



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**EGE BÖLGESİ MARUL ÜRETİM
ALANLARINDA *Nasonovia ribisnigri* (Mosley)
(Hemiptera: Aphididae)
POPÜLASYONLARININ BAZI
İNSEKTİSİTLERE KARŞI DİRENCİNİN
BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

DUYGU UYSAL

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

İZMİR
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**EGE BÖLGESİ MARUL ÜRETİM
ALANLARINDA *Nasonovia ribisnigri* (Mosley)
(Hemiptera: Aphididae)
POPÜLASYONLARININ BAZI
İNSEKTİSİTLERE KARŞI DİRENCİNİN
BELİRLENMESİ**

DUYGU UYSAL

DANIŞMANLAR: PROF. DR. ENVER DURMUŞOĞLU
DOÇ. DR. NURPER GÜZ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
ENTOMOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İZMİR
2020

Duygu UYSAL tarafından doktora tezi olarak sunulan “Ege Bölgesi Marul Üretim Alanlarında *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae) Popülasyonlarının Bazı İnsektisitlere Karşı Direncinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma Ege Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 24.12.2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Enver DURMUŞOĞLU

Raportör Üye : Prof. Dr. Ferit TURANLI

Üye : Prof. Dr. Recep AY

: Prof. Dr. Yusuf KARSAVURAN

: Doç. Dr. Sibel YORULMAZ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Ege Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Ege Bölgesi Marul Üretim Alanlarında *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae) Popülasyonlarının Bazı İnsektisitlere Karşı Direncinin Belirlenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

24 / 12 / 2020

Duygu UYSAL

ÖZET**EGE BÖLGESİ MARUL ÜRETİM ALANLARINDA *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae) POPÜLASYONLARININ BAZI İNSEKTİSİTLERE KARŞI DİRENCİNİN BELİRLENMESİ**

UYSAL, Duygu

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Enver DURMUŞOĞLU

Doç. Dr. Nurper GÜZ

24 Aralık 2020, 106 sayfa

Marul üretiminde sorun olan zararlılardan en önemlilerinden biri de yaprakbitleridir. Yaprakbitlerinin yaşam döngülerinin kısa olması ve hızlı üreme gücüne sahip olmaları nedeniyle sıkça sentetik insektisit kullanılmakta, etki mekanizması aynı olan insektisitlerin yaygın ve yoğun kullanımı sonucunda da direnç gelişimi gözlenebilmektedir.

Çalışmada öncelikle Ege Bölgesi'nde marul üretim alanlarında en yaygın görülen yaprakbiti türü *Nasonovia ribisnigri* olarak belirlenmiş ve belirlenen türün acetamiprid, thiamethoxam, clothianidin ve spirotetramat aktif maddelerine hassasiyetleri biyoassay yöntemlerle araştırılmıştır. Eşik doz uygulanan 70 farklı arazi popülasyonunda en yüksek duyarlılık azalışı 2.38 kat ile acetamiprid aktif maddesine karşı İzmir ili, Menemen ilçesi, İğnedere bölgesinden getirilen popülasyonda belirlenmiştir. Dikkate değer düzeyde direnç tespit edilemediğinden *N. ribisnigri*'nin bazı arazi popülasyonlarının geriye ve ileriye seleksiyonuyla daha hassas ve daha dirençli popülasyonları elde edilmiş, bu popülasyonların RNA izolasyonu yapılmış, gen dizilimleri belirlenip hassas ve dirençli popülasyonlar arasındaki gen farklılıkları ortaya konulmuştur.

Anahtar sözcükler: *Nasonovia ribisnigri*, insektisit direnci, total RNA izolasyonu

ABSTRACT**DETERMINATION OF RESISTANCE OF *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae) TO SOME INSECTICIDES IN LETTUCE PRODUCTION AREAS OF AEGEAN REGION**

UYSAL, Duygu

Ph.D in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Enver DURMUŞOĞLU

Assoc. Prof. Dr. Nurper GÜZ

24 December 2020, 106 pages

One of the most important pests in lettuce production is aphids. Because of the short life cycles of aphids and their rapid reproductive power, synthetic insecticides are frequently used and resistance development can be observed as a result of the widespread and intensive use of insecticides with the same mechanism of action.

In the study, the sensitivity of *Nasonovia ribisnigri* populations, which is a species of aphid that is seen extensively in lettuce production areas in Aegean Region, to acetamiprid, thiamethoxam, clothianidin and spirotetramat active substances was investigated by bioassay methods. In 70 different populations where threshold dose was applied, the highest sensitivity decrease was determined with 2.38 times in the population brought from İzmir province, Menemen district, İğnedere region against acetamiprid active substance.

Since a remarkable level of resistance could not be detected, more sensitive and more resistant populations of *N. ribisnigri* were obtained by backward and forward selection of some land populations, RNA isolation of these populations was made, gene sequences were determined and gene differences between sensitive and resistant populations were revealed.

Keywords: *Nasonovia ribisnigri*, insecticide resistance, total RNA isolation

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2017-2020 yılları arasında Ege Bölgesi marul yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı İzmir, Muğla ve Manisa illerinde yürütülmüştür. Amaç, marulda en yaygın görülen yaprakbiti türü mücadelesinde sıkça kullanılan insektisitlere direnç gelişimini belirlemek, hassas ve dirençli popülasyonlardan RNA izolasyonu sonrası moleküler çalışmalar ile gen dizilimlerini karşılaştırılıp dirençten sorumlu gen bölgelerini ortaya koymaktır.

Marulda zarar meydana getiren birçok zararlı olmakla birlikte, yaprakbitleri bunların başında gelmektedir. Ege Bölgesi'nde marul üretim alanlarından sezon boyunca alınan örneklerin teşhis sonuçlarına göre bölgede hâkim yaprakbiti türünün *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae) olduğu belirlenmiştir. Yaprakbitleri yaşam döngülerinin kısa olması, hızlı üreme gücüne sahip olmaları ve davranışsal özellikleri gereği, marul bitkisinin iç kısmında beslendikleri için kontak etkili ilaçlarla kimyasal mücadeleleri oldukça zor olmaktadır.

Bu tez çalışmasında hassas popülasyon ile belirlenen ayırıcı dozlar kullanılarak, Ege Bölgesi marul üretim alanlarından toplanan 70 popülasyonda neonicotinoidlere direnç durumu belirlenmeye çalışılmış ve dikkate değer bir direnç sorunu tespit edilmemiştir. Hassas popülasyon yurt dışından temin edilemediğinden, pestisit uygulamalarının yapılmadığı bilinen Foça'daki bir marul tarlasından alınan bireylerden, geriye seleksiyon ile mevcut halinden yaklaşık 7 kat daha hassas bir popülasyon elde edilmiştir. Ayırıcı doz uygulanmış arazi popülasyonları içinde sadece Menemen-İğnedere popülasyonunda direnç olasılığı düşünüldüğünden bir tek bu popülasyonlarla LC çalışmaları yürütülmüş, hassas popülasyon LC değerleri ile bu popülasyonun LC değerleri kıyaslanarak direnç katsayıları ortaya konulmuştur.

Dikkate değer düzeyde direnç tespit edilemediği için Menemen-İğnedere popülasyonuna uygulanan ayırıcı doz uygulaması sonrasında canlı kalan bireylerle ileriye seleksiyon yöntemi ile hassas popülasyondan yaklaşık 50 kata kadar daha dirençli bir popülasyon elde edilerek moleküler çalışmalara geçilmiş, hassas ve dirençli bu iki popülasyonda total RNA analizi yapılarak gen dizilimleri belirlenmiş

ve her iki popülasyon arasındaki genetik farklılıklar ortaya konularak dirençten sorumlu gen bölgeleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

İZMİR

24/12/2020

Duygu UYSAL



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK	ii
KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 Dünyada ve Türkiye’de Marul Yetiştiriciliği	7
2.2 <i>Nasonovia ribisnigri</i> Hakkında Genel Bilgiler.....	10
2.3 İnsektisitlere Direnç.....	12
2.3.1 Direnç mekanizmaları ve direnç ile ilgili enzimler	13
2.3.2 Direnci tespit etme yöntemleri.....	17
2.3.2.1 Biyoassay testler	17

İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>Sayfa</u>
2.3.2.2 Biyokimyasal çalışmalar.....	19
2.3.2.3 Moleküler çalışmalar	20
2.4 Önceki Çalışmalar	20
2.4.1 İnsektisitlere direnç ile ilgili dünyada yapılan çalışmalar	20
2.4.2 Türkiye’de insektisit direnci konusunda yapılan çalışmalar	23
2.4.3 <i>Nasonovia ribisnigri</i> ile yapılan direnç çalışmaları.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1 Gereç.....	29
3.2 Yöntem	28
3.2.1 Ege Bölgesi marul üretim alanlarında yaygın yaprakbiti türünün belirlenmesi.....	28
3.2.2 Denemelerde kullanılan insektisitler ve seri konsantrasyonları	29
3.2.3 Hassas popülasyon oluşturulması.....	30
3.2.3.1 Konukçu bitki üretimi.....	30
3.2.3.2 Foça popülasyonunda LC çalışması	31
3.2.3.3 Geriye seleksiyon ile hassas popülasyon oluşturulması	34
3.2.3.4 Hassas popülasyonda LC değerlerinin ve ayırıcı dozun belirlenmesi	35
3.2.4 <i>Nasonovia ribisnigri</i> popülasyonlarının yaygın kullanılan insektisitlere	

direncinin belirlenmesi	36
3.2.4.1 Arazi popülasyonlarının toplanması ve kültüre alınması	36
3.2.4.2 Arazi popülasyonlarına ayırıcı doz uygulamaları ve dirençli popülasyonların belirlenmesi	37
3.2.4.3 LC çalışması ve direnç oranının belirlenmesi	39
3.2.5 Dirençli popülasyon oluşturulması	39
3.2.5.1 İleriye seleksiyon ile dirençli popülasyon oluşturulması.....	39
3.2.5.2 Dirençli popülasyonda LC değerlerinin belirlenmesi.....	40
3.2.6 Moleküler çalışmalar	40
3.2.6.1 RNA izolasyonu.....	40
3.2.6.2 Elde edilen RNA'ların spektrofotometrede ölçümü	41
3.2.6.3 Elde edilen RNA'ların agaroz jelde görüntülenmesi.....	41
3.2.6.4 RNA kalite kontrolü, RNA-seq kütüphane hazırlanması için transkriptom dizileme.....	42
3.2.6.5 Biyoinformatik veri analizi.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1 Yaygın Türün Belirlenmesi	44
4.2 Hassas Popülasyon Eldesi ile İlgili Bulgular.....	44
4.2.1 Foça popülasyonunun LC değerleri.....	44
4.2.2 Geriye seleksiyon denemesi bulguları	46

İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>Sayfa</u>
4.2.3 Hassas popülasyonun LC değerleri ve ayırıcı doz.....	47
4.3 <i>Nasonovia ribisnigri</i> Popülasyonlarının Yaygın Kullanılan İnsektisitlere Direnci ile İlgili Bulgular.....	51
4.3.1 Arazi popülasyonlarına ayırıcı doz uygulama sonuçları	51
4.3.2 Menemen-İğnedere popülasyonunun LC değerleri	53
4.4 Dirençli Popülasyonun Eldesi İle İlgili Bulgular	57
4.4.1 İleriye doğru seleksiyon denemesi bulguları	57
4.4.2 Dirençli popülasyonda LC değerleri.....	59
4.5 Moleküler Çalışmaların Verileri.....	61
4.5.1 Jel elektroforez görüntüsü ve nanodrop verileri	61
4.5.2 Transkriptom analiz sonuçları	61
4.5.2.1 Ham verilerin eldesi ve RNA sekans analizleri.....	61
4.5.2.2 Transkriptom yapılandırması.....	61
4.5.2.3 Transkriptom uzunluk dağılımı	66
4.5.2.4 <i>Nasonovia ribisnigri</i> gen analiz sonuçları	68
4.5.2.5 Nicel sonuçlar	69
4.5.2.6 Diferansiyel gen ekspresyon verileri	70
4.5.2.7 SSR Primer tasarımı	72

4.5.2.8 Gen Mutasyonu.....	72
5.TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	77
TEŞEKKÜR	85
ÖZGEÇMİŞ.....	86



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. 2019 yılında dünyada en çok marul üreten ülkeler ve üretim miktarları .6	
2.2 2019 yılında Türkiye’de marul çeşitlerinin ekim alan ve üretim miktarları	7
2.3 <i>Nasonovia ribisnigri</i> kanatlı ve kanatsız ergin bireyleri	10
2.4 <i>Nasonovia ribisnigri</i> yayılışı	11
3.1 Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü iklim odaları fındık turpu ve marul üretimi	30
3.2 Stok solusyondan hazırlanan seri konsantrasyonlar	34
3.3 Kültür kaplarında <i>N. ribisnigri</i> dişi bireyleri üretimi	35
3.4 Yaprak disklerin ilaçlı suya daldırılması	36
3.5 Yaprakbitlerinin bulaştırılması	36
3.6 Total RNA kit solüsyonları	38
3.7 Solüsyonların mikrosantrifüj tüpüne aktarımı	38
3.8 Spektrofotometrede konsantrasyon ölçümü	39
3.9 Agaroz jelde görüntüleme	40
4.1 Jel elektroforez görüntüleri.....	61
4.2 Transkriptlerin ve unigenlerin uzunluk dağılımı	67
4.3 Benzer tür dağılım grafiği	68

4.4	Farklı koşullar altında gen ekspresyon seviyeleri	69
4.5	Örnekler arasındaki korelasyon eğrisi	70
4.6	Farklı şekilde ifade edilen genlerin taranması.....	71



TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 2016 yılında Ege Bölgesi marul üretim alanlarından toplanan yaprakbiti örnekleri.....	30
3.2 Biyoassay çalışmalarda kullanılan doz serileri.....	32
3.3 Ege Bölgesi marul üretim alanlarından toplanan <i>N.ribisnigri</i> popülasyonları.....	35
4.1 Ege bölgesi marul üretim alanlarından toplanan yaprakbiti türleri teşhis sonuçları.....	43
4.2 Hassas popülasyondan elde edilen 50 farklı koloniye her aktif madde için LC10 uygulaması sonrası ölü birey sayıları.....	45
4.3 Foça popülasyonu ile 33 ve 13 nolu kolonilerinin aktif madde uygulamalarının sonrasında LC değerleri ve direnç oranları	45
4.4 Ege Bölgesi farklı marul ekiliş alanlarından toplanan arazi popülasyonlarında eşik doz uygulamaları sonrası ölü birey sayıları (n:50)	49
4.5 Hassas, MEN-5 ve FET-1 arazi popülasyonlarının acetamiprid LC değerleri	47
4.6 Hassas, MEN-5 ve FET-1 arazi popülasyonlarının thiamethoxam LC değerleri	48
4.7 Hassas, MEN-5 ve FET-1 arazi popülasyonlarının spirotetramat LC değerleri	54
4.8 Hassas, MEN-5 ve FET-1 arazi popülasyonlarının clothianidin LC değerleri	55

TABLOLAR DİZİNİ (devamı)

Tablo	Sayfa
4.9 MEN-5 popülasyonu kolonilerine eşik doz uygulamaları sonrası ölü birey sayıları (n:80)	56
4.10 Dirençli kolonilere 2 kat eşik doz uygulamaları sonrası ölü birey sayıları (n:40).....	57
4.11 K-3 kolonisine her aktifle seleksiyon yöntemi uygulamaları (n=100)	57
4.12 MEN-S ₇ popülasyonuna aktif maddelerin uygulanması sonrasında LC değerleri ve direnç katsayıları.....	59
4.13 İllumina sekans tanımlamaları	62
4.14 Farklı uzunluk aralıklarındaki transkript ve unigenlerin sayısı	66
4.15 Transkriptlerin ve unigenlerin uzunluk dağılımı	66
4.16 <i>N.ribisnigri</i> veritabanına göre bir kısım gen bölgeleri	67
4.17 Referans hizalama.....	68
4.18 Farklı ekspresyon seviyelerindeki gen aralıkları	68
4.19 Farklı olarak ifade edilen genler	70
4.20 İleri ve geri dizi primer tasarım	72
4.21 Tek bir nükleotid polimorfizmi sonuçları.....	72
4.22 Tek bir nükleotid polimorfizmin karakterizasyonu	72

1. GİRİŞ

Beslenmede sadece hayvansal kaynaklı besinleri tüketmek yeterli ve dengeli beslenmemizi sağlamaz. Enzimler, vitaminler, mineraller ve antibiyotik maddelere de beslenmemizde yer vermemiz gerekir. Bu maddelerin en iyi karşılandığı kaynaklar ise bitkisel kaynaklı gıdalardır. Sebzeler değişik miktarlarda karbonhidrat, protein, yağ, selüloz, vitamin, hormon ve mineraller gibi birçok maddeyi ihtiva eder. Sebzeler içerisinde ise marul, dünya genelinde üretimi yaygın olarak yapılan ve salata malzemesi olarak tüketimi gerçekleştirilen, ekonomik değeri yüksek bir sebzedir. İklim koşullarına göre tarla ya da örtü altında yaz-kış üretildiğinden Ege Bölgesi'nde haziran-ağustos dönemi hariç, genellikle ikinci ya da üçüncü ürün olarak yetiştirilmektedir (Eşiyok, 2012). Üretimi tüm yıl içerisinde yapılabildiği için, farklı sebzeler ile kolaylıkla münavebeye girebilmektedir (Yıldırım vd., 2015). Dünyada üretim alanı 1 milyon 200 bin ha olan marul bitkisinin, üretim miktarı ise 25 milyon tondur. Çin marul üretiminde 12 milyon ton ile ilk sırayı alırken, Türkiye ise 215 bin da alanda toplam 487 bin ton üretim ile 4. sırada yer almaktadır (TUİK, 2019). Ülkemizde marul üretimi Ege, Akdeniz ve Marmara Bölgeleri'nde yoğun olarak yapılmaktadır. Ege Bölgesi'nde yaklaşık 43 bin ton göbekli marul, 13 bin ton kıvrıkcık marul ve 6 bin ton iceberg marul üretilmektedir. Bölgede en yoğun olarak marul üretimi 12 bin da alanda 27 bin ton ile İzmir'de, daha sonra 7 bin da alanda 13 bin tonla Muğla'da ve 4 bin da alanda 7 bin tonla Manisa'da yapılmaktadır (TUİK, 2019).

Dünyada ve ülkemizde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan bu kültür bitkisinin üretimini ve verimi olumsuz yönde etkileyen bakteriyel, fungal ve viral hastalık etmenlerinin yanında, başta yaprakbiti olmak üzere birçok zararlı tür de bulunmaktadır. Yaprakbitleri çıkardıkları tatlımsı maddeler sonucu fumajin oluşumuna sebep oldukları gibi, bitki öz suyunu emerek yaprak ve sürgünlerin kıvrılmasına da neden olurlar (TAGEM, 2008). Yoğun popülasyonların bulunduğu bitkilerde solunum ve fotosentez faaliyetlerini engelleyerek bitki gelişiminin gerilemesine ve bazı bitki virüslerini taşıyarak da dolaylı olarak zarara yol açarlar (Petitt and Smilowitz, 1982).

Ülkemizde günümüze kadar marul hastalık ve zararlılarını belirlemek amacıyla birçok çalışma yürütülmüştür. Bölgede konu ile ilgili ilk araştırma Fidan ve Türkoğlu (1984), tarafından Ege Bölgesi marul bitkilerinde görülen virüs hastalıkları üzerine yaptıkları bir çalışmadır. Bu çalışmada marul bitkilerinden toplanan *Myzus persicae* (Sulz.), *Acyrtosiphon lactucae* (Passerini) ve *Ureleucon cichorii* (Koch) (Hemiptera: Aphididae) türleri vektör böcekler olarak saptanmıştır. Zeren (1989), Çukurova Bölgesinde sebzelerde zararlı olan yaprakbitleri, konukçuları, zararları ve doğal düşmanları üzerine yaptığı çalışmada Aphididae familyasından 11 cinse bağlı 18 tür saptamıştır. Marul üzerinde *Aphis craccivora* (Koch), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae), *A. lactucae*, ve *M. persicae* olmak üzere 4 farklı türün bulunduğunu bildirmiştir. Erkılıç vd., 1999, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yaprakbitlerinde bulunan fungal hastalık etmenlerinin belirlenmesi amacıyla 1992-1996 yılları arasında yaptıkları çalışmada yaygın olarak belirlenen fungus türünün *Fusarium subglutinans* olduğunu bildirirken, bu sürveylerde marul üzerinde ilk defa *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae)'nin bulunduğu bildirilmiştir. *N. ribisnigri*'nin ülkemizde varlığı ilk kez bu çalışma ile rapor edilmiştir. Bölgede yürütülen bir diğer çalışma ise Yaşarakıncı ve Hıncal (2000), tarafından örtüaltında yetiştirilen sebzelerde entegre mücadele konulu projedir. Bu proje ile Ege Bölgesi'nde yaprakbitlerinin marulda ciddi olarak sorun olduğu saptanmış ve farklı mücadele yöntemlerinin uygulandığı entegre mücadele yönetimi ile bu zararlı baskı altına alınmaya çalışılmıştır. Doğu Akdeniz Bölgesinde Toros vd. (2002), yaptıkları çalışmalarda marulda en yaygın yaprakbiti türlerinin *M. persicae*, *N. ribisnigri* ve *A. lactucae* olduklarını bildirmiştir. İzmir'de yapılan bir başka çalışmada ise örtüaltı organik sebze üretiminde topraküstü zararlıların durumu incelenmiş ve marulda sadece yaprakbiti türlerinden *M. persicae* saptanmıştır (Günca vd., 2010). Doğu Akdeniz Bölgesi marul ekiliş alanlarında zararlı olan yaprakbiti türleri, bulaşıklık oranları, popülasyon gelişmesi ve uçuş aktivitelerinin belirlendiği bir çalışmada ise marulda *N. ribisnigri*'nin en sık rastlanılan yaprakbiti türü olduğu bildirilmiştir (Sangün ve Satar, 2012).

Yapılan çalışmalara bakıldığında marulda zararlı görülen yaprakbiti türlerinden biri de *N. ribisnigri*'dir. Bu zararlı türün marul bitkisinin iç kısmında

beslenmesi, yaşam döngüsünün kısa olması ve hızlı üreme gücüne sahip olması nedeniyle kontak etkili ilaçlarla kimyasal mücadeleleri oldukça zor olmaktadır (Liu, 2004). Kimyasal savaşta başarısızlık görülmesi sebebiyle aşırı dozda ve sık ilaçlama yapılmakta, bu da direnç gelişiminin görülmesine neden olmaktadır. Avrupa’da marulda birçok yaprakbiti popülasyonunun karbamatlılar, organik fosforlular, sentetik piretroitlerden birçok insektisite karşı direnç gösterdiği bilinmektedir (Rufingier et al., 1997; Barber et al., 1999).

Uluslararası bir kuruluş olan IRAC (İnsektisit Direnç Komitesi), insektisit direncini “bir zararlıya karşı etiket ve prospektüs yönergeleri doğrultusunda kullanılan bitki koruma ürününün, uygulama sonrasında ortaya çıkan ve tekrar eden başarısızlık durumu ve bu yolla zararlı popülasyonu hassasiyeti üzerindeki nesilden nesile aktarılan değişim” olarak (IRAC, 2020a) tanımlamakta iken, EPPO (Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonu) ise “tarla koşullarında doğal olarak ortaya çıkan, normal koşullarda etkili olan bitki koruma ürünü uygulamasında, hedef popülasyon içindeki bireylerin yaşamlarını sürdürme yeteneklerindeki kalıtsal değişim” şeklinde (EPPO, 2020) açıklamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ise, insektisitlere direncini 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 (WHO, 2020) tanımlamıştır. Direnci tespit etmek için birçok farklı yöntem geliştirilmiştir. Bir popülasyonda direncin varlığı IRAC tarafından yayınlanan, geleneksel standart biyoassay yöntemler kullanılarak ve biyokimyasal, immünolojik ve moleküler yöntemler ile tespit edilebilir (IRAC, 2020b). Dünyada özellikle son 30 yıldır insektisitlere direnç konusunda gerek biyokimyasal olarak ve gerekse moleküler biyoloji alanında oldukça detaylı araştırmalar yapılmaktadır.

Günümüzde 600’e yakın böcek ve akar türünün çeşitli ilaçlara karşı direnç geliştirmiş olduğu kaydedilmektedir (IRAC, 2020b). Bu konu ile ilgili ülkemizde ilk direnç çalışmasında Ege Bölgesi’nde tütünlerde görülen *M. persicae*’nin ethyl parathion’a karşı dirençli olduğu belirlenmiştir (Öden, 1969). Daha sonra Polat vd., (1973)’nin yaptığı araştırmada, Karadeniz bölgesinde yine tütün yetiştirilen alanlarda organikfosforlu insektisitlere karşı *M. persicae*

bireylerinde direnç durumunun varlığı araştırılmış ve herhangi bir direnç gelişimi saptanmamıştır. Zümreoğlu (1978), Aydın, Balıkesir, Çanakkale, İzmir ve Manisa illerinden topladığı *M. persicae* popülasyonlarının ethyl ve methyl parathion ile methamidophos'a duyarlılık durumlarını incelediği laboratuvar denemelerinde, yaprakbitlerinin özellikle methyl parathion'a direnç kazandığını belirlemiştir. Velioğlu ve Toros (2006), İzmir, Antalya, Ankara ve İçel'den toplanan *M. persicae* popülasyonlarına yaprak daldırma yöntemi ile deltamethrin, pirimicarb ve diazinon uygulayarak tüm popülasyonların LC değerlerini belirlemiştir. Hassas popülasyon ile karşılaştırılarak bulunan dayanıklılık oranlarından elde edilen biyoassay sonuçları pirimicarb'a karşı oldukça yüksek düzeyde dayanıklılık bulunduğunu ortaya koymuştur. Yapılan bir diğer çalışmada ise, *M. persicae* 'nin 6 farklı popülasyonunda direnç mekanizmalarının biyokimyasal yöntemler kullanılarak insektisitlere direnç ile ilişkili olan karboksilesteraz enzimi spektrofotometre ve elektroforez ile incelenmiştir (Velioğlu ve Toros, 2006). Neonikotinoidlerin *M. persicae*'deki direnç durumlarının belirlenmesi amacıyla ilk kez yürütülen bir çalışmada bu grup insektisitlere karşı oldukça yüksek direnç oranlarının bulunduğu tespit edilmiştir (Velioğlu vd., 2007). Böcek vücudunda bulunan esteraz, glutatyon S-transferaz ve P450 monooksijenaz gibi bazı detoksifikasyon enzimlerinin aktivitelerinin artışlarının direnç gelişimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Yorulmaz ve Ay, 2009). Yapılan çalışmalar incelendiğinde ülkemizde yaprakbitlerinde gelişen insektisit direnci konusunda, daha çok *M. persicae* ile çalışmalar yürütülmüştür.

Dünyada dirençle ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda Moores et al. (1996), üç *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) popülasyonunda insektisitlere direnç düzeyini, toplam esteraz aktivitesini ve insektisit tarafından inhibe edilen asetilkolin esteraz (AChE)'nin duyarlılık durumunu incelemiştir. Farklı esteraz ile AChE kombinasyonlarına sahip olduğu tespit edilen *A. gossypii* popülasyonlarındaki modifiye AChE'in, organikfosforlu ve karbamatlı insektisitlere direncin ana mekanizması olduğu da belirlenmiştir. İspanya ve Fransa'dan toplanan *N. ribisnigri* popülasyonlarının direnç oluşumu 5 insektisitle (endosülfan, deltamethrin, pirimicarb, methomyl ve acephate) biyoassay yöntemleri uygulanarak gözlenen endosülfan ve pirimicarba yüksek

oranda direnç saptanmıştır (Rufinger et al., 1997). Rufingier et al., (1999) 'da Fransa'da yapılan bir çalışmada *N. ribisnigri*'nin pirimicarb ve endosülfan'a karşı oluşan direnç mekanizmaları biyoassay yöntemler ile incelenmiş, direnç gösteren popülasyonlar için biyokimyasal çalışma yapılarak pirimicarba karşı oluşan direncin asetilkolinesteraz enziminden, endosülfana karşı oluşan direncin glutatin-S transferaz (GST) enziminden kaynaklandığı belirtilmiştir. Ffrench-Constant (1999), insektisit direncinin moleküler genetiği üzerine yapılan çalışmaların, nokta mutasyonların üç temel insektisidin hedefi olan molekülleri (Rdl Gama-Aminobütrik asit reseptör, para voltaj kapılı sodyum kanalı ve böcek asetilkolinesteraz) kodlayan genlerde hedef yeri duyarsızlığına neden olduklarını ortaya koyduğunu belirtmektedir. Foster et al. (2003), 1997 ile 2000 yılları arasında tarla ve örtü altı yetiştiriciliğinin yapıldığı sebze alanlarından topladıkları bireylere biyoassay yöntemleri uygulamışlardır. Neonikotinoidli bileşiklerden imidacloprid, acetamiprid ve nitenpyramın *M. persicae* popülasyonlarındaki direnç durumunu araştırmışlar ve bu aktif maddelere karşı direncin bilinen direnç mekanizmalarından kaynaklanmadığını belirlemişlerdir. Kasai et al., (2004), sitokrom P450 monooksijenazların birçok bileşiğin katalizasyonunda görevli olduğunu ve en önemli rollerinin piretroit insektisitler de dâhil olmak üzere birçok insektisidin detoksifikasyonu veya aktivasyonu olan önemli metabolik enzimler olduklarını belirtmektedir. Cassanelli et al., (2005)'a göre dünyada yoğun olarak insektisit kullanımı sonucunda seleksiyon baskısından dolayı *M. persicae*'de insektisit direnç mekanizmaları gelişmiştir. Coğrafi dağılıma dair bulgular ve bu dirençli fenotiplerin farklılaşp evrim geçirmesinin uygun mücadele programlarının geliştirilmesine yardımcı olacağını savunmuşlardır. Var olan direnç mekanizmaları moleküler anlamda 'knockdown' direnci ve modifiye edilmiş asetilkolinesteraz direncinin varlığını tespit etmeyi imkânlı hale getirmektedir. Çalışmalarında PCR-RFLP tekniğini kullanarak yaprak bitlerinin bireysel ve popülasyon düzeyindeki direnç mekanizmalarını saptamışlardır. Beckhingham et al. (2013), *M. persicae* popülasyonlarında neonikotinoid grubuna ait insektisitlere karşı görülen dirençte nikotinik asetilkolin reseptörlerinin (nAChR) rolünü incelemişler ve neonikotinoid seleksiyonunun olmadığı koşullarda nAChR protein seviyelerinin değişmediğini bildirmişlerdir.

Dünyada özellikle son 30 yıldır insektisitlere direnç konusunda gerek biyokimyasal olarak ve gerekse moleküler biyoloji alanında oldukça detaylı araştırmalar yapılmaktadır. Ülkemizde de son yıllarda bu çalışmalara ağırlık verilmiştir. Ege Bölgesi'nde marulda yaygın görülen yaprakbiti türleri ve kullanılan insektisitlere karşı direnci ile ilgili henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Son yıllarda Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne Ege Bölgesi'nde yaprağı yenen sebzelerle ilgili sorunlar ulaşmıştır. Yapılan arazi gözlemlerinde üreticiler tarafından marul yetiştiriciliğinde özellikle yaprakbitleri ile mücadelede yaygın olarak insektisit uygulandığı, zaman zaman ilaçların mücadelede yetersiz kaldığı bildirilmiştir.

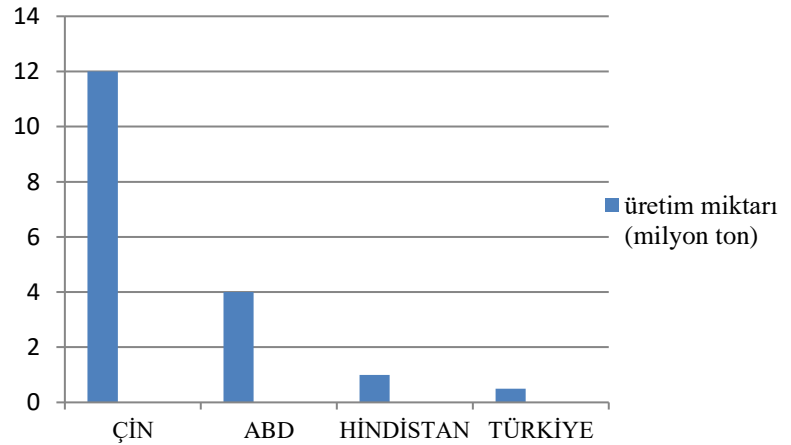
Bu tez projesinde Ege Bölgesi'nde marulda en yaygın görülen yaprakbiti türü üzerinde kullanılan bazı insektisitlere karşı direnç durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için, bölgenin marul yetiştirilen alanlarından yaprakbiti popülasyonları toplanılarak iklim odasında kültüre alınmış, marulda yaygın olarak kullanılan insektisitlerden acetamiprid, thiamethoxam, clothianidin ve spirotetramat'a karşı direnç gelişimi biyoassay yöntemlerle araştırılmıştır. Tez projesinde ayrıca söz konusu aktif maddelere direncin moleküler karakterizasyonunun belirlenmesine de çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Dünyada ve Türkiye’de Marul Yetiştiriciliği

Marul (*Lactuca sativa*), Asteraceae familyasından olan ve anavatanı Avrupa, Asya ve Afrika’yı kapsayan tek yıllık bir bitkidir. Marulun cins adı olan ‘‘Lactuca’’ Latince’de laktik asitten kaynaklanan sütlü anlamına gelmektedir. Tür ismi olan ‘‘sativa’’ ise tohumdan yetiştirilen demektir. İyi bir vitamin kaynağı ve antioksidan özelliğinin yüksek olması sebebiyle dünyada ve ülkemizde bol miktarda tüketilen bir sebzedir. Marul iklim koşullarının elverişli olduğu dönemlerde tarla koşullarında, iklim koşullarının elverişli olmadığı kış aylarında ise örtüaltında yetiştirilen ve vejetasyon süresi oldukça kısa olan bir sebzedir (Eşiyok, 2012).

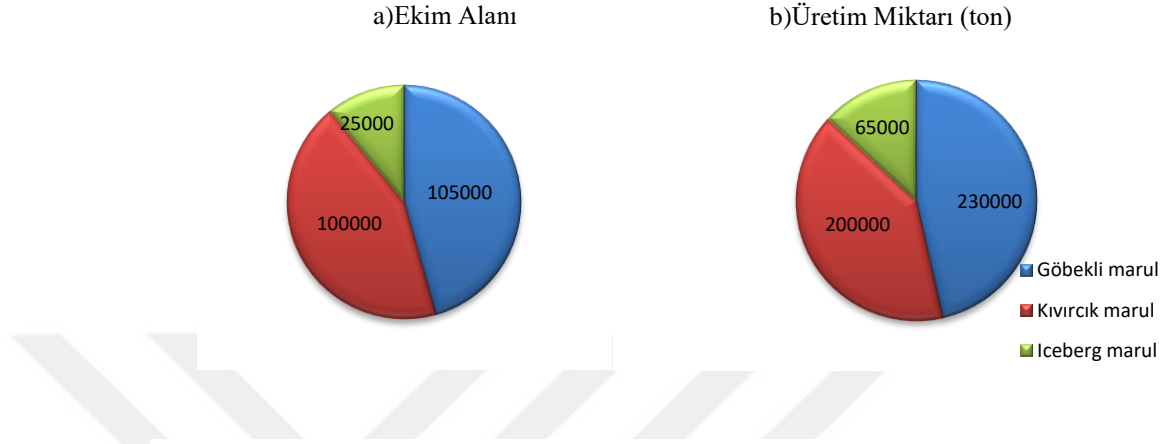
Dünyadaki üretim alanı 1 milyon 200 bin ha olan marul bitkisinin, üretim miktarı ise 25 milyon tondur. Çin dünyada marul üretiminde 12 milyon ton ile ilk sırayı alırken, Türkiye ise 215 bin da alanda toplam 500 bin ton üretim ile 4.sırada yer almaktadır (TUİK, 2019) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 2019 yılında dünyada en çok marul üreten ülkeler ve üretim miktarları (milyon ton).

Marullar yaprak özelliklerine bağlı olarak *Lactuca sativa var. capitata* - göbekli (baş) marullar, *Lactuca sativa var. crispata* - kıvrıkcık yapraklı marullar, *Lactuca sativa var. angustana* - yapraklı marullar olarak çeşitli sınıflara ayrılır.

Ayrıca farklı renklerde de marul çeşitlerinin üretimi yapılmaktadır (Worldatlas, 2020). Türkiye’de yetiştirilen çeşitlere baktığımızda göbekli marul 105 bin da alanda 230 bin ton, iceberg 25 bin da alanda 65 bin ton ve kıvırcık ise 100 bin da alanda 200 bin ton marul üretilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 2019 yılında Türkiye’de marul çeşitlerinin ekim alanı (a) ve üretim miktarları (b).

Ülkemizde marul üretimi Akdeniz ve Ege bölgesinde yoğun olarak yapılmaktadır. Ege Bölgesi’nde yaklaşık 43 bin ton göbekli marul, 13 bin ton kıvırcık marul ve 6 bin ton iceberg marul üretilmektedir. Bölgede en yoğun olarak marul üretimi 12 bin da alanda 28 bin ton ile İzmir’de, daha sonra 7 bin da alanda 13 bin tonla Muğla’da ve 4 bin da alanda 7 bin tonla Manisa’da yapılmaktadır (TUIK, 2019).

Marul nemli ve serin iklim koşullarını seven bir bitkidir. Vegetatif gelişme dönemleri içinde kritik gün uzunluğu ile birlikte günlük ortalama sıcaklığın 18 °C’nin üzerine çıkması bitkilerin çiçek sürgünü oluşturmaya neden olmaktadır. Marulun en iyi yetiştiği toprak tipleri, kumlu tın ve killi tın arasında kalan topraklardır. Yüzeysel köklü olduğu için toprağın 20-30 cm’lik üst kısmının yeterli besin maddesi içermesi gerekir. Toprak, besin maddeleri ve organik maddece zengin olmalıdır. Fazla miktarda su tükettiklerinden, çimlenmeden itibaren hasat edilinceye kadar bol su isterler. İklim şartları ve toprak özelliği dikkate alınarak toprağın devamlı nemli tutulmasına dikkat edilmelidir. Ancak toprakta fazla su kalması da kök çürüklüğüne neden olmaktadır. Bu nedenle hasada yakın dönemde fazla su ve gübreleme yapılmamalıdır (Aybak, 2002).

Marul üretimi birçok zararlı ve hastalık etmenleri tarafından olumsuz yönde etkilenmektedir (Koike et al., 2007). Toprak kökenli hastalık etmenlerinden *Fusarium oxysporum f.sp. lactucae*, *Phoma exigua*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, *Verticillium dahliae*, *Pythium* spp. gibi hastalık etmenleri marullarda solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü gibi hastalıklara sebep olurken, *Microdochium panattonianum*, *Botrytis cinerea*, *Golovinomyces cichoracearum*, *Bremia lactucae* gibi fungal etmenler, gerek fide döneminde gerekse bitkinin ileri vejetasyon döneminde yapraklarda hastalıklara sebep olarak önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır (Dixon, 1984; Smith and Devonshire, 1988; Koike et al., 2007). Marul üretimini ve verimi olumsuz yönde etkileyen önemli bakteriyel hastalık etmenleri arasında bakteriyel yaprak leke etmeni, *Xanthomonas campestris pv. vitians*, *Pseudomonas cichorii* en fazla bildirilen hastalık etmenleridir. Marul yetiştiriciliğinde verim ve kaliteyi azaltan 6 virüs hastalığı bildirilmiştir. Dünyada marulda tespit edilen virüslerin arasında Beet western yellows, Lettuce mosaic, Lettuce dieback, Lettuce big vein, Tomato spotted wilt, Turnip mosaic virüs etmenleri bulunmaktadır (Smith and Devonshire, 1988; Koike et al., 2007).

Hastalık etmenlerinin yanı sıra marulda birçok zararlı türde verim ve kalitede ciddi sorunlara yol açmaktadır. Marulda görülen zararlı etmenlerden başlıcaları ise, beyazsinekler; Sera beyazsineği [*Trialeurodes vaporariorum* (Westw.)] ve Tütün beyazsineği (*Bemisia tabaci* Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae), toprakpireleri; *Phyllotreta* spp., *Epithrix hirtipennis* (Coleoptera: Chrysomelidae), Yaprak galerisinekleri; *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae), tripsler; Tütün tripsi (*Thrips tabaci* Lindeman), Çiçek tripsi (*Frankliniella occidentalis*) (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) ve yaprakbitleri; Pamuk yaprakbiti (*Aphis gossypii* Glover), Bakla yaprakbiti (*Aphis fabae* Scopoli), Şeftali yaprakbiti [(*Myzus persicae*) (Sulzer)], Patates yaprakbiti [(*Macrosiphum euphorbiae*) (Thomas)] ve Marul yaprakbiti (*Nasonovia ribisnigri* Mosley) (Hemiptera: Aphididae). Marulda zarar yapan en önemli zararlılar yaprakbitleri olup, en yaygın olarak görülen tür ise *N. ribisnigri*'dir.

2.2 *Nasonovia ribisnigri* Hakkında Genel Bilgiler

Tanımı ve Biyolojisi: *Nasonovia ribisnigri* (Mosley, 1841) (Hemiptera: Aphididae) nimfleri sarı-yeşil renklerde ve kanatsızdır. Erginleri kanatlı ya da kanatsız bireyler olabilirler. Kanatsız erginleri 2,5 mm uzunluğunda olup üzüksü meyveler gibi primer konukçularında parlak yeşil renkte, marul ve papatyagiller gibi sekonder konukçuları üzerinde ise daha koyu renk ve abdomenin üzerinde koyu renkli bantların yer aldığı bir görünüme dönüşürler. Kanatlı erginleri üzerinde de abdomende siyah lekeler bulunmaktadır (Şekil 2.3). Tarsusun ilk segmentinde 3 adet kıl yer alır. Anten 6 segmentli ve genellikle vücutlarından uzundur (Blackman ve Eastop, 2000).



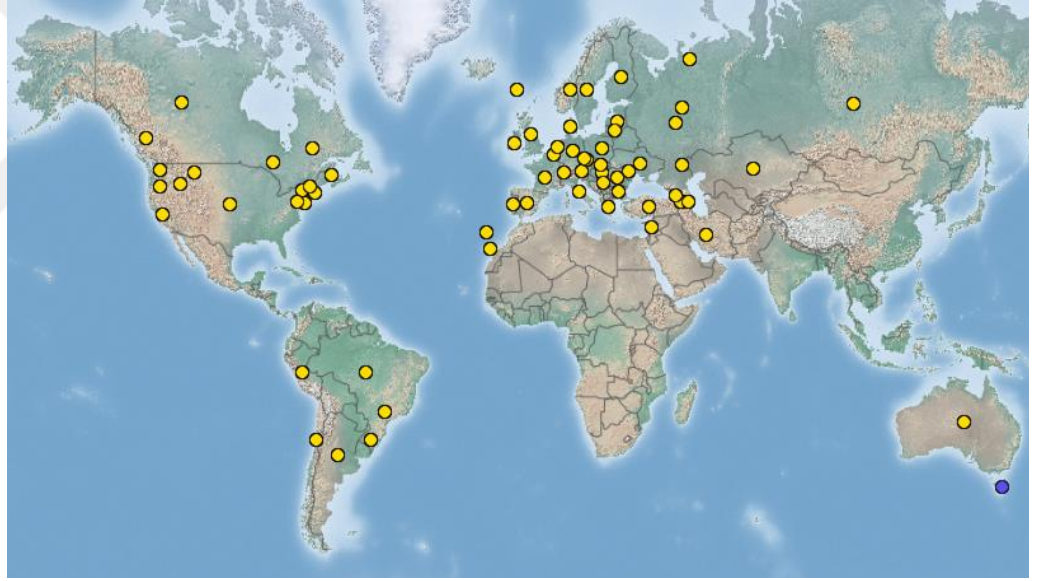
Şekil 2.3 *Nasonovia ribisnigri* kanatlı ve kanatsız ergin bireyleri.

N. ribisnigri'nin ana konukçusu *Ribes spp.*'dir. Ancak sekonder konukçusu marulda da ana zararlı durumunda yaprak altında, çiçek saplarında ve baş içinde beslenmektedir. Kışı yumurta döneminde ana konukçusu üzerinde geçirir (Özdemir, 2004). İlkbaharda yumurtalar açılır ve çıkan nimfler genç bitkilerin yaprak uçlarında koloniler oluşturur. Kanatlı erginler geniş bir alana yayılarak Mayıs ve Haziran aylarında ara konukçularına göç eder ve orada çiftleşme olmaksızın partenogenetik olarak üremeye devam ederler. Dişiler 2-3 hafta yaşar ve günde 3-10 yavru doğururlar. Eylül-Ekim aylarına kadar çok sayıda döl verir ve Kasım ayı itibarıyla yeniden döllenmiş yumurtalarını bırakacakları primer konukçularına göç ederler (EPPO, 2020). Diaz, (2012), popülasyon artışının sıcaklığa bağlı olarak ilkbaharda sonbahara göre daha fazla olduğunu ve ilkbaharda konukçu popülasyonunun da artması ile bu dönem

N. ribisnigri popülasyonunda da artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Mart ayı başında konukçularında görülmeye başlar ve nisan ortasından haziran sonuna kadar zararlı olur. Temmuzda ise yoğunluğu düşer.

Sinonimleri: *Aphis ribisnigri* Mosley, 1841; *Macrosiphum agrostemnum* Theobald, 1913; *Siphonophora alliariae* Koch, 1855; *Submacrosiphum hieracii subsp. teriolanum* Hille Ris Lambers, 1931; *Macrosiphum kaltenbachi* Schouteden, 1906; *Siphonophora polygoni* Buckton, 1876; *Macrosiphum pseudohieracii* Theobald, 1912; *Aphis ribicola* Kaltenbach, 1843; *Myzus ribis* Shinji, 1922; *Myzus ribis* var. *bucktoni* del Guercio, 1894; *Neokakimia vannesii* Stensveh, 1968

Yayılışı: Avrupa, Kuzey Amerika, Güney Amerika, yeni Zelanda ve Avustralya'nın tüm marul üretim alanlarında görülmektedir (Şekil 2.4) (EPPO, 2020).



Şekil 2.4 *Nasonovia ribisnigri*'nin dünyadaki yayılışı.

Konukçuları: Başlıca konukçuları arasında hindiba (*Cichorium endivia*), beyaz hindiba (*Cichorium intybus*), marul (*Lactuca sativa*), tütün, petunya, alp frenk üzümü (*Ribes alpinum*), sarı çiçeklibektaşi üzümü (*Ribes aureum*), siyah beктаşi üzümü (*Ribes nigrum*), kırmızı beктаşi üzümü (*Ribes rubrum*) ve yavşan otu (*Veronica officinalis*) yer almaktadır (Blackman and Eastop, 2006).

Zararı ve Mücadelesi: *N. ribisnigri*, marul yetiştiriciliğinde önemli düzeyde zararlara neden olmaktadır. Bitkiye ilk bulaşmanın özellikle tarla kenarlarında

bulunan yabancı otlardan marul alanlarına geçtiği belirlenmiştir (Morales et al., 2013). Marul bitkisinin daha çok göbek kısmında başlayan zarar daha sonra tüm bitkiyi sarmakta, yapraklarda kıvrılma, sararma, kuruma ve renk değişimi, bitki gelişiminin yavaşlaması veya durmasına neden olabilmektedir. Ayrıca bazı bitki virüs hastalıklarını taşımak suretiyle de dolaylı olarak etkide bulunmaktadır (Lodos, 1982).

Sangün (2012), Doğu Akdeniz bölgesi marul ekim alanlarında zararlı olan Aphididae (Hemiptera) türleri ve bunların mücadelesine yönelik yaptığı çalışmada marul yaprakbitlerine karşı denenilen thiomethoxam, spirotetramat, pymetrozine etken maddeli ilaçlardan ilk ikisinin marul göbek bağlamadan kullanımını ile önce yapılacak bir ilaçlama ile zararlının popülasyon seviyesini ekonomik zarar eşiğinin altında tutabildiğini belirtmiştir. Bu zararlı ile mücadelede öncelikle entegre mücadele kapsamında kültürel önlemler olarak sağlıklı fideler şaşırtılmalı, fidelikte bulaşmayı önlemek amacıyla havalandırma açıklıkları mutlaka tül (462 µm) ile kapatılmalı ve bulaşık bitkiler ile yabancı otlar temizlenmelidir. Predatörlerden, özellikle Coccinellidae, Chrysopidae ve Syrphidae familyalarına ait türler; parazitoitlerden de *Aphidius* türleri, biyolojik mücadele açısından çok önemlidir. Bu faydalıların korunması ve etkinliklerinin artırılması mücadelede önemli başarı elde edilmesini sağlar. Yaprakbitine karşı marulda ruhsatlı birçok zirai mücadele ilaçları bulunmakta ve mücadelesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle marul alanlarında zararlıya karşı kullanılan ilaçların sistemik olması nedeni ile marulda beslenen diğer zararlıları da baskıladığı düşünülmektedir (TAGEM, 2008).

2.3 İsektisitlere Direnç

İsektisitlere direnç, zararlı popülasyonlarının baskı altına alınmasında yanlış depolama, hatalı uygulama ve uygun olmayan çevre koşulları gibi problemler dışında bir hassasiyet azalması ile normal bir popülasyonda bireylerin çoğunun öldürücü dozda canlı kalma yeteneğini geliştirmesi olarak tanımlanmaktadır (Ffrenç-Constant ve Roush, 1990). WHO (Dünya Sağlık Örgütü) isektisit uzmanları komitesi 1957'de isektisitlere direnci, bir türün normal popülasyonunda bireylerin çoğunu öldürdüğü ispatlanan bir isektisit dozuna, aynı böceğin diğer bir ırkının bu dozu tolere etme yeteneğini

geliştirmesi olarak tanımlamıştır. Ya da başka bir ifadeyle, bir zararlıya karşı aynı pestisit veya etki mekanizması aynı olan pestisitlerin ard arda uzun süre kullanılması sonucunda, bu zararlı popülasyonunda pestisit(ler)e karşı önce hassasiyet azalışı görülür sonra da hassasiyeti az olan bireylerin popülasyonunda artışı ile dirençli bireyler çoğalır. Daha sonra bu pestisitlere karşı dirençli popülasyon meydana gelir (Öncüer ve Durmuşoğlu, 2008). Uluslararası bir kuruluş olan “The Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) (İnsektisit Direnç Eylem Komitesi)’ne göre; Direnç, bir zararlı popülasyonunun duyarlılığında bir kalıtsal değişim sonucu azalma olarak tanımlanabilir. O böcek türlerine karşı kullanılan bir insektisit beklenen kontrol seviyesini elde etmek için etiket tavsiyesine göre kullanıldığında etki etmemesi durumudur (IRAC, 2020a).

Melander’in 1908 yılında San Jose kabuklu bitinde kükürt-kireç karşısına karşı oluşan duyarsızlaşmayı gözlemlemesi, insektisitlere karşı dirençle ilgili ilk kayıttır. 1940-1950 yılları arasında hızlı öldürücü etkisi, kullanımının kolay, üretiminin ucuz ve basit olması nedeniyle sık kullanılmaya başlanan DDT’nin ortaya çıkışından kısa bir süre sonra zararlılarda insektisit direnç oranı belirgin bir şekilde artmıştır. 1940’lı yıllarda DDT gibi sentetik organik insektisitlerin sık kullanımının ardından, ilk direnç vakası da 1947 yılında karasineklerde DDT direnci olarak karşımıza çıkmıştır. Bundan sonra, siklodienler, organofosfatlar, karbamatlar, formamidinler, piretroidler, *Bacillus thuringiensis*, spinosinler ve neonicotinoidler gibi her yeni giriş yapan insektisitlerin ardından kısa sürelerde önemli zararlı türlerinde bir dizi direnç olayı görülmüştür (IRAC, 2020b).

2.3.1 Direnç mekanizmaları ve direnç ile ilgili enzimler

Temel olarak insektisitlere karşı direnç gelişimini sağlayan dört mekanizma yaygın olarak bilinmektedir: 1) Esteraz, sitokrom P450, glutatyon S-transferaz (GST) gibi enzimler ile insektisit metabolizasyonunun hızlandırılarak detoksifikasyonun sağlanması, 2) İnsektisit vücut içerisine girişinin azaltılması (Penetrasyon direnci ya da kutiküler direnç), 3) İnsektisit hedef bölgesinin duyarlılığının değiştirilmesini sağlayan mekanizma ve 4) böcek davranışları sonucu meydana gelen direnç mekanizmalarıdır (Simon, 2014). Pek çok böcek popülasyonunda belirlenen bu insektisit direnç

mekanizmalarından hangilerinin böcek popülasyonunda insektisit direncini sağladığının bilinmesi, alternatif insektisitlerin seçimini kolaylaştırmaktadır (Cygler et al., 1993). Zararlılarla kimyasal savaşım da pestisitlere direnç gelişiminin geciktirilmesi, engellenmesi hatta direnç problemlerinin ortadan kaldırarak üretim maliyetinin minimum seviyeye indirilmesi ancak direnç mekanizmasının bilinmesi ile sağlanacağından direnç, direnç kalıtımı ve detoksifikasyon enzimleri üzerine birçok araştırma yapılmıştır (Ay ve İnanıcı, 2018).

Metabolik direnç: Bu direnç mekanizması insektisitleri hedef bölgelerine ulaşmadan metabolize eden ya da ayıran enzimleri içermektedir. Dirençli böcekler toksini hassas böceklere göre daha hızlı detoksifiye ederler ya da yok ederler ve toksik molekülleri vücutlarından uzaklaştırırlar. İnsektisitlerin hedef bölgeye ulaşmadan parçalanması esasına dayanan bu mekanizmada insektisitlerin ya metabolizasyon hızlarının arttırılması, ya da daha az toksik olan öncü bileşiklere dönüştürülmesi gözlenir (Hemingway ve Ranson, 2000). Metabolik direnç en sık görülen ve genellikle büyük sorun oluşturan, kırılması güç bir mekanizmadır. Böcekler insektisiti parçalamak için kendi iç enzim sistemlerini kullanırlar. Dirençli ırklar bu enzimlere yüksek düzeyde veya daha verimli şekilde sahip olabilmektedirler. Böceğin normal enzimatik metabolizması, insektisit detoksifikasyonunu arttırmak veya insektisit aktivasyonunu önlemek için modifiye edilir.

Enzimler, pestisitlerin detoksifikasyon sürecinde nitelik ya da nicelik olarak değişerek rol oynamaktadır. Bu enzimler toplu olarak detoksifikasyon enzimi olarak bilinirler ve sitokrom P450 (P450), glutathion S-transferaz (GST), karboksilesteraz (COE) ve UDT-glikosiltransferaz (UGT) çoklu gen ailelerinin üyeleri tarafından kodlanırlar. Bu dört detoksifikasyon gen familyası elemanlarının çeşitli organizmalarda da bulunduğu bilinmektedir. (Ranson et al., 2002; Claudianos et al., 2006; Nene et al., 2007; Strode et al., 2008; Lee et al., 2010). Böceklerde direnç ile ilgili enzimlerden Esterazlar, Glutathion -S-Transferazlar, P-450 Monooxygenazlar ve Hidrolazlar en çok bilinenleridir. Esterazlar ve mono-oksijenazlar faz I detoksifikasyon enzimleri olarak bilinirken, GST ise faz II enzimi olarak bilinmektedir (Yorulmaz ve Ay, 2010).

Esteraz enzimleri feromon ve hormon metabolizması, sindirim sistemi ve sinir iletimi, üreme davranışı ve insektisitlere direnç gibi birçok mekanizmada rol oynamaktadır. Canlılarda zenobiyotiklerin detoksifikasyondan sorumlu enzimler esterazlar, oksidaz ve GST gibi büyük multigen aileleri üyelerinin transkripsiyonu ile meydana gelmektedir. Glutation transferaz (GST), her yerde görülen aerobik organizmalarda bulunan enzimlerin farklılaşmış bir ailesidir. Organofosfatlı insektisitlerin aktive olmuş oxon formları bu enzimlerle tepkime gösterirler. Bu nedenle organofosfatlı insektisitler esteraz inhibitörleri olarak tanımlanır (Oekeshott et al., 1993). Bütün metazoanlar ve bitkilerde bulunan bir izoenzim ailesidir ve temel detoksifikasyon sistemlerinden birisidir. Böceklerde bu enzim ailesi insektisitlerin toksik etkilerine karşı temel bir savunma olarak bilinmektedir.

Penetrasyon direnci: Penetrasyon direnci böceklerin vücutlarındaki kütikula tabakasının bazı özelliklerinden kaynaklanan ve bunun sonucu olarak kimyasal maddeleri yavaş absorbe etmeleri sonucu ortaya çıkan bir direnç tipidir. Dirençli böcekler duyarlı böceklere göre toksinleri daha yavaş absorbe edebilirler. Bu böcekler dış kütikulasında vücutlarının içine kimyasal emilimini yavaşlatabilecek engelleri geliştirir ve penetrasyon direnci oluşur. Bu durum geniş bir insektisit sınıfından böcekleri koruyabilir. Penetrasyon direnci sıklıkla diğer direnç mekanizmaları ile birlikte görülebilir ve düşük penetrasyon diğer mekanizmaların da etkilerini yoğunlaştırır.

Hedef yeri direnci: İnsektisit etkilerini azaltmak için toksinin genellikle böcek içindeki hedef yeri modifiye edilmiş olur. Hedef de bağlanma yapacağı protein yapı veya sıralanma düzeninin mutasyonla kalıcı şekilde değişmesi sonucu oluşan hassasiyet azalması hedefin değişmesidir. Bu ikinci en yaygın mekanizmadır. Bazı organik fosforlu bileşikler ve sentetik pyretroidliler'de hedef yeri direncinden dolayı ilaçların etkinliği azalmaktadır. Örneğin AChE enzimine bağlanan karbomatlı ve organik fosforlu insektisitlerin enzime bağlanma noktalarındaki serin, alanin, glysin proteinlerinin dizilişinin mutasyonla kalıcı şekilde değişmesiyle insektisitler bağlanma yapamaz ve etkili olamazlar. Bu mutasyonlar protein diziliminde değişikliklere neden olabileceği

gibi, hedef yerinin ekspresiyon seviyesini değiştirerek de dirence katkı sağlayabilmektedirler (Van Leeuwen and Dermauw, 2016).

Kdr direnci (Knock-down resistance), piretroitli insektisitler böceklerdeki sinir hücrelerinin aksonları boyunca aksiyon potansiyelini düzenleyen sodyum kanallarına bağlanarak, bu kanalların açık kalması ile hiper aktiviteye ve sinir hücresinin çalışmasının engelleyerek felce ve ölüme götürür. Voltaja bağlı bu sodyum kanallarının bazı böceklerde mutasyona uğramasıyla piretroitli insektisitler bu kanala bağlanamadığı için direnç kazanmış olmaktadır. Bu direnç tipinde böcek esteraz ve sitokrom P450 monooxygenaz enzimlerinin aktivitesini engelleyen sinerjistlerden etkilenmezler (Durmuşoğlu ve Kumral 2018).

Durmuşoğlu ve Kumral (2018), Hemingway et al'a (2002) atfen, değiştirilmiş asetilkolinesteraz direncinin (Modified acetylcholinesterase (MACE) Ace1), Organik fosforlu ve karbamatlı insektisitlerin, böceklerde sinir hücreleri arasındaki boşlukta bir sinir hücresinden diğerine uyarı transferi sağlayan bir salgı olan asetilkolin (ACh)'in hidrolizinde (parçalanmasında) rol oynayan asetilkolinesteraz (AChE) enzimini bloke edip hidrolizasyonu engelleyerek ACh tarafından başlatılan sinirsel uyarıların sürekli olması sonucu ölüme neden olduğunu belirtmişlerdir. Bazı böceklerde AChE enzimi mutasyona uğradığından, organik fosforlu ve karbamatlı insektisitler bu enzime bağlanıp bloke edemediğı için direnç görölmektedir.

Diieldrin geninde direnç (Rdl; Resistance to diieldrin gene), böceklerin sinir hücrelerinde GABA kapılı klor kanalına bağlanarak klor iyonu geçini engelleyerek onların ölümlerine neden olurlar. Bu kanaldaki tek nokta mutasyonu ile genetik bir değişiklik, söz konusu insektisitlerin bağlanmasını engellediğı için Rdl direncine neden olmaktadır (Durmuşoğlu ve Kumral, 2018).

Davranış Direnci: Bu tip dirençli böcekler kendileri için tehlikeli olabilecek zehirleri algılayabilir veya fark edebilirler. Bu durumda ya ilaçlı alandan etkilenmeden uzaklaşabilir, ya da beslenmeyi durdurarak ilaca maruziyetlerini azaltabilirler (Durmuşoğlu ve Kumral, 2018). Bu tip direnç,

organik klorlu, organik fosforlu, karbamatlı ve piretroit gibi pek çok insektisit sınıfına karşı birçok böcek ve kırmızı örümcekte belirlenmiştir (Simon, 2014).

2.3.2 Direnci tespit etme yöntemleri

Mevcut direnç test teknikleri biyoassay, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar olarak üçe ayrılmaktadır. Biyoassay test tekniği direnç tespitinde kullanılan ilk yöntem olup halen güvenli bir şekilde kullanılmakta ancak uzun zaman gerekmektedir. Biyokimyasal testler düşük frekanstadaki direnç genlerini doğru olarak tanımlama ve kontrol etme açısından yararlıdır ancak çoğu durumda ilişki net değildir. *Ceratitis capitata*'nın malathiona direnç gelişiminin incelendiği bir araştırmada ülkemizde ilk kez biyoassay yöntemlerin yanısıra biyokimyasal testler de uygulanmıştır (Dindar, 1992). Moleküler çalışmalar ise 2000'li yıllardan sonra başlamıştır.

2.3.2.1 Biyoassay testler

Biyoassay çalışmaları zararlıların insektisitlere karşı geliştirdikleri direnç seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir. Geniş anlamda, kullanımıyla "biyoassay" aktif maddenin bir canlı organizmada fizyolojik olarak etkileri ve arasındaki ilişkinin saptanması için kullanılmaktadır (Hoskins ve Craig, 1962). Duyarlı ve dirençli bireyler arasında ayırım yapmak için güvenilir, hızlı ve etkili teknikler gereklidir (Brown, 1981; Gunning, 1993). İyi bir biyoassay kabul görmesi için bazı özellikler içermelidir. Tekrarlanabilirlik özelliği; deneyin aynı şekilde başka bir zamanda ve mekânda tekrar edilebilir olması gerekmektedir. Kolaylıkla gözlenen ve ölçülen sonuçları olmalıdır. Nispeten düşük maliyetli olmalıdır. Tercihen kısa süreli olmalı ve fazla tekrar içeriyor olmalıdır. Bunların sonucunda da "doğrusal bir doz-yanıt eğrisi" vermelidir. Biyoassay çalışma planlanırken bir bitiş noktası seçilerek deneme planlanmalıdır. Amaç belirli konsantrasyon aralıklarında uygulama sonunda böceklere %10 ile %90 arasında etki ölçülebilmektir. Biyoassay denemeler esas olarak bir bitki, bir böcek ve insektisitlerin uygulama şekli ve yöntemi gibi başlıklardan oluşmaktadır. Böceklerin yaş veya yaşam evresi, açlık veya beslenme durumu, bitkinin fenolojik yaşı, toplandığı yer ve uygulamanın yapılacak kısmı ile ekstraksiyon yöntemi ve uygulama yöntemi önem teşkil etmektedir (Durmuşoğlu vd., 2015). Biyoassay yöntemleri insektisitlerin uygulama yöntemlerine göre topikal, daldırma, kalıntı veya yüzey teması ve

besleme olmak üzere dört grupta toplayabiliriz (Ffrench-Constant and Roush, 1990).

Topikal uygulama: Bu yöntemde etki eden kesin bir sabit doz kullanımı söz konusudur doğrudan veya püskürtme şeklinde uygulama yapılır. İnsektisit zehirli olmayan bir çözücüde çözülür, bir mikropipet veya mikroşiringa yardımıyla böceğin vücut yüzeyine uygulanır. Bu uygulama böceklerin larva, pupa ve erginlerde tercih edilmektedir. Özellikle larva ve erginlerde thorax dorseline, pupada ise abdomen ventraline ile uygulanır. Ancak böcek boyutuna ve hareketliliğine bağlı olarak bu yöntemi uygulamak oldukça zor ve zaman alıcıdır (Leibee and Savage, 1992).

Yaprak daldırma yöntemi: Yapraklar direkt olarak hazırlanan ilaç solüsyonlarına kısa bir süre için batırılarak bekletilir ve bir pens yardımıyla alınarak kurutmaya bırakılır. Ardından böcekler de bu yaprak üzerine bırakılarak yeterli süre geçmesi beklenir ve ölü/ canlı birey sayımları yapılır (IRAC, 2020b).

Kalıntı veya yüzey teması: Bu yöntemde ilaçlama kulesi veya yaprak daldırma metodu kullanılır. İlaçlama kulesinin alt tablasına üzerine petri kabı içinde yaprak yüzeyi yerleştirilir ve belirli dozdaki ilaç solüsyonu belirli bir basınçta yaprak yüzeyine püskürtülür. Uygulamadan sonra yaprak yüzeyleri 15-30 dk kurumaya bırakılır. Bir diğer kalıntı bırakma yöntemi filtre kâğıtlarının ilaç solüsyonuna batırılması metodudur. Yaprak daldırma metoduna benzer olarak filtre kâğıtları disk şeklinde kesilerek belirli sürelerle ilaç konsantrasyonlarına batırılır. Kurutmak için çeker ocakta 10-15 dk bekletilir.

Beslenme: Genellikle fitofag böceklerin larvaları için kullanılan bu metotta larvanın besleneceği yaprak hazır besin ya da sprey, daldırma veya sistemik metotla muamele edildikten sonra birkaç saat aç kalmış larvalara verilerek uygulanır. Beslenme biyoassay çalışmaları kısa olmalıdır yani, bir ya da iki besleme döneminde bitmelidir. Benzer olarak bazı böcek türlerinde yapay besin de kullanılmaktadır. Bu metotta yapay besin hazırlanma aşamasında belirli konsantrasyondaki ilaç yapay besine karıştırılır.

Biyosay testler, sadece direnç varlığı ve frekansının bir göstergesi olabilir ve direnç mekanizması hakkında sınırlı bilgi vermektedirler. Daha net

ve kesin bilgiler biyokimyasal ve moleküler çalışmalar ile ortaya konulabilmektedir.

2.3.2.2 Biyokimyasal çalışmalar

Zararlı türlerde pestisit direncini belirleyen diğer bir yöntem ise biyokimyasal denemelerdir. Bu yöntemin temelinde böceklerdeki pestisit direnç mekanizmasının bilinmesi amaçlanmaktadır. Genelde metabolik direnç durumunda bazı enzimlerin miktarı ve/veya fonksiyonları ölçülür. Örneğin böcekte fazla miktarda karboksilesteraz E4 bulunduğu, insektisitler sinir sistemindeki hedefe ulaşmadan önce tutulmakta ve bu nedenle AChE normal biyolojik fonksiyonuna devam etmekte ve böcek yaşamaktadır (Ay ve Sökeli, 2005). Direnç ile α -naftil asetat'ı hidrolize eden enzimin (esteraz) aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon olduğunun belirlenmesi, *M. persicae*'deki direncin biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesinde önemli bir dönüm noktası olmuştur (Needham and Sawicki, 1971). Moores et al. (1996), üç *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) popülasyonunda insektisitlere direnç düzeyini, toplam esteraz aktivitesini ve insektisit tarafından inhibe edilen AChE enziminin duyarlılık durumunu incelemiştir. Farklı esteraz ile AChE kombinasyonlarına sahip olduğu tespit edilen *A. gossypii* popülasyonlarındaki modifiye AChE'nin, organikfosforlu ve karbamatlı insektisitlere direncin ana mekanizması olduğu da belirlenmiştir. Esteraz enzimleri böceklerde feromon ve hormon metabolizması, sindirim sistemi ve sinir iletimi, üreme davranışı ve insektisitlere direnç gibi birçok önemli mekanizmada rol oynamaktadır. Böceklerde insektisitlere karşı direnç gelişiminde özellikle asetilkolinesterazlar ve karboksilesterazlar rol oynamaktadır (Baffi et al., 2005; Yorulmaz vd., 2013).

Biyokimyasal teknikler dirençle ilgili bir mekanizma kurmak için kullanılabilir. Bir popülasyon biyokimyasal deneyler ile iyi karakterize edildiğinde, bu deneyler bazı farklı seleksiyon baskısı altındaki bir popülasyonunda direnç gen frekanslardaki değişiklikleri ölçmek için kullanılabilir (Karaağaç, 2012).

2.3.2.3 Moleküler çalışmalar

Direncin gelişimi genellikle bir veya birkaç gene dayanmaktadır. Duyarlı bir popülasyon, bir insektisite maruz kalmadan önce, tipik olarak direnç genleri bakımından genellikle zayıftır, bu genler insektisit yokluğunda azaltılmaktadırlar (Karaağaç, 2012).

Güz vd., 2020, direncin mutasyon adı verilen genetik değişimler sonucu ortaya çıktığını ve genetik kökenli bu değişimlerin: genin kopya sayısının çoğalması (gen amplifikasyonu), genin fazla çalışması (overexpression), ürün yapısındaki değişiklik (aminoasit değişikliği) ve alel yokluğu olarak kendisini ifade ettinden söz etmektedir. Enzim önemsiz bir organofosfat hidrolitik aktivitesine sahip olmasına rağmen onun fazla ekspresyonu organizmanın hayatta kalması için organofosfatların yeterli miktarını ayırmayı mümkün kılar ve bu hidroliz için neurotransmitter asetilkoline ihtiyaç duyan target site (hedef bölge) asetilkolinesterazın inhibisyonunu önler ve direnç gelişir. Genin fazla çalışması ile direnç oluşumu, gen ekspresyonunun regülasyonu (gen ifadesinin düzenlenmesi) ile gen ifadesindeki değişiklik gen ürününün miktarını da değiştirebilir (Hemingway and Ranson, 2000).

2.4 Önceki Çalışmalar

2.4.1 İsektisitlere direnç ile ilgili dünyada yapılan çalışmalar

İsektisitlerin yoğun olarak kullanılması sonucunda birçok zararlıda direnç gelişimi meydana gelmektedir. Bu konuda yapılmış birçok çalışma direnç gerçeğini ortaya çıkarmıştır. 1908 yılından 2018 yılına kadar böceklerin insektisitlere karşı direnci ile ilgili yapılan tüm çalışmalara baktığımızda 574 türde, 338 aktif maddeye karşı, 10.357 direnç vakası bildirilmektedir. (Whalon et al., 2018).

Günümüzde direnci tespit etmek amacıyla biyoassay, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar yapılmaktadır. Böceklerin insektisitlere direnci ile ilgili yapılan çalışmalar sayesinde, insektisitleri metabolize edici bir dizi enzim tanımlanmıştır (Li et al., 2011). Bu enzimler toplu olarak detoksifikasyon enzimi olarak bilinirler ve sitokrom P450 (P450), glutathion S-transferaz (GST), karboksilesteraz (COE) ve UDT-glikosiltransferaz (UGT) çoklu gen ailelerinin üyeleri tarafından kodlanırlar. Direnç ile alfa-naftil asetat'ı hidrolize eden enzimin (esteraz) aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon olduğunun

belirlenmesi, *M. persicae*' deki direncin biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesinde önemli bir dönüm noktası olmuştur (Needham and Sawicki, 1971).

Yine enzimlerin insektisit direncine olan etkisini ortaya koymak amacıyla Devonshire ve Moores (1982) tarafından yürütülen bir çalışmada, *M. persicae*' nin organik fosforlara direnç göstermesinin sebebi olan karboksilesteraz E4 enzimini saflaştırmışlardır. Çalışmalarında E4'ün artan mevcudiyetinin direncin sebebi olduğunu vurgulamışlardır. İnsektisitlerden hangi birisi uygulanırsa uygulansın aynı mekanizmanın görüleceğini buna rağmen zayıf direnç oluşumu nedeniyle karbamatlıların bu mekanizmada en az seleksiyon baskısını gerçekleştirdiğini belirlemişlerdir. Moores et al., (1996), ise yine yaprakbitleri ile çalışmış, üç *A. gossypii* popülasyonunda insektisitlere direnç düzeyini, toplam esteraz aktivitesini ve insektisit tarafından inhibe edilen AChE enziminin duyarlılık durumunu incelemişlerdir. Farklı esteraz ile AChE kombinasyonlarına sahip olduğu tespit edilen *A. gossypii* popülasyonlarındaki modifiye AChE'in, organikfosforlu ve karbamatlı insektisitlere direncin ana mekanizması olduğu belirlenmiştir.

Zararlı böcek popülasyonlarının insektisitlere karşı direncin ekolojik genetiğinin çalışabilmesi ve biyolojik mücadele stratejilerinin geliştirilebilmesi için, dirence neden olan genlerin teşhis edilmesi ve metabolizmasının anlaşılması gerekmektedir. 1970 ve 1980 yılları sonrasında, çevre toksikologları, entomologlar ve biyologların dikkatlerini direnç konusu üzerine çekmesiyle dayanıklılık gen ve mekanizmaları incelenmeye başlanmıştır. Ffrench-Constant (1999), insektisit direncinin moleküler genetiği üzerine yapılan çalışmaların, nokta mutasyonların üç temel insektisidin hedefi olan molekülleri (Rdl GABA reseptör, para voltaj kapılı sodyum kanalı ve böcek asetilkolinesteraz) kodlayan genlerde hedef yeri duyarsızlığına neden olduklarını ortaya koyduğunu belirtmektedir.

Gao et al., (2002) tarafından insektisit direncine ilişkin yaprakbitlerinde yapılan çalışmalardan ilki *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae)'un cDNA kütüphanelerinden yararlanarak AChE cDNA'sını klonlayıp, karakterize edilmiştir. Yapılan bu çalışma afit türleri arasında AChE'nin moleküler özelliklerini karakterize eden ilk çalışmadır. Çalışmada

buğday yaprak bitine ait AChE cDNA'sının nükleotid ve aminoasit sekansı, AChE cDNA'sının primer yapıları, yaprak biti AChE'sinin karakteristikleri ve yaprak bitine ait AChE geninin diğer hayvan türleriyle filogenetik ilişkisi saptanmıştır.

Javed et al., (2013) tarafından Hemiptera takımına ait 4 farklı böcek türünün (*M.persicae*, *A. gossypii*, *Bemisia tabaci* ve *Trialourodes vaporariorum* (Hemiptera:Aleyrodidae)) asetilkolinesteraz kodlayan gen sekansları çıkarılmıştır. Bu türlerin her birinin insektisitlere dirençli popülasyonlarında asetilkolinesteraz hassasiyeti görülmesine rağmen dirençli böceklerin gen sekanslarında hiçbir mutasyona rastlanmamıştır. Bu nedenle Hemiptera türlerinde ikinci bir alternatif genin karakterize edilmesi gerektiği ve aynı gende insektisitlere hassasiyetle ilişkisi olan mutasyonlarında beraberinde saptanması gerektiği sonucuna varılmıştır. Toda et al., (2004) tarafından ise pamuk afidi *Aphis gossypii*'de bulunan Ace 1 ve Ace 2 olarak bilinen iki asetilkolinesteraz geni tanımlanmış ve karbamat dirençli ve hassas ırkları karşılaştırılmıştır. Ace 1 geninde aminoasit sekanslarında hiçbir değişiklik saptanmazken, hassas ve dirençli ırklardaki Ace2 geninde Ser431Phe ve Ala302Ser olmak üzere iki aminoasit değişikliği saptanmıştır. Ser431Phe yer değiştirmesinin primicarb direncinde, Ala302Ser yer değiştirmesinin organofosfat direncinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür.

Piretroit direncinin en önemli mekanizması knockdown direnç (*kdr*) olarak bilinen hedef yeri duyarlılığın azalmasıdır. *Kdr* olgusu ilk kez DDT'ye dirençli karasineklerde belirlenmiştir. Daha sonra Alman Hamam Böceği gibi diğer önemli zararlılarda da görülmüştür. Anstead et al., (2005), Şeftali yaprak biti *M. persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae)'nin *kdr* olarak adlandırılan sinir sistemindeki duyarlılığı azaltan bir mekanizma ile piretroit insektisitlere direnç geliştirdiğini bildirmişlerdir. Duyarlılıktaki bu azalmaya sodyum kanalında görülen 2 mutasyonun L1014F (*kdr*) ve M918T (süper-*kdr*) sebep olduğunu bulmuşlardır.

Cassanelli et al., (2005)'a göre dünyada yoğun olarak insektisit kullanımı sonucunda seleksiyon baskısından dolayı *M. persicae*' de insektisit direnç mekanizmaları gelişmiştir. Coğrafi dağılıma dair bulgular ve bu dirençli fenotiplerin farklılaşp evrim geçirmesinin uygun mücadele programlarının

geliştirilmesine yardımcı olacağını savunmuşlardır. Var olan direnç mekanizmaları moleküler anlamda 'knockdown' direnci ve modifiye edilmiş asetilkolinesteraz direncinin varlığını tespit etmeyi imkânlı hale getirmektedir. Çalışmalarında PCR-RFLP tekniğini kullanarak yaprak bitlerinin bireysel ve populasyon düzeyindeki direnç mekanizmalarını saptamışlardır. Van Toor et al., (2007), Yeni Zelanda'da yetiştirilen patateslerde *M. persicae*' nin insektisitlere direncini ve genetik kompozisyonunu araştırmışlardır. Çalışmalarında biyokimyasal testlerin bir kombinasyonunu, PCR tekniklerini ve diyagnostik dozlarla biyoassay testlerini uygulamışlardır. 23 adet genoipin %60' ının dört insektisit sınıfından herhangi üçüne karşı bir ya da daha fazla direnç mekanizması geliştirdiğini belirtmişlerdir.

Kwon et al., (2008), *M. persicae* bireylerinin karboksilesteraz enzim aktivitesi aracılığıyla pirimicarba olan dayanıklılığının karakterizasyonunu araştırmışlardır. Pirimicarba olan direnci biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarla incelemişlerdir. PCR stainlerinde pirimicarba 131 kat dayanıklılık görülürken organik fosforlu ve karbamatlı insektisitlere karşı herhangi bir direnç ibaresine rastlamamışlardır.

Beckingham et al., (2013), *M. persicae* populasyonlarında neonikotinoid grubuna ait insektisitlere karşı görülen dirençte nikotinik asetilkolin reseptörlerinin rolünü incelemişlerdir. Neonikotinoid seleksiyonunun olmadığı koşullarda nAChR protein seviyelerinin değişmediğini bildirmişlerdir.

Bass et al., (2014), *M. persicae* türünün dünden bugünüme kadar gösterdiği insektisit direncinin evrimini araştırmışlar ve yedi adet dayanıklılık mekanizması tanımlanmıştır. *M. persicae* üzerindeki toksik etkiyi uzaklaştırmak için dikkate değer birçok mekanizma geliştirmiştir. Bu araştırmanın çalışmanın insektisit direncinin evrimini temsil eden önemli bir çalışma olduğunu söylemişlerdir. Çalışmalarında *M. persicae*' nin biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarını incelemişlerdir. Çalışmanın özünde dayanıklılığın nasıl geliştiği, insektisit seçiciliği ve dayanıklılık ile konukçu bitki arasındaki adaptasyonu olduğunu belirtmişlerdir.

Dünyada özellikle son 30 yıldır insektisitlere direnç konusunda gerek biyokimyasal olarak ve gerekse moleküler biyoloji alanında oldukça detaylı

araştırmalar yapılmaktadır. Ülkemizde de son yıllarda bu çalışmalara ağırlık verilmiştir.

2.4.2 İnektisitlere direnç ile ilgili Türkiye’de yapılan çalışmalar

Ülkemizde inektisit direnci konusunda yapılan ilk yayınlar konuyu açıklayan derlemeler şeklinde olmuştur (Düzgüneş, 1953; Alkan, 1960). Direnç en çok halk ve çevre sağlığı kapsamında kullanılan inektisitlere karşı sivrisinek ve karasinek türleri için rapor edilmiştir (Kasap vd., 1999). Türkiye’de 2000’li yılların başına kadar inektisit ve akarisitlere karşı direnç konusunda yeterince çalışılma yapılmadığını ve toplam 30 araştırma bulunduğunu bildirmiştir (Durmuşoğlu, 2004). Türkiye’de tarımsal zararlıların inektisitlere karşı gösterdiği direnç üzerine önemli bazı çalışmaların sonuçları ise aşağıda sunulmuştur.

Ülkemizde yaprakbitleri ile ilgili ilk direnç çalışmasında Ege Bölgesi’nde tütünlerde görülen *M. persicae*’nin biyoassay yöntemlerle ethyl parathiona karşı dirençli olduğu belirtilmiştir (Öden, 1969). *M. persicae*’nin tütünde direnç ile ilgili çalışmalara devam edilmiş, Polat vd.,(1973)’nin yaptığı araştırmada, Karadeniz bölgesinde tütün yetiştirilen alanlarda organikfosforlu inektisitlere karşı *M.persicae* bireylerinde direnç durumuna rastlanmamıştır.

Zümreoğlu (1978), Aydın, Balıkesir, Çanakkale, İzmir ve Manisa illerinden topladığı *M. persicae* popülasyonlarının ethyl ve methyl parathion ile methamidophos’a duyarlılık, durumlarını incelediği laboratuvar denemelerinde, yaprakbitlerinin özellikle methyl parathion’a direnç kazandığını belirlemiştir.

Erkam ve Gürkan (1983)’nin Yalova ve çevresinde meyve ağaçlarında bulunan *Panonychus ulmi* (Koch) (Acarina: Tetranychidae)’nin dicofol ve chlorobenzilate gibi akarisitlere olan direnç düzeylerini saptadıklarını bildirmektedirler. Araştırmacılar, lam daldırma metoduna göre buldukları sonuçlara göre bu iki preperata hiçbir *P. ulmi* popülasyonunda duyarlılık kaybının olmadığını belirtmektedirler. Kabir vd. (1993), ise *P. ulmi*’nin farklı ırklarının propargite etkili maddeli bir akarisite cevabını ayrıcı ve çoklu

konsatrasyon tekniği kullanarak test ettiklerini ve bu ilaca 11 kat direnç saptadıklarını kaydetmektedirler.

Ülkemizde yürütölen direnç çalışmalarında biyoassay çalışmaların yanı sıra biyokimyasal yöntemlerin ilk kez Velioğlu (1999) tarafından uygulandığı bilinmektedir. Velioğlu ve Toros (2006), İzmir, Antalya, Ankara ve İçel'den toplanan *M. persicae* popölasyonlarına daldırma biyoassayı ile deltamethrin, pirimicarb ve diazinon uygulayarak tüm popölasyonların LC₅₀ değerlerini belirlemişlerdir. Hassas popölasyon ile karşılaştırılarak bulunan dayanıklılık oranlarından elde edilen biyoassay sonuçları pirimicarb'a karşı oldukça yüksek düzeyde dayanıklılık bulunduğunu ortaya koymuştur. Benzer bir çalışmada bu sefer kırmızıörümcekler ile Dağlı ve Tunç (2003), Antalya'dan toplanan *Tetranychus cinnabarinus* (Boisd.) (Acarina: Tetranychidae) popölasyonlarının dicofol'a yüksek direnç gösterdiğini, özellikle seralardan toplanan popölasyonların pamuktan toplananlara göre daha dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, 16 döl boyunca dicofol ile seleksiyona uğratılan *T. cinnabarinus* popölasyonlarının dirençlerinin LC₅₀'ye göre 19.7 ve 100.7 kez arttığı eklemektedirler. Ay ve Gürkan (2005), ölkemizin önemli pamuk üretim merkezlerinden toplanan *Tetranychus urticae* Koch. (Acari: Tetranychidae) popölasyonlarında selektif akarisitlere (dicofol, bromopropylate) karşı önemli ölçüde bir duyarlılık kaybına rastlanmadığı bildirilmiştir. Birçok ölkede özellikle dicofol'a karşı çok yüksek oranlarda direnç kaydedildiğini bildiren araştırmacılar bu durumu, ölkemizde spesifik ilaçların çok fazla tercih edilmediğine ve geniş spektrumlu ilaçların daha çok tercih edildiğine bağlamışlardır.

Yapılan bir diğer çalışmada ise, *M. persicae* 'nin 6 farklı popölasyonunda direnç mekanizmalarının biyokimyasal yöntemler kullanılarak insektisitlere direnç ile ilişkili olan karboksilesteraz enzimi spektrofotometre ve elektroforez ile incelenmiştir (Velioğlu ve Toros, 2006). Ülkemizde neonikotinoitlerin *M. persicae*'deki direnç durumlarının belirlenmesi amacıyla ilk kez yürütölen bir çalışmada bu grup insektisitlere karşı oldukça yüksek direnç oranlarının bulunduğu tespit edilmiştir (Velioğlu vd., 2007).

Ay (2006) tarafından gerçekteştirilen bir başka çalışmada, Antalya'da örtöaltı sebze üretim alanlarında, yine *T. urticae*' nin bazı akarisitlere

(propargite, abamectin ve amitraz) karşı duyarlılıkları araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan akarisitlerden propargite ve abamectin'e karşı önemli ölçüde duyarlılık kaybı belirlenemezken, ülkemizde amitraz'a karşı daha önce bir duyarlılık kaybı bildirilmediği halde bu çalışmada amitraz'a karşı bazı popülasyonlarda önemli ölçüde direnç belirlenmiştir.

Velioğlu ve Toros (2006) tarafından *M. persicae*'nin İzmir, Antalya, Ankara ve İçel'den toplanan 6 farklı popülasyonunda insektisitlere direnç ile ilişkili olan karboksilesteraz enzimi spektrofotometre ve elektroforez ile incelenmiştir. İçel'den toplanan ve dirençli olan 3 popülasyonun toplam karboksilesteraz aktiviteleri diğer popülasyonlara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu popülasyonların poliakrilamid jel elektroforez ile incelenen karboksilesteraz E4/FE4 bantları da diğer popülasyonlara göre daha kalın olduğu gözlemlenmiştir.

Sökeli (2005), elmanın yoğun olarak üretildiği Isparta İli elma bahçelerindeki *T. urticae* popülasyonlarının chlorpyrifos'a karşı dirençli fakat propargite ve abamectin'e karşı duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Dağlı ve Tunç (2007), *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae)'in Antalya'dan elde edilen ırklarının 5 insektisit sınıfına karşı direnç durumunu incelemiş ve tümünde cypermethrine karşı 1.6 ile 12.2 kat arasında değişen direnç artışı tespit etmişlerdir.

Erdoğan vd. (2008), Adana, Antalya, İzmir ve Tarsus pamuk alalarından topladıkları Tütün beyazsineği [*Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae)] popülasyonlarının piretroitli insektisitlere karşı önemli derecede dirençli olduklarını bulmuşlardır.

Kumral ve Kovancı (2007), Bursa İli elma bahçelerinden toplanan *Panonychus ulmi* (Koch) (Acarina: Tetranychidae) popülasyonlarının, chlorpyrifosa 6.0 ile 35.6 kat, lambda-cyhalothrine ise 0.7 ile 5.7 kat daha dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Velioğlu vd. (2008), İçel'de yaptıkları bir çalışma sonucunda *Myzus persicae* (Sulz.) (Hemiptera: Aphididae) popülasyonlarında, yüksek düzeydeki karboksilesteraz (E4 ve FE4) nedeniyle vücuda alınan pirimicarb'ın bir kısmının toksik olmayan yapıya dönüştürüldüğünü (detoksifikasyon), kalan pirimicarb'ın sinir sistemine ulaşabilen kısmının ise, AChE'ın duyarsız hale

gelmesi nedeniyle (hedef alanın duyarsızlaşması) etkisini gösteremediğini bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda, *M.persicae*'nin İçel popülasyonlarında farklı iki direnç mekanizması tespit edildiğinden bu popülasyonlarda “çoklu direnç mekanizması” olduğu belirlenmiştir. Yine Veliöğlü vd. (2009), pamuklarda zararlı *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae)'nin beş farklı popülasyonu ile yapılan biyokimyasal çalışmalar ışığında, hem yüksek esterez aktivitesine, hem de dirençli olan 1081K popülasyonu ile aynı bant dizilişine sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca bu zararlının pirimicarb ve demeton-S-metil'e değişen oranlarda duyarsız asetilkolinesteraz aktivitesi sergiledikleri, dolayısıyla, bu popülasyonların karbamatlılara ve organikfosfor'lulara karşı değişik seviyelerde direnç gösterdikleri bulunmuştur.

Genç vd. (2009), Çanakkale ve çevresinden toplanan Zeytin sineği [*Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae)] popülasyonlarının organik fosforlu ilaçlara karşı dayanıklılık durumları incelenmiş, 2006 yılında toplanan toplam 161 örneğin % 32'sinin homozigot dayanıklı (RR), % 65' inin heterozigot dayanıklı ve % 3'nün ise hassas olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar 2007 yılında topladıkları toplam 181 örneğin aynı grup aktiflerine karşı dayanıklılıklarını incelediklerinde ise % 53'ünün homozigot dayanıklı (RR), % 46'sının heterozigot dayanıklı (RS) ve %1'inin de hassas (SS) olduğu bildirilmiştir.

Bahşı vd. (2012), Antalya ve ilçelerinden toplanan *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) popülasyonlarının acetamiprid, chlorpyrifos-ethyl ve cypermethrin'e karşı duyarlılık düzeylerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada topladıkları popülasyonlarda acetamiprid, chlorpyrifos ve cypermethrin için ortaya çıkan direnç düzeyleri sırasıyla 6-299; 2-16 ve 1-22 kat arasında olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca acetamiprid ve chlorpyrifos-ethyl ile seleksiyona tabi tutulan popülasyonların direnç düzeylerinde sırasıyla 18 ve 4 katlık artışlar kaydetmişlerdir. Bu sonuçlara göre, *B. tabaci* Antalya popülasyonlarının acetamiprid, chlorpyrifos ve cypermethrin'e karşı önemli düzeylerde direnç geliştirdiğini belirlemişlerdir.

1950'li yıllardan günümüze kadar böceklerin insektisitlere direnci konusunda yapılan çalışmalara baktığımızda yaprakbitleri, kırmızıörümcekler, thrips türleri, beyazsinek ve zeytin sineği gibi birçok zararlı türde direnç

konusunda çalışıldığı görülmektedir. Yaprakbitleri ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde *M. persicae* ve *A. gossypii* türleri ile yürütülen birçok çalışma varken proje konumuz olan marul yaprakbiti, *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae) ile ilgili herhangi bir direnç çalışması bulunmamaktadır.

2.4.3 *Nasonovia ribisnigri* ile yapılan direnç çalışmaları

Dünyada marulda yaprakbitleri ile ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda, Blackman and Eastop (1984), yaprakbitlerini ve bunların teşhislerini derledikleri çalışmalarında marul üzerinde 15 yaprakbiti türünün bulunduğunu belirtmişlerdir. Yaprakbiti türlerinden özellikle *N.ribisnigri* Avrupa ve Kanada'da marulun en önemli zararlılarından biri olarak kabul edilmektedir (Mackenzie and Vernon 1988; Martin et al., 1995; Rufinger et al., 1997). Özellikle California ve Arizona'da ilk defa tespit edildiği 1998 yılından itibaren marulun en önemli zararlısı olmuştur.

Direnç ile ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda İspanya ve Fransa'dan toplanan *N.ribisnigri* popülasyonlarının direnç oluşumu 5 insektisitle (endosülfan, deltamethrin, pirimicarb, methomyl ve acephate) biyoassay yöntemler uygulanarak gözlenmiş endosülfan ve pirimicarba yüksek oranda direnç saptanmıştır (Rufinger et al., 1997). Rufingier et al. (1999) çalışmalarına devam ederek bu sefer *N.ribisnigri*'nin pirimicarb ve endosülfan'a karşı oluşan direnç mekanizmaları biyoassay yöntemler ile incelenmiş, direnç gösteren popülasyonlar için biyokimyasal çalışma yapılarak pirimicarba karşı oluşan direncin asetilkolinesteraz enziminden, endosülfana karşı oluşan direncin ise glutatin-S transferaz (GST) enziminden kaynaklandığı belirlenmiştir.

Ülkemizde Doğu Akdeniz Bölgesi marul ekiliş alanlarında zararlı olan yaprakbiti türleri, bulaşıklık oranları, popülasyon gelişmesi ve uçuş aktivitelerinin belirlendiği bir çalışmada marulda *N. ribisnigri*'nin en sık rastlanılan yaprakbiti türü olduğu bildirilmiştir (Sangün ve Satar, 2012). Ancak ülkemizde bugüne kadar *N. ribisnigri* ile ilgili herhangi bir direnç çalışması yapılmamıştır. Yapılan bu tez çalışması ülkemizin önemli tarımsal zararlılarından biri olan yaprakbitlerinde yaygın kullanılan insektisitlere karşı oluşan direncin Ege Bölgesi'ndeki durumunu ortaya koymuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

Çalışmanın ana materyalini, İzmir, Muğla ve Manisa illerinde marul yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bölgelerden toplanan yaprakbiti popülasyonları, laboratuvarında bu popülasyonların yetiştirildiği marul ve turp bitkileri, acetamiprid, thiamethoxam, clothianidin ve spirotetramat aktif maddelerini içeren insektisitler, moleküler çalışmalarda kullanılan RNA izolasyon kiti, çeşitli cam ve kimyasal maddeler ile bazı aletler ve spektrofotometre oluşturmaktadır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Ege Bölgesi marul üretim alanlarında yaygın yaprakbiti türünün belirlenmesi

Ege Bölgesi marul üretim alanlarında yaygın yaprakbiti türünü belirlemek amacı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nün ülkesel olarak yürütülen “Yaprağı Yenen Sebzelerde Görülen Hastalık, Zararlı, Yabancı Otların Belirlenmesi ve Mücadelesi Üzerinde Araştırmalar” projesi kapsamında 2016 yılında marul üretim sezonu boyunca örnek toplanmıştır. Bu amaçla ilk arazi çıkışı Mart ayında Menemen'e yapılmış ve son olarak da Ekim ayında Foça'ya gidilmiştir. Tablo 3.1'de görüldüğü gibi marul yetiştiriciliğinin en yoğun olduğu bölgelerden olan; İzmir ili Menemen, Menderes ve Foça ilçelerinden toplam 30 örnek, Manisa ili Salihli ilçesi ile Muğla ili Fethiye ilçesinden ise 10'ar örnek toplanmıştır.

Her örnekleme alanında, en az 50 bitkide göz ile inceleme yapılarak, yaprakbiti ile bulaşık marul bitkileri ayrı poşetlere konulmuş, etiketlenip buz kutusu içinde Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü laboratuvarlarına getirilmiştir. Laboratuvara getirilen örnekler stereobinoküler mikroskop altında incelenmiş ve söz konusu popülasyonu temsil edecek şekilde erginlerin bir kısmı teşhis için içerisinde %70'lik alkol bulunan mikrosantrifüj tüplerine alınarak Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde görevli konu uzmanı Dr. Işıl ÖZDEMİR'e gönderilmiştir.

Tablo 3.1 2016 yılında Ege Bölgesi marul üretim alanlarından toplanan yaprakbiti örnekleri

Örnekleme Tarihi	İl/İlçe/Mahalle	Örnek Sayısı
8 Mart	İzmir/Menemen/Emiralem	5
22 Mart	İzmir/Menderes/Ataköy	5
31 Mart	İzmir/Menemen/Süleymanlı	8
13 Nisan	Manisa/Salihli/Merkez	10
15 Nisan	İzmir/Menderes/Değirmendere	5
16 Mayıs	Muğla/Fethiye/Nif	9
	Muğla/Fethiye/Merkez	1
27 Ekim	İzmir/Foça/Merkez	7

3.2.2 Denemelerde Kullanılan İsektisitler ve Seri Konsantrasyonların Hazırlanması

Denemelerde kullanılan isektisitler ülkemizde sebze ve marulda yaprakbitlerine karşı kullanılan acetamiprid, thiamethoxam, spirotetramat ve clothianidin aktif maddeleridir. Acetamiprid, thiametyhoxam ve clothianidin neonikotinoid grubuna ait isektisitlerdir. Böceklerin felce neden olan sinir sistemini hedef alırlar, sistemik ve kontakt etkilidirler. Nikotirik asetilkolin reseptörü agonisti olup, böceğin merkezi sinir sistemindeki sinapsisleri etkilemektedirler. Spirotetramat ise tetronik ve tetramik asit türevlerinden sistemik etkili bir isektisittir. Bu grup isektisitler yağ asidi sentezinin gerçekleştiği krebs döngüsünde, Asetil KoA Karboksilaz enzimini inhibe etmekte ve lipid biyosentezini engellemekte görevlidir.

Aktif maddeler üretici firmalardan temin edilmiş ve buzdolabında +4°C’de saklanmıştır. Her aktif madde için uygun çözücüler araştırılmış ve sonuçta etanolde sorunsuz çözüldüğü tespit edilmiştir. Stok solusyonlar denemenin kurulacağı zaman hazırlanmıştır. Stok solusyon hazırlamak için teknik maddeden 1 gr tartılmış ve 100 ml etanolde çözülmüştür. Böylece 10.000 ppm’lik stok solusyon elde edilmiştir.

3.2.3 Hassas popülasyon oluşturulması

Arazi popülasyonlarının isektisitlere direncinin araştırılabilmesi için öncelikle hassas popülasyonların temin edilip bu popülasyon üzerinde başlangıç toksisite (LC/LD) değerlerinin belirlenerek ayırıcı doz tespit edilmesi

gerekmektedir. Bu bağlamda *Nasonovia ribisnigri* ile direnç çalışmalarının yürütüldüğü bir araştırma kurumundan (The University of Warwick, İngiltere) hassas Marul yaprakbiti popülasyonu istenilmiş ancak temin edilememiştir. Bu nedenle daha önce rutinde ilaçlama yapılmadığı bilinen Foça'daki bir marul bahçesinden, bulaşık marul bitkileri laboratuvara getirilmiş, temiz bitkilere aktarılan bireylerden bir popülasyon elde edilmiştir. Konu uzmanı tarafından teşhis sonucu *Nasonovia ribisnigri* olduğu kesinleşen bu popülasyon, başlangıç hassas popülasyonu olarak kullanılmıştır.

3.2.3.1 Konukçu bitki üretimi

Popülasyonların üretimini sağlamak için Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü iklim odalarında farklı sıcaklık ve nem değerlerinde, farklı marul ve turp çeşitleri üzerinde ön denemeler yapılarak en uygun yetiştirme koşulları belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 3.1). Yapılan gözlemler sonucunda en uygun konukçunun fındık turpu olduğu ve en iyi popülasyon gelişiminin $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, $\%60\pm 5$ orantılı nem, 16:8 saatlik fotoperiyot olduğu belirlenerek çalışmalara fındık turpu ile devam edilmiştir.



Şekil 3.1 Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü iklim odaları fındık turpu ve marul üretimi.

3.2.3.2 Foça popülasyonunda LC çalışması

Foça'dan getirilen hassas popülasyonun başlangıç toksisite değerlerini belirlemek için IRAC 19 nolu daldırma metodu ile biyoassay çalışmaları yürütülmüştür.

Denemelerde kullanılmak üzere ülkemizde sebze ve marulda yaprakbitlerine karşı kullanılan acetamiprid, thiamethoxam, spirotetramat ve clothianidin aktif maddeleri seçilmiştir. Teknik maddeler üretici firmalardan temin edilmiş ve buzdolabında +4°C’de saklanmıştır. Stok solüsyonlar denemelerden hemen önce etanol ile hazırlanmıştır (Şekil 3.2). Bu amaçla her teknik maddeden 1 gr tartılıp 100 ml ethanolde çözülerek 10.000 ppm’lik stok solüsyon elde edilmiştir.



Şekil 3.2 Stok solüsyondan hazırlanan seri konsantrasyonlar.

Biyoassay çalışmalarında amaç %10 ile %90 arasında ölüm oranı veren en az 5 farklı konsantrasyonla doz-tepki ilişkisini ortaya koymak olduğu için, stok solüsyonlardan doz serileri hazırlanırken saf su kullanılarak en az 6 doz elde edilmiş ve kontrol olarak da saf su kullanılmıştır (Tablo 3.2). İklim odasında yetiştirilen temiz turp bitkilerinden alınan yaprak örnekleri 4 cm çaptaki yaprak kesici ile kesilip disk şeklindeki yaprak parçaları çıkarılmıştır. Bu disk şeklindeki yapraklar, farklı dozlarda solüsyonun hazırlandığı beherlere bir pens yardımıyla daldırılmış ve solüsyona daldırılan bu yaprak diskleri 5 saniye sallanıp tüm yüzeyinin homojen bir şekilde ilaçlı su ile teması sağlanmıştır. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra da alt kısmı pamukla kaplı petrilere yerleştirilmiştir. Her ilaç ve tekerrür için Foça popülasyonundan alınan 20 adet ergin birey petri kaplarına aktarılıp 5 tekerrürlü bir deneme kurulmuştur (her ilaç için 100 birey). Petri kapları 72 saat süresince iklim odasında tutulmuş ve ölü/canlı birey sayımları yapılmıştır. Sonuçlar POLO-PC (Leora Software, 1987) programı kullanılarak yapılan probit analizi sonucunda LC değerleri elde edilmiştir.

Tablo 3.2 Biyoassay çalışmalarda kullanılan doz serileri

Aktif Maddeler	Dozlar (ppm)					
Acetamiprid	10	3	1	0,3	0,1	0,03
Thiamethoxam	300	100	30	10	3	1
Clothianidin	30	10	3	1	0,3	0,1
Spirotetramat	30	10	3	1	0,3	0,1

3.2.3.3 Geriye seleksiyon ile hassas popülasyon oluşturulması

Foça popülasyonunun LC değerleri beklenilenden yüksek olduğu için, mevcuttan daha hassas bir popülasyon elde etmek amacıyla bu çalışma yürütülmüştür. Yaprakbiti popülasyonu içerisinde heterojenlik olması nedeniyle direnç görülme olasılığı bireylere göre değişkenlik göstermekte olup, bu nedenle 50 birey ayrı kaplarda yetiştirilerek 50 farklı koloni oluşturulmuştur. Bu amaçla önce 50 adet kültür kabına, sapları pamuk ile sarılı temiz turp yaprakları yerleştirilmiştir. Her bir kaba mevcut hassas Foça popülasyonundan birer adet ergin dişi *N. ribisnigri* bireyi bırakılmıştır (Şekil 3.3). Her bir dişiden ayrı elde edilen koloniler yeterli sayıdaki birey sayısına ulaşıncaya kadar temiz fındık turpu yaprakları üzerinde çoğaltılmışlardır.



Şekil 3.3 Kültür kaplarında *N. ribisnigri* dişi bireyleri üretimi.

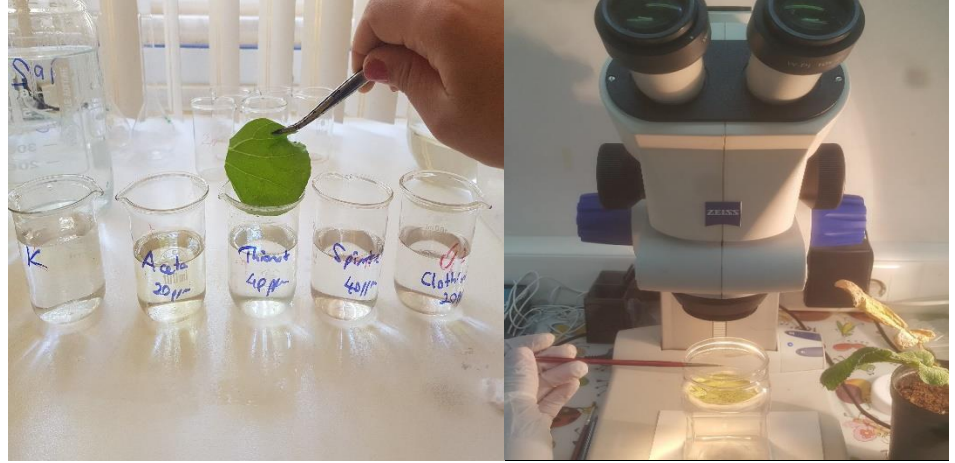
Mevcut Foça popülasyonundan elde edilen LC₁₀ değerleri ile hazırlanan çözeltilere temiz turp yaprakları daldırılarak 5 saniye sallanıp kurutma kâğıtlarında bekletilmiş, ayrı kültür kaplarındaki 50 yeni koloninin herbirinden

10'ar adet birey uygulama yapılmış yapraklar üzerine aktarılmıştır. 72 saat sonra canlı/ölü bireyler sayılmış ve her bir aktif maddeden en fazla ölümün gözleendiği koloniler (LC_{10} değerinde bile tamamı ölenler) daha hassas koloni olarak varsayıp, kültür kaplarında kalan bireyleriyle üretimlerine devam edilmiştir. LC_{10} değerinde canlı bireyi kalan koloniler yeterince hassas olmadıklarından atılmıştır. Bu şekilde seçilen ve üretimine devam edilen iki koloninin bireyleri yeter sayıya ulaştığında yine 50 farklı koloni oluşturularak yukarıda ifade edildiği gibi ancak daha da düşük dozda uygulamalar sonrasında en çok ölüm gözlenen koloniler seçilerek geriye dönük seleksiyon çalışmaları daha da düşük dozda tamamı ölene kadar sürdürülmüş ve böylece her bir aktif için en hassas koloni elde edilmeye çalışılmıştır.

3.2.3.4 Hassas popülasyonda LC değerlerinin ve ayırıcı dozun belirlenmesi

En hassas koloni elde edildikten sonra bu yeni popülasyonda yeni LC çalışması yapılarak her bir aktif için hassas popülasyonların LC değerleri ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla yine yukarıda ifade edildiği gibi her bir aktifin 6 ayrı dozu 5 tekerrürlü olarak ve her tekerrürde 10'ar birey kullanılarak (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5), uygulamadan 72 saat sonra ölü bireyler üzerinden doz-ölüm oranlarının probit analizi ile LC değerleri hesaplanmıştır.

Hassas kolonilerde yapılan LC çalışmalarının ardından, her aktif için %95 güven aralığında elde edilen LC_{90} değerlerinin yaklaşık 2 katı arazi popülasyonlarının direnç durumunu takip edebilmek için ayırıcı doz (eşik doz) olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.4 Yaprak disklerin ilaçlı suya daldırılması Şekil 3.5 Yaprakbitlerinin buluşturılması.

3.2.4 *Nasanovia ribisnigri* popülasyonlarının yaygın kullanılan insektisitlere direncinin belirlenmesi

3.2.4.1 Arazi popülasyonlarının toplanması ve kültüre alınması

Ege Bölgesi'nde marul üretim alanlarındaki yaprakbiti popülasyonlarının insektisitlere direncini belirlemek amacıyla arazi çalışmalarına 2017 yılında başlanmış ve 2019 yılında son bulmuştur. İlk popülasyon Mart ayında Menemen ilçesinden alınmıştır.

Bu amaçla, yukarıda ifade edildiği gibi arazide incelemeler yapılarak 2017 yılı Mart-Nisan aylarında toplam 11 farklı popülasyon, 2018 yılında 28 farklı popülasyon ve 2019 yılında ise 31 farklı popülasyon Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Laboratuvarına getirilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 Ege Bölgesi marul üretim alanlarından toplanan *N.ribisnigri* popülasyonları

Örnekleme Tarihi	İl/İlçe	Mahalle	Popülasyon Kodu
21.03.2017	İzmir/Menemen	İğnedere/Süleymanlı	MEN-1
21.03.2017	İzmir/Menemen	Emiralem	MEN-2
28.03.2017	İzmir/Menderes	Develi	MND-1
28.03.2017	İzmir/Menderes	Çamönü	MND-2
28.03.2017	İzmir/Menderes	Değirmendere	MND-3
09.04.2017	İzmir/Ödemiş	Havuzlar	ÖDM-1
24.04.2017	Manisa/Salihli	Çukuroba	SAL-1
24.04.2017	Manisa/Alaşehir	Çağlayan	ALA-1

Tablo 3.3 Devamı			
Örnekleme Tarihi	İl/İlçe	Mahalle	Popülasyon Kodu
29.04.2017	Muğla/Fethiye	Merkez	FET-1
30.04.2017	Muğla/Seydikemer	Ceylan	SEY-1
30.04.2017	Muğla/Seydikemer	Kayabaş	SEY-2
01.03.2018	İzmir/Menemen	Süleymanlı	-
08.03.2018	İzmir/Menemen	Emiralem-1	MEN-3
08.03.2018	İzmir/Menemen	Emiralem-2	MEN-4
08.03.2018	İzmir/Menemen	Değirmendere-1	MEN-5
08.03.2018	İzmir/Menemen	Değirmendere-2	MEN-6
08.03.2018	İzmir/Menemen	İğnedere	MEN-7
10.03.2018	İzmir/Ödemiş	Merkez	-
21.03.2018	Manisa/Salihli	Kabazlı	SAL-2
21.03.2018	Manisa/Salihli	Çukuroba	SAL-3
21.03.2018	Manisa/Salihli	Hacıbektaşlı-1	SAL-4
21.03.2018	Manisa/Salihli	Hacıbektaşlı-2	SAL-5
22.03.2018	İzmir/Menderes	Ataköy-1	MND-3
22.03.2018	İzmir/Menderes	Ataköy-2	MND-4
22.03.2018	İzmir/Menderes	Ataköy-	MND-5
22.03.2018	İzmir/Menderes	Değirmendere	MND-6
22.03.2018	İzmir/Menderes	Sancaklı	MND-7
8.04.2018	İzmir/Ödemiş	Oğullar-1	ÖDM -2
8.04.2018	İzmir/Ödemiş	Oğuzlar-2	ÖDM-3
13.04.2018	Manisa/Alaşehir	Çağlayan	ALA-2
22.04.2018	Muğla/Fethiye	Merkez-1	FET-2
22.04.2018	Muğla/Fethiye	Merkez-2	FET-3
22.04.2018	Muğla/Fethiye	Nif-1	FET-4
22.04.2018	Muğla/Fethiye	Nif-2	FET-5
22.04.2018	Muğla/Seydikemer	Ceylan-1	SEY-3
22.04.2018	Muğla/Seydikemer	Ceylan-2	SEY-4
22.04.2018	Muğla/Seydikemer	Ceylan-3	SEY-5
30.04.2018	Muğla/Fethiye	Nif-3	FET-6
30.04.2018	Muğla/Fethiye	Nif-4	FET-7
11.05.2018	İzmir/Ödemiş	Merkez-1	ÖDM-4
11.05.2018	İzmir/Ödemiş	Merkez-2	ÖDM-5
29.03.2019	İzmir/Menemen	İğnedere	MEN-8
29.03.2019	İzmir/Menemen	İğnedere	MEN-9
29.03.2019	İzmir/Menemen	İğnedere	MEN-10
29.03.2019	İzmir/Menemen	Süleymanlı	MEN-11

Tablo 3.3 Devamı			
Örnekleme Tarihi	Örnekleme Tarihi	Örnekleme Tarihi	Örnekleme Tarihi
20.04.2019	Manisa/Salihli	Kabazlı	SAL-6
20.04.2019	Manisa/Salihli	Kabazlı	SAL-7
20.04.2019	Manisa/Salihli	Değirmendere	SAL-8
20.04.2019	İzmir/Menemen	Değirmendere	SAL-9
20.04.2019	İzmir/Menemen	Değirmendere	SAL-10
04.05.2019	İzmir/Menemen	Emiralem	MEN-12
04.05.2019	İzmir/Menemen	Emiralem	MEN-13
04.05.2019	İzmir/Menemen	Emiralem	MEN-14
04.05.2019	İzmir/Menemen	Emiralem	MEN-15
29.05.2019	İzmir/Menemen	İğnedere	MEN-16
29.05.2019	İzmir/Menemen	İğnedere	MEN-17
29.05.2019	İzmir/Menemen	İğnedere	MEN-18
29.05.2019	İzmir/Menemen	Emiralem	MEN-19
29.05.2019	İzmir/Menemen	Emiralem	MEN-20
29.05.2019	İzmir/Menemen	Emiralem	MEN-21
29.05.2019	İzmir/Menemen	Emiralem	MEN-22
29.05.2019	İzmir/Menemen	Emiralem	MEN-23
30.05.2019	İzmir/Menderes	Değirmendere	MND-6
30.05.2019	İzmir/Menderes	Değirmendere	MND-8
30.05.2019	İzmir/Menderes	Değirmendere	MND-9
30.05.2019	İzmir/Menderes	Ataköy	MND-10
30.05.2019	İzmir/Menderes	Ataköy	MND-11
30.05.2019	İzmir/Menderes	Ataköy	MND-12
30.05.2019	İzmir/Menderes	Ataköy	MND-13
10.06.2019	Muğla/Fethiye	Çamköy	FET-8
10.06.2019	Muğla/Fethiye	Çamköy	FET-9
10.06.2019	Muğla/Fethiye	Karaçulha	FET-10

Tez çalışması çerçevesinde sonuç olarak 2017, 2018 ve 2019 yıllarında ve 10.06.2019 tarihine kadar Ege Bölgesi marul üretim alanlarından *N. ribisnigri*'nin yaygın kullanılan insektisitlere direncini belirlemek amacıyla 70 farklı popülasyon toplanmış ve biyoassay çalışmalarda kullanılma amacıyla iklim odalarında üretimleri sağlanmıştır.

3.2.4.2 Arazi popülasyonlarına ayırıcı doz uygulamaları ve dirençli popülasyonların belirlenmesi

Ege bölgesinde marul üretiminin yoğun olarak yapıldığı alanlardan 2017 yılı içerisinde 11, 2018 yılı içerisinde 28 ve 2019 yılında ise 31 farklı popülasyon alınarak Enstitü iklim odalarında kültüre alınıp çoğaltıldıktan sonra her bir aktif için hassas popülasyonda belirlenen ayırıcı doz değerleri yine yaprak daldırma yöntemi ile uygulanarak direnç durumları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla arazi popülasyonlarından her bir tekerrür için 10'ar ergin birey petri kaplarındaki ayırıcı doz ile uygulama yapılmış yaprak üzerine aktarılmış (toplamda her bir aktif için 50 birey) ve 72 saat sonra sayım yapılarak popülasyonu temsilen alınan bireylerin tamamı öldüğünde o popülasyonun hassas olduğu/dirençli olmadığı varsayılarak üretimlerine son verilmiş, canlı kalan bireyler söz konusu olduğunda da o popülasyonda direnç başlangıcı olabileceğinden ayrılarak üretimlerine devam edilmiştir.

3.2.4.3 LC çalışması ve direnç oranının belirlenmesi

Sadece ayırıcı doz uygulamasından canlı kalan bireylerin olduğu popülasyonlarda yukarıda ifade edildiği gibi yeni LC çalışmaları yapılarak arazi popülasyonlarının LC değerleri, hassas popülasyonun LC değerleri ile kıyaslanıp direnç katsayıları ortaya konulmaya çalışılmıştır.

3.2.5 Dirençli popülasyon oluşturulması

3.2.5.1 İleriye seleksiyon ile dirençli popülasyon oluşturulması

Ege bölgesi marul üretim alanlarından toplanan arazi popülasyonlarından ayırıcı doz uygulaması sonrasında sadece İzmir ili, Menemen ilçesi, İğnedere bölgesinden getirilen MEN-5 popülasyonunda canlı bireyler kalmış, ancak bu popülasyonun LC değerinin hassas popülasyon LC değerinden büyük farkla ayrılmadığı görüldüğünden ileriye seleksiyonla moleküler çalışmalarda kullanılacak dirençli popülasyonlar elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla ayırıcı doz uygulanan popülasyondan canlı kalan bireyler ayrı ayrı üretilerek yeter sayıya ulaştığında geriye seleksiyon yönteminde açıklandığı gibi her bir birey ayrı ayrı koloniler elde etmek üzere üretilmiş, her koloniye her defasında daha yüksek dozda uygulamalar yapılarak ilaç baskısı altında ileri seleksiyon ile popülasyonu daha dirençli hale getirmek amaçlanmıştır.

Seleksiyon çalışmaları öncesinde ayrı ayrı oluşturulan yeni kolonilerden her bir aktif ve her bir tekerrür için 20'şer birey 4 tekerrürlü olarak (toplamda her aktif için 80 birey) daldırma biyoassay yöntemi ile 2 kat eşik doz

uygulanması yapılmış ve sadece canlı kalan bireylerin üretimine devam edilerek yeni koloniler oluşturulmuştur. Bu kolonilerde yeter sayıda bireye ulaşıldığında popülasyon kaybı yaşamamak için her defasında popülasyonun yarısı ayrılıp diğer yarısına aşağıdaki gibi seleksiyon amaçlı uygulamalar yapılmıştır. Her aktif için 10 ppm'lik hazırlanan konsantrasyonlar haftalık olarak kafesler içerisinde turp bitkileri üzerinde yetiştirilen yaprakbitlerine püskürtülerek uygulanmış, her uygulamadan sonra canlı kalan bireyler ile yeni koloniler oluşturulmuştur. Her hafta dozlar artırılarak 50 ppm'e kadar çıkılmıştır. 50 ppm'de tüm bireylerde ölüm gözlenince doz 45 ppm'e düşürülüp tekrar uygulama yapılmıştır. 25.12.19 tarihinde başlayıp 17.02.2020 tarihine kadar 7 kez seleksiyon yapılmıştır.

3.2.5.2 Dirençli popülasyonda LC değerlerinin belirlenmesi

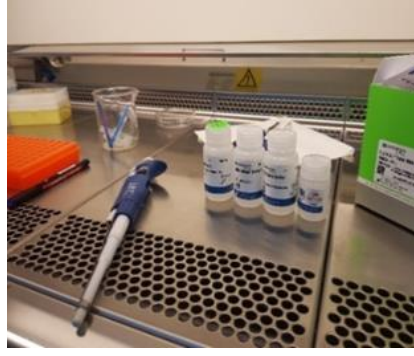
İleriye seleksiyon çalışmalarına hiç canlı birey kalmayan doza kadar devam edilmiş ve 50 ppm'de çalışma sonlandırılmıştır. Söz konusu aktiflere direnç kazanan popülasyon ile direnç oranını belirlemek amacıyla LC çalışmaları yapılarak laboratuvar koşullarında her bir aktif için LC değerleri yukarıda açıklandığı gibi yeniden belirlenmiştir.

Böylece moleküler çalışmalarda kullanılacak dirençli popülasyon elde edilmiştir.

3.2.6 Moleküler çalışmalar

3.2.6.1 RNA izolasyonu

Projede yapılan biyoassay çalışmaları ardından moleküler çalışmaları yürütmek amacıyla Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Moleküler Entomoloji Laboratuvarında *Nasonovia ribisnigri*'nin ileriye ve geriye seleksiyon çalışmaları sonucunda elde edilen en dirençli ve en hassas popülasyonlarında Omega (Bio-Tek) Total RNA Kiti ve bu kitle tanımlanan protokol kullanılarak RNA ekstraksiyonu yapılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Total RNA kit solüsyonları



Şekil 3.7 Solüsyonların mikrosantrifüj tüpüne aktarımı

İzolasyon kitinde yer alan protokole göre yaklaşık 20 mg olacak şekilde yaprakbitleri bir mikrosantrifüj tüpünde tartılarak steril ezici çubuklarla örnekler ezilmiştir. Üzerine 350 μ L lysis buffer ilave edilerek ezme işlemi devam etmiştir. Daha sonra +4 $^{\circ}$ C'de 5 dk 12000g'de santrifüj edilmiştir. Üstteki faz temiz bir tüpe alınarak üzerine % 70'lik 350 μ L etanol ilave edilerek birkaç kez pipetle tüpün içerisinde iyice karıştırılmıştır. Karışım kit içerisinde hazır bulunan filtreli tüplere alınarak 1 dk 12000g'de santrifüj edilmiştir. Filtreli tüpün altında toplanan sıvı atılarak üzerine 500 μ L RNA yıkama solüsyonu I ilave edilerek 1 dk santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı tekrar atılmıştır. Her işlem sonrası 1 dk santrifüj tekrarlanmıştır. Daha sonra tüpe 500 μ L RNA yıkama solüsyonu II ilave edilerek 2 dakika santrifüj edilmiştir. Yeni mikrosantrifüj tüpüne 40 μ L RNase inkubasyon solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dk inkube edilmiştir (Şekil 3.9). İnkubasyon sonrası üzerine 200 μ L SV DNase stop solüsyonu eklenerek 2 dk 14000g'de santrifüj edilmiştir. Altta toplanan RNA -80 $^{\circ}$ C'de saklanmıştır.

3.2.6.2 Elde edilen RNA'ların spektrofotometrede ölçümü

Konsantrasyonlar NanoDrop2000 spektrofotometrede (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE), ölçülerek diğer aşamalarda kullanılabilece kadar mikrosantrifüj tüplerde -80 $^{\circ}$ C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Spektrofotometrede konsantrasyon ölçümü

RNA örnekleri 260 nm, proteinler ise 280 nm dalga boylarında maksimum absorbansa sahiptir. Bu iki dalga boyunda elde edilen absorbansların oranı bize 'saflık' derecesini vermektedir. Nükleik Asitler için saflık değerini 260/230 oranı vermektedir. Beklenen saflık değeri; DNA ölçümleri için : ~ 1,8 RNA ölçümleri için : ~ 2,0 kabul edilmektedir.

3.2.6.3 Elde edilen RNA'ların agaroz jelde görüntülenmesi

İzole edilmiş olan RNA moleküllerinin saflığının ve bütünlüğünün korunup korunmadığının incelenmesi amacıyla görüntüleme yapılmıştır. Total RNA analizlerinde üç bant görülmektedir ve yukarıdan aşağıya doru sırasıyla rRNA, mRNA ve tRNA yer alır.

Agaroz jelde görüntülenmesi için elde edilen PCR ürünleri %1,5' lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Koşurma ve agaroz hazırlama tamponu olarak 1xTAE tampon çözeltisi kullanılmıştır. %1,5' lik agaroz jel hazırlamak için erlenmayer içinde 1,5 gr agaroz ve 100 ml 1xTAE tampon çözelti mikrodalgada ısıtılarak çözülmüştür. Kısa bir süre soğutulduktan sonra 5 µl Pronosafe eklenmiştir. Ardından yatay elektroforez tankına uygun boyutlarda tarak yerleştirilecek ve hazırlanan agaroz dökülmüştür. Yaklaşık 1 saat sonunda polimerize olan jel, içi 1xTAE tamponuyla doldurulmuş tanka yerleştirilmiş ve tarak çıkarılmıştır.

2 µL RNA, 5 µL yükleme boyası(Promega, Madison, ABD) ile iyice karıştırıldıktan sonra %1,5 lik agarose jelle yüklenerek 100 voltta 30 dk koşturulmuştur (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Agaroz jelde görüntüleme

Referans genomu çıkartılmamış böceklerde de yapılan çalışmalar RNA sekanslama (RNA-seq) ile gerçekleştirildiği için örnekler analiz için gönderilmiştir.

3.2.6.4 RNA kalite kontrolü, RNA-seq kütüphane hazırlanması için transkriptom dizileme

RNA kalitesi ve miktarı, Bioanalyzer 2100 sisteminin (Agilent Technologies, CA, ABD) RNA Nano 6000 Assay Kit'i kullanılarak değerlendirilmiştir.

Kütüphane hazırlanması için örnek başına toplam 1 µg/ml RNA miktarı kullanılmıştır. Sekanslama kütüphanesi NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB, USA) kiti üretici firmanın tavsiyesi ve index kodlarından yararlanılarak oluşturulmuştur. Kısaca, mRNA poli-T oligo-bağlı manyetik boncuklar kullanılarak toplam RNA'dan saflaştırılmıştır. Fragmentasyon NEBNext First StrandSynthesis Reaction Buffer (5X) da yüksek sıcaklık altında iki değerlikli katyonlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Birinci cDNA ipliği rastgele heksamer primer ve M-MuLV Reverse Transcriptase (RNase H-) kullanılarak sentezlenmiştir. İkincil cDNA ipliği ise DNA Polymerase I and RNase H kullanılarak sentezlenmiştir.

DNA parçalarının 3' ucunun adenilasyon sonrası, hairpin bağlanma yapılı NEBNext Adaptor hibridizasyona hazırlanmak için bağlanması sağlanmıştır. cDNA fragmanlarını uzunluklar tercihen 150 ~ 200 bp'lik seçmek için, kütüphane parçaları AMPure XP (Beckman Coulter, Beverly, USA) kiti ile saflaştırılmıştır. Boyuta göre seçilmiş, adaptörle bağlanmış cDNA 3 µl

USER Enzim (NEB, USA) PCR öncesi 37 ° C'de 15 dakika, 95 ° C'de 5 dakika koşullarında kullanılmıştır. PCR reaksiyonu Phusion High-Fidelity DNA polymerase, Universal PCR primerleri ve Index (X) Primer gerçekleştirilmiştir. Son olarak PCR ürünleri AMPure XP system ürüleri ile saflaştırılmıştır. Kütüphane kalitesi Agilent Bioanalyzer 2100 sisteminde kontrol edilmiştir.

Index kodlu örneklerin hizalamasında PE Cluster Kit cBot-HS (Illumina) üretici firma talimatlarına göre cBot Cluster Generation Sistemden hizalamalar gerçekleştirilmiştir. Hizalama işleminden sonra, kütüphane hazırlıkları Illumina platformundan çift yönlü okumalar üretilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.5 Biyoinformatik veri analizi

FASTQ formatındaki ham verilerden temiz veriler elde etmek için öncelikli olarak adaptör içeren okumalar ve Poly-N içeren dizileri ve düşük kalitedeki okumalar yazılım yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Temiz verilerin At Q20, Q30 and GC içerikleri hesaplanmıştır. Analizler temiz veriler kullanılarak sonuçlandırılmıştır.

Trinity programı ile transkriptom verileri düzenlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan fazlalıkları kaldırmak için CORSET yazılım programı kullanılmıştır. Hizalama çoklu haritalama ve ifade modellerine göre gerçekleştirilmiştir (<https://github.com/Oshlack/Corset/wiki>).

Gen işlevini Nr (protein dizileri), Nt (nükleotid dizileri), Pfam (Protein ailesi), KOG/COG (Ortolog Protein Grupları), Swiss-Prot (protein dizisi veritabanı), KO (KEGG Ortolog veritabanı) ve GO (Gen ontolojisi) tanımlamak için veritabanlarından yararlanılmıştır. Gen ekspresyon seviyeleri, her örnek için RSEM (Li ve diğerleri, 2011) ile tahmin edilmiştir. RSEM, RNA-Seq verilerindeki transkriptlerin kantifikasyonunun sağlanması için kullanılan bir uygulamadır. Özellikle de novo transkriptom çalışmalarında tercih edilmektedir. Uygulama RNA transkriptlerinin miktar ve oranlarının hesaplanmasında kullanılmaktadır.

4.BULGULAR

4.1 Yaygın Türün Belirlenmesi

Bölgede marulda en yaygın yaprakbiti türünü belirlemek amacıyla toplanan örnekler teşhis için Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsünde konu uzmanı Dr. Işıl ÖZDEMİR'e gönderilmiştir. Yapılan teşhis çalışmalarında marulda en yaygın görülen yaprakbiti türünün marul yaprakbiti *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae) olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Ege bölgesi marul üretim alanlarından toplanan yaprakbiti türleri teşhis sonuçları

Yer	Tür Teşhis Sonucu
Menemen/Emiralem	<i>Nasonovia ribisnigri</i>
Menderes/Ataköy	<i>Nasonovia ribisnigri</i>
Menemen/Süleymanlı	<i>Nasonovia ribisnigri</i>
Salihli/Merkez	<i>Nasonovia ribisnigri</i>
	<i>Myzus persicae</i>
Menderes/Değirmendere	<i>Nasonovia ribisnigri</i>
Fethiye/Nif	<i>Nasonovia ribisnigri</i>
	<i>Uroleucon sonchi</i>
Fethiye/Merkez	<i>Nasonovia ribisnigri</i>
Foça	<i>Nasonovia ribisnigri</i>

N. ribisnigri dışında marulda görülen yaprakbiti türlerinden Salihli Merkez'de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) ve Fethiye Nif bölgesinde *Uroleucon sonchi* (Linnaeus) (Hemiptera: Aphididae) de teşhis edilen örnekler arasında yer almaktadır.

4.2 Hassas Popülasyon Eldesi ile İlgili Bulgular

4.2.1 Foça popülasyonunun LC değerleri

Hassas olduğu düşünülen Foça bölgesinden alınan popülasyonun LC değerlerini belirlemek amacıyla yapılan biyoassay çalışmalarından sonra probit analize göre LC₁₀, LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri belirlenmiştir. Buna göre Tablo 4.2'de Foça hassas popülasyonuna uygulanan acetamiprid, thiamethoxam, clothianidin ve spirotetramat'ın LC değerleri ve güven aralıkları gösterilmiştir.

Tablo 4.2 Hassas Foça popülasyonunda probit analizi sonucunda LC değerlerinin belirlenmesi

P ⁵	Aktifler	LC ₁₀ ppm 95 %GA ¹	LC ₅₀ ppm 95 % GA ¹	LC ₉₀ ppm 95 % GA ¹	Egim±SH ²
Hassas	Acetamiprid	0.103 0.064-0.134	0.770 0.612-0.973	6.139 4.307-9.640	1.421±0.1
	Thiamethoxam	0.136 0.106-0.814	4.222 3.242-5.365	33.226 24.110-50.323	1.430±0.1
	Clothianidin	0.139 0.007-0.433	1.696 0.820-3.603	20.737 8.136-129.508	1.173±0.0
	Spirotetramat	0.219 0.039-0.516	2.35 1.192-4.794	25.164 10.304-156.133	1.245±0.1

¹ Güven aralığı ² Standart hata ³ Popülasyon

Tablo 4.2’de %95’lik güven aralığında probit analizi ile elde edilen sonuçlara göre LC₁₀ değerleri acetamipridin 0.103 ppm, thiamethoxamın 0.136 ppm, clothianidinin 0.139 ppm ve spirotetramatın ise 0.219 ppm olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu değerler hassas popülasyona uygulanıp ölüm oranının en yüksek olduğu bireyler ile geriye seleksiyon çalışmalarına devam edilmiştir.

4.2.2 Geriye seleksiyon denemesi bulguları

Foça’dan getirilen hassas popülasyondan elde edilen 50 farklı koloniye her aktif için belirlenen LC₁₀ değerleri uygulanmış ve ölü birey sayıları Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3 Hassas popülasyondan elde edilen 50 farklı koloniye her aktif için LC₁₀ uygulaması sonrası ölü birey sayıları (n=10 herbir kolonideki ergin birey sayısı)

Koloni	Acetamiprid	Thiamethoxam	Clothianidin	Spirotetramat
1	1	1	4	1
2	2	3	3	5
3	1	2	3	3
4	3	3	1	2
5	4	1	5	4
6	3	2	4	2
7	4	1	5	1
8	1	1	3	6
9	3	6	5	3
10	3	3	2	5
11	5	2	5	4
12	4	2	5	2
13	6	5	7	7

Tablo 4.3 Devamı				
Koloni	Acetamiprid	Thiamethoxam	Clothianidin	Spirotetramat
14	3	5	3	3
15	2	4	3	3
16	3	5	2	2
17	6	5	4	3
18	4	2	6	2
19	4	3	2	4
20	5	4	4	2
21	6	6	2	2
22	4	5	3	4
23	3	2	2	1
24	7	2	3	2
25	4	6	6	4
26	6	6	1	2
27	2	4	4	6
28	5	2	3	4
29	1	2	5	3
30	4	3	5	3
31	4	2	3	3
32	5	4	4	5
33	6	7	5	6
34	2	2	2	3
35	1	3	5	4
36	5	3	2	2
37	4	1	1	2
38	5	1	3	2
39	2	4	5	3
40	2	3	1	5
41	6	2	1	1
42	1	6	3	5
43	1	1	6	3
44	3	2	2	4
45	6	2	4	2
46	2	3	4	2
47	4	5	3	3
48	2	5	1	1
49	2	2	2	3
50	2	3	2	1

Yapılan ölü birey sayım sonuçlarına göre her aktif madde içinde 33 ve 13 nolu koloni bireylerinin ölüm oranının daha fazla olduğu görülerek daha hassas olduğu varsayılmıştır (Tablo 4.3). Bu kolonilerin üretimlerine devam edilmiş, diğerlerinin üretimlerine son verilmiştir.

4.2.3 Hassas popülasyonun LC değerleri ve ayırıcı doz

Seleksiyon çalışması sonrasında daha hassas olarak kabul ettiğimiz 33 ve 13 nolu kolonilere farklı doz serileri uygulanmıştır. Tesadüf parselleri deneme

desenine göre 5 tekerrürlü olarak kurulan denemelerde 10 birey ile yapılan uygulama sonrasında deneme sonuçları 72 saat sonra ölü bireyler üzerinden hesaplanmıştır Her aktif madde için belirlenen doz uygulamaları sonrasında probit analize göre LC değerleri Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4 Foça popülasyonu ile 33 ve 13 nolu kolonilere aktif madde uygulamalarının sonrasında LC değerleri ve direnç oranları

Popülasyon/ Koloni	Aktif madde	n*	LC ₅₀ ppm 95 % GA**	LC ₉₀ ppm 95 % GA**	LC ₉₉ ppm 95 % GA**	Direnç oranı RR***	
						LC ₅₀	LC ₉₀
Foça	Acetamiprid	50	4.077 1.215-19.753	83.765 25.246-198.006	927.99 328.508-9607.6	1.00	1.00
33 Nolu			0.634 0.313-1.243	9.125 3.801 - 45.539	80.258 20.681-1208.6	6.43	9.17
13 Nolu			1.152 0.394-2.499	18.448 7.153-142.009	176.96 45.621-3452.9	3.53	5.24
Foça	Thiamethoxam	50	3.254 0.478-7.695	74.125 22.469-172.06	694.71 213.85-1042.41	1.00	1.00
33 Nolu			0.783 0.448-1.229	26.176 14.445 - 60.883	457.568 162.448-2212.447	4.15	2.83
13 Nolu			1.120 0.670 -1.738	22.069 12.013- 54.0 97	250.723 91.481 -1231.920	4.37	3.35
Foça	Spirotetramat	50	2.454 0.347-6.826	24.556 8.368-1572.9	119.75 32.654-2340.4	1.00	1.00
33 Nolu			0.513 0.111-1.471	13.553 3.820-376.997	195.47 25.740-90.629	4.78	1.81
13 Nolu			0.826 0.074-3.763	29.893 5.7010-25255	557.36 40.020-726.097	2.97	0.82
Foça	Clothianidin	50	2.358 0.755-6.877	54.032 15.257-964.434	694.16 100.33-95669.1	1.00	1.00
33 Nolu			0.698 0.339-1.202	7.667 3.866-26.691	54.106 17.743-529.311	3.37	7.04
13 Nolu			0.760 0.425-1.406	12.997 5.223-75.055	131.48 30.632-2534.7	3.10	5.27

*n:birey sayısı **GA:Güven aralığı ***RR= Direnç oranı (Popülasyonun LC50 veya LC90 değeri/ Hassas popülasyonun LC50 veya LC90 değeri)

Her iki koloni için (33 nolu ve 13 nolu) aktif maddelerle yapılan denemelerde elde ettiğimiz LC değerleri sonucunda %95 güven aralığında acetamiprid, clothianidin ve spirotetramat için 2 kat’lık bir doz farkı ile, thiamethoxam’da ise yakın değerlerin saptanması nedeniyle çalışmalara 33 nolu hassas koloni ile devam edilmiş ve 13 nolu koloni elden çıkarılmıştır. 33 nolu koloni Foça popülasyonuna göre acetamiprid aktif maddesi için yaklaşık olarak 7 kat daha hassas bir popülasyon olarak belirlenmiştir. Bundan sonraki

çalışmalara geriye doğru seleksiyon ile elde edilen bu hassas koloni ile devam edilecektir.

LC çalışmalarının ardından yapılan probit analizi sonucunda, 33 nolu hassas koloni acetamiprid için %95'lik güven aralığında elde ettiğimiz LC₉₀ değeri **9.125 ppm**, thiamethoxam için **26.176 ppm**, spirotetramat için **13.553 ppm** ve clothianidin için ise **7.667 ppm** olarak hesaplanmıştır. Bu değerler doğrultusunda arazi popülasyonlarına uygulanan ayırıcı doz değerleri yaklaşık olarak 2 kat arttırılarak acetamiprid için 20 ppm, thiamethoxam için 40 ppm, spirotetramat için 40 ppm ve clothianidin için 20 ppm olarak belirlenmiştir.

4.3 *Nasanovia ribisnigri* Popülasyonlarının Yaygın Kullanılan İsektisitlere Direnci ile İlgili Bulgular

4.3.1 Arazi popülasyonlarına ayırıcı doz uygulama sonuçları

Ege bölgesinde marul üretiminin yoğun olarak yapıldığı alanlardan toplanan 70 farklı popülasyona elde edilen ayırıcı doz değerleri uygulanmış, ölü birey sayıları Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5 Ege Bölgesi farklı marul ekiliş alanlarından toplanan arazi popülasyonlarında eşik doz uygulamaları sonrası ölü birey sayıları (n:50)

Popülasyonlar	Acetamiprid	Thiamethoxam	Spirotetramat	Clothianidin
MEN-1	50	50	50	50
MEN-2	50	50	50	50
MND-1	50	50	50	50
MND-2	50	50	50	50
MND-3	50	50	50	50
MND-4	50	50	50	50
MND-5	50	50	50	50
ÖDM-1	50	50	50	50
SAL-1	50	50	50	50
ALA-1	50	50	50	50
FET-1	50	50	50	50
SEY-1	50	50	50	50
SEY-2	50	50	50	50
MEN-3	50	50	50	50
MEN-4	50	50	50	50
MEN-5	45	46	44	50
MEN-6	50	50	50	50
MEN-7	50	50	50	50
SAL-2	50	50	50	50

Tablo 4.5 devamı				
Popülasyonlar	Acetamidrid	Thiamethoxam	Spirotetramat	Clothianidin
SAL-3	50	50	50	50
SAL-4	50	50	50	50
SAL-5	50	50	50	50
MND-6	50	50	50	50
MND-7	45	50	50	50
ÖDM -2	50	50	50	50
ÖDM-3	50	50	50	50
ALA-2	50	50	50	50
FET-1	48	45	48	50
FET-2	50	50	50	50
FET-3	50	50	50	50
FET-4	50	50	50	50
FET-5	50	50	50	50
SEY-3	50	50	50	50
SEY-4	50	50	50	50
SEY-5	50	50	50	50
FET-6	50	50	50	50
FET-7	50	50	50	50
ÖDM-4	50	50	50	50
ÖDM-5	50	50	50	50
MEN-8	50	50	50	50
MEN-9	50	50	50	50
MEN-10	50	50	50	50
MEN-11	50	50	50	50
SAL-6	50	50	50	50
SAL-7	50	50	50	50
SAL-8	50	50	50	50
SAL-9	50	50	50	50
SAL-10	50	50	50	50
MEN-12	50	50	50	50
MEN-13	50	50	50	50
MEN-14	50	50	50	50
MEN-15	50	50	50	50
MEN-16	50	50	50	50
MEN-17	50	50	50	50
MEN-18	50	50	50	50
MEN-19	50	50	50	50
MEN-20	50	50	50	50
MEN-21	50	50	50	50
MEN-22	50	50	50	50
MEN-23	50	50	50	50
MND-6	50	50	50	50

Tablo 4.5 devamı				
Popülasyonlar	Acetamiprid	Thiamethoxam	Spirotetramat	Clothianidin
MND-8	50	50	50	50
MND-9	50	50	50	50
MND-10	50	50	50	50
MND-11	50	50	50	50
MND-12	50	50	50	50
MND-13	50	50	50	50
FET-8	50	50	50	50
FET-9	50	50	50	50
FET-10	50	50	50	50

4.3.2 Menemen-İğnedere popülasyonunun LC değerleri

Menemen-İğnedere'den getirilen MEN-5 popülasyonu ve Fethiye Merkez'den getirilen FET-1 popülasyonlarında LC₉₀ değerine göre belirlediğimiz ayırıcı doz uygulamaları sonucunda canlı bireylere rastlandığından, direnç saptayabilme nedeniyle üretimlerine devam edilmiştir.

Canlı kalanlar ile yeniden LC çalışması yapılarak her aktif madde için belirlenen doz serileri uygulanmış ölü birey sayımları yapılmış ve probit analiz verilerine göre LC değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.6, 4.7, 4.8, 4.9).

Tablo 4.6 Hassas, MEN-5 ve FET-1 arazi popülasyonlarının acetamiprid LC değerleri

P ¹	n ²	LC ₅₀ ppm 95%GA ³	LC ₉₀ ppm 95% GA ³	LC ₉₉ ppm 95 % GA ³	Egim± SH ⁴	Direnç Oranı	
						LC ₅₀	LC ₉₀
HASSAS	50	0.634 0.313-1.243	9.125 3.801-45.539	80.258 20.681-1208.6	0.912± 0.09	1.00	1.00
MEN-5	50	1.512 0.497-3.160	21.398 8.748-158.682	185.6 43.288-8091.4	1.114± 0.13	2.38	2.31
FET-1	50	1.232 0.628-2.395	18.119 7.314-109.083	162.12 38.667-3433.8	1.098± 0.10	1.94	1.98

Tablo 4.7 Hassas, MEN-5 ve FET-1 arazi popülasyonlarının thiamethoxam LC değerleri

P ¹	n ²	LC ₅₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₉ ppm 95 %GA ³	Egim ± SH ⁴	Direnç Oranı	
						LC ₅₀	LC ₉₀
HASSAS	50	0.783 0.448-1.229	26.176 14.445 - 60.883	457.568 162.448-2212.4	0.966± 0.08	1.00	1.00
MEN-5	50	0.930 0.386-1.858	64.582 20.279-665.864	2048.9 272.36-	0.696± 0.07	1.18	2.46
FET-1	50	0.835 0.372-1.565	47.750 17.240-322.766	1293.1 217.28-45069	0.729± 0.08	1.06	1.82

¹ Popülasyon ² Birey sayısı ³ Güven aralığı ⁴ Standart hata ⁵ Heterojenite

Tablo 4.8 Hassas, MEN-5 ve FET-1 arazi popülasyonlarının spirotetramat LC değerleri

P ¹	n ²	LC ₅₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₉ ppm 95 % GA ³	Eğim ±SH ⁴	Direnç oranı	
						LC ₅₀	LC ₉₀
HASSAS	50	0.513 0.111-1.471	13.553 3.820-376.997	195.47 25.740-90.629	0.901 ±0.11	1.00	1.00
MEN-5	50	1.047 0.457-2.440	24.667 8.196-205.730	324.06 59.17-11141.1	0.934 ±0.08	2.04	1.82
FET-1	50	0.688 0.272-1.699	24.816 7.355-272.313	461.73 68.128-27092.1	0.823 ±0.07	1.34	1.83

¹ Popülasyon ² Birey sayısı ³ Güven aralığı ⁴ Standart hata

Tablo 4.9 Hassas, MEN-5 ve FET-1 arazi popülasyonlarının clothianidin LC değerleri

P ¹	n ²	LC ₅₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₉ ppm 95 % GA ³	Eğim±S H ⁴	Direnç Katsayısı	
						LC ₅₀	LC ₉₀
HASSAS	50	0.698 0.339-1.202	7.667 3.866-26.691	54.106 17.743-529.311	1.231± 0.14	1.00	1.00
MEN-5	50	0.871 0.495-1.523	23.997 9.844- 110.926	358.20 83.785-4922.9	0.890± 0.08	1.24	3.12
FET-1	50	0.884 0.569-1.365	18.031 9.001-52.165	210.762 68.558- 1267.707	0.978± 0.08	1.26	2.35

¹ Popülasyon ² Birey sayısı ³ Güven aralığı ⁴ Standart hata

Probit analizi ile elde edilen veriler sonucunda hassas koloni ile MEN-5 ve FET-1 arazi popülasyonları arasındaki direnç durumları karşılaştırılmıştır.

Elde edilen verilere göre bölgedeki potansiyel direnç durumu belirlenmiştir. En yüksek duyarlılık azalışı acetamiprid aktif maddesine karşı İzmir ili, Menemen ilçesi, İğnedere bölgesinden getirilen MEN-5 popülasyonunda görülmüştür. Ancak Ege Bölgesi'nde Marul yaprakbiti *N.ribisnigri*'de ciddi bir direnç varlığı söz konusu değildir.

4.4 Dirençli Popülasyon ile İlgili Bulgular

4.4.1 İleriye doğru seleksiyon denemesi bulguları

Ege bölgesi marul ekiliş alanlarından toplanan popülasyonlara uygulanan eşik dozlar sonrasında MEN-5 popülasyonunda en yüksek direnç katsayısı

gözlenmiştir. Bu popülasyon ile oluşturulan 8 yeni koloniye tekrar eşik doz uygulanmış ve sonuçlar (Tablo 4.10)' de gösterilmektedir.

Tablo 4.10 MEN-5 popülasyonu kolonilerine eşik doz uygulamaları sonrası ölü birey sayıları (n:80 herbir kolonideki ergin *N.ribisnigri* birey sayısı)

Popülasyonlar	Acetamiprid	Thiamethoxam	Spirotetramat	Clothianidin
K-1	80	80	80	80
K-2	80	80	80	80
K-3	80	80	80	80
K-4	78	80	80	80
K-5	80	80	80	80
K-6	80	80	80	80
K-7	77	80	80	80
K-8	80	80	80	80

Menemen popülasyonundan elde edilen K-4 ve K-7 kolonilerinde eşik doz uygulamaları sonunda canlı bireylere rastlandığından bu bireyler tekrar üretilerek yeni koloniler oluşturulmuş diğerleri elden çıkarılmıştır. Elde edilen bu 5 yeni koloniye uygulanan eşik doz 2 katına çıkarılmış, acetamiprid için 40 ppm, thiamethoxam için 80 ppm, spirotetramat için 80 ppm ve clothianidin için 40 ppm'lik stok çözelti uygulanmıştır. Yapılan sayım sonuçlarına göre canlı kalan bireyler Tablo 4.11' de gösterilmiştir.

Tablo 4.11 Dirençli kolonilere 2 kat eşik doz uygulamaları sonrası ölü birey sayıları (n:40)

Koloniler/Aktifler	Acetamiprid	Thiamethoxam	Spirotetramat	Clothianidin
K-1	40	40	40	40
K-2	40	40	40	40
K-3	38	40	40	40
K-4	40	40	40	40
K-5	40	40	40	40

K-3 kolonisinde 2 katlık eşik doz uygulamalarına rağmen hala canlı bireylere rastlandığından bu koloni ile seleksiyon çalışmalarına devam edilmiştir.

Haftalık olarak her uygulamadan sonra canlı kalan bireyler ile yeni koloniler oluşturulmuş ve 10 ppm'lik çözelti ile başlayıp her hafta arttırılarak 50 ppm'e kadar çıkılmıştır. İlk uygulamada hiç ölüm gözlenmediğinden dozu 10 ppm arttırarak 20 ppm'lik çözelti püskürtülerek uygulanmıştır. Her uygulamada popülasyonun yarısı ile seleksiyona devam edilmiş, kalan

bireylerin popülasyonunda artış sağlanmıştır. Yeni doz artışı yapmadan önce canlı kalan bireylere bir önceki doz çözelti hafta arasında tekrar uygulanmıştır. 50 ppm'lik çözültide tüm bireyler öldüğünden seleksiyona 45 ppm ile devam edilmiş ve seleksiyon çalışması sonlandırılmıştır. 25.12.19 tarihinde başlayıp 17.02.2020 tarihine kadar her aktifle 7 seleksiyon yapılmıştır (Tablo 4.12).

Tablo 4.12 K-3 kolonisine her aktifle seleksiyon yöntemi uygulamaları (n=100)

Koloni	Seleksiyon	Tarih	Doz
MEN-S ₁	1.Seleksiyon	25.12.2019	10 ppm
MEN-S ₂	2.Seleksiyon	02.01.2020	20 ppm
MEN-S ₃	3.Seleksiyon	15.01.2020	30 ppm
MEN-S ₄	4.Seleksiyon	21.01.2020	35 ppm
MEN-S ₅	5.Seleksiyon	30.01.2020	40 ppm
MEN-S ₆	6.Seleksiyon	10.02.2020	50 ppm
MEN-S ₇	7.Seleksiyon	17.02.2020	45 ppm

4.4.2 Dirençli popülasyonda LC değerleri

Seleksiyon sonucu elde edilen dirençli popülasyon ile LC çalışması yapılarak her aktifle yapılan uygulama sonrasında elde edilen ölü birey sayıları belirlenmiş ve probit analizi ile hassas popülasyon arasındaki direnç oranları ortaya konulmuştur.

Seleksiyon çalışmaları sonrasında MEN-S₇ popülasyonu ile her aktif için LC çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında direnç katsayıları arasında çok büyük farklar oluşmamıştır. En yüksek direnç katsayısı 58.22 kat ile acetamiprid aktifinde gözlenmiştir (Tablo 4.13).

Tablo 4.13 Hassas ve MEN-S₇ popülasyonunun aktif maddelere LC değerleri ve direnç oranları

Acetamiprid							
P ¹	n ²	LC ₅₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₉ ppm 95 % GA ³	Egim±SH ⁴	Direnç oranları	
						LC ₅₀	LC ₉₀
HASSAS	50	0.698 0.339-1.202	7.667 3.866-26.691	54.106 17.743-529.311	1.231±0.14	1.00	1.00
MEN-S ₇	50	40.643 28.661-59.069	141.773 88.123-390.300	392.61 188.31-2127.4	2.362±0.22	58.22	18.49

¹ Popülasyon ² Birey sayısı ³ Güven aralığı ⁴ Standart hata

Thiamethoxam							
P ¹	n ²	LC ₅₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₉ ppm 95 % GA ³	Egim±SH ⁴	Direnç Katsayısı	
						LC ₅₀	LC ₉₀
HASSAS	50	0.698 0.339-1.202	7.667 3.866-26.691	54.106 17.743-529.311	1.310±0.16	1.00	1.00
MEN-S ₇	50	40.082 28.657-57.218	138.451 87.607-352.576	380.35 187.75-1801.7	2.381±0.22	57.42	18.05

¹ Popülasyon ² Birey sayısı ³ Güven aralığı ⁴ Standart hata

Clothianidin							
P ¹	n ²	LC ₅₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₉ ppm 95 % GA ³	Egim±SH ⁴	Direnç Katsayısı	
						LC ₅₀	LC ₉₀
HASSAS	50	0.698 0.339-1.202	7.667 3.866-26.691	54.106 17.743-529.311	1.231±0.1	1.00	1.00
MEN-S ₇	50	33.808 24.132-47.339	123.610 79.449-286.545	355.686 179.320-1455.649	2.276±0.2	48.4	16.12

¹ Popülasyon ² Birey sayısı ³ Güven aralığı ⁴ Standart hata

Spirotetramat							
P ¹	n ²	LC ₅₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₀ ppm 95 % GA ³	LC ₉₉ ppm 95 % GA ³	Egim±SH ⁴	Direnç Katsayısı	
						LC ₅₀	LC ₉₀
HASSAS	50	0.698 0.339-1.202	7.667 3.866-26.691	54.106 17.743-529.311	1.231±0.14	1.00	1.00
MEN-S ₇	50	31.743 22.648-44.723	134.848 84.613-314.239	438.520 212.396-1796.759	2.040±0.18	45.4	17.58

¹ Popülasyon ² Birey sayısı ³ Güven aralığı ⁴ Standart hata

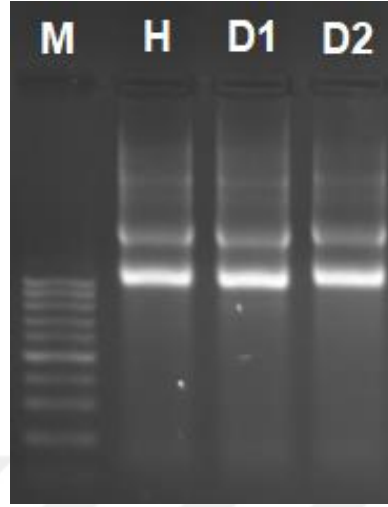
Çalışma sonunda söz konusu aktiflere en hassas ve en dirençli popülasyonlar ile moleküler çalışmalara geçilmiştir.

4.5 Moleküler Çalışmaların Verileri

4.5.1 Jel elektroforez görüntüsü ve nanodrop verileri

Biyosay çalışmaların ardından moleküler çalışmalara geçilerek *N. ribisnigri*'nin en dirençli ve en hassas popülasyonlarında Omega (Bio-Tek) Total RNA Kiti ve bu kitle tanımlanan protokol kullanılarak RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Dirençli ve hassas popülasyonlara ait RNA örneklerinin kalitesi ve konsantrasyonunu belirlemek amacıyla nanodrop

kullanılarak konsantrasyonları ölçülmüş, dirençli ve hassas popülasyonlara ait RNA örneklerinin jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.1’de gösterilmektedir.



M: 100 bp markör (Thermoscientific,USA),H:Hassas, D:Dirençli

Şekil 4.1 Jel elektroforez görüntüleri

Çalışmada elde edilen nanodrop sonuçlarına göre dirençli popülasyonda 2.14 (260/280), 2.15 (260/230) ve hassas popülasyonda 2.15 (260/280), 2.14 (260/230) olarak belirlenmiştir. Rittman et al, (2012)’e göre bu değerlerin 1.8’in altına düştüğü durumlarda sonraki basamakları etkileyebilirler ve saf bir örnekte bu değer 2.0’a yakındır. Elde edilen DNA örneklerinin saflık dereceleri istenen sınırlar arasında bulunmuş ve transkriptom analizi aşamasına geçilmiştir.

4.5.2 Transkriptom analiz sonuçları

4.5.2.1 Ham verilerin ve RNA sekans analizleri

Toplam RNA ekstraksiyonunun ardından örnekler DNase I uygulaması yapılmıştır. İzole edilen mRNA’lar fragmentasyon bufferı ile karıştırılıp fragmente edilmiştir. mRNA fragmentleri template olarak kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonu için uygun fragmentler seçilmiştir. Daha sonra oluşturulan bu kütüphaneler Illumina HiSeq 4000 cihazı kullanılarak sekanslanmıştır. Illumina gen dizileme yöntemi ile elde edilen orijinal ham veriler sekans okumalarına dönüştürülmüş ve sekans bilgisi ile ilgili sekanslama kalite bilgisi bir FASTQ dosyasına kaydedilmiştir.

Sekanslama sonrasında ham okumalar elde edilmiştir. İlk olarak bilinmeyen baz sıraları (N), adaptör kirliliğinden kaynaklı sıralar ve düşük kaliteli

okumalar filtrelenmiş ve net okumalar elde edilmiştir. Ortaya çıkarılan tekrar bölgelerine dayalı SSR primerleri tasarlanmıştır. Böylece primer çiftleri tasarlanırken, ileri [forward] ve geri [reverse] primerler arasında kalacak olan ve PCR deneyiyle çoğaltılacak olan bölgenin kaç baz olması gerektiğine karar verilmiştir. Varsayılan [default] değerler asgari [minimum] 70 baz, azami [maximum] 1000 baz olarak kaydedilmiştir.

4.5.2.2 Transkriptom yapılandırması

Referans genomun olmadığı örnekler için, referans dizisi elde etmek üzere saflaştırılmış okumalar bir araya getirilmiştir. Trinity yazılım programı (Grabherr et al., 2011), transkriptom yapılandırma sürecini tamamlamak için kullanılmıştır. Birleştirilmiş transkriptomun dizileme verileri FASTA formatında kaydedilmiştir. Veritabanlarında sekans üzerinde bir işlem yapmak için Blast programı FASTA formatında veri kabul etmektedir.

4.5.2.3 Transkript uzunluk dağılımı

Elde edilen sekans okumaları transkriptom ile hizalandırılmıştır. Daha sonra, her kümenin en uzun transkriptleri unigen olarak seçilmiştir. Transkriptlerin ve unigenlerin uzunluk dağılım bilgileri Tablo 4.15 ve Tablo 4.16’da listelenmiştir.

Tablo 4.15 Farklı uzunluk aralıklarındaki transkript ve unigenlerin sayısı

Transkript uzunluk aralığı	200-500bp	500-1kbp	1k-2kbp	>2kbp	Total
Transkript sayısı	16450	16847	15236	22446	70979
Unigen sayısı	16366	16846	15236	22446	70894

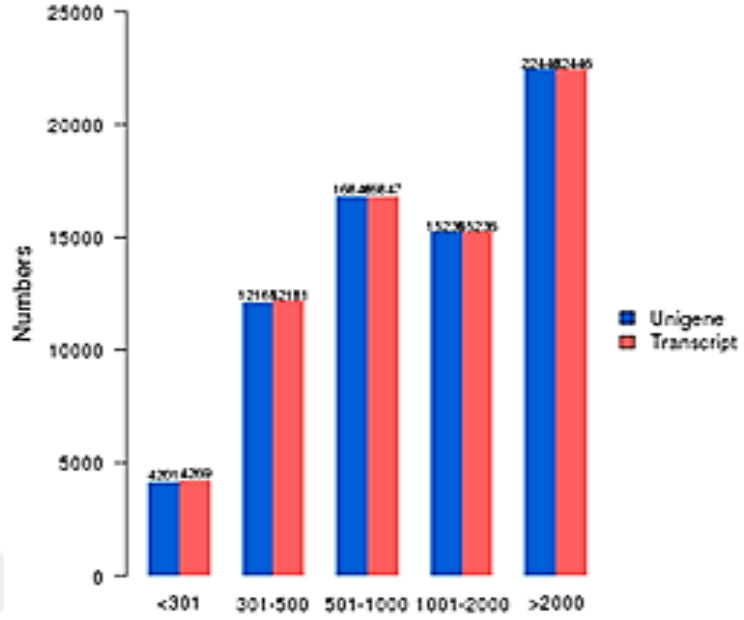
Tablo 4.16 Transkriptlerin ve unigenlerin uzunluk dağılımı

Tip	Min. ¹ uzunluk	Ort. ² uzunluk	Ort. ³ uzunluk	Mak. ⁴ uzunluk	N50	N90	Toplam nükleotid
Transkript	201	1763	1110	22106	2959	757	125163960
Unigen	201	1765	1112	22106	2959	758	125141711

¹Minimum, ²Ortalama, ³Ortanca, ⁴Maksimum

N50 değeri özellikle genom birleştirme işleminde contig uzunluklarını ifade etmekte ve birleştirme işleminin kalitesini tanımlamıştır. Bu değer contig uzunluklarının ortalamasına benzer şekilde hesaplanmakta olup,

hesaplamlarda daha uzun contiglere daha ön planda tutulmuştur. N50 değeri genomun %50 sindeki en kısa dizi uzunluğunu ifade etmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Transkriptlerin ve unigenlerin uzunluk dağılımı

X eksenini, transkript ve unigenin uzunluk aralığını gösterirken Y eksenini, her uzunluk aralığında transkript ve unigene frekansını göstermektedir.

4.5.2.4 *N. ribisnigri* gen analiz sonuçları

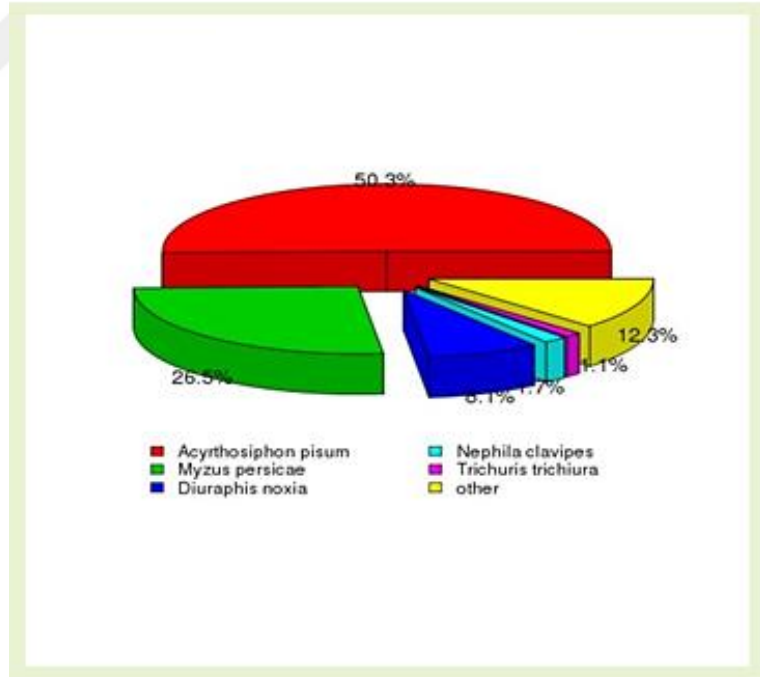
N. ribisnigri'nin bir kısım gen bölgeleri Tablo 4.17'de gösterilmiştir. Daha önce *N. ribisnigri* genom dizilimi genbankasında yer almadığından bu çalışma ile elde edilen veriler genbankasına eklenecektir. İlk sütunda belirlenen genler, ikinci sütunda gen uzunlukları, üçüncü sütunda belirlenen nükleotidin Gen bankası kimliği, 4.sütunda yine belirlenen nükleotid de *N. ribisnigri* kimliği yer almaktadır.

Tablo 4.17 *N.ribisnigri* veritabanına göre bir kısım gen bölgeleri

Genler	Gen Uzunluğu	NR ¹ GF ²	NR ¹ ID ³	NR ¹ Miktarı	NR ¹ Değerleri
9342.20448	6498	328716671	XP_003246006.1	3592	0.0e+00
17088.0	2438	328720393	XP_003247016.1	152	7.2e-07
17088.1	1881	1028692649	XP_016658243.1	288	9.4e-23
9342.23341	8837	1028683432	XP_016657177.1	7753	0.0e+00
15424.0	475	328722964	XP_003247717.1	399	3.2e-36

¹ Aminoasit miktarı ² Genbank Benzerliği ³ Benzerlik Dokümanı

Diğer türlerle benzerlik dağılım grafiği Şekil 4.3’de verilmiştir. En yakın tür *Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776) (Hemiptera: Aphididae) olarak belirlenmiştir. *N.ribisnigri*’nin referans genomu olmadığından dolayı diğer türler ile yakınlık dereceleride bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

**Şekil 4.3** Benzer tür dağılım grafiği.

4.5.2.5 Nicel Sonuçlar

RSEM ile transkriptom verileri haritalanarak gen ekspresyon seviyeleri llmüştür (Li et al., 2011). Gen ekspresyon seviyesi hesaplamaları Bowtie2 programı ile yapılmıştır. Her rneğın her genindeki okuma sayıları belirlenmiştir (Tablo 4.18). Farklı koşullar altında gen ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak için FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions) dağılım diyagramı kullanılmıştır. İlgili genin ekzonları üzerindeki her bin bazlık bölgeye kaç okuma düştüğü ve bu okuma sayısının 1 Milyon'a bölünmesi ile bulunmuştur (Tablo 4.19).

Tablo 4.18 Referans hizalama

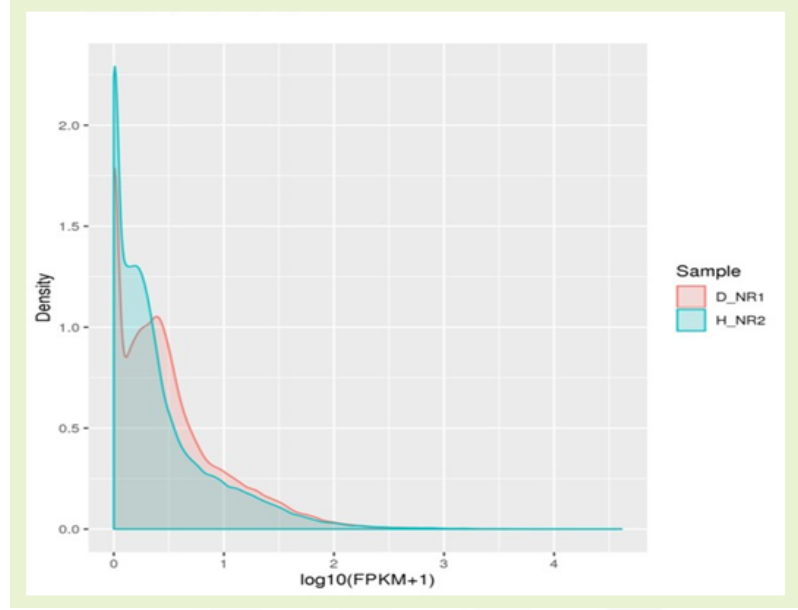
Popölasyon	Toplam okuma	Toplam haritalama
D_NR1	34231151 27117331	(79.22%)
H_NR2	35360302 29941987	(84.68%)

Tablo 4.19 Farklı ekspresyon seviyelerindeki gen aralıkları

FPKM*	Dirençli	Hassas
0~1	28933(40.81%)	37984(53.58%)
1~3	19942(28.13%)	15447(21.79%)
3~15	14914(21.04%)	11450(16.15%)
15~60	5481(7.73%)	4542(6.41%)
>60	1624(2.29%)	1471(2.07%)

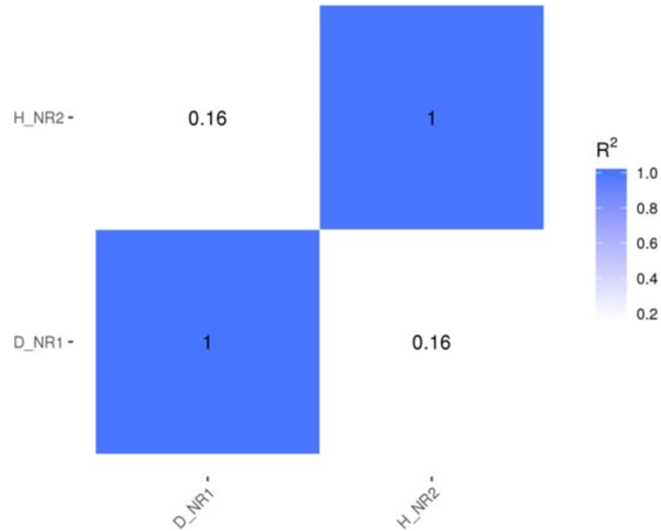
* Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions

Dağılımlarında rnekler için, FPKM değerine göre toplamda tespit edilen contig grubundan eleme yapılarak, kalan contig grubu üzerinden istatistik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Dirençli ve hassas popölasyonda gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Eğimin genişliği gen yoğunluğunu göstermektedir. Örneklerden toplam 35 milyon baz uzunluğunda temiz okuma elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan hassas popölasyon örneklerinde %85 ve dirençli popölasyon örneklerinde %80 oranında temiz okuma tespit edilmiştir.



Şekil 4.4 Farklı koşullar altında gen ekspresyon seviyeleri

RNA sekanslama çalışmaları iki amaç için yapılmıştır. Birincisi, deneyin tekrarlanabilir olup olmadığını göstermek ve ikincisi, örnekler arasındaki gen ifadesindeki farklılıkları ortaya çıkarmaktır. Örnekler arasındaki korelasyon, deneyin güvenilirliğini test etmek için önemli bir göstergedir. Korelasyon katsayısı 1'e ne kadar yakınsa örneklerin benzerliği o kadar fazla olur. İdeal deney koşulları altında R^2 (korelasyon katsayısı)'nin 0.92'den fazla olması gerekirken bu projede 0,8 olarak bulunmuştur (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Örnekler arasındaki korelasyon eğrisi (R^2 : korelasyon katsayısı)

4.5.2.6 Diferansiyel gen ekspresyon verileri

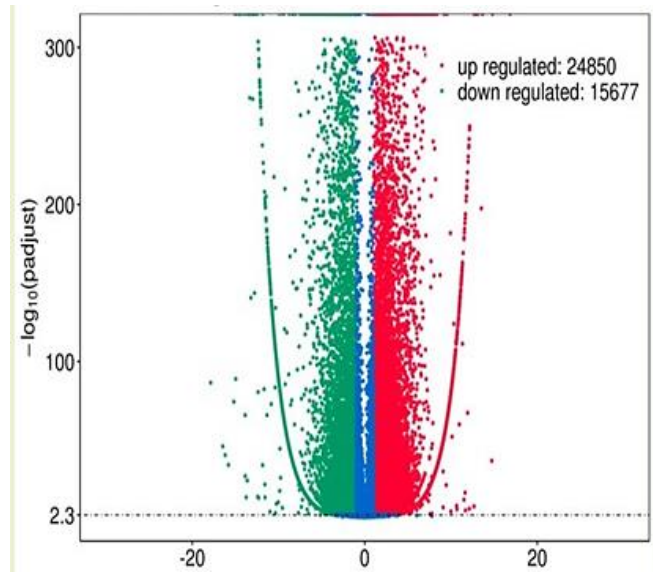
Dirençli ve hassas popülasyondaki farklı olarak ifade edilen genler Tablo 4.20'de verilmiştir.

Tablo 4.20 Farklı olarak ifade edilen genler

Genler	Dirençli	Hassas	log ₂ Kat değişimi	P değeri	K
9342.25795	73.2736124009452	35239.710001662	-8.76673781010595	0	0
9342.26030	3280.38933486645	211.80247908686	4.09603045516842	0	0
9342.25235	4721.28789482546	413.840245598739	3.65498938432554	0	0
9342.23826	148.922926716182	1746.31792712161	-3.40872367043102	0	0

Ekspresyon sonrası değer ne kadar küçükse fark o kadar önemlidir. Log₂ değerinin 1 ve 1'den büyük olması gen ekspresyon farkının önemini ortaya koymaktadır. Dirençli ve hassas popülasyon arasındaki farklı tespit edilen genler arasında log₂ değerine göre büyük oranda farklılık tespit edilmiştir. Farklı şekilde ifade edilen genler Şekil 4.6'de görüldüğü gibi taranmıştır.

Dirençli ve Hassas popülasyon



Şekil 4.6 Farklı şekilde ifade edilen genlerin taranması

X eksenini, örnekler arasındaki gen ekspresyon kat değişimini gösterirken, y eksenini farklılıkların istatistiksel önemini belirtmektedir. Önemli ölçüde yukarı ve aşağı doğru regüle edilmiş genler sırasıyla kırmızı ve yeşil renk ile vurgulanmıştır. Kontrol grubu arasındaki genler mavi renkle ifade edilmiştir. Sonuçlara göre 24850 unigen yukarı regüle edilmiş ve 15677 unigen ise aşağı regüle edilmiş genlerdir.

4.5.2.7 SSR Primer tasarımı

SSR markörleri, heterozigot ve homozigot genotipleri birbirinden ayırabilecek kodominant markörler olup genomda tekrarlanan baz dizilerinin bulunduğu bölgeler çoğaltılmıştır. Primer çiftleri tasarlanırken, ileri ve geri primerler arasında kalacak olan ve PCR deneyiyle çoğaltılacak olan bölge minimum 70 baz, maksimum 1000 baz olarak belirlenmiştir. Bu sekans sonucunda genomik DNA'da istediğimiz bölgeyi çoğaltmak amacı ile spesifik olarak hazırlanan 5 adet ileri ve geri dizi primer dizayn edilmiştir. *N. ribisnigri*'ye spesifik primerlerin adı, nükleotid uzunlukları, dizileri ve Tm dereceleri Tablo 4.21'de gösterilmektedir.

Tablo 4.21 İleri ve geri dizi primer tasarımı

Primer	Nükleotid uzunlukları	İleri Dizileri	Tm
9342.20448	21	CCGTGTACTTCTACGTGGAGT	59.191
9342.20448	20	GATCGACGTTTCGCGGAAATC	59.774
14186.0	20	CAGTCGTGAGTCGTGACACA	59.971
17088.0	22	GGAGGAGTATGGAGTGTGCAG	59.963
6487.0	20	ACCGCATCATTGAGAACGGA	59.751

Primer	Nükleotid uzunlukları	Geri Dizileri	Tm
9342.20448	22	TGGACGATGAAGAGGAAGATGA	58.635
9342.20448	20	CGCATTGCCATTAATCGCCA	59.969
14186.0	22	GGTGCCTACCTACTTTACTTGT	57.452
17088.0	24	CGCAAGAAAATGAGCAGTTAAAGC	59.911
6487.0	20	TATAGTGTCACGCTGGCCAC	59.825

4.5.2.8 Gen Mutasyonu

Tek bir nükleotid polimorfizmi (SNP), tek bir popülasyonda yaygın olarak meydana gelen bir DNA dizisi varyasyonu olarak ifade edilmektedir. Bir genomdaki nükleotid biyolojik bir türün üyeleri veya eşleşmiş kromozomlar arasında farklılıkları gösterir. Tablo 4.22’de hassas ve dirençli popülasyon bireyleri arasındaki gen farkları konum, referans dizisi, kodlanmış genotip ve baz sayıları dikkate alınarak gösterilmiştir. Karakterizasyonu ise Tablo 4.23’de toplam nükleotid sayısı ile homozigot ve heterozigot sayıları ile ifade edilmiştir.

Tablo 4.22 Tek bir nükleotid polimorfizmi sonuçları

Gen	K ¹	R ²	A ³	D_NR 1.GT ⁴	D_NR 1.BS ⁵	D_NR 1.RBS ⁶	H_NR 2.GT	H_NR 2.BS	H_NR 2.RBS
9342.43239	602	C	A	-	-	-	0 1	28	13
9342.6789	867	G	T	0 1	13	4	0 1	434	121
9342.13646	436	T	C	0 1	18	7	-	-	-
9342.29457	1438	A	T	-	-	-	0 1	8	3
9342.14335	4	A	C	0 1	8	3	-	-	-

¹Konum ²Referans dizisi ³Alternatif dizi listesi ⁴Kodlanmış genotip ⁵Baz sayısı ⁶Referans olmayan baz sayısı

Tablo 4.23 Tek bir Nükleotid polimorfizminin karakterizasyonu

Örnekler	Toplam	Homozigot	Heterozigot
Dirençli	16416	405	16011
Hassas	22775	578	22197

RNA sekanslaması yapılmış ve tekrar dizilerinden ileri ve geri olmak üzere EST-SSR primerleri geliştirilmiştir. Toplam Dirençli popülasyondan 16416 adet, Hassas popülasyondan 22775 adet ikili (dinükleotit), üçlü (trinükleotit), dördü (tetra-nükleotit), beşli (penta-nükleotit) ve altılı (hekza-nükleotit) baz tekrarları içeren EST-SSR bölgeleri belirlenmiştir.

Elde edilen verilere göre dirençli ve hassas popülasyonu birbirinden ayıran farklı gen bölgeleri tespit edilmiştir. Hassas ve dirençli popülasyonlarda toplam nükleotid sayısına göre heterozigotluk daha yüksek seviyelerde göstermiştir. Heterozigotluk, soy içi eşleşmenin tespitinde kullanılmaktadır. Eğer heterozigot uygunluğu her iki homozigottan da yüksek ise, allelik

frekansların dengesi yükselmiş olur ve doğal seçim heterozigotların lehine işlediği için, her iki allel de popülasyonda korunmuş olur. Genel olarak bu sonuçlar moleküler markörlerin heterozigotluk seviyelerini tahmin etmede ve kendileme çalışmalarında kontrol aracı olarak başarılı bir şekilde kullanılabilceğini ortaya koymuştur. Ancak elde edilen bu farklılıklar dirençle ilişkili bir gen bölgesi ya da mutasyonu ile bağdaştırılmamıştır.



5. TARTIŞMA

Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda öncelikle Ege Bölgesi'nde marul üretim alanlarında en yaygın görülen yaprakbiti türü *Nasonovia ribisnigri* olarak saptanmıştır. Daha sonra projenin asıl hedefi olan *N.ribisnigri* popülasyonlarının bazı insektisitlere (acetamiprid, thiamethoxam, clothianidin ve spirotetramat) direnç durumları belirlenmiştir. Ülkemizde daha önce bu zararlı ile yapılan herhangi bir direnç çalışması bulunmamaktadır. Yaprakbitleri ile ilgili Velioglu vd. (2008), Ankara, Antalya ve Mersin illerindeki sebze yetiştiriciliği yapılan tarla ve örtüaltı alanlardan topladıkları *M. persicae* popülasyonlarının insektisitlere direncini biyoassay yöntemlerle araştırmışlardır. Neonikotinoid grubundan imidacloprid ve thiamethoxam kullanılarak yürütülen çalışmaları sonucunda popülasyonların insektisitlere farklı düzeylerde direnç gösterdiklerini belirlemişlerdir. Bu çalışmada bölgedeki potansiyel direnç durumu belirlenmiştir. En yüksek duyarlılık azalışı acetamiprid aktif maddesine karşı İzmir ili, Menemen ilçesi, İğnedere bölgesinden getirilen popülasyonda görülmüştür. Direnç katsayılarına göre duyarlılık kayıpları LC₅₀ değeri için 2.38 kat, LC₉₀ değeri için 2.31 kat ile en yüksek bu popülasyonda ve acetamiprid aktif maddesinde görülmüştür. Diğer aktiflerle yapılan çalışmalarda da en yüksek direnç katsayıları ile duyarlılık azalışı yine Menemen- İğnedere popülasyonunda gözlenmiştir. Thiamethoxam için LC₅₀ değerine göre 1.18 kat, LC₉₀ değerinde ise 2.46 kat duyarlılık azalışı saptanmıştır. Spirotetramat ile yapılan çalışmalarda yine LC₅₀ değeri için 2.04 kat duyarlılık azalışı ve clothianidin ile LC₉₀ değerinde 3.12 katlık bir hassasiyet azalışı belirlenmiştir. Yapılan biyoassay testler sonucunda arazi popülasyonları ile hassas popülasyon karşılaştırıldığında yüksek oranlarda direnç gelişimi saptanmamıştır. Bu sonuç doğrultusunda yapılan birçok araştırmada da bölgelere göre insektisitlere duyarlılığın değişebileceği, insektisit etkisinin yetersiz kalmasının sebeplerinin sadece direnç kaynaklı olmayacağı ortaya konulmuştur.

Çalışmanın ikinci aşamasında bölgede saptanamayan dirençli popülasyon seleksiyon yöntemi ile elde edilmiştir. Ege Bölgesi marul yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bölgelerden dirençli koloni bulmaya yönelik olarak

farklı popülasyonlar toplanıp laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen bu arazi popülasyonlarına uygulanan seleksiyon çalışmaları sonrasında MEN-S₇ popülasyonu en direçli popülasyon kabul edilmiştir. Bu popülasyon ile her aktif için LC çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında aktiflerle ilgili direnç katsayıları arasında çok büyük farklar oluşmamıştır. En yüksek direnç katsayısı 7 kez seleksiyon uygulanan popülasyonda 58.22 kat ile acetamiprid aktifinde gözlenmiştir. Yorulmaz ve Ay (2013), bu konu ile ilgili *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae)'da hexythiazox direnç mekanizmasını incelemişler ve seleksiyon çalışmasında, 14 defa hexythiazox uygulaması yapılan popülasyonda 64.04 kat direnç geliştiğini, Rauch and Nauen (2003), ise *Tetranychus urticae*'nin bir tarla ırkını laboratuvarında yapay olarak spirodiclofenle 21 ay boyunca 37 kez selekte etmiş fakat 13 katlık bir direnç tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre yaprakbitleri ile yapılan seleksiyon çalışmalarında akarlar için direnç gelişiminin daha yüksek kat artış gösterdiği kanısına varılabilir.

Projenin son aşamasında ise seleksiyon çalışmaları sonucu elde edilen hassas ve dirençli popülasyonların insektisit direnç mekanizmalarının karşılaştırmalı olarak karakterizasyonu yapılmıştır. İnsektisit direncinin genetiği üzerine yapılan araştırmalar, direncin ve direnç mekanizmalarının belirlenmesini ve ayrıca uygun direnç yönetim stratejilerinin geliştirilmesini sağlamaktadır (Tabashnik and Cushing 1989, Roush and Daly 1990). Şayet direnç allellerinin baskınlığı biliniyorsa buna göre her bir genotipik direnç düzeyini birbirinden ayırt etmek için insektisitlerin uygun konsantrasyonları belirlenerek direncin gelişmesi geciktirilebilmektedir (McDonald and Schmidt 1987, Heim *et al.* 1992). Panini *et al.* (2013) İtalya'dan neonikotinoidli insektisitlere karşı oldukça dirençli *M. persicae* popülasyonlarının varlığını kanıtlamışlardır. 2012 yılında toplanan popülasyonlarda neonikotinoid ve piretroid direnci ile ilişkili hedef bölge mutasyonlarının durumunu araştırmışlardır. Popülasyonların %65'inde R81T, az bir kısmında da L1014F VE M918T mutasyonları bulunmuştur. Son yıllarda büyük ivme kazanan genom sekansı ile araştırmacılar organizmalardaki mRNA ve protein miktarını ölçmekte ve fonksiyonlarını belirlemektedir. Bugüne kadar Hemiptera,

Hymenoptera, Diptera, Coleoptera ve Lepidoptera takımları dahil 138 böceğin genomu çıkartılmıştır (Yin et al., 2016).

Projede analiz sonuçları ile elde edilen veriler dirence neden olan hedef gendeki kalitatif değişikliklerin ortaya koyulmasında ve gen ekspresyon seviyelerinin kantitatif olarak karşılaştırılarak metabolik dirençte rol alan aday genlerin belirlenmesinde kullanılmak amacıyla elde edilmiştir. Neonikotinoid grubu insektistler zararlının sinir sistemindeki nikotinik asetilkolin reseptörlerini (nAChR) hedef almaktadır. Söz konusu mutasyon Fransa'da şeftalilerden toplanan *M. persicae*'nin dirençli popülasyonlarında nAChR β alt ünitesinde R81T nokta mutasyonu olarak tespit edilmiş ve neonikotinoid direnci ile ilişkilendirilmiştir (Bass et al., 2014). Ancak bu projede hassas ve dirençli popülasyon arasındaki farklı gen dizilileri ortaya konulmuş fakat neonikotinoid direnci ile ilişkilendirilememiştir. Ancak moleküler karakterizasyon (RNA-seq) ile geliştirilen primerler sayesinde ileride yapılacak çalışmalarda direncin kısa sürede tespiti ve olası bir direnç gelişimi durumunda zararlıya karşı etkili bir direnç programı oluşturulmasına olanak sağlayacaktır. Ayrıca daha önce referans bir genom dizilimi bulunmayan *N. ribisnigri*'nin bu çalışma ile genbankasında yer alacak ve dünya literatürüne geçecek olan genetik dizilimi ortaya konulmuştur. Bu veriler bundan sonraki çalışmalar için referans olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Marulda zarar meydana getiren yaprakbitlerinin marul bitkisinin iç kısmında beslendiği, yaşam döngülerinin kısa olması ve hızlı üreme gücüne sahip olmaları nedeniyle kontak etkili ilaçlarla kimyasal mücadeleleri oldukça zor olmaktadır. Mücadelede sentetik insektisitlerin bilinçsizce kullanımı sonucunda insan ve çevreye olumsuz etkilerinin yanında direnç geliştirmesi gibi sorunlar da ortaya çıkmaktadır. Bölgede üreticilerle yapılan görüşmeler sonunda yaprakbitleri ile mücadelede marulda ilaçlamanın yetersiz kaldığı ve direnç gelişebildiği kanısına varılmış ve 2017 yılında proje çalışmalarına başlanmıştır.

Bu proje kapsamında öncelikli olarak Ege Bölgesi'nde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan bölgelerde gözlenen marul bitkilerinden yaprakbiti örnekleri toplanmış ve teşhise gönderilmiştir. Gelen sonuçlar doğrultusunda marulda en yoğun görülen yaprakbiti türünün marul yaprakbiti *Nasanovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae) olduğu belirlenmiştir. Daha sonra marulda bu tür ile biyoassay çalışmaları yapılmış ve ruhsatlı bazı insektisitlere karşı direnç varlığı araştırılmıştır. Biyoassay çalışmalarını yürütmek amacıyla gerekli olan hassas popülasyon (33 Nolu) laboratuvar koşullarında seleksiyon yöntemi ile elde edilmiştir. Çalışmada 2017 yılında 11 popülasyon, 2018 yılında 28 ve 2019 yılından ise 31 popülasyon olmak üzere bölgede direnç belirlemek amacıyla toplam 70 farklı popülasyon toplanmıştır. En yüksek direnç katsayısı acetamiprid aktif maddesine karşı İzmir ili, Menemen ilçesi, İğnedere bölgesinden getirilen MEN-5 popülasyonunda görülmüştür. Ancak bölgede direnç varlığından söz edebilmek doğru bir yaklaşım değildir. Böylece bölgede yaprakbiti ile ilgili sorunların direnç kaynaklı olmadığı, ilaçlama hatası ya da çevre koşullarının etkisi nedeniyle mücadelede yetersiz kaldığı sonucuna varılmıştır.

Moleküler çalışmaları yürütebilmek için hassas ve dirençli popülasyon arasındaki direnç katsayısı yeterli düzeyde saptanamamıştır. LC çalışmaları sonucunda en dirençli görülen popülasyonlar ile hassas popülasyonda olduğu gibi laboratuvar koşullarında seleksiyon yöntemi uygulanarak dirençli koloniler üretilmiş ve dirençli bir popülasyon (MEN-S₇) elde edilmiştir.

Son yıllarda geliştirilen ve günümüzde en önemli teknolojilerden biri olarak karşımıza çıkan yeni nesil DNA dizileme teknolojileri yüksek doğrulukla, ultra hızlı dizileme yapabilme kapasiteleri sayesinde transkriptom analizi, ploidi seviyesinin belirlenmesi, moleküler markır geliştirme ve mRNA profilinin belirlenmesi gibi birçok çalışmada kullanılabilir (Dönmez et al., 2015). Projede moleküler çalışmalar olarak dirençli ve hassas popülasyonlar karşılaştırılarak genetik farklılıkları ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bugüne kadar neonikotinoid grubu insektisitlerin dayanıklılığının, ağırlıklı olarak bir detoksifikasyon enzimi olan monooksijenaz enzimi tarafından neden olduğu saptanmıştır (Nauen et al., 2013). Son yıllarda ise bu mekanizmaya ek olarak *Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae) (Tan vd., 2008), *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) (Bass et al., 2011) ve *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae) (Zewen et al., 2003)'te nAChR genlerindeki nokta mutasyonlardan dolayı bir dayanıklılık olduğu belirlenmiştir. Bu mutasyonlar protein diziliminde değişikliklere neden olabileceği gibi, hedef yerinin ekspresyon seviyesini değiştirerek de dirence katkı sağlayabilmektedirler (Van Leeuwen and Dermauw, 2016).

Bu çalışmayla ise marul yaprakbiti popülasyonlarında farklı genlerinin moleküler karakterizasyonu yapılmış, her iki popülasyon genleri aralarındaki ilişkiler belirlenmiştir. Bu noktaları hedefleyen çalışmaların yürütülmesi neonikotinoid direnç mekanizmasıyla ilgili önemli ipuçları olup, diğer araştırmacılar içinde referans noktasıdır. Ayrıca daha önce genbankasında yer almayan *N. ribisnigri* genetik dizilimi ortaya konularak bu çalışma dünyada bir ilk niteliği taşımaktadır. Böylece daha sonra yapılacak gen ekspresyonu ya da neonikotinoid dayanıklılığı ile dirençli ve hassas popülasyonlar arasındaki farkları belirlemede ışık tutmuş olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alkan, B.**, 1960, Insect resistance to insecticides, Proceeding of the regional symposium, Cairo, UAR., 182-186 p.
- Anstead, J.A., Williamson, M.S. and Denholm, I.** 2005, Evidence for multiple origins of identical insecticide resistance mutations in the aphid *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 249–256.
- Ay, R.** 2006, Antalya ili örtüaltı sebze üretim alanlarında zararlı olan *Tetranychus urticae* Koch popülasyonlarının bazı akarisitlere karşı tepkileri. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 12 (3), 301-306.
- Ay, R. ve İnanıcı, M.A.**, 2018, Milbemectin ile Seleksiyon Yapılmış *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae) Popülasyonunda Direnç, Direnç Kalıtımı Ve Bazı Detoksifikasyon Enzimlerinin Belirlenmesi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 13 (1):17-26.
- Ay, R. ve Gürkan, M. O.** 2005, Resistance to bifenthrin and resistance mechanisms of different strains of the Two-Spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae*) from Turkey. *Phytoparasitica*, 33(3), 237-244.
- Ay, R. ve Sökeli, E.**, 2005, Böceklerde Direnç Yönetimi. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9-1, 1-4.
- Aybak, H.Ç.**, 2002, Salata/Marul Yetiştiriciliği, Hasat Yayıncılık.
- Baffi, M.A., Pereira, C.D., Souza, G.R., Bonetti, A.M., Ceron C.B., Goullart, L.R.**, 2005, Esterase profile in a pyrethroid-resistant Brazilian strain of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Genetics and Molecular Biology* 28(4): 749- 753.
- Bahşi, Ş.Ü., Dağlı, F., İkten, C., Göçmen, H.**, 2012, Antalya ve ilçelerinden toplanan Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) popülasyonlarının Acetamiprid, Chlorpyrifos-ethyl ve Cypermethrin'e

karşı duyarlılık düzeyleri. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi (2012) 25(1): 17-22

Barber, M. D., Moores, G. D., Tatchell, G. M., Vice, W. E. and Denholm, I., 1999, Insecticide resistance in the currant-lettuce aphid, *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera: Aphididae) in the UK. Bull. ent. Res., 89, 17-23, (1999).

Bass C, Puinean AM, Andrews M, Cutler P, Daniels M, Elias J, Paul VL, Crosswaite AJ, Denholm I, Field LM, Foster SP, Lind R, Williamson MS, Slater R. 2011, Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. BMC Neuroscience, 12: 51.

Bass, C., Puinean, A. M., Zimmer, C. T., Denholm, I., Field, L. M., Foster, S. P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R., Williamson, M. S., 2014, The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 51; 41-51.

Beckingham, C., Phillips, J., Gill, M., Crossthwaite, A. J., 2013, Investigating nicotinic acetylcholine receptor expression in neonicotinoid resistant *Myzus persicae* FRC. Pesticide Biochemistry and Physiology, 107; 293-298.

Blackman, R.L. and Eastop, V.F., 1984, Aphids on the World's Crops: Identification and Information Guide. John Wiley Sons, London, 476 p.

Blackman, R. L., Eastop, V. F., 2000, *Aphids on the world's crops*. John Wiley & Sons Ltd, London, England. 644 p.

Blackman, R.L. and Eastop, V. F., 2006, *Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs. Volume 2 The Aphids. John Wiley & Sons with the Natural History Museum*, London. viii + pages 1025-1439.

Brown, T.M., 1981, Counter measures for insecticide resistance. Bulletin of the Entomological Society of America, 27:198-202 pp.

Cassanelli S., Cerchiari, B., Giannini, S., Bizzaro, D., Mazzoni, E. and Manicardi, G.C., 2005, Use Of The Rflp-Pcr Diagnostic Test For

Characterizing Mace And Kdr Insecticide Resistance In The Peach Potato Aphid *Myzus Persicae*. Pest Management Science, 61(1):91-6.

Claudianos C., Ranson H., Johnson R.M., Biswas S., Schuler M.A., Berenbaum M.R., Feyereisen R., Oakeshott J.G., 2006, A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee, *Insect Mol. Biol.* 15, 615–636.

Cygler, M., Schrag, J.D., Susman, J.L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M.K. 1993, Relationship between sequence conservation and three dimensional structure in large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Sci*, 2: 366.

Dağlı, F. Ve Tunç İ., 2003, Dicofol resistance in *Tetranychus cinnabarinus*: resistance and stability of resistance in populations from Antalya, Turkey. *Pest Manag. Sci.*, 57 (7): 609-614.

Dağlı, F. ve İ. Tunç, 2007, Insecticide resistance in *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) collected from horticulture and cotton in Turkey. *Australian Journal of Entomology*, 46: 320-324.

Delen. N., 2008, Fungisitler. Nobel Yayınevi, İzmir.

Devonshire, A.L. 1977, The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochemical Journal*, 167, 675–683.

Devonshire, A. L. and Moores, G. D., 1982, A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18, 235-246.

Diaz, B. M., 2012, Interplant movement and spatial distribution of alate and apterous morphs of *Nasonovia ribisnigri* (Homoptera: Aphididae) on lettuce. *Bulletin of Entomological Research* 34(3), 527-534.

Dindar, Ö. N., 1992, Farklı yapay beslenme koşullarında *Ceratitis capitata* (Wied) (Diptera: Tephritidae) erginlerine malathion'un toksisitesi

üzerinde bir araştırma. Türkiye II. Entomoloji Kongresi Bildirileri, 329–334. Entomoloji Derneği Yayınları No: 5. Bornova–İzmir, 747 s.

Dixon GR, 1984, Vegetable Crop diseases. Macmillan, London.

Dönmez D., Şimşek Ö ve Aka Kaçar Y., 2015, Yeni nesil DNA dizileme teknolojileri ve bitkilerde kullanımı. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 8(1): 30-37.

Durmuşoğlu, E., 2004, İsektisitler. Basılmamış Ders Notları.

Durmuşoğlu, E., Hatipoğlu, A., Gürkan, M. O. ve Moores, G., 2015, Comparison of different bioassay methods for determining insecticide resistance in European Grapevine Moth, *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae). Türk. entomol. derg., 2015, 39 (3): 271-276.

Durmuşoğlu, E ve Kumral, N.A., 2018, İsektisitlere Direnç ve Yönetimi. Depolanmış Hububat Zararlılarında Fosfin Direnci Çalıştayı, 11 Temmuz 2018, ANKARA.

Düzgüneş, Z., 1953, Mücadele İlaçlarına Karşı Mukavemetin Meydana Gelişi. Bitki Koruma Bülteni, 5: 39-47 s.

EPPO, 2020, EPPO activities on resistance to plant protection products https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_protection_products/resistance, (Erişim: 23 Ağustos 2020).

Erdoğan, C., Moores, G.D., Gürkan, M.O., Gorman, K.J. and Denholm, I. 2008, Insecticide resistance and biotype status of populations of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Turkey. Crop Protection, 27 (3- 5), 600-605.

Erkılıç, L., Pala, H., Başpınar, N., ve Gerin, Y., 1999, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Bazı Yaprakbiti Türlerinde Entomopatojen Fungusların Belirlenmesi. Türkiye 4. Biyolojik Mücadele Kongresi, 26-29 Ocak 1999, Adana-Türkiye, 623-632.

- Erkam, B. Ve Gürkan S.**, 1983, Marmara bölgesi meyve ağaçlarında zararlı Avrupa kırmızıörümceği (*Panonychus ulmi* Koch)'nin akarisitlere karşı direnci üzerinde ön çalışmalar, Bitki Kor. Bül., 23 (3): 115-123.
- Eşiyok, D.**, 2012, Kışlık ve Yazlık Sebze Yetiştiriciliği, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, İzmir, 404 s.
- Ffrench-Constant, R. H. and Roush, R. T.** 1990, Isolation of Dieltrin Resistance from Field Populations of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Economic Entomology*, Volume 83, Issue 5, 1 October 1990, Pages 1733–1737.
- Ffrench- Constant, C.**,1999, [Expression of the rat homologue of the *Drosophila fat* tumour suppressor gene](#) Ponassi, M., Jacques, T. S., Ciani, L. & [ffrench-Constant, C.](#), 1999, In : Mechanisms of Development. 80, 2, p. 207-12
- Fidan, Ü. ve Türkoğlu, T.**,1984, Ege Bölgesi Marul Bitkilerinde Görülen. Virüs Hastalıkları Üzerinde Ön Çalışmalar. Bitki koruma Bülteni 1988, 28 (1-2): 43-56.
- Foster, S.P., Denholm, I. and Thompson, R.**, 2003, Variation in response to neonicotinoid insecticides in peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science*. 59:166-173, (2003).
- Gao, J.-R., Kambhampati, S. and Zhu, K. Y.** 2002, Molecular cloning and characterization of a greenbug (*Shizaphis graminum*) cDNA encoding 33 acetylcholinesterase possibly evolved from a duplicate gene lineage. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32; 765-775.
- Genç, H., D. Zobar., J. L. Nation.** 2009, Maintaining *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Dipt: Tephritidae) Colony on Its Natural Host in the Laboratory (Basılmamış).
- Georghiou, G.P.** 1986, The Magnitude of The Resistance Problem in Pesticide Resistance Strategies and Tactics for Management. National Reserach Council (U.S.). National Academy Press, pp. 14–43, Washington, D.C.

- Gorman, K. And Denholm, I.**, 2000, Whitefly resistance assessment-toxicological bioassays. European Whitefly Studies Network, Part A5, Plant Protection.
- Grabherr MG, Russel P., Meyer M. and Mauceli E.**, 2011, Genome-wide synteny through highly sensitive sequence alignment: Satsuma. *Bioinformatics.*;26:1145–1151.
- Gupta, R., C**, 2005, Carboxylesterases. Philip Wexter, *Encyclopedia of toxicology*. 2005, 53,569-578.
- Gunning, R.V.**, 1993, Comparison of the two bio-assay techniques for larvae of *Helicoverpa* sp. (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 86:234-238 pp.
- Güncan, A., Madanlar, N., Yoldaş, Z., Ersin F., Tüzel Y.**,2010, İzmir ilinde örtüaltı organik sebze üretiminde topraküstü zararlılarının durumu. *Türk. entomol. derg.*, 2010, 34 (4): 503-513 ISSN 1010-6960.
- Güz, N., Alptekin, S., Veliöglu S., Erdoğan, C., Gürkan, M.O.** 2009, Yeşil şeftali yaprakbitinde, *Myzus persicae* (Sulzer) MACE ve kdr insektisit direncinin PCR RFLP yöntemiyle karakterizasyonu. Sözlü sunum. Türkiye 3. Bitki Koruma Kongresi, Van.
- Güz, N., Çağatay N. S., Fotakis E. A., Durmuşoğlu E. ve Vontas J.**, 2020, Detection of diflubenzuron and pyrethroid resistance mutations in *Culex pipiens* from Mugla, Turkey. *Acta Tropica*, Volume 203, March 2020, 105294.
- Hatipoğlu, A., Durmuşoğlu, E. ve Gürkan, O.**, 2015, Manisa ili bağ alanlarında Salkım güvesi [*Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae)] popülasyonlarının insektisit direncinin belirlenmesi. *Türk. entomol. derg.*, 2015, 39 (1): 55-65.
- Heim, D.C., Kennedy, G.G., Van Duyn, J.W. and Gould, F.**, 1992, Inheritance of fenvalerate and carbofuran resistance in North Carolina Colorado potato beetles. *Pesticide Science*, 34, 303-311.

- Hemingway, J., Ranson, H.** 2000, Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol*, 45: 371–391.
- Hemingway J, Field L, Vontas J.,** 2002, An overview of insecticide resistance. *Science* 298: 96–97.
- Hoskins, W.M. and Craig, R.,** 1962, Uses of Biyoassay in Entomology. *Annual Review of Entomology*. Vol. 7: 437-464 pp.
- IRAC,** 2020a, Resistance Definition, Background, Development. <http://www.ircac-online.org/about/resistance/> (Erişim tarihi: 20 Mayıs 2020)
- IRAC,** 2020b, Insecticide Resistance Action Committee. IRAC Susceptibility Test Methods Series. Method No:019. www.ircac-online.org (Erişim tarihi: 15 Ağustos 2020).
- Javed, H., Iqbal, J. ve Khan, T.M.** 2013, Studies on Population Dynamics of Insect Pest of Safflower, *Carthamus tinctorius* L. *Pakistan. J. Zool.*, 45(1), 213-217.
- Kabir, K.H., Chapman R.B., Penman D.R.,** 1993, Monitoring propargite resistance in European red mite, *Panonychus ulmi* Koch (Acari, Tetranychidae). *New Zealand J. Crop & Horti. Sci.*, 21(2): 133-138.
- Karaağaç, S.U.,** 2012, Insecticide Resistance, 469-478. *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*, F., Perveen, (Ed), InTech, Jan. 2012. 708 pages. ISBN: 978-953-307-780-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-advances-in-integrated-pest-management/insecticideresistance>
- Kasai, A., Kasai, K., Yumoto, S., and Senda, M.,** 2004, "Structural Features of Gmirchs, Candidate of the I Gene Inhibiting Seed Coat Pigmentation in Soybean: Implications for Inducing Endogenous Rna Silencing of Chalcone Synthase Genes. ", *Plant Molecular Biology*, 64: 467-479 (2004).

- Kasap, E., Engürülü, B., Çiftçi, Ö., Kılınç, K.S., Gölbaşı, M. ve Akkurt, M.** 1999, Bitki koruma makinaları. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ders Araç ve Gereçleri Makine Eğitim Merkezi Müdürlüğü, s. 175-176, Ankara.
- Koike ST, Gladders P and Paulus AO**, 2007, Vegetable Diseases. A Colour Handbook, UK, Manson Publishing Ltd, pp. 296-324.
- Kumral, N.A. and Kovancı, B.** 2007, Susceptibility of female populations of *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae) to some acaricides in apple orchards. *Journal of Pest Science*, 80, 131–137.
- Kwon D. H., Choi, B. R., Lee, S. W., Clark, J. M., Lee, S. H.,** 2008, Characterization of carboxylesterase-mediated pirimicarb resistance in *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93, pp:120-126.
- Li, X., Schuler, M.A. and Berenbaum, M.R.,** 2011, Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52, 231-253 pp.
- Liu, Y.-B.,** 2004, Distribution and population development of *Nasonovia ribisnigri* (Homoptera: Aphididae) in iceberg lettuce. *Journal of Economic Entomology* 97(3), 883-890.
- Lee, E. A., Wong, K. W., & Fung, C. C.,** 2010. How does desktop virtual reality enhance learning outcomes? A structural equation modeling approach. *Computers & Education*, 55, 1424–1442.
- Leibee, G.L., and Savage, K.E.,** 1992, Insecticide resistance in diamondback moth in Florida, 427-435. Management of diamondback moth and other curcifer pests. N. S. Talekar (Ed.), *Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan*. 580p.
- Lodos, N.,**1982, Türkiye Entomolojisi II. Genel, Uygulamalı ve Faunistik. EÜZF Yayınları
- Leora Software.** 1987, POLO-PC: A user's guide to Probit or Logit analysis. Berkeley, 20p.

- Mackenzie, J. R. and Vernon, R.S.**, 1988, Sampling for Distribution of the Lettuce Aphid, *Nasonovia ribisnigri* (Homoptera: Aphididae), in Selds and within Heads. *J. Entomol. Soc. Br. Columbia* 85: 10-14.
- Martin, C., Schoen, L., Rufingier, C., and Pasteur, N.**, 1995, A Contribution to the Integrated Pest Management of the Aphid *Nasonovia ribisnigri* in Salad Crops. IOBC/WPRS Working Group Meeting, 6-8 November 1995, Guitte´ France.
- McDonald, P.T. and Schmidt, C.D.**, 1987, Genetics of permethrin resistance in the hornfly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 80, 433-437.
- Moore, G. D., Gao, X., Denholm, I. and Devonshire, A. L.**, 1996, Characterisation of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 56, 102-110.
- Morales, I., Maria, B., Hermoso, A., Nebreda, M. and Fereres, A.**, 2013, The Development of An Economic Threshold for *Nasonovia ribisnigri* (Homoptera: Aphididae) On Lettuce in Central Spain. *Journal of Economic Entomology*, 106: 891– 898. <https://doi.org/10.1603/EC12275>.
- Nauen R, Vontas J, Kausmann M, Wolfel K.** 2013, Pymetrozine is hydroxylated by CYP6CM1, a cytochrome P450 conferring neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science*, 69(4): 457–61.
- Needham, P. H. and Sawicki, R. M.**, 1971, Diagnosis of resistance to organophosphorus insecticides in *Myzus persicae* (Sulz.). *Nature*, 230, 125-126.
- Nene B, Jayant K, Arrossi S, Shastri S, Budukh A, Hingmire S, Muwonge R, Malvi S, Dinshaw K, Sankaranarayanan R.**, 2007, Determinants of womens participation in cervical cancer screening trial, Maharashtra, India. *Bull World Health Organ* 85: 264 – 272.

- Oakeshott J.G., Van Papenrecht E.A., Boyce T.M, Healy M.J., Russell R.J.,** 1993, Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*.90,239.
- Öden, T.,** 1969, Insecticide resistance in agricultural insect species of Turkey. VI. Balkan Ülkeleri Bitki Koruma Konferansı Bildirileri, İzmir, 16 Ekim 1977, 187.
- Öncüler, C. ve Durmuşoğlu, E.,** 2008, Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, Aydın, No:28, 472 s.
- Özdemir, I.,** 2004, Ankara İlinde Otsu Bitkilerde Aphidoidea Türleri Üzerinde Taksonomik Araştırmalar, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 188 s.
- Panini, M., Dradi, D., Marani, and Butturini A,** 2013, Detecting the presence of target-site resistance to neonicotinoids and pyrethroids in Italian populations of *Myzus persicae*. *Journal of Economic Entomology* 83: 48-50.
- Petitt F. L. and Smilowitz Z.,** 1982, Green peach aphid feeding damage to potato in various plant growth stages. *Journal of Economic Entomology* 75: 431-435.
- Polat, M., Özışık, H. ve Yıldırım, A. F.,**1973, Karadeniz bölgesi tütün dikim alanlarında tütünde yaprak biti *Myzus persicae* Sulzer'in insektisitlere karşı gösterdiği direnç üzerinde araştırmalar. Samsun Bölge Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü, 108.662 nolu proje nihai raporu (basılmamış).
- Ranson, H., Claudianos, C., Orтели, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M.V., Unger, M.F., Collins, F.H., Feyereisen, R.,** 2002, Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. [Science 298\(5591\): 179--181.](#)
- Rittman, M., Hoffman S. V., Gilroy E., Hicks M. and Rodger, A.,** 2012, Probing the structure of long DNA molecules in solution using synchrotron radiation linear dichroism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 353–366.

- Roush, R.T. and Daly, J.C.**, 1990, The role of population genetics in resistance research and management, pp. 128– 142. *In* R. T. Roush and B. E. Tabashnik [eds.], Pesticide resistance in arthropods. Chapman & Hall, New York.
- Rufingier, C., I. Schoen, C. Martin & N. Pasteur**, 1997, Resistance of *Nasonovia ribisnigri* (Homoptera: Aphididae) to insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 90: 1445-1449.
- Rufinger, C., Schoen, L. and Martin, C.** 1999, Evaluation of the resistance in the aleyrodid, *Trialeurodes vaporariorum* to buprofezin, deltamethrin, methomyl and pyriproxyfen. In proceeding: 5th International Conference on Pests in Agriculture: Part I, Montpellier, France, December, 7-9, pp. 107- 114.
- Sangün, O. ve Satar, S.**, 2012, Aphids (Hemiptera: Aphididae) on lettuce in the Eastern Mediterranean Region of Turkey: Incidence, population fluctuations, and flight activities. *Türk. entomol. derg.*, 2012, 36 (4): 443-454.
- Simon, J. Yu**, 2014, *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. CRC Press. 2th Edition, ISBN: 13: 978-1-4822-1061-3. pp 353.
- Sökeli, E.**, 2005, Isparta İli ve Çevresindeki Elma Bahçelerinde Zararlı Olan Tetranychidae Familyasına Ait Kırmızıörümceklerin Bazı Kimyasallara Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 42s,Isparta.
- Smith, S. D. J. and Devonshire, A. L.**,1988, Variation in resistance frequencies of *Myzus persicae* on sugar beet- implications for control. Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases, 1213-1218.
- Strode, C., Wondji, C.S., David, J.P., Hawkes, N.J., Lumjuan, N., Nelson, D.R.,Drane, D.R., Karunaratne, S.H., Hemingway, J., Black, W.C., Ranson, H.**, 2008, Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *InsectBiochem. Mol. Biol.* 38, 113e123.
- Tabashnik, B.E. and Cushing, N.L.** 1989, Quantitative genetic analysis of insecticide resistance: variation in fenvalerate tolerance in a diamondback

moth (Lepidoptera: Plutellidae) population Journal of Economic Entomology, 82, 5-10.

Tan J, Salgado VL, Hollingworth RW. 2008, Neural actions of imidacloprid and their involvement in resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Pest Manag. Sci, 64: 37–47.

TAGEM, 2008, Ziraî M¼cadele Teknik Talimatı. Cilt 3. Tarım ve Orman Bakanlığı, Ankara, 332 s.

Toda, S., S. Komazaki, T. Tomida and Y. Kono. 2004, Two aminoacid substitutions in acetylcholinesterase associated with pirimicarb and organophosphorous insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). Insect Mol. Biol., 13 (5): 549-553.

Toros, S., Uygun, N., Ulusoy, R., Satar, S., Ve Özdemir, I., 2002, Doğu Akdeniz Bölgesi Aphidoidea Türleri. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara.

TUİK, 2019, Sebzelede üretim miktarları. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 10 Ekim 2020)

Van Toor, R. F., Foster, S. P. , Anstead, J. A., Mitchinson, S., Fenton, B., Kasprowicz, L., 2007, Insecticide resistance and genetic composition of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) on field potatoes in New Zeland. Science Direct Crop Protection 27, pp:236-247.

Van Leeuwen, T. and W. Dermauw, 2016, The molecular evolution of xenobiotic metabolism and resistance in chelicerate mites. Annual review of entomology, 61: 475-498.

Velioğlu, A.S. 1999, Değişik bölgelerden toplanan *Myzus persicae* (Sulz.) pop¼lasyonlarının farklı gruptan bazı insektisitlere karşı duyarlılık farklarının belirlenmesi üzerinde araştırmalar. Doktora tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, 106s., Ankara.

- Velioğlu, A. S. ve Toros, S.** 2006, Değişik bölgelerden toplanan *Myzus persicae* (Sulz.) (Homoptera: Aphididae) populasyonlarının farklı gruptan bazı insektisitlere karşı duyarlılık farklarının belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 42 (1-4): 67-79.
- Velioğlu, A. S., Erdoğan, C. ve Gürkan, M.O.,** 2007, Sebzelerde Zarar Yapan *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) Populasyonlarının İnsektisitlere Direnci İle Karboksilesteraz Aktivitesi Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 27-29 Ağustos 2007, Isparta. pp: 57.
- Velioğlu, A. S., Erdoğan, C., Gürkan, M. O. ve Moores, G. D.,** 2008, Sebzelerde zarar yapan *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) popülasyonlarının insektisitlere direnci ile biyokimyasal mekanizmalarının incelenmesi. TÜBİTAK Sonuç Raporu, Proje No: 1050176.
- Velioğlu A.S., Erdoğan C., Gurkan M.O., Moores G.D.,** 2009, Determination of the insecticide resistance mechanisms using biochemical methods in the *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) populations damaging on cotton in Turkey. Tarım Bilimleri Dergisi-Journal of Agricultural Sciences. 14 (2): 116-123.
- Whalon, M.E., Mota-Sanchez, D. and Hollingworth, R.M.,** 2018, Global Arthropod Pesticide Resistance Reporting. Department of Entomology Michigan State University. http://www.ipmcenters.org/ipmsymposium12/20-1_Whalon.pdf (Erişim tarihi: 21 Ekim 2020).
- WHO,** 2020, Insecticide resistance
https://www.who.int/malaria/areas/vector_control/insecticideresistance/en/ (Erişim tarihi: 23 Haziran 2020).
- Worldatlas,** 2020, “World Leaders In Lettuce Production”.
<https://www.worldatlas.com/articles/world-leaders-in-lettuce-production.html> (Erişim tarihi 12.01.2020).

- Yaşarakıncı, N. ve Hıncal P.**, 2000, Ege Bölgesi'nde örtü altında yetiştirilen sebzelerde entegre mücadele çalışmaları Türkiye 4. Entomoloji Kongresi. 12- 15 Eylül 2000, Aydın.
- Yıldırım, M., Bahar, E. ve Demirel, K.**, 2015, Farklı Sulama Suyu Seviyelerinin Serada Yetiştirilen Kıvırcık Marulun (*Lactuca sativa* var. *campania*) Verimi ve Gelişimi Üzerine Etkileri. ÇOMÜ Zir. Fak. Dergisi. 2015: 3 (1): 29–34.
- Yin, C., Shen, G., Guo, D., Wang, S., Ma, X., Xiao, H., Li, F.** 2016, "InsectBase: A resource for insect genomes and transcriptomes". *Nucleic Acids Research*.
- Yorulmaz, S. 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, 393-402.
- Yorulmaz, S. S., Ay R.**, 2010. Inheritance and detoxification enzyme levels in *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae) strain selected with chlorpyrifos. *Journal of pest science*, 83, 85-93.
- Yorulmaz, S. S., Bayrak, F., Kılıçoğlu, R., Sancar, İ. ve Ay, R.**, 2013, Farklı Bitkiler Üzerinde Yetiştirilen *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)'nin Esteraz ve Glutathion S-Transferaz Enzim Düzeylerinin Belirlenmesi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 4 (1): 1-6.
- Yorulmaz, S. S. ve Ay, R.**, 2013, Analysis of hexythiazox resistance mechanisms in a laboratory selected predatory mite *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae), *Türk. entomol. derg.*, 2013, 37 (4): 409-422.
- Zeren, O.**, 1989, Çukurova Bölgesinde Sebzelerde Zararlı Olan Yaprakbitleri (Aphidoidea) Türleri, Konukçuları, Zararları ve Doğal Düşmanları Üzerinde Araştırmalar. Tarım ve Orman Bakanlığı Araştırma Yayınları Serisi Yayın No. 59, 205s.

Zewen L, Zhaojun H, Yinchang W, Lingchun Z, Hongwei Z, Chengjun L.

2003, Selection for imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: cross-resistance patterns and possible mechanisms. *Pest Manag. Science*, 59: 1355–1359.

Zümreoğlu, S., 1978, Investigations on the green peach aphid against insecticides on tobacco growing areas in Aegean Region. *Türkiye Bitki Koruma Dergisi*, 2(2): 97-102.



TEŞEKKÜR

Proje sürecinde benden desteğini esirgemeyen saygı değer hocalarım Sayın Prof. Dr. Enver Durmuşoğlu, Sayın Doç. Dr. Nurper GÜZ, Sayın Prof. Dr. Recep Ay ve Sayın Prof. Dr. Ferit TURANLI'ya, değerli katkılarından dolayı hocalarım Sayın Prof. Dr. Yusuf KARSAVURAN'a ve Sayın Doç.Dr. Sibel YORULMAZ'a teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yaprakbiti örneklerinin teőhislerinde Dr. Işıl ÖZDEMİR'e, moleküler çalışmalarda destek olan Naciye Sena ÇAĞATAY'a ve yardımlarından dolayı Dr. Mehmet KAYA'ya teőekkürü borę bilirim.

Tez çalışmasının yürütölmesi için bütçe sağlayan Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne, Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü İdaresi'ne, Sayın Bölüm Baőkanım Hakan ÖRNEK'e ve değerli bölüm arkadaşlarıma, tez süresince sabırla her zaman yanımda olan desteğini hiç esirgemeyen sevgili eőim Ferhat UYSAL'a, oğullarım Toprak ve Rüzgar'a ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan değerli anneme ve babama sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

24 / 12 / 2020

Duygu UYSAL

ÖZGEÇMİŞ

Araştırıcı 1985 yılında İzmir’de dünyaya gelmiştir. İlkokul eğitimini Ankara’da Tahsin şahinkaya İlköğretim okulunda, ortaokul eğitimini Bandırma Anadolu Lisesinde ve lise eğitimini İstanbul Ümraniye Anadolu Lisesi’nde tamamlamıştır. 2008 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü’nden mezun olmuş ve aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim dalı, Entomoloji Bilim dalında yüksek lisans eğitimine başlamış ve 2011 yılında tamamlamıştır. Aynı yıl Bornova Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüsü’nde çalışmaya başlamış ve İlaç, Alet, Toksikoloji ve Yabancı Ot şubesinde çalışmaya halen devam etmektedir.

