTTGGTGTGGTGCAGCGTATGTAAGCAATCCTTTAGTAACAGAGGTTAC
TGGTGATAAAAAATCTGGATTTGGTTTTGCTTATCAAGCAAAAGCTGGTG
TTAGTTATGATGTAACCCAGAAATCAAGCTTTATGCTGGTGCTCGTTATT
TTGGTTCTTATGGTGCTAATTTTGGTAAGACAGCTAAAGATGATGGCGGA
ATCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGCAGAAGCTGGAGTAGCGTTTAA
AATTTTAAA

SN10_Antibiyotikli

TTGCATTATAATGGTGAAGTTTTACCTTTTAAAACAAAGATTGATGGTGT
TACATATAAATCAGGTAAGGACAACAATAGTCCCTTAAAAGCATCTTTTC
TAGCTGGAGGTGGTGCATTTGGTTATAAAAATGGATGATATTAGGGTTGAT
GTTGAAGGACTTTACTCACAATTGAGTAAAGATGCAGATGTAGTAGATAC
TTCTCCAGCAGTTGTAGAAAAGTTTAAACAGCATTTTCAGGACTAGTTAATG
TTTATTACGATATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGT
GTTGGTGTGGTGCAGCGTATGTAAGCAATCCTTTAGTAACAGAGGTTAC
TGGTGATAAAAAATCTGGATTTGGTTTTGCTTATCAAGCAAAAGCTGGTG
TTAGTTATGATGTAACCCAGAAATCAAGCTTTATGCTGGTGCTCGTTATT
TTGGTTCTTATGGTGCTAATTTTGGTAAGACAGCTAAAGATGATGGCGGA
ATCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGCAGAAGCTGGAGTAGCGTTTAA
AATTTTAAA

4.4. Esteraz, Glutathion S-transferaz (GST) ve P450 Monoksijenaz Enzim Aktiviteleri

Tetranychus urticae'nin *Wolbachia* enfekteli GSS, *Wolbachia* enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında esteraz enzim aktiviteleri $\text{mOD min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein değerinde belirlenerek sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir. *Tetranychus urticae*'nin

Wolbachia enfekteli GSS ve bu popülasyondan seleksiyon yoluyla elde edilen popülasyonlarda esteraz enzim miktarları istatistiki olarak benzer bulunmuştur. Bu popülasyonlarda içerisinde en son seleksiyon popülasyonu olan S10 popülasyonunda spirodiclofen için en yüksek direnç oranı olarak 27 kat direnç belirlenmiştir. *T. urticae*'nin *Wolbachia* enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında durum incelendiğinde ise, SN6, SN8 ve SN10 popülasyonlarında esteraz enzim miktarlarının GSS, SN2 ve SN4 popülasyonlarındaki esteraz enzim miktarlarından yüksek olduğu görülmektedir. *Wolbachia* enfektesiz popülasyon ve seleksiyonlarda spirodiclofen direnç artışı incelendiğinde ise SN6, SN8 ve SN10 popülasyonlarında direncin SN4, SN2 ve GSS popülasyonlarına göre önemli ölçüde artış gösterdiği görülmektedir. Bu durumda ise SN6, SN8 ve SN10 popülasyonlarında spirodiclofen direnç gelişimi ve esteraz enzimi arasında bir ilişki olduğu düşünülebilir.

Çizelge 4.4. *Tetranychus urticae*'nin *Wolbachia* enfekteli GSS, *Wolbachia* enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında esteraz enzim aktiviteleri

Popülasyon	n*	Spesifik aktivite mOD min ⁻¹ mg ⁻¹ protein
Esteraz		
GSS	4	11.63a**
S2	4	11.88a
S4	4	12.57a
S6	4	11.16a
S8	4	13.25a
S10	4	13.52a
GSSN	4	8.69c
SN2	4	8.92c
SN4	4	8.72c
SN6	4	13.75b
SN8	4	14.48b
SN10	4	18.90a

* Tekerrür sayısı

** Aynı harfler istatistiki olarak aynı grubu göstermektedir (P<0.05)

Tetranychus urticae'nin *Wolbachia* enfekteli GSS, *Wolbachia* enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında GST enzim aktiviteleri mOD min⁻¹ mg⁻¹ protein değerinde belirlenerek sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde ise, *T. urticae*'nin *Wolbachia* enfekteli GSS ve bu popülasyondan elde edilen

seleksiyon popülasyonlarında GST enzimi benzer bulunmuş olup, istatistiki olarak bir fark belirlenememiştir. Benzer şekilde *T. urticae*'nin *Wolbachia* enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında da GST enzim miktarları arasında herhangi bir fark belirlenememiştir.

Çizelge 4.5. *Tetranychus urticae*'nin *Wolbachia* enfekteli GSS, *Wolbachia* enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında GST enzim aktiviteleri

Popülasyon	n*	Spesifik aktivite mOD min ⁻¹ mg ⁻¹ protein
GST		
GSS	4	3.5a**
S2	4	3.2a
S4	4	3.8a
S6	4	4.0a
S8	4	3.6a
S10	4	3.8a
GSSN	4	2.9a
SN2	4	3.2a
SN4	4	3.0a
SN6	4	3.5a
SN8	4	3.8a
SN10	4	4.2a

* Tekerrür sayısı

** Aynı harfler istatistiki olarak aynı grubu göstermektedir (P<0.05)

Tetranychus urticae'nin *Wolbachia* enfekteli GSS, *Wolbachia* enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında P450 monooksijenaz enzim aktivitelerinin mOD min⁻¹ mg⁻¹ protein değerinde belirlenerek sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde ise, *Tetranychus urticae*'nin *Wolbachia* enfekteli GSS ve bu popülasyondan elde edilen seleksiyon popülasyonları içerisinde S6, S8 ve S10 popülasyonlarında belirlenen monooksijenaz enzim miktarları GSS, S2 ve S4 popülasyonlarına göre daha yüksek bulunmuştur. *Tetranychus urticae*'nin *Wolbachia* enfektesiz GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında en düşük monooksijenaz enzim miktarı GSSN popülasyonunda belirlenmiş olup, diğer popülasyonlardan farklı bir istatistiki grubu oluşturmuştur. SN2, SN4, SN6 ve SN8 popülasyonlarında belirlenen enzim miktarı benzer bulunmuştur. 103 kat spirodiclofen direncine sahip olan SN10

populasyonunda ise en yüksek monoksigenaz enzim miktarı belirlenmiş olup, diğer populasyonlardan farklı bir istatistiki grubu oluşturmuştur.

Çizelge 4.6. *Tetranychus urticae*'nin *Wolbachia* enfekteli GSS, *Wolbachia* enfektesiz GSSN ve seleksiyon populasyonlarında P450 monooksigenaz enzim aktiviteleri

Populasyon	n*	Spesifik aktivite mOD min ⁻¹ mg ⁻¹ protein
P450		
GSS	4	0.0023b**
S2	4	0.0032b
S4	4	0.0035b
S6	4	0.0049a
S8	4	0.0053a
S10	4	0.0055a
GSSN	4	0.0017c**
SN2	4	0.0035b
SN4	4	0.0038b
SN6	4	0.0050b
SN8	4	0.0056b
SN10	4	0.0072a

* Tekerrür sayısı

**Aynı harfler istatistiki olarak aynı grubu göstermektedir (P<0.05)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Zararlılarda insektisit direnç mekanizmalarının bilinmeyen yönlerinden birisi de insektisitlerin parçalanmasına yol açabilme olasılıkları bulunan fakültatif endosimbiontlardır. *T. urticae*'de yaygın olarak bulunduğu bilinen *Wolbachia* endosimbiontu ile akarisit direnci arasındaki olası ilişkinin belirlenmesi, zararlının mücadelesinde yenilik sağlayabilmek açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmada, *T. urticae*'de *Wolbachia*'nin spirodiclofen direnç gelişim hızı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla seleksiyon yapılmıştır. Ayrıca zararlıda *Wolbachia* frekans yoğunluğu ve bazı detoksifikasyon enzim miktarları da belirlenerek spirodiclofen direnç gelişimi üzerindeki olası pozitif, negatif ya da nötr etkileri araştırılmıştır.

Endosimbiontlar ve akarlarda insektisit/akarisit direnç gelişimi arasındaki ilişkinin belirlenmesi adına yapılan çalışma literatürde bulunmamaktadır. Ancak özellikle Tetranychidae familyasında bazı endosimbiontların varlığının saptandığı çalışmalar bulunmaktadır. Vala vd. (2002), *T. urticae*'de *Wolbachia*'nin ömür uzunluğunu etkilemediğini, hayatta kalma eğrilerinde bir değişikliğe neden olduğunu belirlemişlerdir. Gotoh vd. (2003), Japonya'daki 42 Tetranychidae türünün yedisinin (%16.7) *Wolbachia* ile enfekte olduğunu belirlemişlerdir. Zang vd. (2013), Çin'de *Tetranychus* türlerinde (*Tetranychus truncatus*, *Tetranychus urticae*, *Tetranychus pueraricola* ve *Tetranychus phaselus*) *Wolbachia* endosimbiontunun olduğunu belirlemişlerdir. Zélé vd. (2018), Tetranychidae familyasında en yaygın endosimbiont kombinasyonunun *Wolbachia* ve *Cardinium* olabileceğini bildirmişlerdir. Pina vd. (2020), *T. truncatus*'da *Wolbachia* ve *Cardinium* veya *Spiroplasma* ve *Rickettsia* kombinasyonlarını gösterdiğini, *T. evansi*, *T. ludeni* ve *T. urticae*'nin ise sadece *Wolbachia* ve *Cardinium* kombinasyonlarını gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmalar Tetranychidae türlerinden *Wolbachia* endosimbiontunun yaygın olarak bulunduğunu göstermesi nedeniyle önem taşımaktadır. Tetranychidae türlerinde yaygın olarak bulunan *Wolbachia* simbiyontunun fitofag akar türlerinde insektisit/akarisit direnç gelişimi ile ilişkili olmasının olası bir durum olabileceği düşünülmektedir.

GSS ve GSSN popülasyonlarında eş zamanlı olarak spirodiclofen seleksiyonu yapılmıştır. GSS ve seleksiyon popülasyonlarında spirodiclofen direnci en fazla 27 kata ulaşmıştır. Bununla birlikte her iki seleksiyon aralıklarıyla belirlenen *Wolbachia* frekansında S2 ve S6 popülasyonlarında bir miktar düşüş olmasına rağmen tüm popülasyonlarda *Wolbachia* frekansı antibiyotik uygulanmış popülasyonlara göre yüksek bulunmuştur. Buna karşılık GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında, 5. seleksiyondan sonra daha hızlı bir spirodiclofen direnç gelişimi belirlenmiştir. Her iki seleksiyon aralıklarıyla yapılan *Wolbachia* frekans belirleme çalışmalarında ise, antibiyotik uygulanmamış popülasyonlara göre çok daha az *Wolbachia* varlığı belirlenmiştir. Antibiyotik uygulaması yapılmış olan GSSN ve seleksiyon popülasyonlarında spirodiclofen direncinin 103 kata kadar arttığı belirlenmiştir. Buna karşılık daha yoğun bir şekilde *Wolbachia* içeren GSS ve seleksiyon popülasyonlarında ise en fazla 27 kat spirodiclofen direnci belirlenmiştir. Literatürde *T. urticae*'nin laboratuvar ve arazi popülasyonlarında yüksek oranda spirodiclofen direnç gelişimi belirlendiği çalışmalar bulunmaktadır (Rauch ve Nauen, 2003; Van Pottelberge vd., 2009a; Van Pottelberge vd., 2009b; Ferreria vd., 2015). Ancak bu çalışmalarda zararlıda yüksek spirodiclofen direncine endosimbiontların etkisi olup olmadığı incelenmemiştir. Çalışmamız sonucunda, *T. urticae*'de *Wolbachia* varlığı ve yoğunluğu ile spirodiclofen direnç gelişimi arasında negatif bir ilişki olabileceği düşünülebilir. Ancak *Wolbachia* frekans yoğunluğunun az sayıda birey üzerinden belirlenmesi ve tesadüfi örnekleme yapmanın sonuca etkilerinin olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Dolayısıyla ileriki çalışmalarda bu bağlantının net bir şekilde ortaya koyulması için örnek ve tekrar sayısının artırılarak, *T. urticae*'de *Wolbachia* varlığı ve spirodiclofen direnç ilişkisinin daha net bir şekilde ortaya konulması gerektiği düşünülmektedir.

Akarlarda endosimbiont-pestisit direnci üzerinde yapılan çalışma bulunmamasına rağmen bazı zararlılarda bu konu araştırılmıştır. Simbiyont aracılı insektisit direnci/duyarlılığı, böceklerin türüne, simbiyont türlerine ve kimyasal bileşiğe göre değişmektedir. Yapılan bir çalışmada acetamiprid, thiametroxam, sporimesifen ve pyriproxyfen'e karşı en yüksek hassasiyet *Rickettsia-Arsenophonus*, *Rickettsia-Wolbachia* gibi çoklu simbiyont barındıran beyazsineklerde görülmüştür (Ghanim ve Kontsedalov, 2009). *Bemisia tabaci* popülasyonlarında yüksek oranda simbiyotik bakterinin bulunmasının böceğin insektisitleri ve diğer toksik maddeleri detoksifiye

etmesine kolaylık sağladığı düşünülmektedir. Nitekim *B. tabaci* populasyonlarında insektisit direnci belirleme çalışmalarında özellikle *Rickettsia* bakterisinin dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır (Kontsedalov vd., 2008). Diğer taraftan, *Wolbachia*, *Aedes aegypti*'nin kimyasal insektisitlerden bifentrin, temephos ve s-methoprene ve *Bacillus thuringiensis*'e (Bt) duyarlılığını değiştirmemiştir. Ayrıca, başka bir simbiyont *Arsenophonus* ile birlikte bulunan *Rickettsia*'nın, *B. tabaci*'de acetamiprid'e karşı insektisit direncini arttırdığı, ancak diafenthiurona duyarlılığı etkilemediği belirlenmiştir. Bir organofosforlu insektisit olan fenitrothion, toprak kaynaklı bir simbiyont olan *Burkholderia* tarafından parçalanarak insektisit direncine katkı sağlayabilmektedir. Fasulye böceği, *R. pedestris*'de *S. kochii*, geniş spektrumlu bir detoksifikasyon kapasitesine sahip olup organofosforlu insektisit olan parathion'u hidrolize edebildiği bildirilmiştir (Liu vd., 2019).

Zararlı vücudunda bulunan aromatik ester hidrolaz, glukozidaz, fosfataz ve glutatyon S-transferaz gibi detoksifiye edici enzimler, simbiyontlar tarafından aktive edilebilmektedir. Detoksifikasyon enzimlerin aktivite değişiklikleri sebebiyle, simbiyotların konukçularının insektisit direncinde değişikliğe yol açabileceği bildirilmiştir (Kikuchi vd., 2012). Çalışmamızda *Wolbachia* enfekteli GSS ve seleksiyon populasyonlarında esterase enzim miktarları arasında istatistiki olarak bir fark belirlenmemiştir. Buna karşılık antibiyotik uygulaması yapılan GSSN ve seleksiyon populasyonları incelendiğinde SN10 populasyonunda en yüksek esterase enzimi belirlenmiştir. Özellikle SN6, SN8 ve SN10 populasyonlarının esterase miktarlarının GSSN, SN2 ve SN4 populasyonlarına göre önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Bununla birlikte özellikle SN5 populasyonundan sonraki populasyonlarda spirodiclofen direncinin de hızlı bir şekilde artmış olması, direnç ve esterase enzimi arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda direncin hızlı artışında da *Wolbachia* endosimbiyont yokluğunun bulunması durumunun etkili olabileceği düşünülmektedir. Çünkü antibiyotik uygulanmamış GSS ve seleksiyon populasyonlarında spirodiclofen direnci çok artmamıştır. *T. urticae*'nin antibiyotik uygulaması yapılmış ve yapılmamış olan GSS ve GSSN populasyonları ile tüm seleksiyon populasyonlarında GST enzim aktivitesinin istatistiki olarak bir değişiklik göstermediği belirlenmiştir. P450 monooksijenaz enzim aktivitesi incelendiğinde ise, GSS ve seleksiyon populasyonlarında S6, S8 ve S10 populasyonlarındaki enzim miktarının diğer seleksiyon populasyonlarına göre yüksek

çıkıldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde GSSN ve seleksiyon popülasyonları incelendiğinde de, en yüksek monooksijenaz enzim miktarı SN10 popülasyonunda belirlenmiştir. Bununla birlikte SN2, SN4, SN6 ve SN8 popülasyonlarında da monooksijenaz enzim miktarları GSSN popülasyonuna göre yüksek bulunmuştur. Ancak monooksijenaz enzimi esteraz enziminde farklı olarak antibiyotik uygulaması yapılmış ve yapılmamış olan seleksiyon popülasyonlarında da artış göstermiştir. *T. urticae*'de spirodiclofen direncinin artışında esteraz ve P450 enzimlerinin ilişki olduğunu kanıtlayan birçok çalışma literatürde bulunmaktadır (Van Pottelberge vd., 2009; Kramer ve Nauen, 2011; Badieinia vd., 2020). Ancak *Wolbachia*'nın zararlılarda insektisitlerin etkilerini azaltabildiğini veya detoksifiye edebildiğini kanıtlayacak doğrudan bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bununla birlikte, simbiyontların toksik bileşikleri detoksifiye edebileceğini bildiğimiz başka simbiyont örnekleri bulunmaktadır (Shen ve Downd, 1991; Hayatsu vd., 2000).

Doğada birçok canlı türde birlikte yaşam örneği gösteren endosimbiyontlar zararlılarda da sıklıkta bulunmaktadır. Endosimbiyontlar zararlılarda özellikle üreme üzerinde bir takım değişikliklere yol açmaktadır. Ancak zararlıların mücadelesinde zorluklara yol açan direnç gelişimi üzerinde de etkileri olabileceği düşünülmektedir. Zararlılarda insektisit direnci ve endosimbiyont türü ile yoğunluğu arasındaki ilişkinin bilinmesi mücadelede yeni stratejilerin geliştirilebilmesi açısından önem taşımaktadır. Ülkemizde önemli bir zararlı konumunda bulunan ve mücadelesi zor olan *T. urticae*'de bu ilişkilerin belirlenmesi ile direnç yönetim programlarına katkı sağlanabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada *T. urticae*'de akarisit direnci ve *Wolbachia* arasındaki ilişkinin belirlendiği ilk çalışma olması yönünden önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Badieinia, F., Khajehali, J., Nauen, R., Dermauw, W. & Van Leeuwen, T. (2020). Metabolic mechanisms of resistance to spiroticlofen and spiromesifen in Iranian populations of *Panonychus ulmi*. *Crop Protection*, 134, 105166.
- Bandi, C., Trees, A.J. & Bratting, N.W. (2001). Wolbachia in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Veterinary Parasitology*, 98, 215-238. doi:10.1016/S0304-4017(01)00432-0
- Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology*, 59, 155-189. doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121041
- Bordenstein, S.R., Fitch, D.H. & Werren, J.H. (2003). Absence of Wolbachia in nonfilariid nematodes. *Journal of Nematology*, 35(3), 266-270.
- Breeuwer, J.A.J. & Jacobs, G. (1996). Wolbachia: intracellular manipulators of mite reproduction. *Experimental & Applied Acarology*, 20(8), 421-434.
- Breeuwer, J.A.J., Stouthamer, R., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Weisburg, W.G. & Werren, J.H. (1992). Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Molecular Biology*, 1(1), 25-36. doi:10.1111/j.1365-2583.1993.tb00074.x
- Bretschneider, T., Fischer, R. & Nauen, R. (2007). Inhibitors of Lipid Synthesis (Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors). In *Modern Crop Protection Compounds*. (pp. 909-926)
- Broderick, N.A., Raffa, K.F. & Handelsman, J. (2006). Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), 15196-15199. doi:10.1073/pnas.0604865103
- Brumin, M., Levy, M. & Ghanim, M. (2012). Transovarial transmission of *Rickettsia* spp. and organ-specific infection of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5565-5574.
- Buchner, P. (1965). *Endosymbiosis of Animals With Plant Microorganisms*. New York: John Wiley.
- Cordaux, R., Michel-Salzat, A. & Bouchon, D. (2001). Wolbachia infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(2), 237-243.
- Dedeine, F., Vavre, F., Fleury, F., Loppin, B., Hochberg, M.E. & Boulétreau, M. (2001). Removing symbiotic Wolbachia bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6247-6252. doi:10.1073/pnas.101304298

- Dermauw, W., Wybouw, N., Rombauts, S., Menten, B., Vontas, J., Grbic, M., Clark, R.M., Feyereisen R. & Van Leeuwen, T. (2013). A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2), 113–122. doi:10.1073/pnas.1213214110
- Douglas, A. (1989). Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews*, 64(4), 409-434. doi:10.1111/j.1469-185X.1989.tb00682.x
- Dunbar, H.E., Wilson, A.C.C., Ferguson, N.R. & Moran, N.A. (2007). Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS Biology*, 5(5), e96. doi:10.1371/journal.pbio.0050096.
- 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.
- Ghanim, M. & Kontsedalov, S. (2009a). Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 65(9), 939-942.
- Gotoh, T., Noda, H. & Hong, X.Y. (2003). Wolbachia distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Heredity*, 91(3), 208-216. doi:10.1038/sj.hdy.6800329
- Gotoh, T., Oku, H., Moriya, K. & Odawara, M. (1995). Nucleus–cytoplasm interactions causing reproductive incompatibility between two populations of *Tetranychus quercivorus* Ehara et Gotoh (Acari: Tetranychidae). *Heredity*, 74(4), 405-414. doi:10.1038/hdy.1995.58
- Güz, N., Dağeri, A. & Aksoy, S. (2015). Endosimbiyotik bakterilerin böcekler üzerine etkisi. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 5(2), 101-113.
- Harris, H.L., Brennan, L.J., Keddie, B.A. & Braig, H.R. (2010). Bacterial symbionts in insects: balancing life and death. *Symbiosis*, 51(1), 37-53.
- Hayatsu, M., Hirano, M. & Tokuda, S. (2000). Involvement of two plasmids in fenitrothion degradation by *Burkholderia* sp. strain NF100. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1737-1740. doi:10.1128/AEM.66.4.1737-1740.2000
- Helle, W. & Sabelis, M.W. (1985). *Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control*. Amsterdam, Elsevier, 545p.
- Hertig, M. & Wolbach, S.B. (1924). Studies on rickettsia- like microorganisms in insects. *The Journal of Medical Research*, 44(3), 329-374.

- Jeppson, L.R., Keifer, H.H. & Baker, E.W. (1975). *Mites Injurious to Economic Plants*. Berkeley, University of California Press, 614 p.
- Jeyaprakash, A. & Hoy, M.A. (2000). Long PCR improves Wolbachia DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology*, 9(4), 393-405. doi:10.1046/j.1365-2583.2000.00203.x
- Kaltenpoth, M. (2009). Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects?. *Trends in Microbiology*, 17(12), 529-535. doi: 10.1016/j.tim.2009.09.006.
- Karaman, İ. & Koçak, E. (2020). Süne (*Eurygaster integriceps* Put.)’de wolbachia varlığının belirlenmesi. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 180-185.
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K. & Fukatsu, T. (2012). Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 8618-8622. doi:10.1073/pnas.1200231109
- Koçak, E. & Ertürk, Ş. (2019). ‘Türkiye’de testereli böcek (*Oryzaephilus surinamensis* L. Coleoptera, Silvanidae) popülasyonlarında endosimbiyont bakterilerin moleküler yöntemlerle belirlenmesi. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(1), 126-133.
- Kontsedalov, S., Zchori-Fein, E., Chiel, E., Gottlieb, Y., Inbar, M. & Ghanim, M. (2008). The presence of Rickettsia is associated with increased susceptibility of Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 64(8), 789-792.
- Kramer, T. & Nauen, R. (2011). Monitoring of spiroticlofen 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. doi:10.1002/ps.2184.
- Li, Y., Liu, X. & Guo, H. (2018). Variations in endosymbiont infection between buprofezin-resistant and susceptible strains of Laodelphax striatellus (Fallén). *Current Microbiology*, 75(6), 709-715. doi:10.1007/s00284-018-1436-x
- Liu, X.D. & Guo, H.F. (2019). Importance of endosymbionts Wolbachia and Rickettsia in insect resistance development. *Current Opinion in Insect Science*, 33, 84-90. doi:10.1016/j.cois.2019.05.003
- Lo, N., Paraskevopoulos, C., Bourtzis, K., O’Neill, S.L., Werren, J.H., Borndestein, S.R. & Bandi, C. (2007). Taxonomic status of the intracellular bacterium Wolbachia pipientis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), 654-657. doi:10.1099/ijs.0.64515-0
- Merçot, H. & Poinso, D. (2009). Infection by Wolbachia: from passengers to residents. *Comptes Rendus Biologies*, 332(2-3), 284-297. doi:10.1016/j.crv.2008.09.010

- Miresmailli, S. & Isman, M.B. (2006). Efficacy and persistence of rosemary oil as an acaricide against two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) on greenhouse tomato. *Journal of Economic Entomology*, 99, 2015–2023.
- Oliver, K.M., Degnan, P.H., Burke, G.R. & Moran, N.A. (2010). Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 247-266.
- Perotti, M.A. & Braig, H.R. (2005). Endosymbionts of Acari. *Phytophaga*, 14, 457-474.
- Pina, T., Sabater-Muñoz, B., Cabedo-López, M., Cruz-Miralles, J., Jaques, J.A. & Hurtado-Ruiz, M.A. (2020). Molecular characterization of Cardinium, Rickettsia, Spiroplasma and Wolbachia in mite species from citrus orchards. *Experimental and Applied Acarology*, 81(3), 335-355. doi:10.1007/s10493-020-00508-z
- 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. doi:10.1016/S0048-3575(02)00150-5
- Rose, R.L. Barbhuiya, L., Roe, R., Rock, G. & Hodgson, E. (1995). Cytochrome p450-associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in Heliothis virescens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 51(3), 178-191. doi:10.1006/pest.1995.1018
- Sapp, J. (1994). *Evolution by Association: a History of Symbiosis*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Sazama, E.J., Ouellette, S.P. & Wesner, J.S. (2019). Bacterial endosymbionts are common among, but not necessarily within, insect species. *Environmental Entomology*, 48(1), 127-133. doi:10.1093/ee/nvy188
- Shen, S.K. & Dowd, P.F. (1991). Detoxification spectrum of the cigarette beetle symbiont Symbiotaphrina kochii in culture. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 60(1), 51-59. doi:10.1111/j.1570-7458.1991.tb01522.x
- Sinkins, S.P. & O'Neill, L.S. (2000). Wolbachia as a Vehicle to Modify Insect Populations. In *Insect Transgenesis - Methods and Applications*. (pp. 271-284)
- Stouthamer, R., Breeuwer, J.A. & Hurst, G.D. (1999). Wolbachia pipiensis: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 71-102.
- 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. doi: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. doi:10.1006/pest.2001.2583
- Su, Q., Zhou, X.M., Zhang, Y.J. (2013). Symbiont-mediated functions in insect hosts. *Communicative & Integrative Biology*, 6, e23804. doi:10.4161/cib.23804
- Taylor, M.J., Cross, H.F., Ford, L., Makunde, W.H., Prasad, G.B.K.S. & Bilo, K. (2001). Wolbachia bacteria in filarial immunity and disease. *Parasite Immunol*, 23(7), 401-409. doi:10.1046/j.1365-3024.2001.00400.x
- Türkmen, K. & Koçak, E. (2019). Pirinç biti *Sitophilus oryzae* popülasyonlarında Wolbachia'nın belirlenmesi. *Yalvaç Akademi Dergisi*, 4(1), 23-31.
- Ünal, H. & Koçak, E. (2019). Küçük kırma biti *Cryptolestes ferrugineus* (L.) popülasyonlarında endosimbiyont mikroorganizmaların belirlenmesi. *Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(2), 93-96.
- Vala, F., Egas, M., Breweur, J.A.J. & Sabelis, M.W. (2004). Wolbachia affects oviposition and mating behaviour of its spider mite host. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(3), 692-700. doi:10.1046/j.1420-9101.2003.00679.x
- Vala, F., Weeks, A., Claessen, D., Breeuwer, J.A.J. & Sabelis, M.W. (2002). Within- and between-population variation for Wolbachia-induced reproductive incompatibility in a haplodiploid mite. *Evolution*, 56(7), 1331-1339. doi:10.1111/j.0014-3820.2002.tb01447.x
- 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(8), 563-572. doi:10.1016/j.ibmb.2010.05.008
- Van Leeuwen, T., Pottelberge, S.V. & Tirry, L. (2005). Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science*, 61(5), 499-507. doi:10.1002/ps.1001
- Van Leeuwen, T.V., Tirry, L. & Nauen, R. (2006). Complete maternal inheritance of bifenazate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and its implications in mode of action considerations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(11), 869-877. doi:10.1016/j.ibmb.2006.08.005
- 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. doi:10.1016/j.pestbp.2014.12.009

- Van Pottelberge, S., Khajehali, J., Van Leeuwen, T. & Tirry, L. (2009a). Effects of spiroadiclofen on reproduction in a susceptible and resistant strain of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 47(4), 301-309. doi.org/10.1007/s10493-008-9226-y
- Van Pottelberge, S., Van Leeuwen, T., Khajehali, J. & Tirry, L. (2009b). Genetic and biochemical analysis of a laboratory-selected spiroadiclofen-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 65(4), 358-366. doi:10.1002/ps.1698
- Weiss, B. & Aksoy, S. (2011). Microbiome influence on insect host vector competence. *Trends in Parasitology*, 27, 514-522. doi:10.1016/j.pt.2011.05.001
- Werren, J.H. (1997). Biology of wolbachia. *Annual Review of Entomology*, 42, 587-609.
- Werren, J.H., Zhang, W. & Guo, L.R. (1995). Evolution and phylogeny of Wolbachia: reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society B*, 261(1360), 55-71. doi:10.1098/rspb.1995.0117
- Xie, R.R., Chen, X.L. & Hong, X.Y. (2011). Variable fitness and reproductive effects of Wolbachia infection in populations of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch in China. *Applied Entomology and Zoology*, 46(1), 95-102. doi:10.1007/s13355-010-0014-x
- Yaman, M.O. & Koçak, E. (2019). Piriñ biti sitophilus oryzae (L.) popölasyonlarında endosimbiont mikroorganizmaların belirlenmesi. *Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(sp2), 82-85. doi:10.24925/turjaf.v7isp2.82-85.3150
- Zélé, F., Weill, M. & Magalhães, S. (2018). Identification of spider-mite species and their endosymbionts using multiplex PCR. *Experimental and Applied Acarology*, 74(2), 123-138. doi:10.1007/s10493-018-0224-4
- Zhang, Y.K., Zhang, K.J., Sun, J.T., Yang, X.M., Ge, C. & Hong, X.Y. (2013). Diversity of Wolbachia in natural populations of spider mites (genus *Tetranychus*): evidence for complex infection history and disequilibrium distribution. *Microbial Ecology*, 65(3), 731-739. doi:10.1007/s00248-013-0198-z
- Zhang, Z. (2003). *Mites of Greenhouses: Identification Biology and Control*. CABI Publishing, Wallingford, 828 p.
- Zientz, E., Dandekar, T. & Gross, R. (2004). Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 745-770. doi:10.1128/MMBR.68.4.745-770.2004.

ÖZGEÇMİŞ

