T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tetranychus urticae (ACARINA: TETRANYCHIDAE)' NİN ÜÇ FARKLI İNSEKTİSİT-AKARİSİT İLE SELEKSİYONUNDAN SONRA ÇOKLU DİRENÇ VE BAZI ENZİM DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

Sibel YORULMAZ

Danışman: Doç.Dr. Recep AY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİMDALI

ISPARTA – 2008

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER……... i

ÖZET…….. iii

ABSTRACT……... iv

TEŞEKKÜR……... v

ŞEKİLLER DİZİNİ…… vi

ÇİZELGELER DİZİNİ…….. viii

SİMGELER DİZİNİ……... x

1. GİRİŞ…….. 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ……... 5

3. MATERYAL VE YÖNTEM……. 20

3.1. Materyal…….. 20

3.1.1. *Tetranychus urticae* Populasyonları……. 20

3.1.1.1. *Tetranychus urticae* Populasyonlarının Orijini……. 20

3.1.1.2. *Tetranychus urticae* Populasyonlarının Yetiştirilmesi…….. 21

3.1.2. İnsektisitlerin Seçimi…… 22

3.1.3. Çoklu Direnç Çalışmalarında Kullanılan İnsektisitler……. 26

3.1.4. Sinerjistler…… 28

3.2. Yöntem…… 30

3.2.1. Biyoassay Çalışmalar……... 30

3.2.1.1. İlaç Konsantrasyonlarının Hazırlanması……... 30

3.2.1.2. İlaçların Uygulanması……... 30

3.2.1.3. İstatiksel Değerlendirmesi……. 32

3.2.1.4. Seleksiyon Çalışmaları…….. 32

3.2.1.5. Çoklu Direnç Çalışmaları…….. 33

3.2.1.6. Sinerjist + İlaç Çalışmaları…… 33

3.2.1.7. Direnç Kalıtım Çalışmaları……... 34

3.2.2. Biyokimyasal Çalışmalar……. 35

3.2.2.1. Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) ile Esteraz Enziminin İncelenmesi…….. 35

3.2.2.2. Microplate Assay ile Toplam Esteraz Enzimi Aktivitesinin

İncelenmesi……... 36
3.2.2.3. Microplate Assay ile GST Enzimi Aktivitesinin İncelenmesi..... 37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI…… 38
4.1. Biyoassay Sonuçları…… 38
4.1.1. Seleksiyon Sonuçları…… 39
4.1.2. Çoklu Direnç Sonuçları…… 47
4.1.3. Sinerjist + İlaç Sonuçları…….. 49
4.1.4. Direnç Kalıtım Sonuçları……. 53
4.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçları……... 57
4.2.1. Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) ile Esteraz Enziminin İncelenmesi……..... 57
4.2.2. Microplate Assay ile Toplam Esteraz Enzimi Aktivitesinin İncelenmesi……..... 61
4.2.3. Microplate Assay ile GST Enzimi Aktivitesinin İncelenmesi……. 65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ…….. 69
6. KAYNAKLAR……... 75
EKLER……... 81
ÖZGEÇMİŞ……..... 86

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Tetranychus urticae Koch (Acarina: Tetranychidae)' nin Üç Farklı İnsektisit-Akarisit ile Seleksiyonundan Sonra Çoklu Direnç ve Bazı Enzim Düzeylerinin İncelenmesi

Sibel YORULMAZ

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Juri: Doç. Dr. Recep AY (Danışman)
Prof.Dr. Oktay Gürkan
Prof.Dr. Bülent YAŞAR

Bu tez çalışmasında *Tetranychus urticae* Koch' nin üç faklı populasyonunun chlorpyrifos, propargite ve abamectin direnç karekterleri incelenmiştir. *T. urticae'* nin üç populasyonunun $LC_{50, 60, 90}$ değerleri kuru film yöntemi ile belirlenmiştir. Daha sonra her yeni populasyon için belirlenen LC_{60} değeri uygulanarak populasyonların seleksiyonu yapılmıştır. Chlorpyrifos ile 12 seleksiyon yapılan Şak populasyonuna 91.452 kat, propargite ile 17 seleksiyon yapılan 2 numaralı populasyona 32.748 kat ve abamectin ile 15 seleksiyon yapılan 21 numaralı populasyona 35.058 kat direnç kazandırılmıştır. Direnç kazandırılan populasyonların faklı gruptan ilaçlara karşı çoklu direnç geliştirip geliştirmedikleri incelenmiştir. Chlorpyrifos dirençli ŞAK 12 populasyonu abemectin, propargite, clofentezine, fenpyroximate; propargite dirençli KUM 17 populasyonu abamectin, chlorpyrifos, clofentezine, fenpyroximate ve abamectin dirençli BEY 15 populasyonu ise chlorpyrifos, propargite, clofentezine, amitraz ve fenpyroximate karşı çoklu direnç geliştirmiştir. Ayrıca direnç kazandırılan populasyonlarda piperonyl butoxide, triphenyl phosphate ve S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate sinerjistlerinin ilaçlar ile etkinliği incelenmiştir. Her üç sinerjistin de chlorpyrifos, propargite ve abamectin' in etkinliklerini arttırdıkları belirlenmiştir. Direncin kalıtımını belirlemek amacıyla dirençli populasyonlar ve hassas populasyon arasında resiprokal çaprazlamalar sonucunda elde edilen F1 dişilerinde chlorpyrifos, propargite ve abamectin dirençlerinin kalıtım şekilleri dominant olarak bulunmuştur. Dirençli populasyonlarda esteraz ve gluthathione S-transferase enzim aktiviteleri araştırılmıştır. Chlorpyrifos' a dirençli ŞAK 12 populasyonunda esteraz enzim aktivitesi 19.35 mOD/min/mg protein' den 33.59 mOD/min/mg protein' e artmıştır. Esteraz enziminin elektroforetik yöntemde bant yoğunluğunun da arttığı gözlenmiştir. Ancak GST ile chlorpyrifos direnci arasında bir ilişki kurulamamıştır. Propargite dirençli KUM 17 populasyonunda esteraz enzim aktivitesi 7.69 mOD/min/mg protein' den 13.97 mOD/min/mg protein' e artmıştır. Esteraz enziminin elektroforetik yöntemde bant yoğunluğu da artmıştır. Ayrıca GST enzim aktivitesi de 9.74 mOD/min/mg protein' den 13.71 mOD/min/mg protein' e yükselmiştir. Abamectin dirençli BEY 15 populasyonunun esteraz enzim aktivitesinde önemli bir değişme olmamıştır. GST enzim aktivitesi 10.23 mOD/min/mg protein' den 12.36 mOD/min/mg protein' e yükselmiştir.

Anahtar Kelimeler: *T. urticae*, chlorpyrifos, propargite, abamectin, çoklu direnç , sinerjist, esteraz, gluthathione S-transferase

2008, 96 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Determination Some of Enzyme Levels and Multiple Resistant in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina :Tetranychidae) after with Three Different Insecticide-acaricide Selection

Sibel Yorulmaz

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

Thesis Committee: Assoc. Prof. Recep AY (Supervisor)
Prof.Dr. Oktay GÜRKAN
Prof.Dr. Bülent YAŞAR

In this thesis study, three different populations of *Tetranychus urticae* Koch were analyzed to chlorpyrifos, propargite and abamectin for resistance characters . $LC_{50, 60, 90}$ levels of three populations of *T. urticae* were determined by dry film method. Then, the selection was completed by applying the LC_{60} level that was determined for each new population. ŞAK population exposed to twelve selection with chlorpyrifos 91.452 fold, the number 2 population exposed to seventeen selection with propargite 32.748 fold and the number 21 population exposed to fifteen selection abamectin 35.058 fold resistance were developed. It was investigated whether the resistance population was developed multiple resistance against pesticide from different groups. ŞAK 12 population with chlorpyrifos resistance developed multiple resistance against abamectin, propargite, clofentezine and fenpyroximate. KUM 17 population with propargite resistance developed multiple resistance against abamectin, chlorpyrifos, clofentezine and fenpyroximate. BEY 15 population with abamectin resistance developed multiple resistance against chlorpyrifos, propargite, clofentezine, amitraz and fenpyroximate. Also it was studied the sinergists activity of piperonyl butoxide, triphenyl phosphate and S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate with pesticides in populations developed resistance. It was determined that every three sinergist increased the activities of chlorpyrifos, propargite and abamectin. F1 females produced after resiprocal crosses made between resistance and susceptibility populations were dominantly found the ways of resistance heritage to chlorpyrifos, propargite and abamectin. Resistance populations were investigated the enzyme activities of esterase and gluthathione S-transferase. ŞAK 12 population which was resistance against chlorpyrifs the esterase enzyme activity increased from 19.35 mOD/min/mg protein to 33.59 mOD/min/mg protein. It was observed that the band density of esterase enzyme was increased in the electrophoretic method. However relations between GST and chlorpyrifos resistance was not observed. KUM 17 population which was resistance against propargite the esterase enzyme activity was incresed from 7.69 mOD/min/mg protein to 13.97 mOD/min/mg protein. The band density of esterase enzyme increased in the electrophoretic method. Besides, the GST enzyme activity increased from 9.77 mOD/min/mg protein to 13.71 mOD/min/mg protein. It was not determined significant change in esterase enzmye activities of BEY 15 resistance population to abamectin. GST enzyme activity increased from 10.23 mOD/min/mg protein to 12.36 mOD/min/mg protein.

Key Words: *T. urticae*, chlorpyrifos, propargite, abamectin, multiple resistance, sinergist, esterase, gluthathione S-transferase

2008, 96 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, araştırmanın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç.Dr. Recep AY'a teşekkürlerimi sunarım. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri sırasında yardımlarını gördüğüm Doç.Dr. Hayati KÖKNAROĞLU'na ve çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Bitki Koruma Bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Araştırmayı mali yönden destekleyen TÜBİTAK'a (iki noktalı kırmızıörümcek, *Tetranychus urticae* Koch'nin üç insektisit-akarisite karşı direnç, direnç kalıtımı, çoklu direnç ve direnç mekanizmasının incelenmesi adlı, 105 0 179 nolu proje) teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca manevi olarak yanımda hissettiğim canım anneme ve her zaman yanımda olarak başarılarımda büyük pay sahibi olan aileme özellikle teşekkür ederim.

Sibel YORULMAZ

ISPARTA-2008

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. *Tetraychus urticae* populasyonlarının yetiştirildiği bölmeler……. 22
Şekil 3.2. Chlorpyrifos' un kimyasal yapısı…… 23
Şekil 3.3. Abamectin' in kimyasal yapısı…… 24
Şekil 3.4. Propargite' nin kimyasal yapısı ……. 25
Şekil 3.5. Bifenthrin' in kimyasal yapısı……. 26
Şekil 3.6. Amitraz' ın kimyasal yapısı…… 26
Şekil 3.7. Clofentezine' nin kimyasal yapısı……... 27
Şekil 3.8. Fenpyroximate' in kimyasal yapısı……. 27
Şekil 3.9. Piperonyl butoxide' nin kimyasal yapısı……. 28
Şekil 3.10.Triphenly phosphate' ın kimyasal yapısı……... 29
Şekil 3.11. S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate' in kimyasal yapısı… 29
Şekil 3.12. Petrileri ilaçlamada kullanılan ilaçlama kulesi (spray-tower)……... 31
Şekil 3.13. İlaçlanarak içerisine kırmızıörümcek aktarılmış petriler…….. 32
Şekil 4.1. GSS ve chlorpyrifos ile seleksiyon yapılan Şak populasyonlarının LC_{50} değerleri ve direnç oranları……. 42
Şekil 4.2. GSS ve propargite ile seleksiyon yapılan 2 numaralı populasyonun LC_{50} değerleri ve direnç oranları……. 44
Şekil 4.3. GSS ve abamectin ile seleksiyon yapılan 21 numaralı populasyonun LC_{50} değerleri ve direnç oranları……. 46
Şekil 4.4. GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının esteraz bant sistemleri…… 58
Şekil 4.5. GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının esteraz bant sistemleri……... 59
Şekil 4.6. GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının esteraz bant sistemleri……... 60
Şekil 4.7. GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının esteraz enzimlerinin kinetik aktivitesi……..... 62
Şekil 4.8. GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının esteraz enzimlerinin kinetik aktivitesi…….. 63
Şekil 4.9. GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının esteraz enzimlerinin

kinetik aktivitesi……..... 64
Şekil 4.10. GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının GST enzimlerinin kinetik aktivitesi……. 66
Şekil 4.11. GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının GST enzimlerinin kinetik aktivitesi……. 67
Şekil 4.12. GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının GST enzimlerinin kinetik aktivitesi……. 68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. *Tetranychus urticae* populasyonlarının toplandığı yerler ve yıllar……..... 21
Çizelge 4.1. GSS ve Şak populasyonunun chlorpyrifos ile seleksiyonu sonucu belirlenen LC_{50} değerleri ve direnç oranları…… 41
Çizelge 4.2.GSS ve 2 numaralı populasyonun propargite ile seleksiyonu sonucu belirlenen LC_{50} değerleri ve direnç oranları……. 43
Çizelge 4.3. GSS ve 21 numaralı populasyonun abamectin ile seleksiyonu sonucu belirlenen LC_{50} değerleri ve direnç oranları…….. 45
Çizelge 4.4. Chlorpyrifos' a dirençli ŞAK 12 populasyonunun diğer ilaçlara karşı oluşturduğu LC_{50} değerleri ve direç oranları……. 47
Çizelge 4.5. Propargite dirençli KUM 17 populasyonunun diğer ilaçlara karşı oluşturduğu LC_{50} değerleri ve direnç oranları……... 48
Çizelge 4.6. Abamectin' e dirençli BEY 15 populasyonunun diğer ilaçlara karşı oluşturduğu LC_{50} değerleri ve direnç oranları…….. 49
Çizelge 4.7. Chlorpyrifos ve chlorpyrifos + sinerjistlerin LC_{50} değerleri ve sinerjist etki oranları…….. 50
Çizelge 4.8. Propargite ve propargite + sinerjistlerin LC_{50} değerleri ve sinerjist etki oranları…….. 51
Çizelge 4.9. Abamectin ve Abamectin + sinerjistlerin LC_{50} değerleri ve sinerjist etki oranları…….. 52
Çizelge 4.10. ŞAK 12, GSS, F1 ve F2 populasyonlarının chlorpyrifos' a karşı belirlenmiş LC_{50} değerleri ve direnç oranları…… 53
Çizelge 4.11. KUM 17, GSS, F1 ve F2 populasyonlarının propargite karşı belirlenmiş LC_{50} değerleri ve direnç oranları…… 55
Çizelge 4.12.BEY 15, GSS, F1 ve F2 populasyonlarının abamectin' e karşı belirlenmiş LC_{50} değerleri ve direnç oranları…… 56
Çizelge 4.13. GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının esteraz enzim aktiviteleri…… 61
Çizelge 4.14. GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının esteraz enzim aktiviteleri…….. 62

Çizelge 4.15. GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının esteraz enzim aktiviteleri…… 63
Çizelge 4.16. GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının GST enzim aktiviteleri…… 65
Çizelge 4.17. GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının GST enzim aktiviteleri…… 67
Çizelge 4.18. GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının GST enzim aktiviteleri…… 68

SİMGELER DİZİNİ

AchE: Asetilkolinesteraz

BEY 15 Abamectin' e direnç kazandırılmış populasyon

BSA: Bovine Serum Albumin

CarE: Karboksilesteraz

CDNB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene

DC: Diagnostik doz

DEF: S,S,S-tributylphosphorotrithioate

DEM: Diethyl maleate

EST: Esteraz

GSH: reduced gluthathione

GST: Gluthathione S-tarnsferase

IBP: S-Benzyl-O,O-diisopropyl phoshorothiate

IGR: Böcek büyüme düzenleyicisi

kdr: knockdown direnç

KUM 17 Propargite direnç kazandırılmış populasyon

LC_{50}: Lethal konsantrasyon-50

LC_{60} Lethal konsantrasyon-60

LC_{90}: Lethal konsantrasyon-90

MFO: Monoxygenaz

µl: mikrolitre

MO: P-450 monoxygenaz

METI: Mitokondrial elektron taşıma engelleyicileri

PAGE: Poliakrilamid jel elektroforez

PBO: Piperonyl butoxide

ŞAK 12 Chlorpyrifos' a direnç kazandırılmış populasyon

TEMED: N,N,N,N-tetrametyyl(ethylenediamine)

TMBZ: 3,3',5,5' tetramethylbenzidine

TPP: Triphenly phosphate

1. GİRİŞ

Tetranychus urticae Koch. (Acari:Tetranychidae) süs bitkileri, meyve bahçeleri ve sera alanlarında önemli ürün kaybına neden olan bir zararlı türüdür. *T. urticae* sera koşullarında yıl boyunca uygun yaşama ortamı bulmasından dolayı yüksek yoğunluğa ulaşarak önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Tsagkarakou vd. 1999). Özellikle örtü altı sebze yetiştiriciliğinin anahtar zararlıları arasında yer alan kırmızıörümcekler ile bilinçli bir mücadele yapılmadığı sürece ürünün önemli bir miktarı kayba uğramaktadır. Başarılı bir mücadele için zararlıların tanınmaları, yayılışları, biyolojileri, ekolojik istekleri, davranışları ve zarar şekillerinin bilinmesinde zorunluluk vardır (Uygun vd. 2002). Kırmızıörümcekler bitki özsuyunu sokup emme suretiyle yapraklarda sararma, kuruma ve dökülmeyle doğrudan zarar yaparken, fotosentezin azalması ve virüs hastalıklarının nakliyle de dolaylı zarar meydana getirmektedir (Leeuwen vd. 2005). İki noktalı kırmızıörümcek tüm biyolojik dönemlerini aynı konukçu bitki üzerinde ve aynı anda geçirebilmektedir. *T. urticae* yüksek üreme oranına sahip olmasından dolayı, uygun konukçu bitki ve iklim koşullarında populasyon yoğunluğunu hızla artırabilmektedir.

T. urticae' nin savaşımında uygulamasının kolay olması, kısa sürede etki göstermesi ve çoğu zaman tür teşhisine ihtiyaç duyulmaması nedeniyle kimyasal mücadele tercih edilmektedir (Ay vd. 2005). Ancak sürekli ve yoğun ilaç kullanımı çevre kirlenmesi, doğal dengenin bozulması ve zararlıların kısa sürede direnç oluşturması gibi birçok problemi ortaya çıkarmaktadır. *Tetranychus urticae'*nin kontrolündeki en büyük problemlerden biriside birçok akarisite karşı kısa sürede direnç geliştirme yeteneğine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Populasyonun yoğun olması durumunda üreticiler mücadele için sık aralıklarla akarisit veya insektisit-akarisit uygulamaları yapmaktadır. *T. urticae'* nin polifag, üreme potansiyelinin yüksek olması veyılda çok sayıda döl vermesi birkaç uygulamadan sonra akarisitlere direnç geliştirmesini kolaylaştırmaktadır (Stumpf ve Nauen, 2001).

Direnç, pestisitin önerildiği zararlıların populasyonlarının baskı altına alınmasında yanlış depolama, hatalı uygulama ve uygun olmayan çevre koşulları gibi problemler dışında bir hassasiyet azalması olarak tanımlanmaktadır (Ünal ve Gürkan, 2001).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) direnci, normal bir populasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin belirli bir dozuna karşı, aynı türün diğer populasyonundaki bireylerin tolerans kazanma yeteneğinin gelişmesi şeklinde belirtmektedir.

İnsektisitlerin yaygın ve bilinçsiz kullanımı sonucu zararlılarda davranışsal, morfolojik, fizyolojik, çok yönlü ve çapraz direnç olmak üzere 5 tip direnç görülmektedir. Davranışsal direnç, zararlının davranışı nedeniyle ortaya çıkan dayanıklılık şeklidir. İnsektisitin uygulanması sonucunda böceklerin normal davranışlarında bir farklılık görülmektedir. Bu durumda böcek ilaçlı kısımdan uzaklaşma, ilaçlı kısımlarla beslenmeme gibi davranışlar göstererek direnç geliştirebilmektedir. Morfolojik direnç, zararlının vücut özelliklerinden kaynaklanan direnç şeklidir. Zararlının vücudunun sık kıllı olması veya kutikula' nın çok kalın olması gibi özellikleri nedeniyle ilacın böceğin vücuduyla temas edememesi sonucunda dayanıklılık ortaya çıkmaktadır. Fizyolojik direnç, zararlının fizyolojik faaliyetleri sonucu biyokimyasal yollarla meydana getirdikleri dayanıklılık şeklidir. En önemli direnç şeklidir ve insektisitlerin yoğun kullanılması sonucu büyük oranlarda ortaya çıkmaktadır. Çok yönlü direnç, bir ilaca dayanıklılık kazanan zararlının farklı gruplardan değişik etkiye sahip ilaçlara karşı dayanıklılık kazanması durumudur. Çapraz direnç ise herhangi bir insektisite karşı gelişen direncin aynı gruptan farklı insektisitlere karşı da oluşması olarak tanımlanmaktadır (Öncüer, 2004).

Direnç test teknikleri Biyoassay denemeler ve Biyokimyasal denemeler olmak üzere 2 kısımdan oluşmaktadır. Biyoassay yöntemler insektisitlerin uygulama yöntemlerine göre daldırma, rezidü veya yüzey teması, topikal uygulama ve besleme olmak üzere 4 grupta sınıflandırılmaktadır. Biyoassay denemeleri direncin belirlenmesinde kullanılan etkili bir yöntemdir. Biyokimyasal denemeler ise düşük frekanstaki direnç genlerini doğru olarak tanımlama ve kontrol etme yeteneğindedir (Ay ve Sökeli, 2005). Kırmızıörümceklerde dayanıklılığın belirlenmesinde biyoassay yöntemlerden rezidü yöntemi hızlı sonuç vermesi nedeniyle direnç çalışmalarında tercih edilmektedir.

Genel olarak direnç kontrolü LC_{50}' lerin ve LC_{90}' ların karşılaştırılmasını veya tarla laboratuvar populasyonları arasındaki doz-tepki grafiğini içermektedir. Zararlılarla ilgili toksisite denemelerinde her zararlının kendine özgü bir doz-ölüm eğrisi bulunmaktadır. Kullanılan ilacın dozu arttığı zaman ölüm oranı artmaktadır. İnsektisit dozu arttığında zararlı ölümünde artış oranı yavaş yavaş azalıyorsa kullanılan toksik maddeye karşı dayanıklılık başlamıştır. Kontrol düzeydeki doz-ölüm eğrisi ile karşılaştırma yapıldığında fark oluşmuşsa zararlı insektisite karşı direnç kazanmıştır (Toros vd. 2001).

Metobolik direncin oluşmasında böcek bünyesinde bulunan esteraz, glutathion S-transferaz, P-450 monooxygenaz ve hidrolaz enzimlerinin etkili oldukları bilinmektedir. Direncin nedenlerinin belirlenmesinde, insektisitlerin etki mekanizmalarının bilinmesi gerekmektedir. İnsektisitler organik klorlular, organik fosforlular, karbamatlılar ve piretroidler olmak üzere 4 grupta toplanmaktadır.

Organik fosforlular ve karbamatlılar grubundaki insektisitlerin asetilkolinesteraz (AChE) enzimini engelleyerek etkili oldukları bilinmektedir. Bu bileşikler sinir sistemindeki synapsislerde elektriksel sinir uyarılarının iletimini bozarak böceğin ölümüne neden olmaktadırlar. Organik klorlular ve piretroidler sinir sistemi üzerinde etkili olmakla birlikte AChE enzimi bağlayıcısı değillerdir. Sodyum kanallarındaki iyon geçişini engelleyerek sinirsel iletimi bozmakta ve böceğin ölümüne sebep olmaktadırlar (Uğurlu, 2001). Böceklerde piretroid insektisitlere karşı görülen dirence knockdown direnç (kdr) adı verilmektedir. Bu direnç tipi böcek esteraz ve monooxygenaz enzimlerinin aktivitesini engelleyen sinerjistlerden etkilenmeyip, böceklerde sinir sisteminin duyarlılığının azalmasına sebep olmaktadır (Akgünlü, 2005).

Kimyasallara karşı direnç geliştirmiş zararlılarda yoğun ilaç kullanımı, maliyeti arttırarak ekeonomik yönde çiftçiyi olumsuz etkilemekte ve çevre kirliliğine sebep olmaktadır. İnsektisit direncinin çalışılması zararlı yönetim programlarının geliştirilmesi ve direncin evrimsel sürecinin değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Direnç mekanizmalarının bilinmesi çapraz direnç oluşumunu

belirlemeye yardım etmekte ve alternatif insektisitlerin seçimini kolaylaştırmaktadır. Direncin belirlenmesindeki en önemli amaç, en az düzeyde dayanıklılığa sebep olana insektisitlerin belirlenerek, üreticiye tavsiye edilebilmesini sağlamaktır.

Günümüz tarımsal üretimin amacı, birim alana kullanılan ilaç miktarını azaltmak ve zararlılarla yerinde ve doğru mücadele etmektir. Bu çalışmada *Tetranychus urtica'* nin Şak, 2 numara ve 21 numaralı populasyonlarının seçilen ilaçlara karşı biyoassay ve biyokimyasal metodları belirlenmiştir. Direnç gelişimi sağlanan bireylerde enzim ve direnç gelişimi arasındaki ilişki, direncin kalıtımı, sinerjistlerin ilaçlar üzerine etkinliği ve çoklu direnç gelişimi incelenmiştir. Populasyonların esteraz enzimleri elektroforez yöntemi ile incelenmiş, ayrıca toplam esteraz ve GST enzim düzeyleri microplate reader ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Böylece kısa sürede direnç gelişimine neden olan kimyasalların daha az kullanılması tavsiye edilerek, IPM programları içerisinde bu ilaçların alternatifleri de belirlenerek daha uzun süre kullanım olanakları ortaya konmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kabir vd. (1993), Avrupa kırmızıörümceğinde çoklu konsantrasyon test teknikleri ve diagnostik doz (DC) kullanarak propargite direncini belirlemişlerdir. Her iki teknikteki direnç seviyeleri benzer sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Onbir tarla populasyonunun iki tanesinde propargite direnci bulunmuştur.

Herron vd. (1997), Batı Avustralya'da ki meyve bahçelerinde bulunan kırmızı örümceklerin clofentezine ve fenbutatin oxide'e karşı direnç gelişimini araştırmışlardır. Batı Avustralya içerisindeki 30 meyve bahçesinden toplanan kırmızı örümcek populasyonunda diagnostik doz denemeleri yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda kırmızı örümceklerde fenbutatin oxide karşı yüksek, buna karşılık clofentezine karşı düşük direnç gelişimi bulunmuştur.

Goka (1998), Japonya'nın Kanzawai Kishita eyaletinde *Tetranychus urticae* Koch. (Acarina: Tetranychidae)' nin hassas (S) ve dirençli (R) dirençli ırklarını çaprazlayarak tebufenpyrat, fenpyroximate ve pyridaben akarisitlerine karşı direnç gelişiminin genetiğini araştırmıştır. Hassas ve dirençli ırkların LC_{50} değerlerin kullanılarak elde edilen tebufenpyrat, fenpyroximate ve pyridaben direnç oranları sırasıyla; 97, 1265 ve 134 kat bulunmuştur. Dirençli ve hassas ırklar arasında yapılan resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F1 dişilerindeki 3 akarisit direnci tamamen dominant ve resesif direnç kalıtımını göstermiştir. Resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F2 dişilerindeki direnç oranı ise, 3 akarisit direncini tek gen tarafından kontrol edildiğini ispatlamıştır.

Levitin ve Cohen, (1998), *Aonidiella aurantii* (Mask.) (Diaspididae: Coccoidea)' de organofosfatlılar içerisinde yer alan chlorpyrifos direnci ve AChE enzim aktivitesini incelemişlerdir. Dirençli ırkta hassas ırkla karşılaştırıldığında 9-13 kat AChE enzim aktivitesi belirlenmiştir.

Tsagkarakou vd. (1999), Güney Fransa içinden toplanan 21 *Tetranychus urticae* örneğindeki 4 enzimatik polymorfizmi seralar arasındaki ve içindeki genetik

farklılıkları belirlemek için analiz etmişlerdir. Kırmızıörümcekerin genetik yapıları konukçu bitki kolonileri, seraların yayılışları ve yoğunlukları göz önüne alınarak incelenmiştir. Gen faklılıklarının farklı bitki kolonilerinin toplandığı yerde açığa çıkmadığını belirlemişlerdir.

Gonzalez vd. (1999), Brezilya' dan toplanan *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) populasyonunun insektisit direnç mekanizması ve seviyesini belirlemişlerdir. Dirençli ırkta malathion, chlorpyrifos, pirimiphos-methyl, propoxur, cypermethrin, deltamethrin, lamdadacyhalotrhin ve DDT ile bioassay denemeleri yapılmıştır. Denemeler sonucunda chlorpyrifos' a karşı yüksek oranda direnç gelişimi tespit edilmiştir. PBO ve DEF sinerjistlerinin propoxur, lamdadacyhalotrhin ve chlorpyrifos' un etkinliğini arttırdığı saptanmıştır. Esteraz ve oxidaz enzim aktivitelerinin direnç mekanizmasında rol oynayabileceği belirlenmiştir.

Navajas vd. (2000), Akdeniz çevresindeki alanlarda bulunan *Nerium oleander* L. (*Apocynaceae*) gül çeşidi üzerinden toplanan *Tetranychus urticae*'nin genetik çeşitliliği nükleer ribozomal DNA bazları (ITS2) ve Pgm noktalarındaki eletroforezis allozyme enzimleri temel alınarak çalışmalardır. Gül üzerinden toplanan kırmızı örümceklerdeki genetik farklılıklar Yunanistan, Fransa ve laboratuvar ırkı arasındaki uyumsuzluk oluşumları araştırılmıştır. Bu ırklar arasındaki resiprokal çaprazlamalar uyumsuzluk seviyelerini göstermiştir. Data verileri genetik farklılıklarda ekolojik faktörlerin ve coğrafik uzaklıkların rol oynadığını göstermişlerdir.

Szlendak vd. (2000), *Acarus farris (*Oudemans) (Acari: Acaridae)*'* in bir ırkı ve *Acarus siro* L. (Acari: Acaridae)*'* nun iki ırkında seleksiyon ve döllenmiş dişilerde filtre kağıt biyoassay denemelerini kullanarak pirimiphos-methyl direncini araştırmışlardır. *Acarus siro'* nun ilk ırkında en yüksek oranda pirimiphos-methyl direnci gözlenmiştir. Yüksek esteraz enzim aktivitesi de dirençli *Acarus siro* ırkında tespit edilmiştir. AChE enzim aktivitesinde *Acarus siro'* nun iki ırkı arasında bir fark gözlenmemiştir. Sonuç olarak, *Acarus siro* ve *Acarus farris* ırklarında esteraz enzim aktivitesinin pirimiphos-methyl direncinde rol oynadığı belirtilmiştir.

Vontas vd. (2000), böceklerdeki Glutathione S-trasferase (GST) enzim aktivitesinin genellikle kısıtlayıcı Glutathione (GSH) ve 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) gibi supstraktar kullanılarak spektrofotometrik kinetik ölçümler yapılarak hesaplandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada GSH ve CDNB kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda GST enziminin böcek direncinde rol oynayabileceği bulunmuştur.

Dağlı ve Tunç (2001), *Tetranychus cinnabarinus* (Boisd.) (Acarina: Tetranychidae)' da dicofol direncini araştırmışlardır. Antalya'dan toplanan tüm populasyonlarda petri kabı-ilaçlama kulesi ve yaprak daldırma yöntemi kullanılarak direnç oranları belirlenmiştir. Yaprak daldırma yönteminde daha yüksek direnç oranları elde edilmiştir. Topçular bölgesinden toplanan populasyonda yaprak daldırma yöntemi ile 58.9 kat petri kabı-ilaçlama kulesi yöntemi ile 17.5 kat LC_{95} direnç oranları bulunmuştur. Dicofol ile16 seleksiyona maruz bırakılan *Tetranychus cinnabarinus* populasyonunda her iki yöntemde LC_{50} değerleri 19.7 ve 100.7 kat olarak belirlenmiştir. Ancak tetradifon ve dicofol ile dönüşümlü olarak seleksiyona maruz bırakılan populasyonda LC_{50} değerleri 19.4 ve 52.0 kat olarak hesaplanmıştır. Her iki yöntem için 5 ay sonra dicofol direncinde meydana gelen değişiklikler, yalnızca dicofol ile selekte edilen populasyonda 11.7 ve 99.1 kat, dicofol ve tetradifon ile dönüşümlü olarak selekte edilen populasyonda 10.8 ve 15.8 kat olarak bulunmuştur.

Devine vd. (2001), İngiltere'de kısa süre tebufenpyrad'a maruz bırakılmış *Humulus humuli* L; (*Cannabaceae*) bitkisi üzerinden toplanan *Tetranychus urticae* ırkında 4 METI (mitokondrial elektron taşıma engelleyicileri) akarisite; tebufenpyrad, pyridaben, fenazaquin ve fenpyroximate; karşı direnç gelişimini incelemişlerdir. Daldırma metodu kullanılarak bu kimyasallara karşı elde edilen direnç oranları, 46, 346, 168 ve 77 kat bulunmuştur. Bu sonuçlar Japon METI-akarisit dirençli ırkla uyum göstermiştir. UK ırkında aynı zamanda bifenthrin'e karşı da direnç gelişimi (6 kat) gözlenmiştir. Sonuç olarak, METI - akarisit direncinin anne ve babadan gelen ve tamamen dominant genlerle taşındığı bulunmuştur.

Gorman vd. (2001), *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.) (Homoptera: Aleyrodidae)' da direnç gelişimini belirlemek için, böcek büyüme düzenleyicisi

(IGR) olan buprofezin ile test etmişlerdir. Dirençli ırk bu buprofezinin tarla uygulama dozundan etkilenmemiştir. Buprofezin dirençli bireyler benzophenylurea teflubenzurona karşı çapraz direnç geliştirmiştir. *Trialeurodes vaporariorum* test edilen tüm ırklarında imidacloprid'e karşı direnç gelişimi gözlenmemiştir. Ancak *Bemisia tabaci* (Gennadius) gibi diğer beyazsinek türlerinde karşılaştırıldığında *T. vaporariorum* yüksek nikotin toleransı geliştirmiştir. *Tetranychus urticae*'nin sera populasyonlarında fenbutatin oxide ve tebufenpyrad direnci gelişmiştir.

Nauen vd. (2001), Avrupa kırmızıörümceği *Panonychus ulmi* (Koch) (Acarina: Tetranychidae) ve iki noktalı kırmızıörümcek *Tetranychus urticae*'nin 3 laboratuvar ırkının altı bacaklı larva dönemlerinde sekiz farklı akarisit toksisitesi sprey metodu ile değerlendirilmiştir. Fransa, İtayla, Brezilya, Kaliforniya ve Florida'dan toplanan *Tetranychus urticae*'nin 5 tarla populasyonun larvaları %95'lik ölüm oranını sağlayan çeşitli akarisit konsantrasyonları ile hassasiyetlerini belirlemek için test edilmiş ve organofosfat dirençli laboratuvar ırkı WI ile karşılaştırılmıştır. *Tetranychus urticae*'nin laboratuvar ırkından biri olan AK mitekondriyel elektron taşıma inhibitörleri olan pyridaben ve fenpyroximate'ye karşı 2000-4000 kat direnç geliştirmiştir. *Tetranychus urticae*'nin başka bir ırkı olan AU clofentezine ve hexythiazox'e karşı 1000 kat direnç geliştirmiştir. Hexythiazox'e benzer direnç gelişimleri *Panonychus ulmi*'nin laboratuvar ırkı olan CE'de gözlenmiştir.

Stumpf ve Nauen (2001), *Tetranychus urticae*'nin Japon ırkı AKITA ve İngiliz ırkı UK-99 'da METI-akarisitlere çapraz direnç gelişimini araştırmışlardır. AKITA ve UK-99 ırklarının larvalarında hassas ırk GSS ile karşılaştırıldığında pyridaben'e karşı 1.100 ve 480 kat, fenpyroximate karşı 870 ve 45 kat, tebufenpyrad'a karşı 33 ve 44 kat direnç gelişimi gözlenmiştir. Aynı zamanda AKITA ırkı dicofol'a çapraz direnç oluşturmuştur. METI-akarisit dirençli AKITA VE UK-99 ırkları 2.4 ve 1.7 kat 7-ethoxycoumarin O-deethyation (cytochrome P450) aktivitesi belirlenmiştir. GSS ve AKITA ırkları arasında yapılan resiprokal çaprazlamalar sonucunda direnç kalıtımının tamamen dominant olarak taşındığı ve pyridaben ve fepyroximate direnç gelişimleri saptanmıştır.

Stumpf vd. (2001), *T. urticae* populasyonlarının organik fosforlulara karşı (demeton-S-metil, etil paraoxon, chlorpyrifos ve karbamat karbofurun) dayanıklılığını incelemişlerdir. Yapılan petri denemelerinde kullanılan inhibitöre bağlı olarak dayanıklı ırklardaki AChE' ın hassas *T. urticae* türüne göre 34-380 kat daha az duyarlı olduğu bulunmuştur. Yaprak püskürtme denemelerinde, WI (Organik fosforlulara dayanıklı WIESMOOR türü) ve VB (Florida' da Vero Beach' deki pamuklardan alınan *T. urticae* türü) larvaları hassas türe nispeten yüksek derecede dayanıklı AChE' larının aksine orta derecede direnç gösterdiği saptanmıştır. WI ve VB ırklarında chlorpyrifos' a karşı direnç oranlarının dikkate değer olduğu belirlenmiştir. Araziden toplanan VB ırkları ile laboratuvarda yetiştirilmiş WI ırkları chlorpyrifos' a karşı sırasıyla 78-9.5 kat daha fazla dirençli olduğunu tespit edilmiştir. İki ırk arasında AChE inhibe kinetiklerinde açık bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak chlorpyrifos' a karşı VB ırkında ek bir dayanıklılık mekanizmasının olduğu belirlenmiştir.

Uğurlu (2001), *Helicoverpa armigera* (Hübn.) (Lepidoptera: Noctuidae)' nın İsrail (hassas), Adana, Hatay ve Antalya populasyonlarında topikal bioassay yöntemi kullanılarak endosulfan, profenofos, methomyl, tralomethrin ve lamda-cyhalothrin' in LD_{50} değerlerini belirlemiştir. Biyokimyasal analizlerde *H. armigera* populasyonlarının genel esteraz, GST ve asetilkolinesteraz enzimlerinin aktiviteleri belirlenmiştir. Adana ve Hatay populasyonunun genel esteraz enzim aktivitesi hassas populasyonun genel esteraz aktivitesinden daha düşük bulunmuştur. GST ve AChE enzim aktiviteleri açısından tarla populasyonları ile hassas populasyon arasındaki farklılık istatiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Pree vd. (2002), Avrupa kırmızıörümceği *Panonychus ulmi* (Koch)' de clofentezine direncini araştırmışlardır. Clofentezine ile seleksiyona maruz bırakılarak dirençli hale getirilen ırkta 2000 kat direnç geliştirilmiştir. Dirençli ırkta hexythiazox, cyhexatin ve fenbutatin-oxide' ye karşı direnç gelişimi gözlenirken; pyridaben, propargite ve dicofol' a karşı direnç oluşumu tespit edilmemiştir. PBO ve DEF sinerjistlerinin direnç gelişiminde etkisiz olduğu belirlenmiştir.

Stumpf ve Nauen (2002), *T. urticae*' nin Hollanda (NL-00), Kolombiya (COL-00) ve Brezilya (BR-000) ırklarının abamectin' e dayanıklılığını belirlemek için diagnostik doz yöntemini kullanmışlardır. Abamectin' e dayanıklılık bu ırklarda cytrokrom P450 monooksigenazla ilgili olarak bulunmuştur. *T. urticae*' de abamectin dayanıklılığında GST (glutathione S-transferase) ve MFO (monooxygenases)' nun ilişkisini, MFO inhibitörü piperonhyl butoxide ve GST inhibitörü diethyl maleate' nin sinerjizm çalışmalarını doğruladığını belirtmişlerdir.

Tsagkarakou vd. (2002), *T. urticae'* nin methyl-parathion' a 44 kat ve methomyl' e 8 kat dirençli dirençli ırkında (RLAB) ve hassas ırkında (SAMB) enzim çeşitlerinin kinetiklerini ve sinerjistlerin enzim üzerindeki etkisini araştırmışlardır. S,S,S-tributyl phosphorotrithioate ve piperonyl butoxide sinerjistlerinin RLAB ırkında methyl-parathion ve methomyl direnci ve direnç oranları üzerine etkisi olmadığı saptanmıştır.

Yang vd. (2002), *Oligonychus pretensis* (Acarina: Tetranychidae) ve *T.urticae*' de insektisitlere karşı hassasiyette gözlenen farklılıkları ve detoksifikasyon enzim aktivitesindeki değişiklikleri laboratuvar ortamında incelemişlerdir. Her iki akar türünün birbirini takip eden 3 dölü pyretroit insektisitlerden bifentrin ve λ-cyholothrine veya bir organikfosforlu insektisite (dimethoate) maruz bırakılmıştır. 10 kez ilaca maruz bırakılmadan sonra bifentrin, λ-cyholothrin ve dimethoate' e karşı hassasiyetin *T.urticae*' de sırasıyla 4.5, 5.9, 289.2 kat ve *O. pretensis*' te ise 14.8, 5.7, 104.7 kat azaldığı belirlenmiştir. *O. pretensis*' in 3 dölüne karşı kullanılan bifentrin ilaçlamalarından sonra bu türde dimethoate' e 88.9 kat dayanıklılık tespit edilmiştir. *T. urticae*' nin 3 dölüne karşı kullanılan dimethoate ilaçlamalarından sonra bifentrin' e 15.9 kat direnç oluştuğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar dimethoate ile bifentrin arasında çapraz-direnç olabileceği sonucunu çıkarmıştır. Bifentrin, λ-cyholothrine ve dimethoate' e maruz kalmış *O pretensis* ' teki hassasiyet azalması, genel esteraz aktivitesinde sırasıyla 4.7, 3.0, 3.6 katlık artışla ilişkilendirilmiştir. Böcek ilaçlarına karşı duyarlılıktaki azalma glutathione S-transferaz, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene' deki karşılıklı aktivitedeki azalma ilişkilendirilmiş, fakat bu böcek ilacının dayanıklılığı etkilemediği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar bu akarlarda

esterazların, pyretroitlere karşı dayanıklılığın oluşumunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Herron vd. (2003), standart bioassay yöntemleri ve yeni bir akarisit kullanılarak iki noktalı kırmızıörümcek *T. urticae'* nin hassas ve dirençli ırklarında çapraz-direnç gelişiminin kimyasal etkisini incelemişlerdir. Denemelerde kullanılan akarisit NN1 850.0 EW (fenpyroximate ve propargite 3:10 oranında)' nin etkisinin kimyasalların tek başına kullanımlarından daha toksik olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). NN1 850.0 EW' de organofosfat ve pyrethroid direncinden daha az çapraz-direnç gelişimi gözlenmiştir. Sonuç olarak NN1 850.0 EW' de *T. urticae* kontrolü için yeni araştırmalar yapılması gerektiği belirlenmiştir.

Rauch ve Nauen (2003), İtalya' dan toplanan *T. urticae'* nin tarla populasyonunun spirodiclofen ile 37 kez seleksiyona maruz bırakıldıktan sonra 13 kat direnç geliştirdiğini belirtmişlerdir. Selekte edilmemiş ırkla karşılaştırıldığında dirençli ırkta 1.2 kat karboxilesteraz, 1.2 kat GST ve 2.1 kat monooxigenaz enzim aktivitesi tespit edilmiştir.

Riberio vd. (2003), *Sitophilus zeamais* Motschulsky. (Coleoptera: Curculionidae)' ın 6 populasyonunda üç organofosfat (chlorpyrifos-methyl, malathion ve pirimiphos-methyl) ve üç piretroid (cypermethrin, deltamethrin ve permethrin) ve direncini belirlemek için hassas populasyon, DDT ve piretroid dirençli ırklarla karşılaştırmışlardır. Tüm populasyonlar malathion ve pirimiphos-methyl' e karşı direnç geliştirmezken; yalnızca DDT ve piretroid dirençli ırkta tüm piretroid ilaçlara karşı direnç oluşumu tespit edilmiştir. DEF, PBO ve TPP sinerjistleri ile yapılan çalışmada cypermethrin direnç mekanizmasında esteraz enziminin rol oynadığı belirtilmiştir.

Kim vd. (2004), *T. urticae'* nin tarla populasyonun fenpyroximate karşı direncini belirlemek için % 30-50 ölüm oranını sağlayan fenproximate 5SC ile 20 seleksiyona maruz bırakmışlardır. *T. urticae'* nin 20 seleksiyon sonucu meydana gelen ırkı ise FR-20 olarak adlandırılmıştır. FR-20 ırkında direnç ve çapraz direnç seviyeleri spray

yöntemiyle belirlenmiştir. FR-20 ırkı fenpyroximate yüksek oranda (RR 252) direnç geliştirmiştir. Ayrıca FR-20 ırkında acrinathrin (RR, 196), benzoximate (RR 55), propartige (RR 64) yüksek oranda çapraz direnç; abamectin, fenbutatin oxide, fenpropathrin, pyridaben, pyridaben+bifenthrin ve tebufenpyrad' a (RR 11-40) karşı orta seviyede çapraz direnç gelişimi gözlenmiştir. FR-20 ırkı azocyclotin, bromopropylate, chlorfenapry, clorfenapry+bifenthrin, chlorfenapry+pyridaben, dicofol, fenazaquin ve mibectin' e karşı düşük direnç gelişimi (RR<10) tespit edilmiştir. Farklı metobolik inhibitörlerle yapılan sinerjist çalışmalarında fenpyroximate üzerinde en yüksek etki piperonyl butoxide' de gözlenmiş, bunu iprebenfos ve triphenly phosphate izlemiştir. Enzim detoksifikasyonu için yapılan çalışmalarda FR-20 ırkında p-nitroaisole-O-demethylation aktivitesi 2.5 kat, α ve β-naphthyl acetate hydrolysis aktiviteleri 2.5 ve 2.2 kat olarak bulunmuştur. Sonuç olarak *T. urticae'* nin FR-20 ırkında fenpyroximate direncinin esteraz ve oxidaz enzim aktivitelerini yükseltebileceği belirtilmiştir.

Konanz ve Nauen (2004), GSTs enziminin böceklerde ve akarlarda bulunan xenobiotik grubu içerisinde yer alan glutathion' u önleyen sulfhydryl grubundan bir enzim olduğunu belirtmişlerdir. Bu enzimin iki noktalı kırmızıörümceklerde abamectin gibi akarisitlere karşı dayanıklılıkla bağlantısı olduğu bilinmektedir. Akarisite dayanıklı ve duyarlı olan *T. urticae* ırklarından 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ve monochlorobimane substratları kullanılarak GSTs saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Azocyclotin, dicumarol ve plumbagin' in engelleyici etkisi düşük olarak tespit edilmiştir (IC_{50} değeri> 100µM). En yüksek GSTs aktivitesi 2-4 günlük olgun dişi bireylerde görülmüştür. *T. urticae*' lerde GSTs' nin moleküler ağırlığı ve N-terminal amino asit dizilimi ilk kez belirlenmiştir. *T. urticae*' nin WI ırkından saflaştırılan GSTs' nin moleküler ağırlığı 1 kDa olarak bulunmuştur. N-terminal amino asit diziliminin ise böcek sınıf I grubuna dahil olan GSTs ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Leeuwen vd. (2004), *T. urticae'* nin hassas laboratuvar ırkını direnç kazanana kadar chlorfenapry ile selekte etmişlerdir. 12 seleksiyon sonrası direnç oranı (RR) *T.urticae'* nin selekte edilen ırkı ve hassas ırkının LC_{50} değerlerinden 580 kat fazla

olarak hesaplanmıştır. Çapraz direnç çalışmaları için dirençli ırk ayrı ayrı 16 akarisite maruz bırakılmıştır. *T. urticae'* nin dirençli ırkında amitraz (RR=191), bifenthrin (RR=1.3), bromopropylate (RR=7.5), clofentezine (RR=29.6) ve dimethoate (RR=17.6) çapraz direnç gelişimi belirlenmiştir. Bifenazate ve spirodiclofen' de ise çapraz direnç gelişmemiştir. Hassas ve dirençli ırklar arasında yapılan resiprokal çaprazlamadan elde edilen F_1 döllerinde chlorfenapry ilaçlamalarından sonra direnç kalıtımının tamamen resesif olduğu, F_2 döllerinde ise direncin birden fazla gen tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir. Esteraz, monoxygenaz ve GST enzim inhibitörleri olan S,S,S-tributylphosphorotrithioate (DEF), piperonylbutoxide (PBO) ve diethylmaleate (DEM) ile yapılan çalışmalarında ise, chlorfenapry direncinde esteraz enziminin büyük rol oynadığı bulunmuştur.

Sato vd. (2004), Brezilya' nın yaygın çilek bahçelerinden toplanan *T.urticae* populasyonunda fenpyroximate dirençli ve hassas ırkları belirlemek için seleksiyon yapmışlardır. Hassas ırk için 3, dirençli ırk için 5 seleksiyondan sonra LC_{50} ve LC_{95} direnç oranları (R/S) 2.910 ve 2.280 olarak tespit edilmiştir. *T.urticae'* nin selekte edilen hassas ve dirençli ırkları kullanılarak fenpyroximate ve farklı 8 akarisit arasında çapraz direnç gelişimi belirlenmiştir. Fenpyroximate ile pyridaben ve dimethoate arasında çapraz direnç gelişimi belirlenirken; propargite, abamectin, milbetcin, fenpropathrin ve cyhexatin arasında çapraz direnç gelişimi tespit edilememiştir. Fenpyroximate direncinin genetiği üzerinde yapılan çalışmalarda direncin tamamen dominant olarak taşındığı belirlenmiştir.

Akgünlü (2005), Adana, Isparta, Diyarbakır, Mardin ve Urfa' dan farklı kültür bitkileri üzerinden toplanan 11 farklı *T. urticae* populasyonlarının bazı sentetik piretroidlere (bifenthrin, fenpropathrin, lamda-cyhalothrin) karşı meydana getirdiği direnci bioassay methodlarıyla incelemiştir. Direnç oranlarının dağılımı bifenthrin, fenpropathrin, lamda-cyhalothrin için sırasıyla 1.396-7.957, 1.055-8.698, 2.293-48.952 kat düzeylerinde olmuştur. Biyokimyasal analizlerde *T. urticae'* nin direnç mekanizması elektroforetik yöntemle ve kinetik microplate assay yöntemleri ile

incelenmiştir. En yüksek esteraz aktivitesi 7.875 mOD/min/µg protein olarak SAR populasyonunda ölçülmüştür.

Ay (2005), Türkiye'de Antalya ve Isparta illerindeki seralardan toplanan *T. urticae* (Koch) populasyonlarının chlorpyrifos' a karşı hassasiyet seviyelerini petri kabı yöntemiyle belirlemiştir. Çalışmanın birinci aşamasında, populasyonların chlorpyrifos' a karşı direnç geliştirip geliştirmedikleri incelenmiştir. Chlorpyrifos' un farklı dozları kullanılarak populasyonların LC_{50} ve LC_{90} değerleri belirlenmiştir. Populasyonların direnç oranları LC_{50} değerlerinin hassas populasyonun LC_{50} değerine bölünmesiyle hesaplanmıştır. Sonuç olarak Isparta ilinden toplanan üç kırmızıörümcek populasyonlarından ikisinde ve Antalya ilinden toplanan populasyonların tamamında chlorpyrifos' a karşı direnç gelişimi saptanmıştır.

Ay ve Gürkan (2005), Adana, Antalya, İzmir ve Urfa'dan pamuk üzerinden toplanan 9 farklı *Tetranychus urticae* Koch. populasyonunun iki selektif akarisite (dicofol ve bromopropylate) karşı duyarlılığı biyoassay ve biyokimyasal yöntemlerle incelemişlerdir. Rezidü biyoassay (petri kabı-ilaçlama kulesi) yöntemi ile dicofol ve bromopropylate uygulanarak tüm populasyonlarda LC_{50} ve LC_{90} değerleri belirlenmiştir. Standart hassas (GSS) populasyon ile karşılaştırılarak bulunan direnç oranlarının dağılımı dicofol ve bromopropylate için sırasıyla 1.112-2.497 ve <1.0-1.106 kat olmuştur (LC_{50}'ye göre). Biyokimyasal analizlerde *T. urticae*'nin esteraz enzimi elektroforetik yöntemle incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda Adana'dan toplanan iki populasyonda ve Urfa'dan toplanan bir populasyonda belirgin Est-4 bantı bulunmuştur. Ancak *T. urticae* populasyonlarının duyarlılık düzeyleri ile esterase enzimi yoğunluğu arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Ay vd. (2005), iki noktalı kırmızıörümcek, *Tetranychus urticae* Koch'nin bazı akarisitlere (propargite((Omite) 570 g l^{-1}, amitraz (Kortraz) 200g l^{-1} ve abamectin (Agrimec) 18 g l^{-1})' e karşı duyarlılığını belirlemişlerdir. Isparta'da bulunan beş farklı sebze üretim serasından toplanan *T. urticae* populasyonlarının bu akarisitlere karşı duyarlılıkları yaprak daldırma yöntemi ile saptanmıştır ve standart hassas populasyon (GSS) ile karşılaştırılmıştır. Standart hassas (GSS) populasyon ile

karşılaştırılarak bulunan direnç oranlarının dağılımı propargite, amitraz ve abamectin için sırasıyla <1.0-2.5 1.2-2.1 ve <1.0-2.9 kat olarak belirlenmiştir. Isparta ve çevresindeki sebze seralarının birçoğu yeni kurulduğu için denemeye alınan populasyonların çalışmada kullanılan akarisitlere karşı önemli düzeyde bir duyarlılık kaybı olmamıştır.

Bues vd. (2005), Güney Fransa ekim alanlarında *Helicoverpa armigera*' de pyrethroid direnç faktörleri ve direnç mekanizmasını deltamethrin dirençli ırk (Rd) ve methomyl dirençli ırkın (Rm) insektisit uygulanmamış tarla ırkı ile karşılaştırarak araştırmışlardır. Çalışmalarda her üç ırkın larvalarına sinerjistli (PBO, DEF, DEM) ve sinerjistsiz ilaç uygulamaları ve üç enzim sisteminin (oxidaz, esteraz, GST) biyokimyasal analizleri yapılmıştır. Deltamethrin direnç faktörü Rd ırkı için 32.4 kat Rm ırkı için 11.5 kat olarak bulunmuştur. Üç ırkta da deltamethrin ve PBO sinerjistinin birlikte uygulanmaları sonucunda 30-80 kat arasında direnç gelişimi gözlenmiştir. Rd ve Rm ırklarındaki EST ve MFO aktiviteleri tarla ırkından yüksek bulunmuştur. Rm ırkındaki GST enzim düzeyi tarla ırkından oldukça farklı olarak belirlenmiştir. DEM sinerjistinin deltamethrin ile birlikte uygulanması sonucunda ilaç etkinliği üzerinde bir etkisi bulunmamıştır.

Leeuwen vd. (2005), *T. urticae'* nin tarla ırkının (MR-VL) laboratuvar ırkı (LS-VL) ile karşılaştırıldığında bifenthrin, dicofol ve fenbutatin oxide ' ye karşı yüksek seviyede direnç geliştirdiğini belirtmişlerdir. MR-VL ırkında clofentezine (RR=17), dimethoate (RR=250), chlorfenapyr (RR=154), bromopropyate (RR=25), amitraz (RR=17), flucycloxuron (RR=15) ve azocyclotine (RR=7) çapraz direnç gelişimi gözlenirken; abamectin, acequinocyl, bifenazate, tebufenpyrad ve spirodiclofen' e karşı çapraz direnç gelişimi belirlenmemiştir. 7-ethoxycoumarin (7-EC) ve 7-ethoxy-4-trifliоromethylcoumarin (7-EFC) ile yapılan monoxygenaz (MO) denemelerinde *T. urticae'* de ilk kez EFC'nin EF yerine alternatif olabileceği belirlenmiştir. MR-VL ırkında 7-EFC ve 7-EC ile yapılan çalışmalarda 3-4 kat MO aktivitesi bulunmuştur. MR-VL ırkında –nitrophenly acetate ve 1-naphthyl acetate substratları kullanılarak enzim aktivitesi tespit edilmiştir. GST enziminin her iki ırkta da direnç gelişiminde etkisi olmadığı belirlenmiştir.

Sato vd. (2005), abamectin ile selekte edilmiş *T. urticae* populasyonunda çapraz direnç gelişimi ve direncin stabilitesini incelemişlerdir. Abamectin ile 5 seleksiyondan sonra dirençli ve hassas ırklar elde edilmiştir. Abamectin' e karşı direnç oranı (R/S) 342 kat olarak bulunmuştur. Abamectin ile milbectin arasında çapraz direnç gelişimi gözlenirken, fenpyroximate, cyhexatin, propargite dimethoate arasında çapraz direnç gelişimi belirlenmemiştir. Sonuç olarak abamectin dirençli tarlalarda milbectin kullanımından uzak durulması gerektiği belirtilmiştir.

Sökeli (2005), Isparta ili ve çevresindeki elma üretimi yapılan alanlardan toplanan *T. urticae* ve *Oligonychus sp*. (Acarina: Tetranychidae)' de propargite, abamectin ve chlorpyrifos' a karşı direnç oranlarını belirlemiştir. Propargite, chlorpyrifos ve abamectin için LC_{50} düzeyi sırasıyla <1.0-1.046, 2.341-40.206 ve <1.0-1.387 kat olarak saptanmıştır. Denemenin sonunda *T. urticae* populasyonlarının chlorpyrifos' a karşı dirençli oldukları propargite ve abamectin' e karşı ise hassas oldukları bulunmuştur.

Wheelock vd. (2005), carboxylesterases enziminin piretroid, organofosfat ve karbamatların detoksifikasyonunda büyük rol oynağını belirtmişlerdir. Bu çalışmada enzimin katalik mekanizması, özel substratları, agrokimyasal metabolizması, insektisit direncindeki rolü ve çevre üzerine etkisi incelenmiştir.

Young vd. (2005), *Helicoverpa armigera* ' nın tarla populasyonunda piretroid direnci ve esteraz enzimi arasındaki ilişkiyi PBO sinerjistini kullanarak araştırmışlardır. Sonuç olarak, doğru sıcaklıklarda uygulandığında PBO' nun *Helicoverpa armigera'* da piretroid direncini düzenlediği belirtilmiştir.

Ako vd. (2006), *T. urticae'* nin 4 ırkında (GSS (hassas), WI (organofosfat ile selekte edilmiş), USA (karakteristik olmayan ırk) ve Akita (METI akarisit direnç ve dicofol çapraz dirence sahip), daldırma yöntemi ve yapraklara imidacloprid uyguladıktan sonra, *T. urticae* ırklarının yumurta bırakma sürelerini karşılaştırdıklarını belirtmişlerdir. 16 günlük yumurta bırakma süreci boyunca GSS ırkının çoklu

dirence sahip Akita ırkından daha fazla yumurta bıraktığı tespit edilmiştir. USA ırkında yumurta bırakma süresine imidacloprid' in etkisi olmadığı saptanmıştır.

Kang vd. (2006), Çin, Fujian, Shangjie' de *Brassica oleracea var. İtalica L.* Üzerinden toplanan *Bemisia tabaci* Genn. (Homoptera: Aleyrodidae)' nin insektisit direnç mekanizması ve enzim inhibitörlerini kuru film metodu ve biyokimyasal analizlerle araştırmışlardır. *B. tabaci'* nin hassas ırkıyla karşılaştırıldığında methamidophos için 29.3 kat, chlorpyrifos için 21.8 kat, phoxim için 2.2 kat, fenvalerate için 72.4 kat, avermectin için 9.4 kat, emamectin benzoate için 5.5 kat, spinoad için 1.8 kat, fipronil için 11.6 kat ve imidacloprid için 8 kat direnç oranı belirlenmiştir. *B. tabaci'* nin tarla populasyonunda methamidophos ve dichlorvos için yüksek carboxylesteraz (CArE) ve asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi tespit edilmiştir. *B. tabaci'* nin tarla poplasyonunda PB ile 9 insektisitin; TPP ile imidacloprid, fenvalerate, phoxim, chlorpyrifos, methamidophos' un; DEM ile avermectin ve methamidophos' un birlikte uygulanmaları sonucunda yüksek sinerjist oranı bulunmuştur. Sonuç olarak, *B. tabaci'* nin organofosfat direncinde AChE yoğunluğunun rol oynadığı belirlenmiştir.

Kim vd. (2006), pyridaben ile 20 kez seleksiyona maruz bırakılan *T. urticae'* nin tarla populasyonunda 240 kat direnç kazandırılarak PR-20 ırkının elde edildiğini belirtmişlerdir. PR-20 ırkında fenpyroximate için 373 kat, acrinathrin için 329 kat, benzoximate için 84 kat direnç tespit edilmiştir. Sinerjist çalışmalarında PBO' nin pyridaben direnci üzerinde büyük etkisi olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, tarla koşullarında pyridaben direncinin yönetiminde PBO' nin yararlı olabileceği belirlenmiştir.

Leeuwen vd. (2006), chlorfenapyr dirençli *T.urticae'* nin laboratuvar ırkında araştırmalar yapmışlardır. Chlorfenapyr direncinde esteraz ve P450 mono-oxigenaz (MO) aktivitesinde artış, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMBZ) aktiviteside ise azalma tespit edilmiştir. Sonuç olarak esteraz ve P450 MO aktivitelerinin chlorfenapyr detoksifikasyonunda değişime sebep olabileceği belirtilmiştir.

Leeuwen vd. (2006), *T. urticae'* nin hassas ırkının (LS-VL) bifenazate ile seleksiyona maruz bırakılması sonucunda dirençli ırkı (BR-VL) elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bifenazate dirençli ırkta enzim detoksifikasyonunda artış ve sinerjizm etkisi saptanmamıştır. LS-VL ırkı ve BR-VL ırkı arasında yapılan resiprokal çaprazlamalar sonucunda bifenazate direncinin dişi bireyler ile taşındığı belirlenmiştir.

Rakotondravelo vd. (2006), *Chironomus tentans* Fab. (Diptera: Chironomidae)' da atrazine, DDT ve chlorpyrifos' un esteraz , GST, AChE ve P450 enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. *Chironomus tentans'* a atrazin uygulanması sonucunda sadece P450 enzim aktivitesinde 12.5 – 15.5 kat artış belirlenmiştir. DDT uygulanması sonucunda ise GST enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. Chlorpyrifos uygulanması sonucunda ise AChE ve esteraz enzim aktivelerinde değişim tespit edilmiştir.

Sato vd. (2006), *Amblyseius womersleyi* Schicha. (Acari: Phytoseiidae)' nin hassas ve methidathion dirençli ırkında P450 monooxygenaz enzim aktivitesini araştırmışlardır. O-deethylation 7- exhoxycoumarin (7-EC) ile belirlenen monooxygenaz aktivitesi dirençli ırkta hassas ırklardan 3.60 ve 5.42 kat daha yüksek olmuştur. Monooxygenaz aktivitesi *Amblyseius womersleyi'* nin biyolojik dönemlerinde farklı seviyelerde gözlenmiştir. Larva döneminde en düşük monooxygenaz aktivitesi tespit edilirken; protonimf, deutonimf ve ergin dönemlerde yüksek monooxygenaz aktivitesi belirlenmiştir.

Suh vd. (2006), Kore' de 16 tane sera ve 10 tane elma bahçesinden toplanan *Tetranychus urticae* populasyonlarında fenpyroximate ve pyridaben direnç oranlarını saptamışlardır. Sera populasyonlarında elma bahçelerinden toplanan populasyonlara göre daha yüksek direnç tespit edilmiştir. Sonuç olarak *Tetranychus urticae'* de meydana gelen genetik varyasyonların direnç gelişiminde etkili olduğu belirlenmiştir.

Wang ve Wu (2007), abamectin ile 18 seleksiyona maruz bırakılarak 14.5 kat direnç kazandırılan *B. tabaci'* nin NJ-Abm ırkında emamectin benzoate 4.4 kat,

imidacloprid' e 3.4 kat çapraz direnç belirlemişlerdir. NJ-Abm ırkında 2.1 kat P450 monoxigenaz ve 2.0 kat GST aktivitesi tespit edilmiştir. Sonuç olarak NJ-Abm ırkında imidacloprid, emamectin benzoate çapraz direncinin ve abamectin direncinin P450 monoxigenaz ve GST aktivitesiyle ilgili olduğu belirtilmiştir.

Huang ve Han (2007), *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae)' nın hassas ve dirençli ırkında çoklu direnç mekanizmasını araştırmışlardır. Her iki ırkta da yüksek piretroid direnci (RR: 63-530), orta seviyede organofosfat ve karbamat (AChE hedefi insektisitler) direnci (RR: 5.7-26) gelişmiştir. Ancak fipronil' e karşı direnç gelişimi saptanamamıştır. Sonuç olarak, piretroidler ve AChE hedefli insektisitler arasında gelişen çapraz direncin MFO ve esteraz aktivitelerinin artması sonucu oluşabileceği belirtilmiştir.

Ismail vd. (2007), iki noktalı kırmızıörümceğin yaşam dönemleri üzerinde abamectin ve bir bioinsektisit olan spinosad' ın akarisit özelliklerini karşılaştırmışlardır. Hassas laboratuvar ırkının ergin ve yumurta dönemleri üzerinde abamectin'in 5 dozu, spinosad' ın 5 dozu ve abamectin spinosad karışımı uygulanmıştır. Spinosad' ın abamectin' e göre dişi üremesi üzerinde daha fazla etkisi olduğu gözlenmiştir. Spinosad ve abamectin karışımının uygulanması sonucunda % 74 oranında ölüm oranı tespit edilmiştir. Sonuç olarak kırmızıörümceğin yaşam dönemleri üzerinde spinosad' ın abamectin' den daha etkili olduğu belirtilmiştir.

Leeuwen ve Tirry (2007), *T. urticae*'nin çoklu dirence sahip tarla ırkının laboratuvar ırkı ile karşılaştırıldığında bifenthrine yüksek oranda direnç geliştirdiğini belirtmişlerdir. Dirençli ırkta esteraz inhibitörü S,S,S-tributyl-phospharotrithioate (DEF)' in bifenthrin toksisitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Hassas ve dirençli ırkta bifenthrin-hidrolize aktivitesi gaz kromatografisi ile ölçülmüş ve in vitro' da denenmiştir. Dirençli ırkta 7.2 kat yüksek aktivite belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini üç farklı iki noktalı kırmızıörümcek, *Tetranychus urticae* Koch. populasyonları, Rothamstad Experimental Station (İngiltere)' den sağlanan standart hassas (German Susceptible Starins, GSS) *Tetranychus urticae* populasyonu; ilaç olarak organik fosforlu insektisitlerden chlorpyrifos, akarisitler içerisinde yer alan abamectin (avermectin) ve spesifik akarisitler grubuna ait kükürtlülerden propargite oluşturmaktadır.

Biyoassay çalışmaları sırasında, ilaçlama kulesi (Spray tower) (Burkard Scientific), plastik petriler, pencere bantı, ince uçlu fırça, farklı hacimlere sahip mikropipetler, steromikroskop, 50, 100 ml' lik ölçü silindirleri, pens, 50, 100 ml' lik cam ölçü balonları gibi materyaller kullanılmıştır.

Biyokimyasal çalışmalarda ise, vertikal elektroforez seti (BIO-RAD), microplate reader ($Versa_{max}$), çoklu homojenizer, hassas terazi, manyetik karıştırıcı, tek ve çok kanallı mikropipetler, microplate reader plate, farklı devirlerde çalışan soğutmalı santrifüj (Hettich UNIVERSAL 32R), pH metre, buz makinesi (Scotsman AF 100), değişik cam ve plastik malzemeler gibi materyaller kullanılmıştır.

3.1.1. *Tetranychus urticae* populasyonları

3.1.1.1. *Tetranychus urticae* populasyonlarının orijini

Tetranychus urticae' nin tarla populasyonları ülkemizde sera alanlarının fazla olduğu ve yoğun insektisit kullanılan bölgelerimizden Antalya ve Isparta illerinden toplanmıştır. 2003 yılında Antalya' nın Kumluca (2 numara), Gazipaşa-Beyobası (21 numara) ilçelerinden ve Isparta' nın Şarkikaraağaç (Şak) ilçesindeki seralardan populasyonlar toplanmıştır. Toplanan populasyonlar Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümündeki böcek yetiştirme kabinlerinde

günümüze kadar yetiştirilmiştir. *Tetranychus urticae'* nin hassas populasyonu (German Susceptible Strains, GSS) Rothamstad Experimental Station (İngiltere)' den kontrol amaçlı kullanılmak üzere getirtilmiştir. Bu populasyona 1965 yılından itibaren ilaç uygulaması yapılmamıştır. Populasyonların toplandıkları yerler ve tarihler Çizelge 3.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *Tetranychus urticae* populasyonlarının toplandığı yerler ve yıllar

Populasyon adı	**Örneklerin toplandığı yer ve konukçuları**	**Toplandığı yıl**
GSS	Rothamstad Experimental Station (İngiltere)	1964
Şak	Isparta Şakrikaraağaç fasulye üretici serası	2003
21 Numara	Antalya Gazipaşa-Beyobası fasulye üretici serası	2003
2 Numara	Antalya Kumluca fasulye üretici serası	2003

3.1.1.2. *Tetranychus urticae* populasyonlarının yetiştirilmesi

Laboratuvara getirilen *Tetranychus urticae* populasyonlarının yetiştirilmesi için barbunya bitkisi kullanılmıştır. Çünkü laboratuar koşullarında barbunya fasulyesi bitkisinin yetiştirilmesi kolaydır. *Tetranychus urticae* populasyonlarının hepsi konukçu bitki yaprakları ile birlikte küçük kutulara alınarak populasyonlarının devamlılığı sağlanmıştır. Populasyonların birbirine bulaşmasını önlemek için akar yetiştirme odası uygun hale getirilmiştir. Bunun için akar yetiştirme odaları 45X90 cm' lik raflardan oluşan vazelinlenmiş bölmeler içermektedir. Kültürler 26±2 ^{o}C sıcaklıkta % 50-60 orantılı nem ve florasan lambalarla 16 saatlik ışıklanma, 8 saatlik karanlık sağlanan koşullarda yetiştirilmiştir.

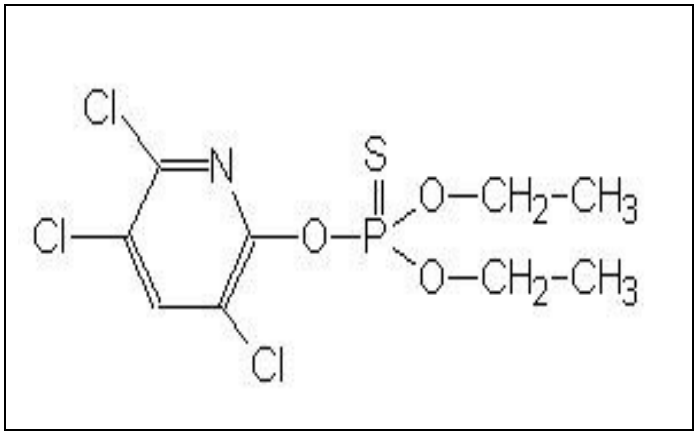


Şekil 3.1. *Tetraychus urticae* populasyonlarının yetiştirildiği bölmeler

3.1.2. İnsektisitlerin seçimi

Denemede bir insektisit –akarisit ve iki selektif akarisit kullanılmıştır. İlaçların seçiminde doğada yoğun olarak kullanılan ilaçlar tercih edilmiştir. Chlorpyrifos, abamectin ve propargite' nin seçilmesi uygun bulunmuştur. Ayrıca direnç kazandırılan populasyonlarda çoklu direnç çalışmaları için; amitraz, bifenthrin, clofentezine ve fenpyroximate kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan ilaçlara ait özellikler aşağıda verilmiştir.

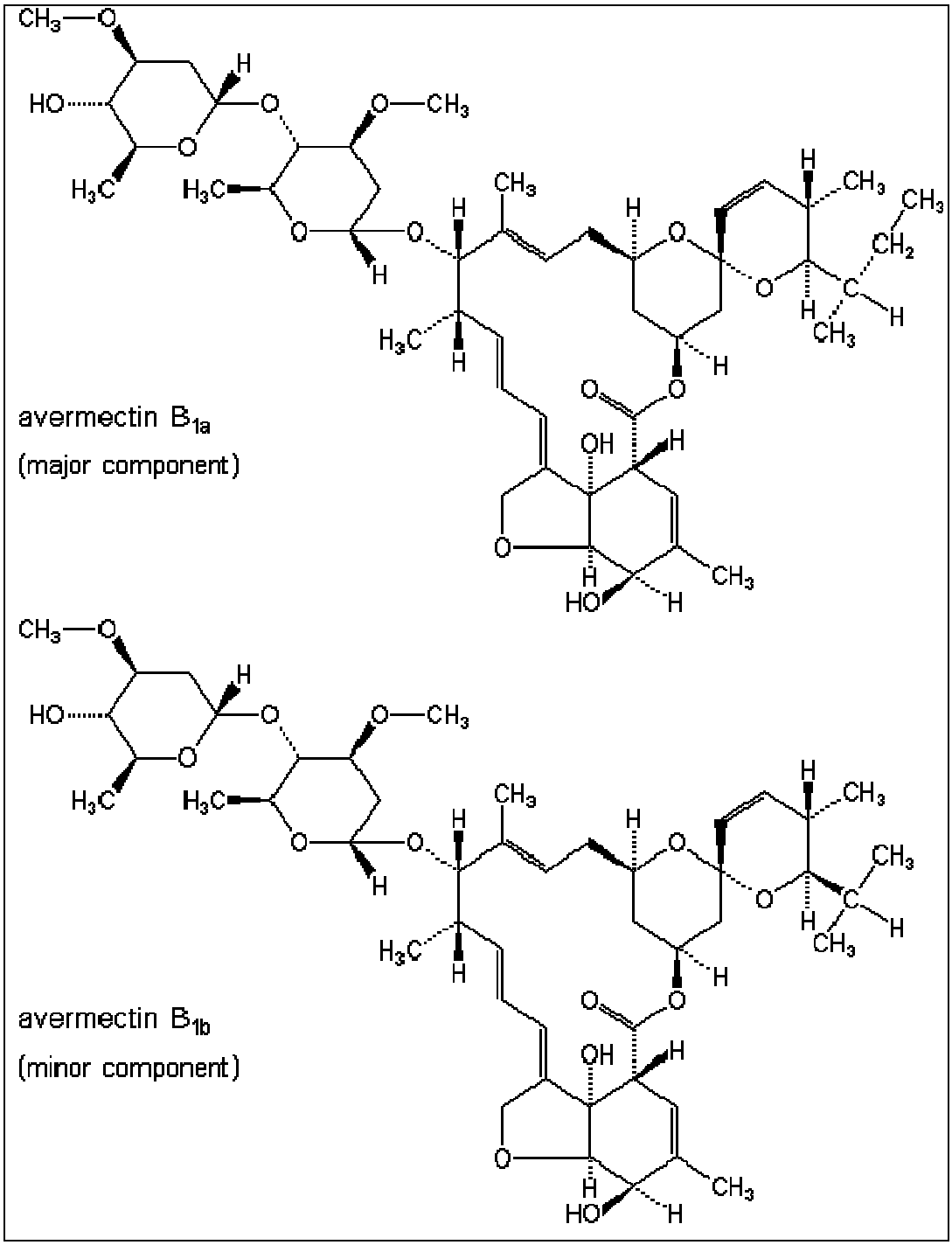
Chlorpyrifos ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$)



Şekil 3.2. Chlorpyrifos' un kimyasal yapısı (Anonim, 2007h)

Kimyasal adı *O,O*-diethyl *O*-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate olan chlorpyrifos organik fosforlu insektisitler içerisinde yer almaktadır. Etkili madde beyaz renkli ve kristal halindedir. Kontakt, mide zehiri ve gaz etkili bir insektisittir. Penetrasyon yeteneği iyidir. Toprakaltı zararlılarına ve çok sayıda toprak üstü zararlısı böceklere karşı önerilmektedir. Zehirlilik sınıfı 2' dir. Balarılarına ve balıklara çok zehirlidir. LD50: ağızdan 914-270mg/kg, deriden 2000 mg/kg; tolerans üzüm ve sebzelerde 0.2 ppm, meyvelerde 0.05 ppm ve turunçgillerde 0.05 ppm' dir. Bekleme süresi 15-20 gündür. Fransa' da bitkilerin çiçeklenme döneminde kullanılması yasaktır. Günlük alınabilir zararsız miktarı (ADI) 0.01 mg/kg' dır. Toprakta kalıcılığı 120-140 gün olarak saptanmıştır (Öncüer, 2004). Kullanılan chlorpyrifos etkili maddeye sahip ticari insektisit ismi Dursban 4 EC 480 g/l' dir.

Abamectin ($C_{48}H_{72}O_{14}$ Avermectin B 1a) ($C_{47}H_{70}O_{14}$ Avermectin B 1b)

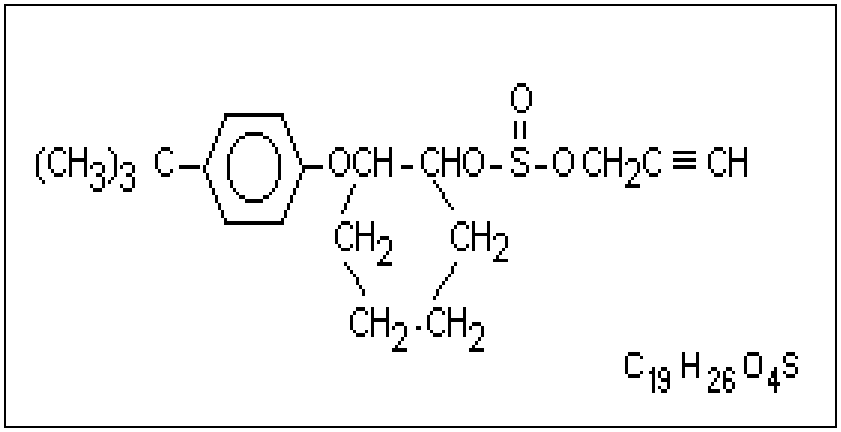


Şekil 3.3. Abamectin' in kimyasal yapısı (Anonim, 2007e)

Abamectin akarisitler içerisinde diğerleri grubunda yer almaktadır. Avermectin' in iki analogundan meydana gelmiştir. Bir toprak mikroorganizması *Streptomyces*

avermitilis' in fermantasyonuyla elde edilmiştir (Öncüer, 2004). İnsektisit ve akarisit olup kontakt ve mide yoluyla etkilidir. Süs bitkilerindeki Tetranychidae' ler ve yaprak galeri güvelerine karşı kullanılmaktadır. Sıçanlarda akut oral LD_{50} değeri erkekler için 300 mg/kg' dır. Toksisite sınıfı II'dir (Toros vd. 2001). Narenciyede pas böcüsü, yaprak galeri güvesi, süs bitkilerinde galeri sineği, domates ve pamukta kırmızörümceğe karşı kullanılmaktadır. Kullanılan abamectin etkili maddeye sahip ticari insektisit-akarisit ismi Agrimec 18 g/L' dir.

Propargite ($C_{19}H_{26}O_4S$)

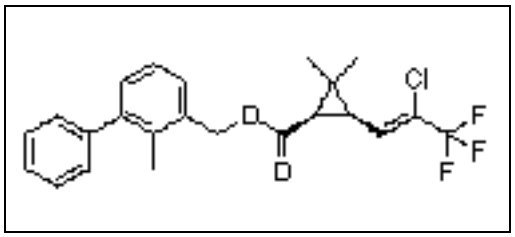


Şekil 3.4. Propargite' nin kimyasal yapısı (Anonim, 2007d)

Propargite akarisitlerden kükürtlüler içerisinde yer almaktadır. Kimyasal adı 2-(4-tert-butylphenoxy)-cyclohexyl prop-2 sulphite' dir. Teknik madde koyu sarı viskoz sıvı olup suda erimez, birçok organik çözücülerde çözünmektedir. Sıçanlar için akut oral LD_{50} 2800 mg/kg' dır. Toksisite sınıfı I' dır (Toros vd. 2001). Elmada akdiken akarı, şeftalide Avrupa kırmızıörümceği, fasulye ve bağda iki noktalı kırmızıörümceğe karşı kullanılmaktadır (Anonim, 2002). Kullanılan propargite etkili maddeye sahip ticari insektisit-akarisit ismi Komite EC 588 g/l' dir.

3.1.3. Çoklu direnç çalışmalarında kullanılan insektisitler

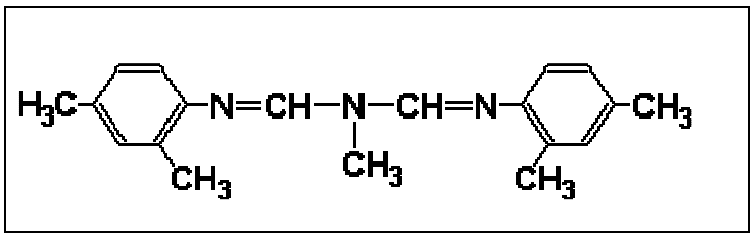
Bifenthrin ($C_{23}H_{22}CIF_3O_2$)



Şekil 3.5. Bifenthrin' in kimyasal yapısı (Anonim, 2007b)

Bifenthrin sentetik piretroid' ler grubunda yer almaktadır. Etkili madde renksiz ve katı haldedir. Geniş spektrumlu bifenthrin insektisit ve akarisittir. Kontakt ve mide zehiri etkilidir. LD_{50}: ağızdan 54mg/kg, tolerans hububatta 0.1 ppm' dir. Serada yetiştirilen süs bitkilerinde, meyveler ve bağda kırmızıörümceklere karşı kullanılmaktadır (Öncüer, 2004). Kullanılan bifenthrin etkili maddeye sahip ticari insektisit-akarisit ismi Talstar EC 100 g/l' dir.

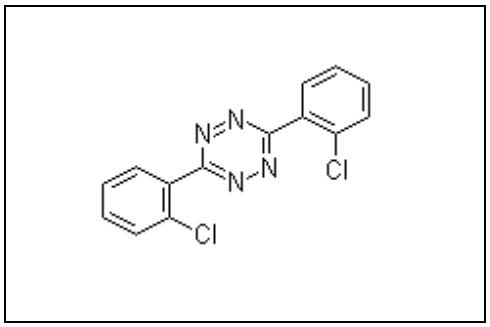
Amitraz ($C_{19}H_{23}N_3$)



Şekil 3.6. Amitraz' ın kimyasal yapısı (Anonim, 2007f)

Akarisitler içerisinde amin ve hidrazin türevleri içerisinde yer almaktadır. Etkili madde renksiz ve kristal haldedir. Kontakt ve buhar etkili bir akarisittir. Sıçanlar için akut oral LD_{50} 650 mg/ kg' dır (Toros vd, 2001). Kullanılan amitraz etkili maddeye sahip ticari insektisit-akarisit ismi Kortraz 20 EC 200 g/l' dir.

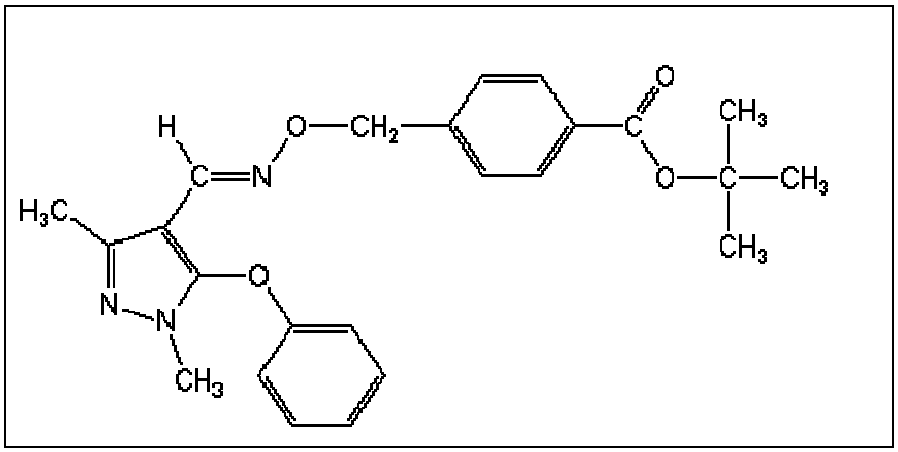
Clofentezine ($C_{14}H_8C_{l2}N_4$)



Şekil 3.7. Clofentezine' nin kimyasal yapısı (Anonim, 2007f)

Akarisitler içerisinde diğerleri grubunda yer almaktadır. Etkili madde morumsu kırmızı renkte ve kristal haldedir. Kontakt etkili akarisittir. LD_{50} ağızdan 3200mg/kg' dır (Öncüer, 2004). Kullanılan clofentezine etkili maddeye sahip ticari insektisit-akarisit Apollo ismi SC 500 g/l' dir.

Fenpyroximate ($C_{24}H_{27}N_3O_4$)



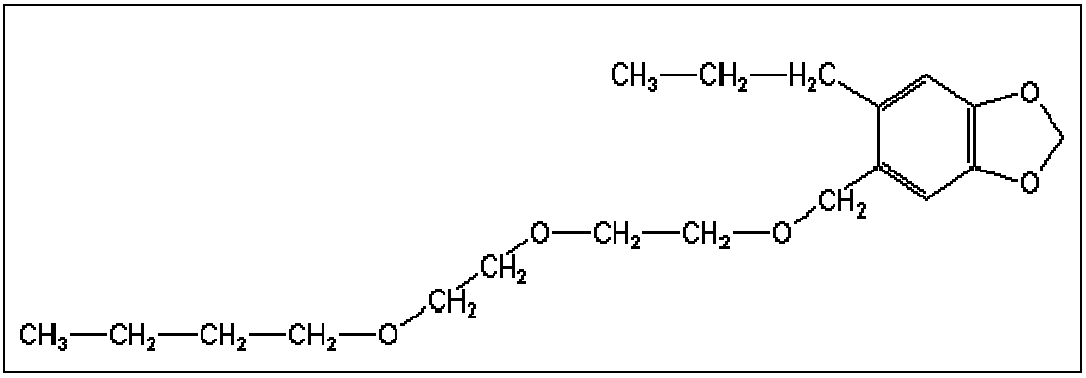
Şekil 3.8. Fenpyroximate' in kimyasal yapısı (Anonim, 2007c)

Akarisitler içerisinde diğerleri grubunda yer almaktadır. Etkili madde beyaz renkli ve toz halindedir. LD_{50}: ağızdan 480mg/kg' dır (Anonim, 2002). Kullanılan fenpyroximate etkili maddeye sahip ticari insektisit-akarisit ismi Meteor 50 g/l' dir.

3.1.4. Sinerjistler

Sinerjist çalışmalarında piperonyl butoxide (PBO), S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) ve triphenyl phosphate (TPP) kullanılmıştır. Bu sinerjistlerle ilgili özellikler aşağıda verilmiştir.

Piperonyl butoxide (PBO) ($C_{19}H_{30}O_5$)

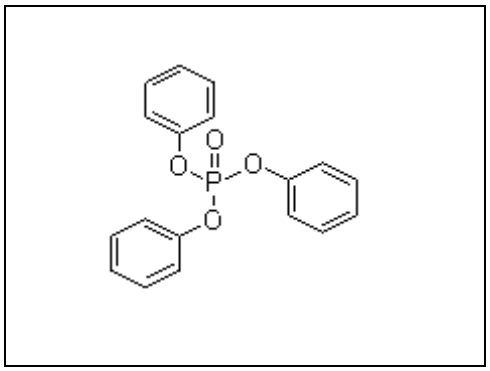


Şekil 3.9. Piperonyl butoxide' nin kimyasal yapısı (Anonim, 2007g)

Etkili madde renksiz ve sıvı haldedir. Sentetik piretroitler ve karbamatlılar için sinerjisttir. LD_{50}: ağızdan 7500 mg/kg olup kansorejen etkisi yoktur (Öncüer, 2004). PBO esteraz ve monooxygenaz enzim grubu içerisinde yer alan P-450 Cytochinekrom ve esteraz inhibitörüdür (Stumpf ve Nauen, 2002; Young vd. 2005; Kim vd. 2006; Leeuwen ve Tirry, 2007)

.

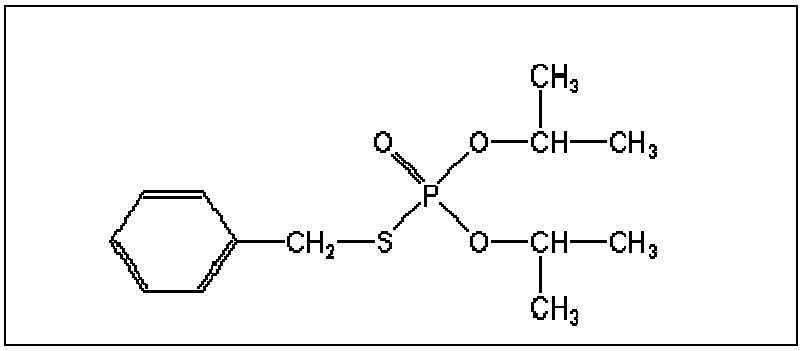
Triphenyl phosphate (TPP) ($C_{18}H_{15}O_4P$)



Şekil 3.10. Triphenly phosphate' ın kimyasal yapısı (Anonim, 2007i)

Etkili madde renksiz ve sıvı haldedir. Fosforik asit ve fenol türevidir. Bazı insektisitlerin sinerjisti olarak kullanılmaktadır. TPP esteraz enzimlerinin inhibitörüdür (Kang vd. 2006; Wang ve Wu, 2007)

S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) ($C_{13}H_{21}O_3PS$)



Şekil 3.11. S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate' in kimyasal yapısı (Anonim, 2007a)

O,O-bis(1-methylethyl) *S*-(phenylmethyl) phosphorothioate kimyasal adıyla bilinmektedir. Organofosfor fungisit ve bazı insektisitlerde sinerjist olarak kullanılmaktadır. IBP esteraz enzimi inhibitörüdür (Kim vd. 2004).

3.2. Yöntem

Denemeler $LC_{50, 60, 90}$ değerlerinin belirlenmesi, seleksiyon çalışmaları, çoklu direnç çalışmaları, sinerjist + ilaç çalışmaları ve direncin kalıtımının belirlendiği biyoassay çalışmaları ile dirençle ilişkili esteraz ve gluthatione S-transferase (GST) enzim aktivitelerinin belirlendiği biyokimyasal çalışmalar olmak üzere iki ayrı bölümden oluşmuştur.

3.2.1. Biyoassay çalışmalar

T. urticae populasyonlarının seçilen ilaçlara göstermiş olduğu $LC_{50, 60, 90}$ değerlerinin belirlenmesinde aşağıda açıklanan kuru rezidü yöntemi kullanılmıştır.

3.2.1.1. İlaç konsantrasyonlarının hazırlanması

İlaç konsantrasyonları saf su ile seyreltilerek solüsyonlar hazırlanmıştır. Solüsyonlar hazırlanırken ilaçların uygulama dozları dikkate alınmıştır. Bu solüsyondan hazırlanan her doz bir önceki dozun yarısı olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan solüsyondan yapılan tüm seyreltmelerde ve kontrolde de saf su kullanılmıştır. Populasyonların LC_{50}, LC_{60} ve LC_{90} değerlerinin belirlenmesi için 1 kontrol+ 7 doz kullanılmıştır. Her doz 3 tekerrürden oluşmaktadır. Uygulanan ilaçların en yüksek dozları abamectin' de 20 - 280 µl / 100ml su, propargite' de 100 - 3200 µl / 100ml su ve chlorpyrifos' ta 200 - 2100 µl / 100ml su arasında olmuştur.

3.2.1.2. İlaçların uygulanması

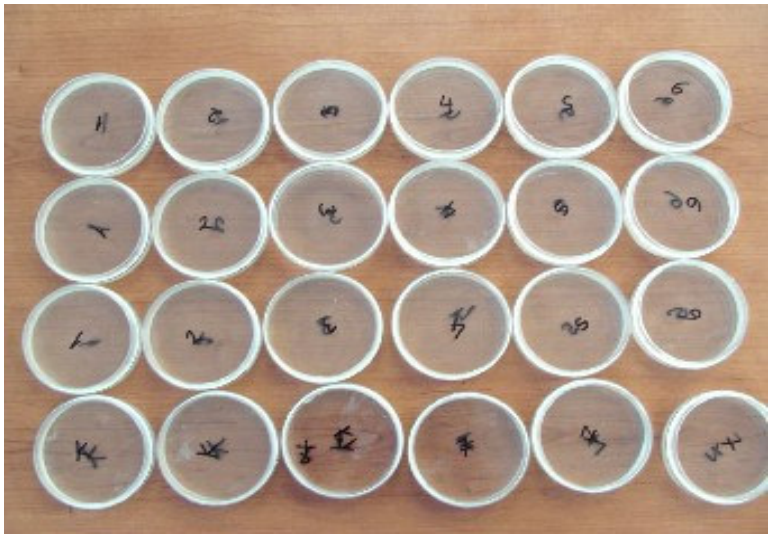
İlaçların uygulanmasında Kabir ve Chapman (1997) ve Ay (2005)'den alınan ilaçlama kulesi – petri kabı yöntemi geliştirilerek kullanılmıştır. İlaç konsantrasyonları hazırlandıktan sonra Şekil 3.12.' de gösterilen ilaçlama kulesinde 5 cm çapındaki plastik petrinin alt ve üst kapağına 1000 µl olmak üzere toplam 2000 µl ilaçlı sıvı püskürtülmüştür. Kontrole sadece saf su uygulanmıştır. İlaçlama kulesi 1 bar basınçta çalıştırılmıştır. Uygulama yapılan petriler yaklaşık 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Petri kaplarından akarların kaçmasını önlemek için alt tarafın çevresine

pencere bandı yapıştırılmış ve böylece petri kaplarının iyi bir şekilde kapanması sağlanmıştır (Şekil 3.13.).

Uygulama yapılan petrilerin her birine bir fırça yardımı ile 25 - 30 adet dişi birey aktarılmış ve kapağı iyice kapatılmıştır. Daha sonra bu petriler 26$\pm$2 ^{0}C sıcaklıkta yaklaşık %50 - 55 orantılı nem, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık koşullara sahip odaya bırakılmıştır. Ölü ve canlı bireylerin sayımı 24 saat sonra steromikroskop altında yapılmıştır. Denemeler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Böylelikle her bir doza ait petrilerde en az 75 dişi birey olmak üzere LC_{50} değerlerinin belirlenmesinde en az 600 birey kullanılmıştır.



Şekil 3.12. Petrileri ilaçlamada kullanılan ilaçlama kulesi (spray-tower)



Şekil 3.13. İlaçlanarak içerisine kırmızıörümcek aktarılmış petriler

3.2.1.3. İstatiksel değerlendirilmesi

T. urticae populasyonlarının 24 saat sonra belirlenen ölüm verilerinden yararlanılarak POLO bilgisayar paket programında (LeOra Software, 1994) LC_{50}, LC_{60} ve LC_{90} değerleri belirlenmiştir. Denemede kullanılan bütün populasyonlar için LC_{50} ve LC_{90} değerlerinin standart hassas populasyona ait LC_{50} ve LC_{90} değerine oranlanması ile her ilaç için populasyonların duyarlılık kaybı ve direnç oranları elde edilmiştir.

3.2.1.4. Seleksiyon çalışmaları

Populasyonların LC değerleri belirlendikten sonra LC_{60} değerleri 100µl saf su içerisinde çözdürülerek solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyondan 3.2.1.2. ilaçların uygulanması bölümünde anlatılan metoda göre 25 petriye uygulanmıştır. Uygulama yapılan her bir petriye 40-50 ergin dişi birey aktarılmıştır. 24 saat sonra canlı kalan bireyler uygulama yapılmamış barbunya fasulyesi yapraklarına aktarılmıştır ve üremeye bırakılmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanarak populasyonun hızlı bir şekilde artması sağlanmıştır. Populasyon yeterli birey sayısına

ulaşınca tekrar LC değerleri belirlenmiş ve bu populasyonlara da LC_{60} değeri uygulanarak seleksiyon çalışmalarına devam edilmiştir.

3.2.1.5. Çoklu direnç çalışmaları

Seleksiyon çalışmaları ile her populasyon seçilen ilaca karşı farklı oranlarda direnç kazandırılmıştır. Dirençli populasyonların seçilen 6 ilaca karşı çoklu direnç geliştirip geliştirmediği incelenmiştir. Bu amaçla önce bu ilaçlara karşı dirençli populasyonların ve hassas populasyonun LC_{50} değerleri belirlenmiştir. Dirençli populasyonlarının LC_{50}'lerinin hassas populasyonun LC_{50}' sine oranlanmasıyla çoklu direnç oranları bulunmuştur. İlaçların uygulanmasında yukarıda anlatılan metod kullanılmıştır.

3.2.1.6. Sinerjist + ilaç çalışmaları

Direnç kazandırılan populasyonlarda ve hassas populasyon (GSS)' da bazı sinerjistlerin ilaçlar üzerine olan etkisi incelenmiştir. Sinerjistlerin uygulanmasında Kim vd. (2004)' den alınan metot değiştirilerek uygulanmıştır. Sinerjist çalışmalarında piperonyl butoxide (PBO), S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) ve triphenyl phosphate (TPP) kullanılmıştır. Sinerjistler; piperonyl butoxide (PBO) 125µl/1, S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) 100µl/1 ve triphenyl phosphate (TPP) 62.5 mg/l dozlarında hazırlanmıştır. Sinerjistler 1:1 oranında aseton: saf su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan sinerjist çözeltileri ilaçlama kulesinde 5 cm çapındaki plastik petrinin alt ve üst kapağına 1000 µl olmak üzere toplam 2000 µl olarak püskürtülmüştür. Petriler 1 saat kurumaya bırakıldıktan sonra hazırlanan 7 farklı ilaç konsantrasyonu petrilerin tabanına ve kapağına uygulanmıştır. Kontrolde sadece sinerjist kullanılmıştır. Petrilere 25-30 adet dişi birey aktarılmıştır. *T. urticae* populasyonlarının 24 saat sonra belirlenen ölüm verilerinden yararlanılarak POLO bilgisayar paket programında LC_{50} değerleri belirlenmiştir.

Sinerjistik etki oranı= Sinerjistsiz LC_{50} / Sinerjistli LC_{50}
formülü ile hesaplanmıştır (Kim vd. 2004).

3.2.1.7. Direnç kalıtım çalışmaları

Direncin döllere aktarımını ve geriye dönüşümünü belirlemek için dirençli ve hassas populasyonlar arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır. Resiprokal çaprazlamalar dirençli populasyonun dişi bireyleri ile hassas populasyonun erkek bireyleri ve hassas populasyonun dişi bireyleri ile dirençli populasyonun erkek bireyleri arasında çiftleşmelerini sağlamak amacıyla yapılmıştır. Çalışma için öncelikle hassas ve dirençli populasyonların ilaçlara karşı duyarlılıkları tekrar belirlenmiştir. Daha sonra 9 cm çapındaki petrilerin tabanına pamuk konmuş ve ıslatılmıştır. Tabanı pamukla kaplı petrilerin üzerine temiz barbunya fasulyesi yaprağı konmuştur. Her dirençli populasyonda resiprokal çaprazlamalar için 20 adet petri hazırlanmıştır. Her bir petrideki yaprağın üzerine dirençli populasyondan 20 adet deutonimf dişi birey ve hassas populasyondan 30 adet ergin erkek birey aktarılmıştır. Ayrıca dirençli populasyondan erkek birey ve hassas populasyondan dişi birey aktarılarak işlemin tam tersi yapılmıştır. Bu süreçte diploid dişiler haploid erkekler tarafından döllenmiştir. 5 gün sonra yapraklar üzerindeki ergin bireyler uzaklaştırılmış ve dişi bireylerin bırakmış oldukları yumurtalar açıldıktan sonra yeni nimfler saksılardaki barbunya fasulyesi bitkileri üzerine aktarılmıştır. Bu şekilde F1 dölleri elde edilmiştir. Bireyler ergin olduğunda LC_{50} değerleri belirlenmiş ve hassas populasyonun LC_{50} değeri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada yaklaşık 250 adet dişi birey kullanılmıştır. F1 döllerinin bulunduğu yapraklardaki ergin bireyler uzaklaştırılarak yeni bitkilere aktarılmıştır. F1 döllerinin yumurtalarından F2 dölleri elde edilmiştir. F2 döllerinin de LC değerleri de belirlenerek hassas populasyonla karşılaştırılmıştır (Leeuwen vd. 2004). Her iki çaprazlamadan sonra F1 dişilerinde direncin kalıtımı ,

$$D= (2X_2-X_1-X_3) / (X_1-X_3)$$

X_1= Dirençli ırkın LC50 değerinin $\log_{10}$' u
X_2= F1 dişilerinin LC50 değerinin $\log_{10}$' u
X_3= Hassas ırkın LC50 değerinin $\log_{10}$' u
formülü ile hesaplanmıştır (Stone, 1968' e atfen Sato vd. 2004).

Baskınlık derecesi -1 ile +1 arasında değişmektedir.

- -1: Çekinik direnç
- 0: Baskınlık yok (nötr)
- +1: Baskın direnç

3.2.2. Biyokimyasal çalışmalar

Biyokimyasal çalışmalarda *T. urticae'* nin direnç kazandırılan üç populasyonunda poliakrilamid gel elektroforez (PAGE) ile esteraz enzimi incelenmiştir. Ayrıca Microplate assay ile toplam esteraz ve gluthatione S-transferase (GST) enzim aktivitelerinin belirlenmiştir.

3.2.2.1. Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) ile esteraz enziminin incelenmesi

Esteraz enzimi bant haritasını belirlemek için "mini vertical nondenaturing poliakrilamide gel elektrophoresis" yöntemi kullanılmıştır. Elektroforez çalışmalarında Ay ve Gürkan (2005)' ın geliştirdiği yöntem uyarlanarak kullanılmıştır. Elektroforez işleminde farklı yoğunlukta iki poliakrilamid jel kullanılmıştır. Jel dökme standı hazırlandıktan sonra %7.5'lik poliakrilamid jel (EK. 1) dökülmüş ve cam plakaların üst kısmında geniş delikli poliakrilamid jeli (%3.5'lik) (EK. 1) dökmek için 2 cm' lik bir boşluk bırakılmıştır. Bu aşamada %7.5'lik poliakrilamid jeli döktükten sonra, jelin üst yüzeyinin düzgün olması ve hava ile temasını kesmek için henüz polimerize olmamış jelin üzerine saf su ilave edilmiştir. Yaklaşık 30 dk. sonra jel üzerindeki su boşaltılmış ve hazırlanan %3.5'lik poliakrilamid jel pasteur pipet ile jel standına aktarılmıştır. Taraklar yerleştirildikten sonra geniş delikli jelin polimerize olması beklenmiştir. Jel hazırlandıktan sonra elektroforez tankına yerleştirilerek alt ve üst tank elektrot buffer (Glycine buffer pH 8.3) (EK. 1) ile doldurulmuştur.

Tetranychus urticae bireyleri hareketlerinin azaltılması amacıyla üzerinde bulundukları yapraklar ile buz dolabında 4 ^{0}C'de 15 dk tutulmuştur. Daha sonra bir fırça yardımıyla dişi bireyler seçilerek microplate hücrelerine tek tek aktarılmıştır.

Her birinin üzerine 15 µl homojenizasyon buffer (%0.1 Triton X-100 içeren % 32 (w/v) lik sucrose) (EK.1) verilerek çoklu homojenizatör ile ezilmiştir. Bu işlem enzimin bozulmaması için buz kalıpları üzerinde yapılmıştır. Polimerizasyondan sonra her bir jel hücresine 12.5 µl homojenat verilmiştir. Elektroforezde koşturma işlemi 150 V de yaklaşık 1.5 saat sürmüştür. Koşturma sırasında elektroforez tankının etrafı buz kalıplarıyla kaplanarak ortam sıcaklığı yaklaşık 5-8 ^{0}C'de sabit tutulmuştur. Bu sürenin sonunda 0.2 M fosfat buffer (pH 6.5 ve %1 aseton içeriyor) ile %0.02 lik α-naphthyl asetat solüsyonu hazırlanmıştır (EK. 1). Jel bu çözeltide esteraz enzimi inkübasyonu için 30 dk. bekletilmiştir. %0.02 lik α-naphthyl asetat solüsyonu ile %0.4 oranında Fast blue BB salt boya solüsyonu hazırlanmıştır (EK. 1). Jel bu çözeltide 1 saat boyanmıştır. Boyama işlemi bittikten sonra jel %7'lik asetik asit içine alınmış ve 24 saat sonra densiometre de fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.2.2. Microplate assay ile toplam esteraz enzimi aktivitesinin incelenmesi

Kinetik esteraz aktivitesinin belirlenmesinde α – naphtyl acetate kullanılarak 96 hücreli düz tabanlı mikroplakada Stumpf ve Nauen, (2002)' in geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. 20 adet ergin dişi %0.1 Triton X-100 içeren 100µl sodyum fosfat buffer (0.1M, pH 7.5) (EK. 2) içinde eppendorf tüplerde ezilmiştir. Bu homojenat 10000g ve +4 ^{o}C' da 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. 10 kez seyreltilen supernatant ve 0.2 M, pH 6 fosfat buffer' dan 25' er µl mikroplakanın hücrelerine konulmuştur. Çalışma 200 µl substrat solüsyonunun eklenmesiyle başlatılmıştır. Substrat solüsyonu 30 mg Fast blue RR tuzunun 50 ml 0.2 M sodyum fosfat buffer' da çözülmesi ve bu karışıma 500 µl 100 Mm α – naphtyl acetate' ın ilavesiyle elde edilmiştir (EK. 2). Enzim aktivitesi 25 ^{o} C ve 450 nm' de 10 dakika süreyle okunmuştur. Kontrol hücreleri ise homojenatsız olarak okunmuştur. Esteraz enzim aktivitesi ölçümleri Bradford (1976) yöntemiyle BSA M/ml (bovine serum albumin) kullanılarak yapılmıştır. Esteraz enzim aktivitesi mOD/min/mg protein olarak hesaplanmıştır. Elde edilen mOD/min/mg protein değerleri SAS, (1999) programında GLM (General Linear Model) prosedürü kullanılarak analiz edilmiştir. Ortalamalar arasındaki fark Duncan çoklu oran testi ile belirlenmiştir.

3.2.2.3. Microplate assay ile GST enzimi aktivitesinin incelenmesi

T. urticae populasyonlarında gluthathione S-transferase (GST) enziminin kinetik olarak belirlenmesinde Stumpf ve Nauen, (2002)' in geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. 30 ergin dişi 300 µl Tris HCL buffer (0.05M, pH 7.5) (EK. 3) içinde eppendorf tüplerde ezilmiştir. 100 µl supernatant 10000g ve +4 ^{o}C' da 5 dakika santrifüj edilmiştir. 100 µl supernatant, 100 µl 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ve 100 µl reduced glutathione (GSH) oluşan toplam hacim mikroplate hücrelerine konulmuştur. CDNB % 0.1 (v/v) ethanolda hazırlanmıştır ve final konsantrasyonda 0.4 mM CDNB bulunmaktadır (EK.3). Redused glutation (GSH) Tris HCL buffer de hazırlanmıştır ve final konsantrasyonda 4 mM GSH bulunmaktadır (EK. 3). Kontrol hücrelerinde ise sadece CDNB ve GSH homojenatsız okunmuştur. Absorvanstaki değişim 340 nm de 25 ^{o}C de 5 dk' da okunarak belirlenmiştir. GST enzim aktivitesi ölçümleri Bradford (1976) yöntemiyle BSA (bovine serum albumin) kullanılarak mOD/min/mg protein olarak hesaplanmıştır. Elde edilen mOD/min/mg protein değerleri SAS, (1999) programında GLM (General Linear Model) prosedürü kullanılarak analiz edilmiştir. Ortalamalar arasındaki fark Duncan çoklu oran testi ile belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü' ndeki insekteryumlarda 2003 yılından itibaren yetiştirilen *T. urticae'* nin Şak, 2 numara ve 21 numaralı populasyonlarının sırasıyla chlorpyrifos, propargite ve abamectin' e karşı duyarlılık düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca Rothamstad Experimental Station (İngiltere)' den getirtilen standart hassas populasyon (German susceptible strains, GSS), populasyonların deneme ilaçlarına göstermiş olduğu duyarlılık kaybını belirlemede kullanılmıştır. Populasyonların her biri seçilen ilaçla seleksiyona tabi tutularak direnç kazandırılmıştır. Dirençli hale getirilen her üç populasyonun seçilen 6 ilaca karşı çoklu direnç geliştirip geliştirmediği incelenmiştir. Ayrıca seçilen üç sinerjist ilaçlarla birlikte uygulanarak ilaçlar üzerindeki etkinlikleri belirlenmiştir. Direncin kalıtımını belirlemek amacıyla, dirençli populasyonlarla hassas populasyon arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır. Duyarlılık çalışmalarına paralel olarak, dirençli populasyonların esteraz enzimi bant sistemleri poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile ortaya konmuştur. Bu bant sistemlerinin populasyonların deneme ilaçlarına göstermiş olduğu duyarlılıkla ilişkisi incelenmiştir. Ayrıca populasyonların toplam esteraz ve GST enzim miktarları microplate reader ile kantitatif olarak belirlenerek duyarlılıkla ilişkisi ortaya konmaya çalışılmıştır.

4.1. Biyoassay sonuçları

Biyoassay çalışmalarında Şak, 2 numara ve 21 numaralı populasyonların sırasıyla chlorpyrifos, propargite ve abamectin' e karşı göstermiş oldukları duyarlılıklar LC_{50}, LC_{60} ve LC_{90} düzeylerine göre belirlenmiştir. Biyoassay çalışmalarında ilaçlama kulesi – petri kabı yöntemi kullanılmıştır. Populasyonların LC_{50} ve LC_{90} değerleri ile hassas populasyonun LC_{50} ve LC_{90} değerleri karşılaştırılarak populasyonların ilaçlara göstermiş olduğu duyarlılık dereceleri ortaya konmuştur.

4.1.1. Seleksiyon sonuçları

Seleksiyon çalışmalarının ilk ilacı chlorpyrifos ile Şak populasyonu direnç kazandırılmak amacıyla 12 kez seleksiyon yapılmıştır. Şak populasyonunun 12 seleksiyon boyunca chlorpyrifos' a göstermiş olduğu duyarlılık düzeyleri Çizelge 4.1.' de özetlenmiştir. Şak populasyonunun LC_{50} değerleri 22.251 µl / 100 ml su - 237.044 µl / 100 ml su değerleri arasında değişmiştir. Şak populasyonunun LC_{60} değerleri ise 35.087 - 386.774 µl / 100 ml su değerleri arasında değişmiştir. Her seleksiyon sonucunda populasyonun elde edilen LC_{60} değeri ile bir sonraki seleksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Aynı sıraya göre populasyonların LC_{50} değerlerinin hassas populasyonun LC_{50} değerine oranlanması ile populasyonlara kazandırılan direnç katları elde edilmiştir. Başlangıç populasyonu olan Şak populasyonunda chlorpyrifos' a karşı 8.584 kat direnç belirlenmiştir. Şak populasyonunun chlorpyrifos ile seleksiyonundan sonra direnç oranları 8.584-91.452 kat arasında bulunmuştur. Her seleksiyon sonucunda LC_{50} değeri ve direnç oranlarındaki artış Şekil 4.1.' de görülmektedir. LC_{90} değerlerine göre ise direnç oranları 16.257 kattan 205.853 kata yükselmiştir. Şak populasyonun chlorpyrifos ile12 kez seleksiyon sonucunda 91.452 kat direnç kazandırılan ırkı ŞAK 12 populasyonu olarak adlandırılmıştır.

Seleksiyon çalışmalarının ikinci ilacı propargite ile 2 numaralı populasyonun dayanıklılığını arttırmak amacıyla 17 kez seleksiyon yapılmıştır. 2 numaralı populasyonunun 17 seleksiyon boyunca propargite göstermiş olduğu duyarlılık düzeyleri çizelge 4.2.' de özetlenmiştir. 2 numaralı populasyonun propargite ile 17 kez seleksiyonundan sonra LC_{50} 12.755µl / 100 ml su değerinden - 417.707 µl / 100 ml su değerine artmıştır. Her seleksiyon sonucunda populasyonların elde edilen LC_{60} değerleri 22.772 – 676.473 µl / 100 ml su arasında değişmiştir.

2 numaralı populasyonun LC_{50} değerlerinin hassas populasyonun LC_{50} değerine oranlanması ile populasyonlara kazandırılan direnç katları 1.031 - 32.748 değerleri arasında tespit edilmiştir. LC_{90} değerleri ise, 1.454 - 33.034 değerleri arasında

değişmiştir. 2 numaralı populasyonda her seleksiyon sonucunda LC_{50} değeri ve direnç oranlarındaki artış Şekil 4.2.' de görülmektedir. 2 numaralı populasyonun propargite ile 17 kez seleksiyonundan sonra 32.748 kat direnç kazandırılan ırkı KUM 17 populasyonu olarak adlandırılmıştır.

Seleksiyon çalışmalarının üçüncü ilacı abamectin ile 21 numaralı populasyon direnç kazandırılmak amacıyla 15 kez seleksiyon yapılmıştır. 21 numaralı populasyonun 15 seleksiyon boyunca abamectin' e karşı göstermiş olduğu dayanıklılık düzeyleri çizelge 4.3.' de verilmiştir. 21 numaralı populayonun abamectin ile 15 kez seleksiyonundan sonra LC_{50} değerleri 2.424 µl / 100 ml su değerinden - 38.670 µl / 100 ml su değerine artmıştır. Her seleksiyon sonucunda populasyonların elde edilen LC_{60} değerleri 4.475- 65.759 µl / 100 ml su değerleri arasında belirlenmiştir.

21 numaralı populasyonun LC_{50} değerlerinin hassas populasyonun LC_{50} değerine oranlanması ile populasyonlara kazandırılan direnç oranları 2.198 - 35.058 kat arasında belirlenmiştir. LC_{90} değerleri ise, 3.326 - 35.021 kat değerleri arasında tespit edilmiştir. Şekil 4.3.' de her seleksiyon sonucunda 21 numaralı populasyonun LC_{50} değerleri ve direnç oranlarındaki artış görülmektedir. 21 numaralı populasyonun abamectin ile 15 kez seleksiyonundan sonra 35.058 kat direnç kazandırılan ırkı BEY 15 populasyonu olarak adlandırılmıştır.

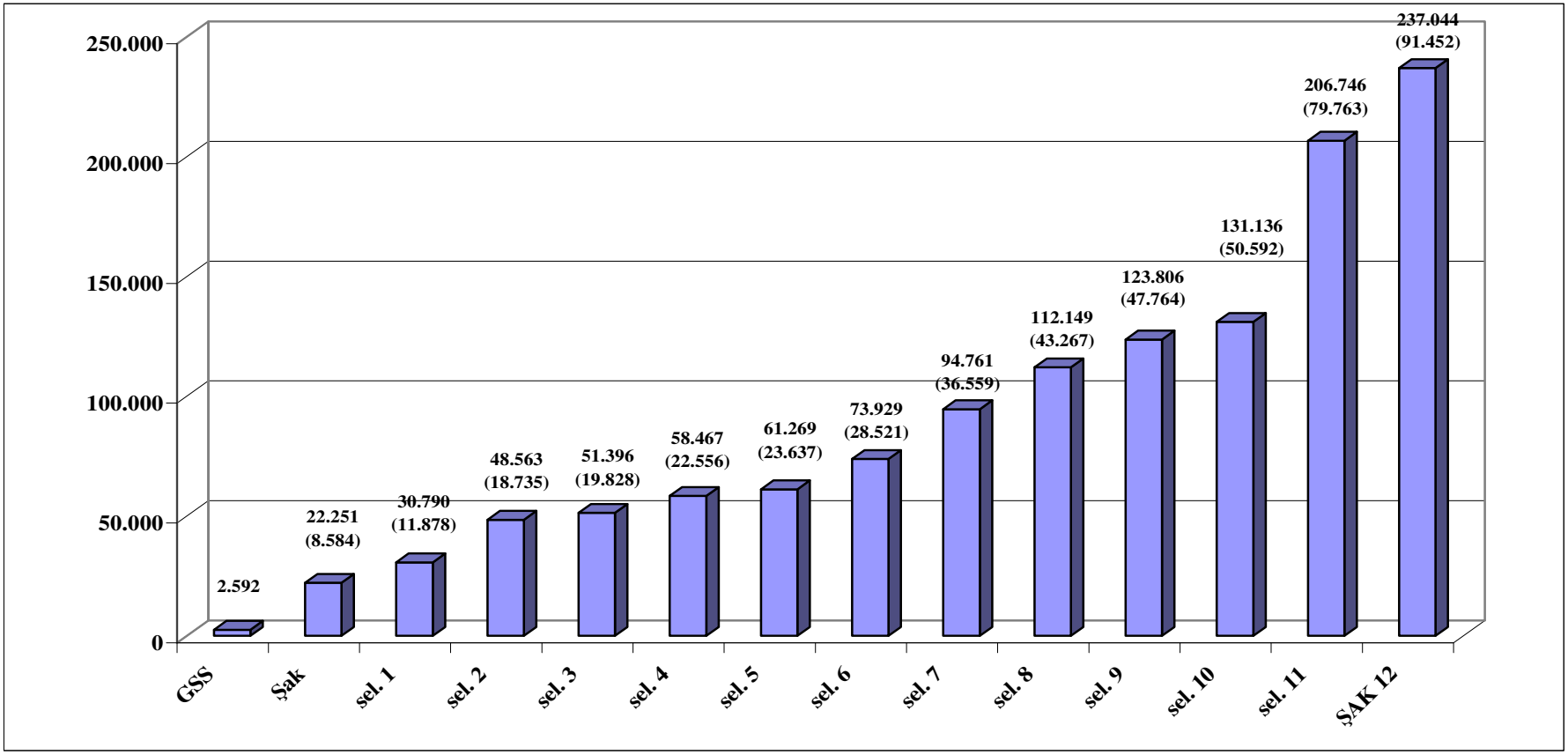
Çizelge 4.1. GSS ve Şak populasyonunun chlorpyrifos ile seleksiyonu sonucu belirlenen LC_{50} değerleri ve direnç oranları

Populasyon	**n***	**Eğim±se**	**LC_{50} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{60} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{90} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{50} direnç oranı****	**LC_{90} direnç oranı*****
Şak	721	1.281±0.107	22.251 17.693-27.630	35.087 28.257-44.106	222.794 156.317-355.737	8.584	16.257
sel. 1	724	1.216±0.110	30.790 23.976-39.122	49.755 38.652-63.378	348.931 232.493-605.941	11.878	25.461
sel. 2	721	1.161±0.114	48.563 37.111-63.215	80.276 61.708-107.998	617.298 387.018-1191.951	18.735	45.045
sel. 3	724	1.179±0.113	51.396 39.402-66.382	84.310 65.293-111.811	628.426 403.127-1167.109	19.828	45.857
sel. 4	724	1.139±0.106	58.467 45.367-75.174	96.878 74.908-129.412	779.680 493.477-1470.748	22.556	56.894
sel. 5	724	1.114±0.102	61.269 47.593-78.321	103.415 80.847-136.613	865.467 552.810-1604.877	23.637	63.154
sel. 6	722	1.044±0.097	73.929 57.584-94.744	129.249 100.647-172.159	1247.571 766.435-2460.997	28.521	91.036
sel. 7	726	1.063±0.034	94.761 72.871-122.442	164.072 126.868-219.246	1522.624 940.539-2985.182	36.559	111.107
sel. 8	727	1.120±0.103	112.149 87.020-143.262	188.758 147.689-247.558	1561.610 1003.002-2871.757	43.267	113.952
sel. 9	727	1.144±0.103	123.806 96.513-157.171	206.177 162.346-267.741	1633.774 1068.739-2916.214	47.764	119.218
sel. 10	728	1.194±0.103	131.136 103.042-164.616	213.773 170.284-272.517	1553.439 1053.498-2617.105	50.592	111.897
sel. 11	723	1.042±0.097	206.746 160.962-265.472	361.806 281.179-483.751	3506.257 2143.097-6973.083	79.763	255.856
ŞAK 12	723	1.192±0.105	237.044 185.078-299.109	386.774 306.515-495.608	2821.023 1901.193-4806.426	91.452	205.853
GSS(hassas)	720	1.772±0.135	2.592 2.132-3.088		13.704 10.923-18.183		

n*: denemede kullanılan birey sayısı

** Direnç oranı= Tarla populasyonu LC_{50} / Hassas populasyon LC_{50}

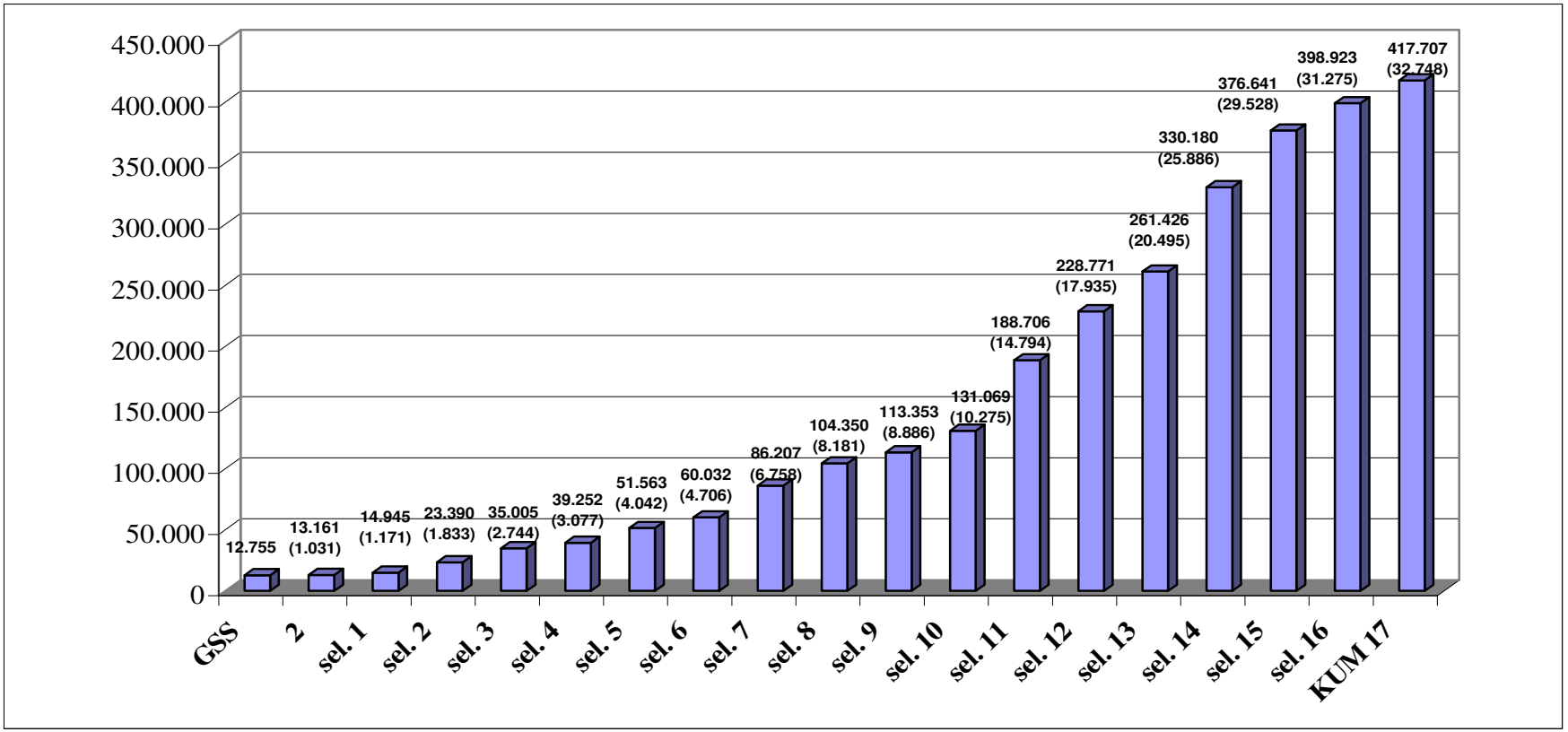
***Direnç oranı= Tarla populasyonu LC_{90} / Hassas populasyon LC_{9}



Şekil 4.1. GSS ve chlorpyrifos ile seleksiyon yapılan Şak populasyonlarının LC_{50} değerleri ve direnç oranları (parantez içerisinde verilenler direnç oranları)

Çizelge 4.2. GSS ve 2 numaralı populasyonun propargite ile seleksiyonu sonucu belirlenen LC_{50} değerleri ve direnç oranları

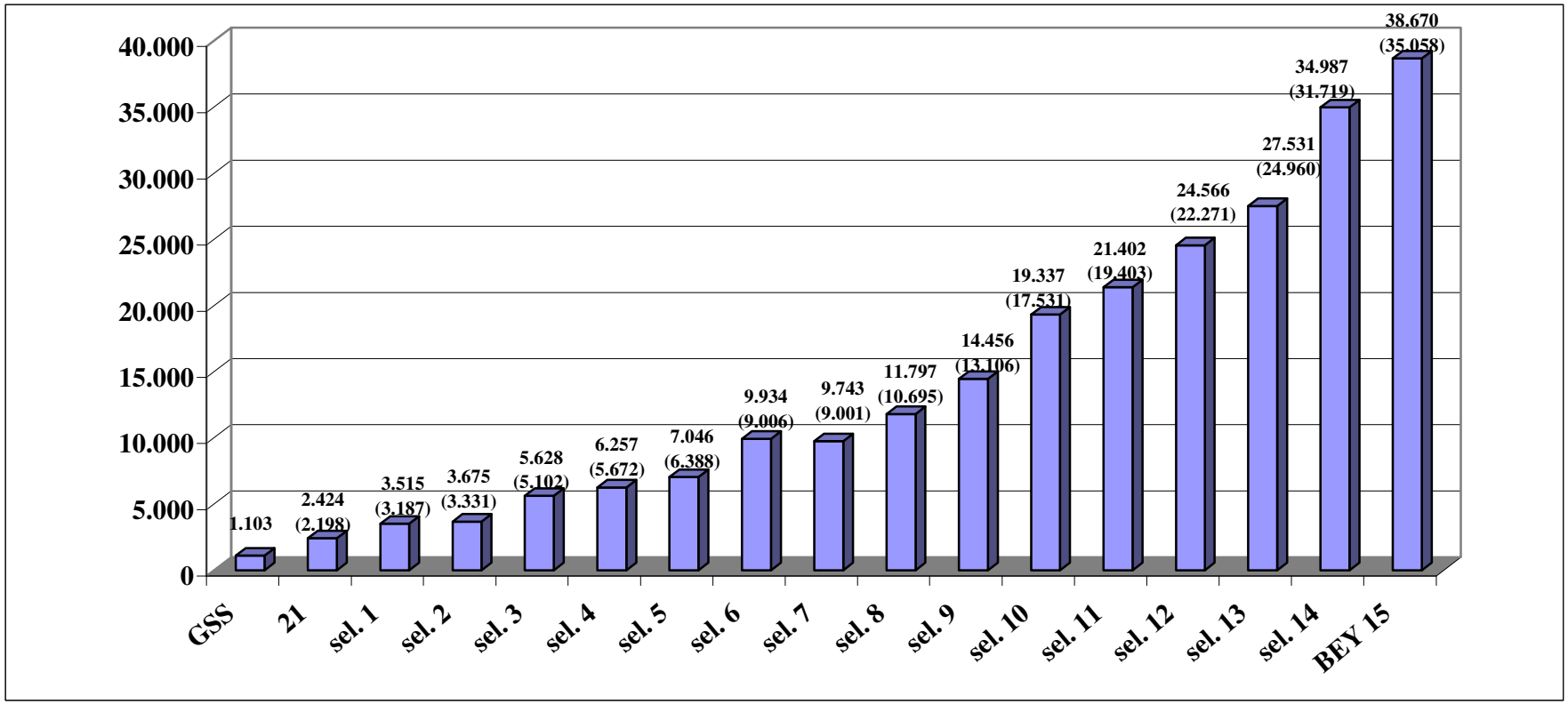
Populasyon	n*	Eğim±se	LC_{50} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı	LC_{60} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı	LC_{90} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı	LC_{50} direnç oranı**	LC_{90} direnç oranı***
2	718	1.064±0.097	13.161 10.285-16.795	22.772 17.813-30.111	210.784 131.526-405.011	1.031	1.454
sel. 1	721	1.284±0.108	14.945 11.932-18.583	23.537 18.925-29.807	248.684 202.936-342.395	1.171	1.716
sel. 2	720	1.079±0.102	23.390 18.041-30.278	40.166 31.004-53.985	360.489 222.057-709.342	1.833	2.487
sel. 3	720	1.163±0.097	35.005 27.186-44.294	57.806 45.695-73.860	442.651 302.487-731.208	2.744	3.055
sel. 4	722	1.188±0.111	39.252 30.244-50.383	64.137 49.972-84.255	470.523 306.568-849.547	3.077	3.247
sel. 5	722	1.047±0.097	51.563 40.256-66.229	90.038 69.939-120.748	864.826 572.282-1724.827	4.042	5.968
sel. 6	727	1.082±0.100	60.032 46.379-77.126	102.913 80.041-136.250	917.297 577.006-1742.927	4.706	6.330
sel. 7	725	1.083±0.101	86.207 66.702-110.971	147.717 114.649-196.739	1314.167 819.506-2533.056	6.758	9.069
sel. 8	726	1.042±0.097	104.350 81.288-133.928	182.673 142.025-244.135	1772.631 1083.850-3522.362	8.181	12.234
sel. 9	725	1.079±0.098	113.353 88.737-144.070	194.631 152.904-255.361	1746.044 1104.554-3283.330	8.886	12.050
sel. 10	722	1.119±0.099	131.069 103.152-165.356	220.779 174.817-285.940	1832.426 1191.505-3295.499	10.275	12.646
sel. 11	722	1.014±0.096	188.706 145.811-243.861	335.502 259.056-452.228	3466.971 2080.721-7113.672	14.794	23.927
sel. 12	723	1.036±0.097	228.771 177.565-294.167	401.831 311.884-537.454	3952.953 2411.168-7893.276	17.935	27.281
sel. 13	720	1.085±0.098	261.426 204.889-332.481	447.559 351.356-588.523	3967.437 2506.443-7473.930	20.495	27.381
sel. 14	725	1.129±0.104	330.180 256.817-422.179	553.545 432.673-729.097	4506.962 2881.000-8352.758	25.886	31.105
sel. 15	722	1.057±0.102	376.641 288.169-489.620	653.979 502.711-881.324	6139.403 3748.091- 12288.427	29.528	42.371
sel. 16	721	1.095±0.099	398.923 313.657-506.867	679.589 533.958-894.241	5904.814 3735.263- 11092.364	31.275	40.752
KUM 17	725	1.210±0.106	417.707 329.099-525.503	676.473 537.559-868.862	4786.422 3215.040-8190.725	32.748	33.034
GSS(hassas)	724	1.214±0.101	12.755 10.178-15.820		144.893 99.711-238.140		



Şekil 4.2. GSS ve propargite ile seleksiyon yapılan 2 numaralı populasyonunun LC_{50} değerleri ve direnç oranları (parantez içerisinde verilenler direnç oranları)

Çizelge 4.3. GSS ve 21 numaralı populasyonun abamectin ile seleksiyonu sonucu belirlenen LC_{50} değerleri ve direnç oranları

Populasyon	**n***	**Eğim±se**	**LC_{50} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{60} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{90} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{50} direnç oranı****	**LC_{90} direnç oranı*****
21	718	0.952±0.098	2.424 1.802-3.213	4.475 3.373-6.161	53.860 30.951-120.005	2.198	3.326
sel. 1	727	1.059±0.103	3.515 2.672-4.603	6.099 4.656-8.287	57.059 34.599-115.474	3.187	3.523
sel. 2	715	1.073±0.101	3.675 2.834-4.751	6.4 4.892-8.489	57.552 35.519-112.849	3.331	3.553
sel. 3	721	1.074±0.102	5.628 4.348-7.340	9.689 7.424-13.252	87.864 52.884-179.413	5.102	5.425
sel. 4	721	1.036±0.102	6.257 4.775-8.238	10.988 8.340-15.196	108.041 63.504-230.209	5.672	6.670
sel. 5	727	1.074±0.101	7.046 5.444-9.113	12.128 9.369-16.302	109.896 67.579-216.702	6.388	6.785
sel. 6	720	1.231±0.106	9.934 7.885-12.47	15.956 13.169-19.666	109.204 73.333-186.654	9.006	6.742
sel. 7	726	1.100±0.101	9.743 7.557-12.461	16.560 12.938-21.783	142.548 90.763-265.563	9.001	8.801
sel. 8	726	1.086±0.098	11.797 9.261-14.981	20.183 15.867-26.493	178.419 113.016-334.466	10.695	11.016
sel. 9	730	1.086±0.101	14.456 11.151-18.571	24.740 19.245-32.707	219.048 138.117-415.136	13.106	13.524
sel. 10	728	1.091±0.102	19.337 14.941-24.928	33.006 25.585-44.023	289.064 180.297-557.543	17.531	17.847
sel. 11	723	1.004±0.096	21.402 16.514-27.691	38.256 29.499-51.675	404.075 241.042-837.833	19.403	24.949
sel. 12	722	1.030±0.097	24.566 19.033-31.591	43.280 33.592-57.817	431.009 262.846-861.492	22.271	26.612
sel. 13	721	1.081±0.098	27.531 21.539-792.250	47.217 37.084-61.953	421.644 266.908-792.250	24.960	26.033
sel. 14	725	1.133±0.104	34.987 27.233-44.662	58.544 45.836-76.877	472.979 303.861-869.445	31.719	29.203
BEY 15	723	1.339±0.102	38.670 29.908-49.678	65.759 51.154-87.113	567.205 357.583-1075.315	35.058	35.021
GSS (hassas)	721	1.098±0.098	1.103 0.867-1.402	1.876 1.474-2.468	16.196 10.259-30.363	-	-



Şekil 4.3. GSS ve abamectin ile seleksiyon yapılan 21 numaralı populasyonunun LC_{50} değerleri ve direnç oranları (parantez içerisinde verilenler direnç oranları)

4.1.2. Çoklu direnç sonuçları

Chlorpyrifos' a dirençli ŞAK 12 populasyonunun (91.452 kat) 6 farklı ilaca karşı çoklu direnç geliştirip geliştirmediği incelenmiştir. Bu ilaçlara karşı belirlenen LC_{50} değerleri ve direnç oranları çizelge 4.4 özetlenmiştir.

Çizelge 4.4. Chlorpyrifos' a dirençli ŞAK 12 populasyonunun diğer ilaçlara karşı oluşturduğu LC_{50} değerleri ve direnç oranları

İlaç	Populasyon	n	Eğim±se	LC_{50} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı	LC_{50} direnç oranı
Abamectin	GSS	721	1.098±0.098	1.103 0.867-1.402	-
	ŞAK 12	724	1.062±0.101	8.040 6.178-10.387	7.289
Amitraz	GSS	724	1.508±0.114	30.035 24.639-36.205	-
	ŞAK 12	723	1.267±0.104	24.473 19.543-30.125	<0
Propargite	GSS	724	1.214±0.101	12.755 10.178-15.820	-
	ŞAK 12	724	1.091±0.099	33.265 26.126-42.263	2.607
Clofentezine	GSS	716	1.387±0.108	2.864 2.323-3.478	-
	ŞAK 12	722	1.189±0.106	8.720 6.803-11.018	3.044
Fenoxyprimate	GSS	720	1.349±0.104	6.617 5.423-7.986	-
	ŞAK 12	725	1.211±0.105	17.745 13.962-22.287	2.681
Bifenthrin	GSS	527	1.493±0.154	54.531 34.035 – 85.546	-
	ŞAK 12	722	1.106±0.103	43.598 33.621-55.892	<0

Chlorpyrifos' a dirençli ŞAK 12 populasyonu farklı gruptan bazı ilaçlara karşı direnç geliştirmiştir. Akarisitler içerisinde diğerleri grubunda yer alan abamaectin' e karşı 7.289 kat direnç oranıyla kritik direnç katsayısı olan 4 katın üzerinde direnç gelişimi belirlenmiştir. Akarisitler içerisinde yer alan fenpyroximate, propargite ve clofentezine karşı ise düşük oranda direnç gelişimi saptanmıştır. Ancak amitraz ve

bifenthrin' e karşı direnç gelişimi hassas populasyondan da duyarlı olarak bulunmuştur.

Propargite dirençli KUM 17 populasyonunun (32.748 kat) 6 farklı ilaca karşı oluşturduğu LC_{50} değerleri ve direnç oranları çizelge 4.5.' de özetlenmiştir.

Çizelge 4.5. Propargite dirençli KUM 17 populasyonunun diğer ilaçlara karşı oluşturduğu LC_{50} değerleri ve direnç oranları

İlaç	Populasyon	n	Eğim±se	LC_{50} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı	LC_{50} direnç oranı
Abamectin	GSS	721	1.098±0.098	1.103 0.867-1.402	-
	KUM 17	723	1.392±0.114	4.794 3.080-6.938	4.346
Amitraz	GSS	724	1.508±0.114	30.035 24.639-36.205	-
	KUM 17	722	1.350±0.113	28.865 22.747-35.881	<0
Chlorpyrifos	GSS	720	1.772±0.135	2.592 2.132-3.088	-
	KUM 17	722	1.466±0.117	6.664 4.626-9.065	2.570
Clofentezine	GSS	716	1.387±0.108	2.864 2.323-3.478	-
	KUM 17	724	1.326±0.116	11.207 8.746-14.057	3.913
Fenoxyprimate	GSS	720	1.349±0.104	6.617 5.423-7.986	-
	KUM 17	722	1.293±0.109	14.466 11.422-17.989	2.186
Bifenthrin	GSS	527	1.493±0.154	54.531 34.035 – 85.546	-
	KUM 17	721	1.248±0.107	43.219 34.151-54.085	<0

Propargite dirençli KUM 17 populasyonunda yapılan çoklu direnç çalışmalarında 4.346 kat ile en yüksek oranda abamectin' e karşı direnç gelişimi belirlenmiştir. Clofentezine , chlorpyrifos, ve fenpyroximate karşı düşük oranda direnç gelişimi tespit edilirken; amitraz ve bifenthrin' e karşı direnç gelişimi hassas populasyondan da duyarlı olarak bulunmuştur.

Abamectin dirençli BEY 15 populasyonunun (35.058) 6 farklı ilaca karşı oluşturduğu LC_{50} değerleri ve direnç oranları çizelge 4.6.' da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Abamectin' e dirençli BEY 15 populasyonunun diğer ilaçlara karşı oluşturduğu LC_{50} değerleri ve direnç oranları

İlaç	Populasyon	n	Eğim±se	LC_{50} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı	LC_{50} direnç oranı
Chlorpyrifos	GSS	720	1.772±0.135	2.592 2.132-3.088	-
	BEY 15	721	1.341±0.111	8.410 5.986-11.330	3.244
Amitraz	GSS	724	1.508±0.114	30.035 24.639-36.205	-
	BEY 15	722	1.258±0.108	31.131 24.505-38.893	1.036
Propargite	GSS	724	1.214±0.101	12.755 10.178-15.820	-
	BEY 15	723	1.329±0.107	27.166 22.000-33.248	2.129
Clofentezine	GSS	716	1.387±0.108	2.864 2.323-3.478	-
	BEY 15	724	1.482±0.121	9.889 6.340-14.376	3.452
Fenoxyprimate	GSS	720	1.349±0.104	6.617 5.423-7.986	-
	BEY 15	725	1.282±0.113	17.236 13.407-21.715	2.604
Bifenthrin	GSS	527	1.493±0.154	54.531 34.035 – 85.546	-
	BEY 15	725	1.216±0.107	45.739 35.999-884.222	<0

Abamectin dirençli BEY 15 populayonunda clofentezine' ye karşı 3.452 kat direnç oranıyla en yüksek direnç gelişimi gözlenmiştir. Chlorpyrifos, fenpyroximate, propargite ve amitraz'a karşı düşük direnç gelişimi gözlenirken; bifenthrin' e karşı direnç gelişimi hassas populasyondan da duyarlı olarak tespit edilmiştir..

4.1.3. Sinerjist + ilaç sonuçları

Direnç kazandırılan tüm populasyonlarda ve GSS populasyonunda piperonyl butoxide (PBO), S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) ve triphenyl phosphate (TPP) sinerjistlerinin ilaçlar üzerine olan etkinliği incelenmiştir. Piperonyl

butoxide (PBO), S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) ve triphenyl phosphate (TPP) sinerjistlerinin chlorpyrifos, propargite ve abamectin ilaçları üzerindeki etki oranları

Sinerjistik etki oranı (SR)= Sinerjistsiz LC_{50} / Sinerjistli LC_{50} formülü ile hesaplanmıştır (Kim vd. 2004).

Chlorpyrifos' a dirençli ŞAK 12 populasyonunda chlorpyrifos ve chlorpyrifos + piperonyl butoxide (PBO), S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) ve triphenyl phosphate (TPP) sinerjistlerinin LC_{50} değerleri ve sinerjist etki oranları çizelge 4.7.' de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Chlorpyrifos ve chlorpyrifos + sinerjistlerin LC_{50} değerleri ve sinerjist etki oranları

İlaç	**n**	**Eğim±se**	**LC_{50} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{90} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**SR**
Chlorpyrifos (Sinerjistsiz)	723	1.192±.105	237.044 185.078-299.109	2821.023 1901.193-4806.426	**-**
Chlorpyrifos+PBO	723	1.167±0.104	168.856 131.525-213.684	2118.935 1411.315-3678.008	**1.40**
Chlorpyrifos+IBP	723	1.228±0.107	133.786 106.044-165.748	1322.276 942.379-2063.342	**1.77**
Chlorpyrifos+TPP	723	1.335±0.113	161.110 127.021-200.679	1469.220 1047.653-2293.439	**1.47**
GSS	720	1.72±0.135	2.592 2.132-3.088	13.704 10.923-18.183	**-**
GSS + PBO	720	1.442±0.118	2.903 1.889-4.158	22.473 13.812-48.788	**-**
GSS + IBP	723	1.450±0.118	2.796 1.855-3.947	21.410 13.412-44.448	**-**
GSS + TPP	722	1.402±0.111	2.846 1.895-4.043	23.335 14.161-51.852	**-**

ŞAK 12 populasyonuna chlorpyrifos ile birlikte uygulanan PBO, IBP ve TPP' ın üçü de chlorpyrifos' un biyolojik etkinliğini arttırdıkları tespit edilmiştir. Chlorpyrifos' un PBO ve TPP ile beraber uygulanması sonucunda LC_{50} değerlerinde bir miktar

azalma belirlenirken, en fazla azalma esteraz inhibitörü IBP' de belirlenmiştir. Ancak GSS populasyonunda chlorpyrifos ile birlikte uygulanan PBO, IBP ve TPP sinerjistlerinin chlorpyrifos' un etkinliği üzerinde etkileri bulunmamıştır. Her üç sinerjistin de chlorpyrifos ile birlikte uygulanması sonucunda GSS populasyonunun LC_{50} değerinde önemli bir değişme olmamıştır.

Propargite dirençli KUM 17 populasyonunda propargite ve propargite + piperonyl butoxide (PBO), S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) ve triphenyl phosphate (TPP) sinerjistlerinin LC50 değerleri ve sinerjist etki oranları çizelge 4.8.' de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Propargite ve propargite + sinerjistlerin LC_{50} değerleri ve sinerjist etki oranları

İlaç	**n**	**Eğim±se**	**LC_{50} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{90} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**SR***
Propargite (Sinerjistsiz)	725	1.210±0.106	417.707 329.099-525.503	4786.422 3215.040-8190.725	**-**
Propargite+PBO	723	1.355±0.112	272.291 192.649-369.139	2402.977 1541.021-4637.978	**1.53**
Propargite+IBP	723	1.260±0.107	285.112 224.427-355.582	2968.079 2082.264-4748.965	**1.46**
Propargite+TPP	719	1.322±0.107	308.765 249.201-378.438	2875.235 2056.679-4457.647	**1.35**
GSS	724	1.214±0.101	12.755 10.178-15.820	144.893 99.711-238.140	**-**
GSS + PBO	725	1.200±0.103	10.733 5.600-18.824	125.458 56.308-687.464	**1.18**
GSS + IBP	722	1.433±0.122	9.744 7.652-12.104	76.403 56.215-113.981	**1.30**
GSS + TPP	723	1.423±0.117	9.069 6.442-12.222	72.138 47.343-133.720	**1.40**

KUM 17 populasyonuna propargite ile birlikte uygulanan PBO, IBP ve TPP' ın chlorpyrifos' un biyolojik etkinliğini bir miktar arttırdıkları belirlenmiştir. Propargite ve sinerjistlerin birlikte uygulanması sonucunda LC_{50} değerindeki en fazla azalma

PBO' da tespit edilmiştir. GSS populasyonuna propargite ile birlikte uygulanan PBO, IBP ve TPP' ın chlorpyrifos' un etkinliğini bir miktar arttırdıkları belirlenmiştir. Dirençli KUM 17 populasyonu ve GSS populasyonuna uygulanan propargite + PBO, IBP ve TPP sinerjistlerinin propargite etkinliği üzerine olan etkileri hemen hemen aynı olmuştur.

Abamectin' e dirençli BEY 15 populasyonunda abamectin ve abamectin + piperonyl butoxide (PBO), S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) ve triphenyl phosphate (TPP) sinerjistlerinin LC_{50} değerleri ve sinerjist etki oranları çizelge 4.9.' de verilmiştir.

Çizelge 4.9. Abamectin ve Abamectin + sinerjistlerin LC_{50} değerleri ve sinerjist etki oranları

İlaç	**n**	**Eğim±se**	**LC_{50} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{90} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**SR***
Abamectin (Sinerjistsiz)	723	1.099±0.102	38.670 29.908-49.678	567.205 357.583-1075.315	**-**
Abamectin+PBO	723	1.382±0.113	21.937 17.478-27.005	185.680 135.977-278.319	**1.76**
Abamectin+IBP	720	1.333±0.109	15.909 11.601-20.890	145.578 97.853-256.438	**2.43**
Abamectin+TPP	723	1.519±0.110	22.302 17.832-27.410	194.224 141.623-292.775	**1.73**
GSS	721	1.098±0.098	1.103 0.867-1.402	16.196 10.259-30.363	**-**
GSS + PBO	721	1.522±0.121	0.545 0.405-0.709	3.786 2.622-6.335	**2.02**
GSS + IBP	720	1.183±0.104	0.632 0.490-0.801	7.666 5.175-13.012	**1.74**
GSS + TPP	724	1.487±0.120	0.527 0.347-0.751	3.830 2.372-8.206	**2.09**

Abamectin ile birlikte uygulanan PBO, IBP ve TPP' ın her üçünün de abamectin' in biyolojik etkinliğini arttırdıkları belirlenmiştir. Ancak abamectin' in IBP ile birlikte uygulanması sonucunda LC_{50} değerinin çok düştüğü ve en fazla etkinin IBP' de oluştuğu bulunmuştur. GSS populasyonunda abamectin ile birlikte uygulanan PBO,

IBP ve TPP sinerjistlerinin her üçünün de abamectin'in etkinliğini arttırdıkları belirlenmiştir.

4.1.4. Direnç kalıtım sonuçları

Chlorpyrifos' a dirençli ŞAK 12 populasyonu ile GSS (hassas) populasyon arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır. Çaprazlamalar sonucunda elde edile F1 ve F2 döllerinin LC_{50} değerleri ve direnç oranları çizelge 4.10.' da verilmiştir.

Çizelge 4.10. ŞAK 12, GSS, F1 ve F2 populasyonlarının chlorpyrifos' a karşı belirlenmiş LC_{50} değerleri ve direnç oranları

Populasyon	**n**	**Eğim±se**	**LC_{50} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{90} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{50} direnç oranı**	**LC_{90} direnç oranı**	**D***
ŞAK 12	723	1.192±0.105	237.044 185.078-299.109	2821.023 1901.193-4806.426	91.452	205.853	-
F1 (ŞAK 12 ♀ X GSS ♂)	611	1.322±0.123	138.031 106.649-175.488	1285.777 881.512-2148.826	53.252	93.824	0.75
F2 (ŞAK 12 ♀ X GSS ♂)	611	1.210±0.112	129.159 100.595-164.019	1479.750 978.603-2611.949	49.829	107.979	-
F1 (GSS ♀ X ŞAK 12 ♂)	602	1.128±0.114	171.008 129.341-224.809	2341.586 1435.570-4703.040	65.975	170.868	0.85
F2 (GSS ♀ X ŞAK 12 ♂)	602	1.235±0.114	143.213 112.137-181.586	1561.376 1034.717-2745.674	55.251	113.935	-
GSS (hassas)	720	1.772±0.135	2.592 2.132-3.088	13.704 10.923-18.183	-	-	-

*D: dominantlık derecesi

ŞAK 12 ♀ X GSS ♂ çaprazlamasından elde edilen F1 ve F2 döllerinde direnç oranları 53.252 ve 49.829 kat olarak belirlenmiştir. GSS ♀ X ŞAK 12 ♂ çaprazlamasından elde edilen F1 ve F2 döllerinin direnç oranları ise 65.975 ve 55.251 kat olarak tespit edilmiştir. Çaprazlama populasyonlarının chlorpyrifos direnç oranlarının başlangıç populasyonuna göre önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Her iki çaprazlamadan sonra F1 dişilerinde direncin kalıtımı,

ŞAK 12 ♀ X GSS ♂ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F1 dişilerinde,

D= 0.75

GSS ♀ X ŞAK 12 ♂ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F1 dişilerinde,

D= 0.85

Her iki çaprazlamadan da belirlenen D değerleri 0<D>1 değerleri arasında bulunmuştur. Sonuçlara göre ŞAK 12 (dirençli) X GSS (hassas) populasyonunda chlorpyrifos için direnç özelliğinin eksik baskın olduğu belirlenmiştir.

Propargite dirençli KUM 17 populasyonu ile GSS (hassas) populasyon arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır. Çaprazlamalar sonucunda elde edile F1 ve F2 döllerinin LC_{50} değerleri ve direnç oranları çizelge 4.11.' de belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. KUM 17, GSS, F1 ve F2 populasyonlarının propargite karşı belirlenmiş LC_{50} değerleri ve direnç oranları

Populasyon	**n***	**Eğim±se**	**LC_{50} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{90} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{50} direnç oranı**	**LC_{90} direnç oranı**	**D***
KUM 17	725	1.210±0.106	417.707 329.099-525.503	4786.422 3215.040-8190.725	32.748	33.034	-
F1 (KUM 17 ♀ X GSS ♂)	723	1.373±0.023	311.055 249.088-382.650	2666.554 1934.042-4052.102	24.386	18.403	0.83
F2 (KUM 17 ♀ X GSS ♂)	720	1.367±0.109	237.686 190.269-291.389	2059.123 1514.001-3064.520	18.634	14.211	-
F1 (GSS ♀ X KUM 17 ♂)	721	1.266±0.107	340.212 269.389-423.996	3497.032 2434.608-5655.363	26.672	24.135	0.88
F2 (GSS ♀ X KUM 17 ♂)	720	1.236±0.103	278.758 221.962-345.025	3033.810 2121.219-4872.011	21.854	20.938	-
GSS (hassas)	724	1.214±0.101	12.755 10.178-15.820	144.893 99.711-238.140	-	-	-

*D: dominantlık derecesi

KUM 17 ♀ X GSS ♂ çaprazlamasından elde edilen F1 ve F2 döllerinde direnç oranları 24.386 ve 18.634 kat olarak belirlenmiştir. GSS ♀ X ŞAK 12 ♂ çaprazlamasından elde edilen F1 ve F2 döllerinin direnç oranları ise 26.672 ve 21.854 kat olarak tespit edilmiştir. Çaprazlama populasyonlarının propargite direnç oranlarının başlangıç populasyonuna göre bir miktar azaldığı belirlenmiştir. Her iki çaprazlamadan sonra F1 dişilerinde direncin kalıtımı,

KUM 17 ♀ X GSS ♂ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F1 dişilerinde,

D= 0.83

GSS ♀ X KUM 17 ♂ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F1 dişilerinde,

D= 0.88

Her iki çaprazlamadan da belirlenen D değerleri 0<D>1 değerleri arasında bulunmuştur. Sonuçlara göre KUM 17 (dirençli) X GSS (hassas) populasyonunda propargite için direnç özelliğinin dominanta genle taşındığı tespit edilmiştir.

Abamectin dirençli BEY 15 populasyonu ile GSS (hassas) populasyon arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır. Çaprazlamalar sonucunda elde edile F_1 ve F_2 döllerinin LC_{50} değerleri ve direnç oranları çizelge 4.12.' de verilmiştir.

Çizelge 4.12. BEY 15, GSS, F1 ve F2 populasyonlarının abamectin' e karşı belirlenmiş LC_{50} değerleri ve direnç oranları

Populasyon	**n***	**Eğim±se**	**LC_{50} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{90} (µl/100ml) 0.95 güven aralığı**	**LC_{50} direnç oranı**	**LC_{90} direnç oranı**	**D***
21 sel. 15	723	1.339±0.102	38.670 29.908-49.678	567.205 357.583-1075.315	35.058	35.021	-
F1 (BEY 15 ♀ X GSS ♂)	724	1.223±0.107	29.372 23.057-36.911	328.154 223.471-549.984	26.629	20.261	0.84
F2 (BEY 15 ♀ X GSS ♂)	723	1.264±0.109	28.031 20.115-37.938	289.600 180.186-585.349	25.413	17.880	-
F1 (GSS ♀ X BEY 15 ♂)	724	1.288±0.108	28.568 22.745-35.449	282.297 198.031-451.129	25.900	17.430	0.82
F2 (GSS ♀ X BEY 15 ♂)	721	1.334±0.110	26.355 20.991-32.592	240.874 172.318-373.805	23.893	14.872	-
GSS (hassas)	721	1.098±0.098	1.103 0.867-1.402	16.196 10.259-30.363	-	-	-

*D: dominantlık derecesi

BEY 15 ♀ X GSS ♂ çaprazlamasından elde edilen F1 ve F2 döllerinde direnç oranları 26.629 ve 25.413 kat olarak belirlenmiştir. GSS ♀ X BEY 15 ♂ çaprazlamasından elde edilen F1 ve F2 döllerinin direnç oranları ise 25.900 ve 23.893 kat olarak tespit edilmiştir. Çaprazlama populasyonlarının abamectin direnç oranlarının başlangıç populasyonuna önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Her iki çaprazlamadan sonra F1 dişilerinde direncin kalıtımı,

BEY 15 ♀ X GSS ♂ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F1 dişilerinde,

D= 0.84

GSS ♀ X BEY 15 ♂ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F1 dişilerinde ise,

D= 0.82

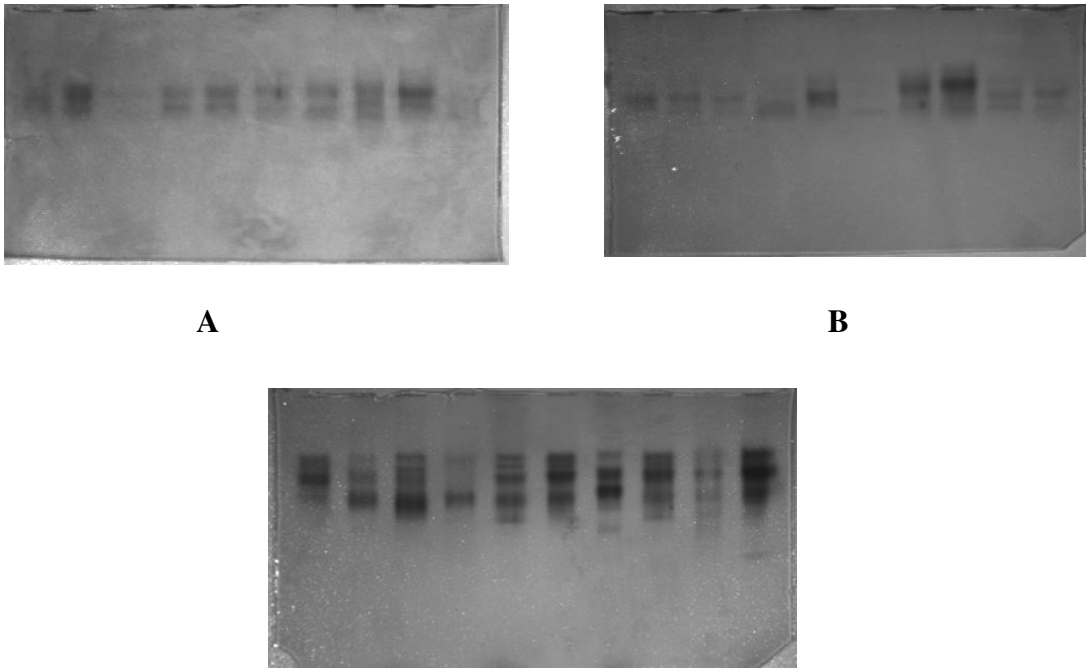
Her iki çaprazlamadan da belirlenen D değerleri 0<D>1 değerleri arasında bulunmuştur. Sonuçlara göre BEY 15 (dirençli) X GSS (hassas) populasyonunda abamectin için direnç özelliğinin baskın olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Biyokimyasal analiz sonuçları

Biyokimyasal analizler sırasında bütün populasyonların esteraz enzimleri elektroforez ve microplate yöntemiyle, GST enzimleri de microplate yöntemiyle belirlenmiştir.

4.2.1. Poliakrilamid gel elektroforez (PAGE) ile esteraz enziminin incelenmesi

Böceklerde insektisitlere karşı gelişen direnci belirlemede biyoassay yöntemlerin yanı sıra elektroforetik yöntemler de kullanılmaktadır. Elektroforetik yöntemlerle böceklerin insektisitlere göstermiş olduğu dirençle ilgili olduğu düşünülen bazı enzimler incelenerek, böceklerdeki direnç düzeyi ile bu enzimler arasında ilişki kurulmaktadır (Tsagkarakou vd. 2002). Bu çalışmada seçilen ve seleksiyonlar sonucunda dirençli hale getirilen populasyonların iki spesifik akarisit ve bir insektisit-akarisite karşı göstermiş olduğu duyarlılık ile esteraz enzimi arasında bir ilişki olup olmadığı incelenmiştir.



A **B**

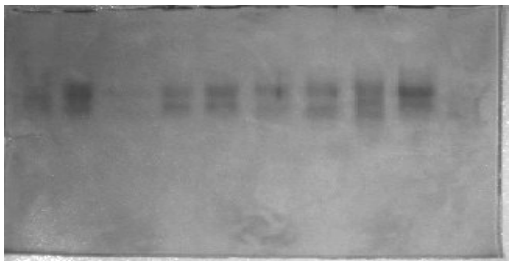
C

Şekil 4.4. GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının esteraz izozimlerinin PAGE elektroforez bant sistemleri (A: GSS, B: Şak, C: ŞAK12)

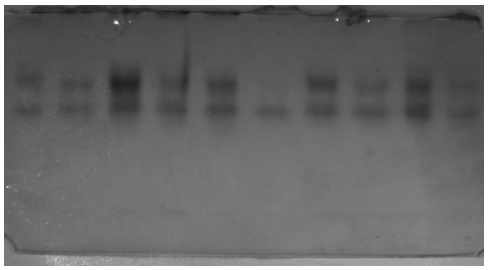
Çalışmada her populasyon için seçilen 10 bireyin ayrı ayrı mikroplaka hücrelerinde çoklu homojenizatör ile ezilmesi sonucu elde edilen homojenatların elektroforezi sonucunda GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının esteraz enzim izozimleri arasında hem diziliş bakımından hem de aktivite bakımından farklılıklar görülmüştür (Şekil 4.4.).

Poliakrilamid jel elektroforez yönteminde iki farklı yoğunluktan oluşan jel de populasyonların spesifik olmayan esteraz enzimi bantları belirlenmiştir. Jel' lerin farklı poliakrilamid yoğunlukta olmasının amacı esteraz enziminin bantlarını molekül büyüklüğüne göre ayırmaktır. Şekil 4.4.' de her populasyonun enzim aktivitesi incelenmekte ve çıkan sonuçlarda populasyonların her birinde oldukça farklı enzim aktivitesi göze çarpmaktadır. GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının esteraz izozimlerinin PAGE elektroforez bant sistemlerinin birbirlerinden farklı olduğu tespit edilmiştir. GSS populasyonlarından alınan bireylerin esteraz enzim aktivitelerinde bant sayısı ve yoğunluklarının en az düzeyde olduğu belirlenmiştir.

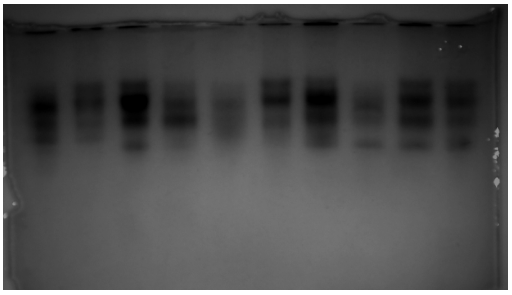
GSS populasyonunda esteraz aktivitesi bakımından heterojen bir yapının olduğu görülmektedir. Başlangıç populasyonu olan Şak populasyonunda da bant sayısı ve yoğunluklarının GSS'e göre biraz daha fazla olduğu belirlenmiştir. Şak populasyonunda da esteraz aktivitesi bakımından heterojen bir yapı görülmektedir. Chlorpyrifos ile 12 kez seleksiyondan sonra elde edilen ŞAK 12 populasyonunda ise bant sayısı ve yoğunluğunun fazla düzeyde olduğu görülmektedir. ŞAK 12 populasyonu GSS ve Şak populasyonlarıyla karşılaştırıldığında esteraz enzim aktivitesi bakımından homojen bir yapı görülmektedir. ŞAK 12 populasyonunda GSS ve Şak populasyonuna göre bant sayısı ve yoğunluğunda bir artış gözlenmiştir.



A



B

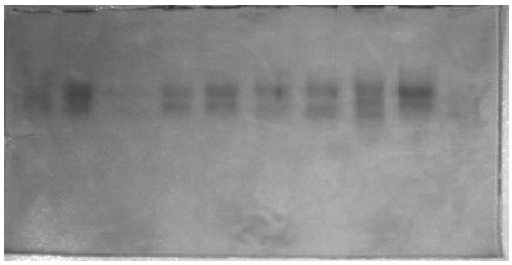


C

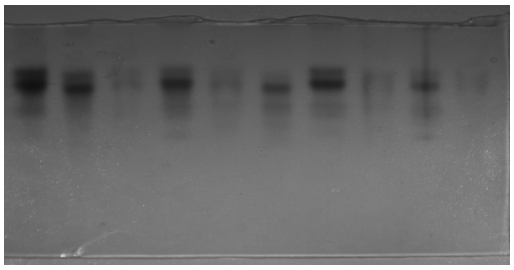
Şekil 4.5. GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının esteraz izozimlerinin PAGE elektroforez bant sistemleri (A: GSS, B: 2 numara, C: KUM 17)

Şekil 4.5.' de GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle elde edilen esteraz bantları görülmektedir. Başlangıç populasyonu olan 2 numaralı populasyonun esteraz bantları incelendiğinde GSS

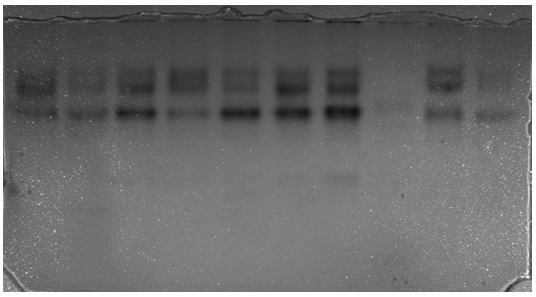
populasyonuna göre bant sayısı ve yoğunluğunda artış olduğu belirlenmiştir. Başlangıç populasyonu olan 2 numaralı populasyon içerisinde esteraz aktivitesi yüksek olan bireyler bulunmaktadır. Propargite ile 17 kez seleksiyondan sonra elde edilen KUM 17 populasyonunda ise 2 numaralı populasyona göre bant sayısı ve yoğunluğunda bir artış göze çarpmaktadır.



A



B



C

Şekil 4.6. GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının esteraz izozimlerinin PAGE elektroforez bant sistemleri (A: GSS, B: 21 numara, C: BEY 15)

Şekil 4.6.' da GSS, 21 ve BEY 15 populasyonlarının 10 bireyden oluşan gruplardan elde edilen homojenatlarının elektroforezi sonucunda esteraz enzim izozimleri görülmektedir. Başlangıç populasyonu olan 21 numaralı populasyon GSS populasyonuyla karşılaştırıldığında bant sayısı ve yoğunluğunda bir artış gözlenmiştir. 21 numaralı populasyon içerisinden seçilen 10 bireyin elektroforezinde bazı bireylerin esteraz enzim yoğunluğunun fazla olduğu belirlenmiştir. Abamectin

ile 15 kez seleksiyondan sonra elde edilen BEY 15 populasyonunda ise esteraz enzim izozimleri incelendiğinde, bant sayısı ve yoğunluğunda bir artış gözlenmiştir. 21 numaralı ve BEY 15 populasyonaları GSS ile karşılaştırıldığında her ikisinde de esteraz enzim aktivitesinde bir artış olduğu göze çarpmaktadır. Ancak 21 numaralı populasyonla BEY 15 populasyonu karşılaştırıldığında esteraz enzim aktivitesinde çok fazla bir artış olmadığı belirlenmiştir. BEY 15 populasyonun esteraz enzim bantlarının daha homojen bir yapıda olduğu gözlenmiştir.

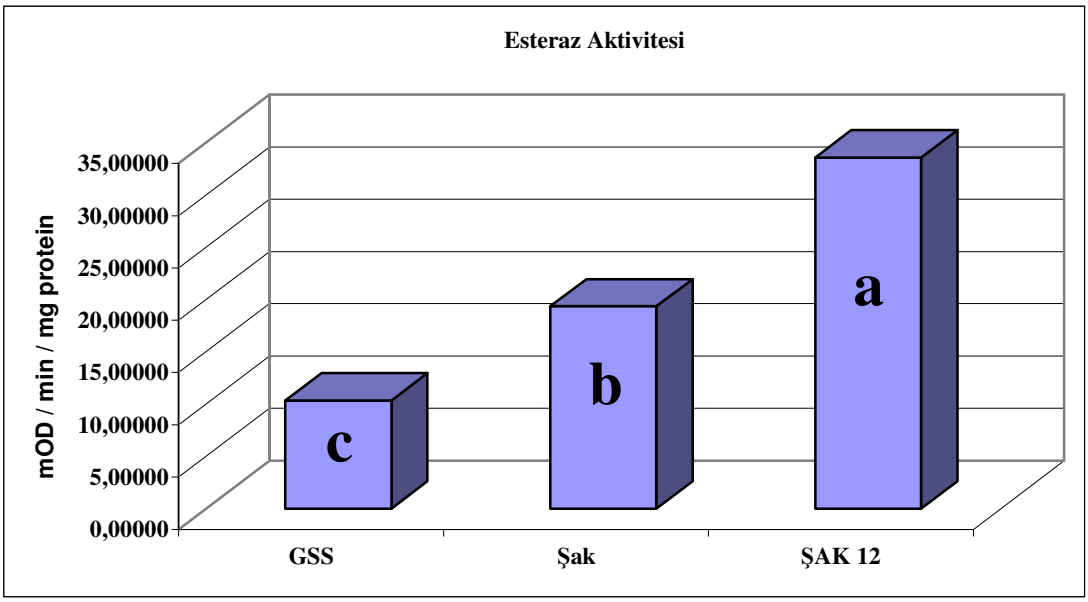
4.2.2. Microplate assay ile toplam esteraz enzimi aktivitesinin incelenmesi

Populasyonların microplate assay ile toplama esteraz enzim aktiviteleri α-naftyl asetat ile girdiği reaksiyonda 10 dakikada kinetik olarak belirlenmiştir. Esteraz enzim aktivitesi mOD/min/mg protein olarak hesaplanmıştır. Her üç populasyonların esteraz enzimlerinin microplate reader' da kinetik olarak okunması sonucunda, elde edilen protein miktarları (mOD/min/mg protein) Duncan istatistik programı ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda grup farkları ortaya konmuştur.

Çizelge 4.13. GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının esteraz enzim aktiviteleri

Populasyon	**N***	**mOD/min/mg protein**
GSS	4	10.35 **C**
Şak	4	19.35 **B**
ŞAK 12	4	33.59 **A**

N: tekerrür sayısı



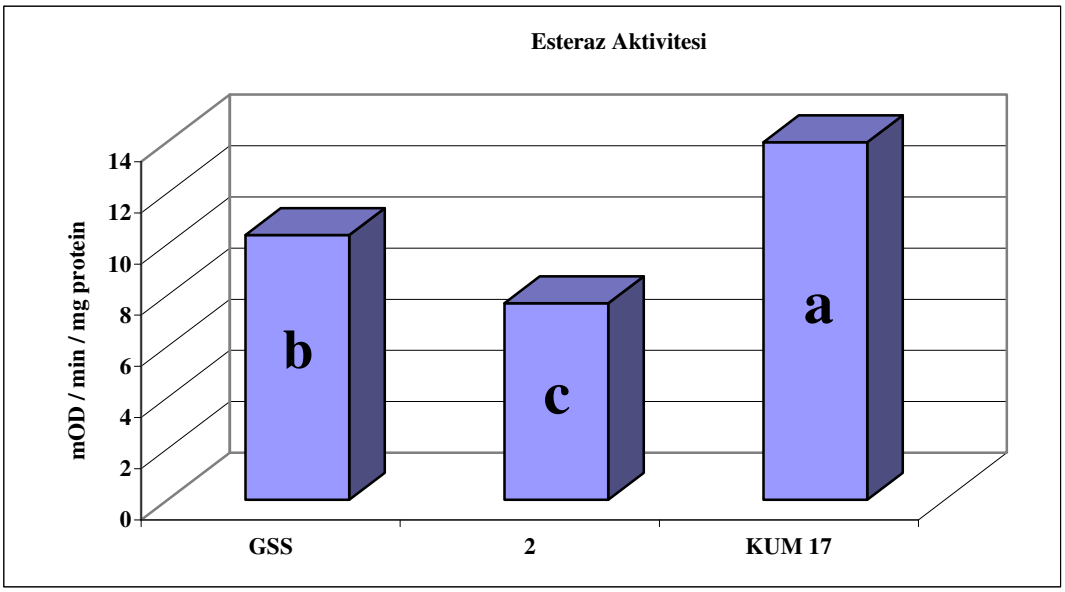
Şekil 4.7. GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının esteraz enzimlerinin kinetik aktivitesi (farklı olan harfler istatistikiolarak faklı grupları göstermektedir P=0.05).

GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının esteraz enzim aktiviteleri microplate reader' da kinetik olarak okunmuştur. En yüksek enzim aktivitesi 33.59 mOD/min/mg protein olarak chlorpyrifos ile 12 kez seleksiyondan sonra elde edilen ŞAK 12 populasyonunda bulunmuştur. Esteraz enzim aktivitelerinin GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının farklı istatistiki gruplar ile temsil ettiği şekil 4.7.' de gösterilmiştir (P=0.05). Poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle elde edilen jellerde de ŞAK 12 populasyonunda esteraz enzim bantlarının sayısında ve yoğunluğunda bir artış belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının esteraz enzim aktiviteleri

Populasyon	**N***	**mOD/min/mg protein**
GSS	4	10.35 **B**
2	4	7.69 **C**
KUM 17	5	13.97 **A**

N: tekerrür sayısı



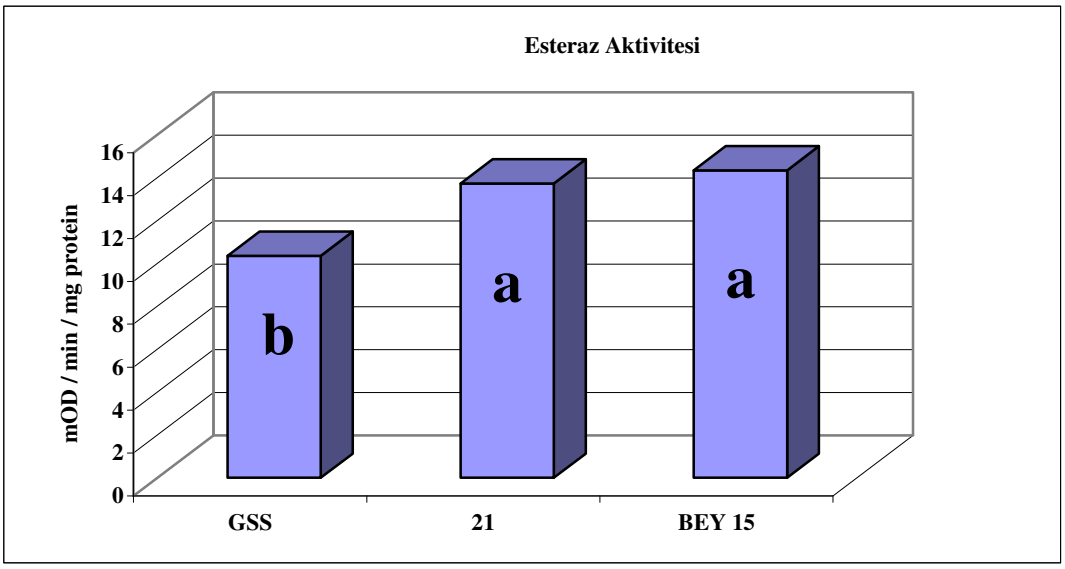
Şekil 4.8. GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının esteraz enzimlerinin kinetik aktivitesi (farklı olan harfler istatistikiolarak faklı grupları göstermektedir P=0.05).

GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının esteraz enzim aktiviteleri microplate reader' da kinetik olarak okunmuştur. En yüksek enzim aktivitesi 13.97mOD/min/mg protein olarak KUM 17 populasyonunda bulunmuştur. Başlangıç populasyonu olan 2 numaralı populasyonunun enzim aktivitesi ise GSS'e göre daha az olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.8.' de üç populasyonun istatistiki olarak birbirinden farklı olduğu görülmektedir (P=0.05). Poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle elde edilen jellerde de KUM 17 populasyonunun 2 numaralı populasyona göre bant sayısında ve yoğunluğunda bir artış olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.15. GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının esteraz enzim aktiviteleri

Populasyon	**N***	**mOD/min/mg protein**
GSS	4	10.35 **B**
21	4	13.72 **A**
BEY 15	3	14.33 **A**

N: tekerrür sayısı



Şekil 4.9. GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının esteraz enzimlerinin kinetik aktivitesi (farklı olan harfler istatistikiolarak faklı grupları göstermektedir P=0.05).

GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının esteraz enzim aktiviteleri microplate reader' da kinetik olarak okunmuştur. Başlangıç populasyonu olan 21 numaralı populasyon ile abamectin ile 15 kez seleksiyondan sonra elde edilen BEY 15 populasyonunun esteraz enzim aktiviteleri arasında çok büyük bir fark bulunmamıştır. Şekil 4.9.' da 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının esteraz enzim aktivitelerinin Duncan istatik analiz programı ile analizinden sonra aynı grupla temsil edildikleri görülmektedir.

4.2.3. Microplate assay ile GST enzimi aktivitesinin incelenmesi

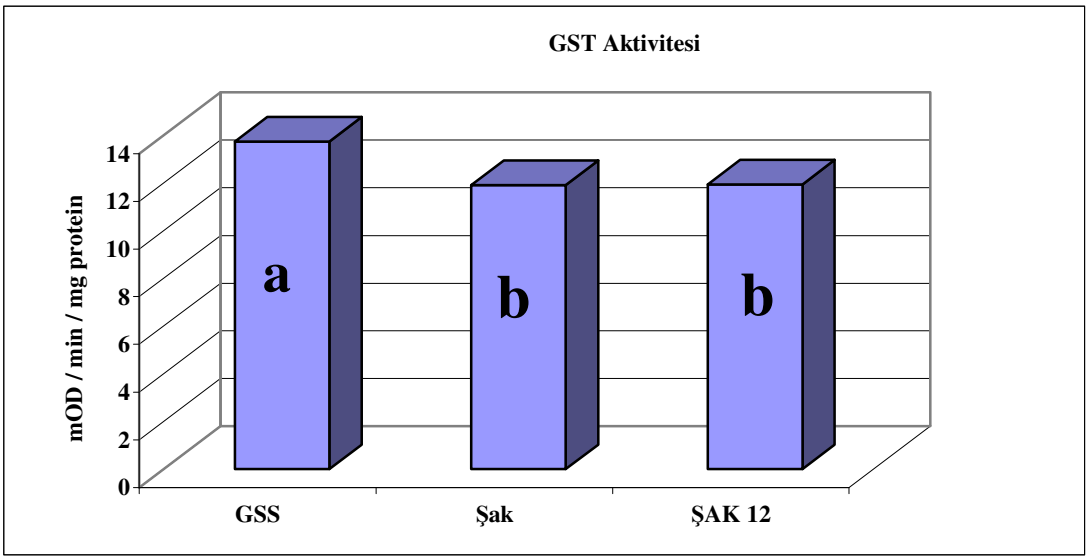
Populasyonların microplate assay ile GST enzim aktiviteleri CDNB ile girdiği reaksiyonda 5 dakikada kinetik olarak belirlenmiştir. GST enzim aktivitesi mOD/min/mg protein olarak hesaplanmıştır. GSS, Şak, ŞAK 12; GSS, 2 numara, KUM 17 ve GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının 3'erli gruplar halinde GST enzimlerinin kinetik okuması yapılmıştır. Her üç populasyonların GST enzimlerinin microplate reader' da kinetik olarak okunması sonucunda, elde edilen

protein miktarları (mOD/min/mg protein) Duncan istatistik programı ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda grup farkları ortaya konmuştur.

Çizelge 4.16. GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının GST enzim aktiviteleri

Populasyon	**N***	**mOD/min/mg protein**
GSS	5	13.73 **A**
Şak	4	11.91 **B**
ŞAK 12	4	11.94 **B**

N: tekerrür sayısı



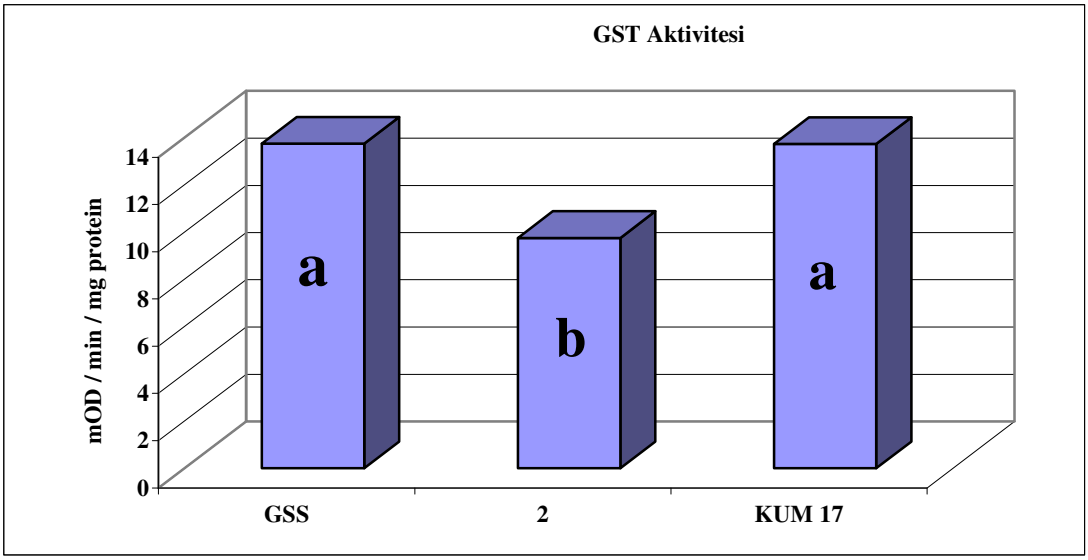
Şekil 4.10. GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının GST enzimlerinin kinetik aktivitesi (farklı olan harfler istatistikiolarak faklı grupları göstermektedir P=0.05).

GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının GST enzim aktivitelerinin microplate reader' da kinetik olarak okuması yapılmıştır. En yüksek enzim düzeyi 13.73 mOD/min/mg protein olarak GSS populasyonunda belirlenmiştir. Başlangıç populasyonu olan Şak populasyonu ile chlorpyrifos ile 12 kez seleksiyondan sonra 91.452 kat direnç kazandırılan ŞAK 12 populasyonu arasında GST enzim aktivitesi yönünden istatistiki olarak önemli bir fark bulunmamıştır (P=0.05). Duncan istatik programı ile yapılan analiz sonucunda Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının aynı grup içerisinde temsil edildikleri şekil 4.10.' da görülmektedir. Yapılan bu çalışma sonucunda GST enziminin chlorpyrifos direnci ile ilişkili bulunmamıştır.

Çizelge 4.17. GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının GST enzim aktiviteleri

Populasyon	N*	mOD/min/mg protein
GSS	5	13.73 **A**
2	4	9.74 **B**
KUM 17	5	13.71 **A**

N: tekerrür sayısı



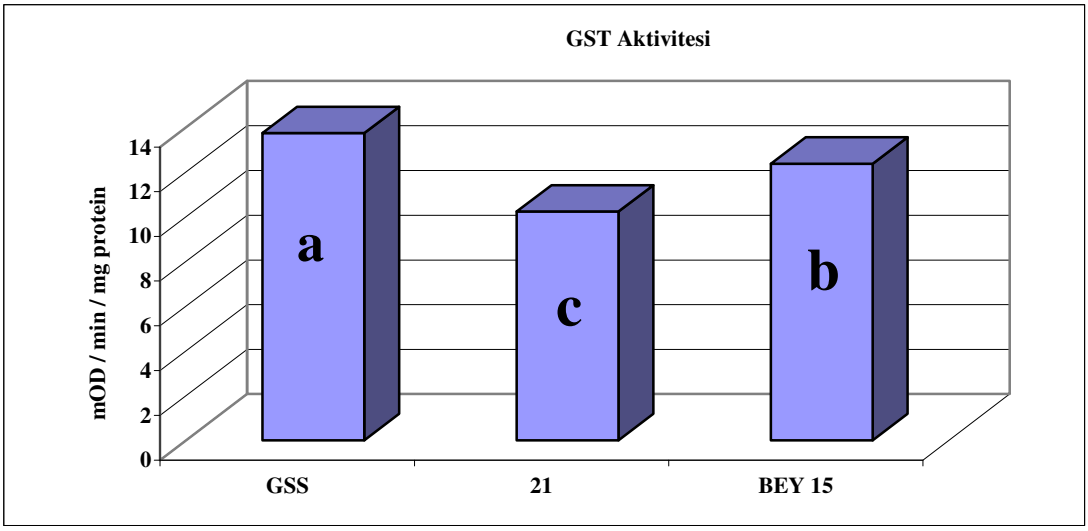
Şekil 4.11. GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının GST enzimlerinin kinetik aktivitesi (farklı olan harfler istatistiki olarak faklı grupları göstermektedir P=0.05).

GSS, 2 numara ve KUM 17 populasyonlarının GST enzim aktiviteleri microplate reader' da kinetik olarak okunmuştur. Başlangıç populasyonu olan 2 numaralı populayonda en düşük GST enzim aktivitesi bulunmuştur. GSS populasyonu ve propargite dirençli KUM 17 populasyonunda GST enzim aktivitesi yönünden önemli bir fark bulunmamıştır. 2 numaralı populasyon ve KUM 17 populasyonunun GST enzim aktiviteleri arasında istasistik olarak belirlenen fark şekil 4.11.' de görülmektedir (P=0.05).

Çizelge 4.18. GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının GST enzim aktiviteleri

Populasyon	N*	mOD/min/mg protein
GSS	5	13.73 **A**
21	5	10.23 **B**
BEY 15	5	12.36 **C**

N: tekerrür sayısı



Şekil 4.12. GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının GST enzimlerinin kinetik aktivitesi (farklı olan harfler istatistiki olarak faklı grupları göstermektedir P=0.05).

GSS, 21 numara ve BEY 15 populasyonlarının GST enzim aktivitelerinin microplate reader' da kinetik olarak okumaları yapılmıştır. En yüksek GST enzim düzeyi 13.73 mOD/min/mg protein olarak GSS populasyonunda bulunmuştur. Başlangıç populasyonu olan 21 numaralı populasyon ile abamectin dirençli BEY 15 populasyonu karşılaştırıldığında, BEY 15 populasyonun GST enzim aktivitesinde bir miktar artış belirlenmiştir. Üç populasyonun istatistiki olarak faklı oldukları şekil 4.12.' de görülmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kırmızıörümceklerin kimyasal savaşımında ilaçlara karşı kısa sürede direnç geliştirmeleri önemli bir problem olarak görülmektedir. Leeuwen ve Tirry (2007), son yıllarda *T. urticae'* nin kullanılan kimyasalların çoğuna direnç geliştirmiş durumda olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada kırmızıörümceklerin üç farklı ilaca direnç geliştirip geliştirmediği, direnç geliştiren populasyonda çoklu direnç, direnç kalıtımı, ilaçların sinerjistlerle birlikte etkisi ve direnç mekanizmaları incelenmiştir.

Çalışmanın birinci ilacı chlorpyrifos' a karşı ŞAK 12 populasyonunda direnç gelişimi biyoassay ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Chlorpyrifos organik fosforlu bir insektisittir; ancak tarım alanlarında yaprakbiti, elma içkurdu gibi zararlılara karşı kullanılırken kırımızıörümcekler üzerindeki seleksiyon baskını artırmaktadır. Böcek ve akarlarda tarım ilaçlarına karşı direnç gelişimi doğrudan ilaç kullanım sıklığı ile ilişkilidir. Chlorpyrifos'un yoğun kullanılması sonucunda kırmızıörümcekler de dolaylı olarak bu ilaca karşı direnç kazanmaktadır.

Chlorpyrifos ile 12 seleksiyon yapılan Şak populasyonunda direnç oranı 8.584 kattan 91.452 kata artmıştır. Şak populasyonu seleksiyon sayısına bağlı olarak chlorpyrifos'a karşı önemli oranda direnç geliştirmiştir. Chlorpyrifos'a dirençli ŞAK 12 populasyonu abamectin, clofentezine, fenpyroximate ve propargite karşı sırasıyla 7.289, 3.044, 2.681 ve 2.607 kat direnç geliştirmiştir. Ancak bifenthrin ve amitraz' a karşı direnç gelişimi hassas populasyona göre daha duyarlı olmuştur. Herron vd (1997), organik fosforlu ilaçlara karşı dirençli populasyonlarda diğer ilaçlara karşı direnç gelişiminin hızlı olduğunu belirtmişlerdir.

ŞAK 12 populasyonuna chlorpyrifos ile birlikte uygulanan PBO, IBP ve TPP'ın her üçünün' de chlorpyrifos' un biyolojik etkinliğini bir miktar arttırdıkları tespit edilmiştir. Ancak chlorpyrifos ile birlikte uygulanan PBO, IBP ve TPP sinerjistlerinin hassas populasyonda chlorpyrifos etkinliği üzerinde fazla etkisi olmamıştır. Kang vd (2006), *Bemisia tabaci'* nin tarla populasyonunda kuru film yöntemiyle 21.8 kat chlorpyrifos direnci bulmuşlardır. Ayrıca PBO ve TPP

sinerjistlerinin chlorpyrifos etkinliği üzerinde 2.9 ve 2.4 kat etkili olduklarını belirtmişlerdir. Dirençli ŞAK 12 populasyonu ile hassas GSS populasyonu arasında direncin kalıtımını belirlemek amacıyla yapılan resiprokal çaprazlamalarda direncin outosomal dominant genle taşındığı bulunmuştur.

ŞAK 12 populasyonunda direnç gelişiminin esteraz ve GST enzimleriyle olan ilişkisini belirlemek için poliakrilamid jel elektroforez ve mikroplaka okuyucu yapılmıştır. ŞAK 12 populasyonun esteraz enzim izozimleri başlangıç populasyonu olan Şak populasyonu ve GSS populasyonundan farklı olduğu görülmektedir. ŞAK 12 populasyonunu esteraz bantlarının sayısı ve yoğunluğunda önemli bir artış bulunmaktadır. Ayrıca esteraz enzimini microplate reader' da kinetik olarak okunması sonucunda da esteraz enziminin sayısal olarak da arttığı belirlenmiştir

Esteraz enzimi 19.352 mOD/min/mg protein' den 33.591 mOD/min/mg protein' e yükselmiştir. GSS, ŞAK ve ŞAK 12 populasyonlarının kinetik esteraz enzim aktiveleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur (P=0.05). Wheelock vd. (2005), esteraz enziminin piretroid, organofosfat ve karbamatların detoksifikasyonunda büyük rol oynağını belirtmişlerdir. Sökeli (2005), Isparta ili ve çevresindeki elma bahçelerinden toplanan *T. urticae* populasyonlarının 2.341-40.206 kat ile chlorpyrifos' a direnç geliştirdiklerini; ancak propargite ve abamectin' e karşı hassas olduklarını bulmuştur.GSS, Şak ve ŞAK 12 populasyonlarının GST enzim aktiviteleri de kinetik olarak belirlenmiştir. GST enziminin chlorpyrifos direnç gelişiminde herhangi bir etkisi bulunmamıştır.

Bu sonuçlara bağlı olarak ŞAK 12 populasyonunda yüksek direnç gelişimi ile esteraz enzimi arasında ilişki olduğu belirtilebilir. Esteraz inhibitörü sinerjistlerin chlorpyrifos etkinliğini dirençli populasyonda artırması bu sonucu desteklemektedir. Nauen vd. (2001), Almanya, Avustralya ve Japonya' dan topladıkları *T. urticae* populasyonlarında hassas populasyona göre sırasıyla 9.5, 8.3 ve 9.8 kat chlorpyrifos direnci bulmuşlardır. Stumpf vd. (2001), *T. urticae'* nin WI e VB laboratuvar ırklarında 9.5 ve 78 kat chlorpyrifos direnci bulduklarını belirtmişlerdir. Ay (2005), Antalya ve Isparta bölgesinden topladığı *T. urticae'* nin 8 populasyonunda petri kabı

– ilaçlama kulesi yöntemini kullanarak 8.00 – 1.774.00 kat chlorpyrifos direnci belirlemiştir.

Çalışmanın ikinci ilacı propargite karşı KUM 17 numaralı populasyonda direnç karakteri incelenmiştir. Propargite ile 17 seleksiyon yapılan 2 numaralı populasyonda hassas populasyonla karşılaştırıldığında direnç oranı 1.031 kattan 32.748 kata artmıştır. Propargite dirençli KUM 17 populasyonunda abamectin, chlorpyrifos, clofentezine ve fenpyroximate karşı sırasıyla 4.346, 2.570, 3.913 ve 2.186 kat direnç gelişimi belirlenmiştir. Amitraz ve bifenthrin' e karşı direnç gelişimi <0 olarak bulunmuştur. Bu durumda propargite dirençli *T. urticae* populasyonlarında abamectin, chlorpyrifos, clofentezine ve fenpyroximate etkili maddeye sahip ilaçlar kullanılmamalıdır. Propargite dirençli KUM 17 ve hassas populasyonun her ikisinde de PBO, IBP ve TPP sinerjsitlerinin propargite' nin etkinliğini artırdıkları belirlenmiştir. Hassas populasyon ve propargite dirençli KUM 17 populasyonu arasında yapılan resiprokal çaprazlamalar sonucunda propargite direncinin outosomal dominant genle taşındığı belirlenmiştir.

KUM 17 populasyonunda direnç gelişiminin esteraz ve GST enzimleriyle olan ilişkisini belirlemek için poliakrilamid jel elektroforez ve enzimler microplate reader' da kinetik olarak okunmuştur. Esteraz enziminin microplate reader' da okunması sonucunda 7.693 mOD/min/mg protein' den 13.976 mOD/min/mg protein'e arttığı belirlenmiştir. Ayrıca esteraz enziminin elektroforetik olarak incelenmesi sonucunda, KUM 17 populasyonunun esteraz bantlarının sayısı ve yoğunluğunda başlangıç populasyonuna göre artış bulunmaktadır.

Propargite dirençli KUM 17 populasyonunda GST enziminin kinetik olarak okunması sonucunda 9.747 mOD/min/mg protein' den 13.712 mOD/min/mg protein' e artmıştır. Ancak esteraz ve GST enzim aktiviteleri hassas populasyonda başlangıç populasyonuna göre daha yüksektir. Bu nedenle KUM 17 populasyonunda propartige direncinde esteraz ve GST enzim aktivitelerinin dolaylı olarak rol oynadığı belirtilebilir. Kabir vd. (1993), *Panonychus ulmi'* nin 11 populasyonunun 2'sinde petri kabı – ilaçlama kulesi yöntemi ile propargite karşı 9.57 ve 15.0 kat direnç

belirlemişlerdir. Herron vd. (2003), 3:10 oranında fenpyroximate ve propargite içeren NN1 850.0 EW kimyasalının propargite' nin tek başına uygulanmasından daha toksik bir etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ay vd. (2005), Isparta' da bulunan beş farklı sebze üretim serasından toplanan *T. urticae'* lerde yaprak daldırma yöntemi sonucunda propargite karşı 1.0-2.5 kat direnç belirlemiştir. Sato vd. (2004)'nun fenpyroximate 2.910 kat dirençli *T. urticae* populasyonunun propargite ve abamectin' e karşı direnç geliştirmediğini belirtmiştir.

Çalışmanın üçüncü ilacı abamectin'e karşı BEY 15 numaralı populasyonda direnç gelişimi incelenmiştir. Abamectin ile 15 seleksiyon yapılan 21 numaralı populasyonda direnç oranı 2.198 – 35.058 kat arasında değişmiştir. Abamectin dirençli BEY 15 populasyonu chlorpyrifos, propargite, clofentezine, amitraz ve fenpyroximate karşı sırasıyla 3.244, 2.129, 3.452, 1.036 ve 2.604 kat direnç geliştirmiştir. Ancak bifenthrin' e karşı direnç gelişimi belirlenmemiştir. Dirençli BEY 15 populasyonu ve hassas populasyonun her ikisinde de PBO, IBP ve TPP sinerjistlerinin abamectin' in etkinliğini arttırdıkları belirlenmiştir. Direncin kalıtımını belirlemek amacıyla, abamectin dirençli BEY 15 populasyonu ve hassas populasyon arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır. Bu çaprazlamalardan elde edilen F1 dişilerinde direncin outosomal dominant genle taşındığı belirlenmiştir.

BEY 15 populasyonunda direnç gelişiminin esteraz ve GST enzimleriyle olan ilişkisini belirlemek için poliakrilamid jel elektroforez ve enzimler microplate reader' da kinetik olarak okunmuştur. Esteraz enziminin kinetik olarak okunması sonucunda dirençli populasyon ve başlangış populasyonunun enzim değerleri arasında istatistiki bir fark bulunmamıştır (P=0.05). Ancak dirençli populasyonda elektroforez yöntemiyle elde edilen esteraz bantlarınının sayısı ve yoğunluğunda başlangıç populasyonuna göre artış belirlenmiştir.

GST enziminin kinetik olarak okunması sonucunda enzim değerinin 10.233 mOD/min/mg protein' den 12.368 mOD/min/mg protein'e artmıştır. Ancak GST artışı istatistiki olarak önemli bulunmuştur (P=0.05). Ancak en yüksek GST enzim aktivitesi hassas populasyonda belirlenmiştir. Bu nedenle abamectin direncinde GST

enzim artışının dolaylı etkisi olduğu söylenebilir. Stumpf ve Nauen (2002), *T. urticae'* nin NL-00 ve COL-00 ırklarında diagnostik doz yöntemi ile 54 ve 26 kat abamectin direnci belirlemişlerdir. Ayrıca PBO' nun her iki ırkta da abamectin direncini sınırladığını bulmuşlardır. Abamectin dirençli iki ırkta 1.6 kat esteraz enzim aktivitesi belirlenmiştir.

Sato vd. (2005), *T. urticae* populasyonunun abamectin ile 5 seleksiyondan sonra 342 kat direnç geliştirdiğini bulmuşlardır. Ayrıca 342 kat abamectin dirençli populasyonda milbectin'e 16.3, fenpropathrin' e 3.20 ve chlorfenapyr' e 2.23 kat direnç gelişimi belirlenmiştir. Ancak fenpyroximate, cyhexatin, propargite ve dimethoate karşı çapraz direnç gelişmemiştir. Wang ve Wu (2007), *B. tabaci* abamectin' e karşı 14.5 kat direnç belirlemişlerdir. Dirençli populasyonda emamectin benzoate (4.4 kat), imidacloprid (3.4 kat), direnç belirlenirken, fipronil'e karşı direnç oluşmamıştır. PBO sinerjisti abamectin etkinliği üzerinde etkili olurken , TPP abamectin etkinliğini etkilememiştir. Abamectin dirençli populasyonda P450 ve GST enzim aktivitelerinin direnç üzeride etkili olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışma sonucunda *T.urticae* populasyonlarında seleksiyon sayısına bağlı olarak her üç ilaca karşıda farklı oranlarda direnç gelişmiştir. Chlorpyrifos dirençli populasyonda abamectin, propargite, clofentezine ve fenpyroximate karşı direnç oluşurken; amitraz ve bifenthrin' e karşı direnç gelişmemiştir. PBO, IBP ve TPP sinerjistlerinin her üçü de dirençli populasyonda chlorpyrifos'un etkinliğini arttırırken, hassas populasyonda etkili olmamışlardır. Dirençli populasyonda chlorpyrifos direncinin dominant genle taşındığı belirlenmiştir.

Chlorpyrifos direncinde biyoassay ve biyokimyasal sonuçlar bir arada yorumlandığında, direncin esteraz enzim aktivitesi ile ilişkili olduğu görülmektedir. GST enziminin ise chlorpyrifos direncinde bir etkisi bulunmamaktadır. Propargite dirençli populasyonda abamectin, chlorpyrifos, clofentezine ve fenpyroximate karşı direnç gelişirken; amitraz ve bifenthrin' e karşı direnç gelişmemiştir. Hassas populasyon ve propargite dirençli KUM 17 populasyonu arasında yapılan resiprokal çaprazlamalar sonucunda propargite direncinin dominant genle taşındığı

belirlenmiştir. Dirençli populasyon ve hassas populasyonun her iksinde de PBO, IBP ve TPP sinerijstlerinin propargite etkinliği üzerinde etkisi olmuştur. Propargite dirençli populasyonda başlangıç populasyonuna göre esteraz ve GST enzim aktivitelerinde artış belirlenmiştir. Ancak hassas populasyonda esteraz ve GST enzim aktiviteleri başlangıç populasyonuna göre daha yüksektir. Bu nedenle propargite direncine esteraz ve GST enzim artışlarının dolaylı olarak bağlantılı olabilir. Abamectin dirençli populasyon chlorpyrifos, propargite, clofentezine, amitraz ve fenpyroximate karşı direnç geliştirirken; bifenthrin'e karşı direnç geliştirmemiştir.

Sinerjistlerle yapılan çalışma sonucunda her üç sinerjistin de abamectin etkinliğini arttırdığı belirlenmiştir. Direncin kalıtımını belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda abamectin direncinin dominant olarak taşındığı belirlenmiştir. Biyokimyasal çalışmalar sonucunda esteraz enziminin abamectin direncinde rol oynamadığı belirlenmiştir. GST enziminde dirençli populasyonda başlangış populasyonuna göre artış bulunmaktadır. Ancak hassas populasyonda başlangıç populasyonuna göre daha fazla GST enzimi bulunmuştur. Bu sonuca göre GST enziminin dolaylı olarak abamectin direnci üzerinde etkili olabilir.

Sonuç olarak, böceklerin hangi ilaç gruplarına karşı direnç kazandıkları belirlemek için çalışmalar devam edilmesi gerekmektedir. Böylece yüksek oranda direnç gelişimine neden olan ilaçlar yerine etki mekanizması farklı ilaçlar alternatif olarak kullanılarak direnç yönetim programları oluşturulmalıdır.

6. KAYNAKLAR

Akgünlü, F., Z., 2005. *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)' nin Değişik Populasyonlarının Sentetik Pyretroidli İlaçlara Karşı Meydana Getirdiği Direncin İzlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 41s, Ankara.

Ako, M., Poehling, H., M., Borgemeister, C., Nauen, R., 2006. Effect of Imidacloprid on the Reproduction of Acaricide-Resistant and Susceptible Strains of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Pest Management Science, 62: 419-424.

Anonim, 1999. Statistical Analysis Systems User' s Guide (8^{th} ed). SAS Institute INC., Raleigh, North Carolina, USA.

Anonim, 2002. Bitki Koruma Ürünleri. T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. TİSİT-Tarım İlaçları Sanayi, İthalatçı ve Temsilcileri Derneği, İstanbul, 336 s.

Anonim, 2007a. http://www.alanwood.net/pesticides/structures/abamectin.gif. Erişim Tarihi: 08.10.2007

Anonim, 2007b. http://www.answers.com/topic/bifenthrin. Erişim Tarihi: 08.10.2007

Anonim, 2007c. http://www.chemblink.com/structures/134098-61-6.gif. Erişim Tarihi: 09.10.2007

Anonim, 2007d. http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v077pr19.gif. Erişim Tarihi: 09.10.2007

Anonim, 2007e. http://www.ipworld.um.edu/chapters/ware/abamectin.gif. Erişim Tarihi: 09.10.2007

Anonim, 2007f. http://www.lineone.net/amitrazmolecule.gif. Erişim Tarihi: 10.10.2007

Anonim, 2007g. http://www.ntp.niehs.nih.gov. Erişim Tarihi: 08.10.2007

Anonim, 2007h. http://www.the-piedpiper-co.uk/chlorpyrifos.jpg. Erişim Tarihi: 10.10.2007

Anonim, 2007i. http://www.wikipedia.com/triphenyl phosphate gif. Erişim Tarihi: 10.10.2007

Ay, R., 2005. Determination of Susceptibility and Resistance of Some Greenhouse Populations of *Tetranychus urticae* Koch to Chlorpyrifos (Dursban 4) by the Petri Dish-Potter Tower Method. J Pest Sc., 78: 139-143.

Ay, R. ve Gürkan, M., O., 2005. *Tetranychus urticae* Koch (Acari:Tetranychidae)'nin Değişik Populasyonlarının İki Selektif Akarisite Karşı Duyarlılıkları ve Duyarlılık Mekanizmaları Üzerinde Araştırmalar. Tarım Bilimleri Dergisi, 11 (2): 217-223.

Ay, R. ve Sökeli, E., 2005. Böceklerde Direnç Yönetimi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9-1, 1-4.

Ay, R., Sökeli, E., Karaca, İ., 2005. Response to Some Acaricides of the Two-spotted Spider Mite (*Tetrychus urticae* Koch) from Protected Vegetables in Isparta. Turk J Agric For, 29: 165-171.

Bradford, M., M., 1976. A Rapid and Sensitiv Method for the Quantitation of Microgramm Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein – Dye B inding. Anal. Biochem., 72: 248-254.

Bues, R., Bouvier, J., C., Boudinhon, L., 2005. Insecticide Resistance and Mechanism of Resistance to Selected Strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in the South of France . Crop Protection, 24: 814-820.

Dağlı, F. ve Tunç, İ., 2001. Dicofol Resistance in *Tetranychus cinnabarinus*: Resistance and Stability of Resistance in Populations from Antalya, Turkey. Pest Management Science, 57: 609-614.

Devine, G., J., Barber, M., Denholm, I., 2001. Incidence and Inheritance of Resistance to METI-acaricides in European Strains of the Two-spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae*) (Acari: Tetranychidae). Pest Management Science 57: 443-448.

Goka, K., 1998. Mode of Inheritance of Resistance to Three New Acaricides in the Kanzawa Spider Mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae). Experimental & Applied Acarology, 22: 699-708.

Gonzalez, T., Bisset, J., A., Diaz, C., Rodriguez, M., M., Brandolini, M., B., 1999. Insecticide Resistance in a *Culex quinquefasciatus* Strain from Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94(1): 121-132.

Gorman, K., Hewitt, F., Denholm, I., Devine, G., J., 2001. New Developments in Insecticide Resistance in the Glasshouse Whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) and the Two-spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae*) in the UK. Pest Management Science, 58: 123-130.

Herron, G., A., Learmonth, S., E., Rophail, J., Barchia, I., 1997. Clofentezine and Fenbutatin oxide Resistance in the Two-spotted Spider Mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) from Deciduous Fruit Tree Orchards in Western Australia. Experimental & Applied Acarology, 21: 163-169.

Herron, G., A., Rophail, J., Holloway, J., Barchıa, I., 2003. Potentiation of a Propargite and Fenpyroximate Mixture Against Two-spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Experimental & Applied Acarology, 29: 115-119.

Huang, S. ve Han, Z., 2007. Mechanisms for Multiple Resistances in Field Populations of Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) in China. Pesticide Biochemistry and apahysiology, 87, 14-22.

Ismail, M., S., Soliman, M., F.M., Naggar, M., H., Ghallab, M., M., 2007. Acaricidal Activity of Spinosad and Abamectin against Two Spotted Spider Mite. Experimental and Applied Acarology, 43: 129-135.

Kabir, K., H., Chapman, R., B., Penman, D., R., 1993. Monitoring Propargite Resistance in European Red Mite, *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, Vol. 21: 133-138.

Kabir, K., H. ve Chapman, R., B., 1997. Operational and Biologal Factors Influencing Responses of Spider Mites (Acari:Tetranchidae) to Propargite by Using Petri Dish-Potter Tower Method. J. Econ. Entomol., 90 (2): 272-277.

Kang, C., Y., Wu, G., Miyata, T., 2006. Synergism of Enzyme Inhibitors and Mechanisms of Insecticide Resistance in *Bemisia tabaci* (Gennadius) (HOM., Aleyrodidae). J. Appl. Entomol. 130(6-7): 377-385.

Kim, Y., J., Lee, S., H., Lee, S., W., Ahn, Y., J., 2004. Fenpyroximate Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): Cross-resistance and Biochemical Resistance Mechanisms. Pest Management Science, 60(10): 1001-1006.

Kim, Y-J., Park, H-M, Cho, J-R., Ahn, Y-J., 2006. Multiple Resistance and Biochemical Mechanisms of Pyridaben Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol. 99(3): 954-958.

Konanz, S. ve Nauen, R., 2004. Purification and Partial Characetrization of a Glutathione S-transferase from the Two-spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 79(2): 49-57.

Leeuwen, T., V., Pottelberge, S., V., Tirry, L., 2005. Comparative Acaricide Susceptibility and Detoxifying Enzyme Activities in Field-Collected Resistant and Susceptible Strains of *Tetranychus urticae*. Pest Management Science, 61: 499-507.

Leeuwen, T., V., Pottelberge, S., V., Tirry, L., 2006a. Biochemical Analysis of a Chlorfenapyr- Selected Reistant Strain of *Tetranychus urticae* Koch. Pest Management Science, 62: 425-433.

Leeuwen, T., V., Tirry, L., Nauen, R., 2006b. Complete Maternal Inheritance of Bifenazate Resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and

its Implications in Mode of Action Considerations. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36: 869-877.

Leeuwen, T., V. ve Tirry, L., 2007. Esterase-Mediated Bifenthrin Resistance in a Multiresistant Strain of the Two-spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae*. Pest Mnagement Science, 63:150-156.

Leeuwen, T., V., Stıllatus, V., Tirry, L., 2004. Genetic Analysis and Cross-Resistance Spectrum of a Labaratory-Selected Chlorfenapry Resistant Strain of Two-spotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae). Experimental & Applied Acarology, 32: 249-261.

LeOra Software, 1994. POLO-PC: A User' s Guide to Probit or Logit Analysis LeOra Software, 28 p., Berkeley, CA.

Levitin, E. ve Cohen, E., 1998. The Involvement of Acetylcholinesterase in Resistance of the California Red Scale *Aonidiella aurantii* to Organophosphorus Pesticides. Entomologia Experimentalis et Applicata 88: 115-121.

Nauen, R., Stumpf, N., Elbert, A., Zebitz, C., PW., Kraus, W., 2001. Acaricide Toxicity and Resistance in Larvae of Different Strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). Pest Management Science, 57: 253-261.

Navajas, M., Tsagkarakov, A., Lagnel, J., Minnot, M-J., 2000. Genetic Differentiation in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): Polymorphism, Host Races or Sibling Species? Experimental & Applied Acarology, 24: 365-376.

Öncüer, C.,2004. Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, No: 19, 424s. Aydın.

Pree, D., J., Bıttner, L., A., Whıtty, K., J., 2002. Characterization of Resistance to Clofentezine in Populations of European Red Mite from Orchards in Ontario. Experimental and Applied Acarology, 27: 181-193.

Rakotondravelo, M., L., Anderson, T., D., Charlton, R., E., Zhu, K., Y., 2006. Sublethal Effects of Three Pesticides on Activities of Selected Target and Detoxification Enzymes in the Aquatic Midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). Arc. Environ. Contam. Toxicol., 51: 360-366.

Rauch, N. ve Nauen, R., 2003. Spirodiclofen Resistance Risk Assessment in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): a Biochemical Approach. Pesticide Biochemistry and Physiology, 74: 91-101.

Riberio, B., M., Guedes, R.N.C., Oliveira, E., E., Santos, J., P., 2003. Insecticide Resistance and Synergism in Brazilian Populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Stored Products Research 39: 21-31.

Sato, M., E., Miyata, T., Silva, M-D., Raga, A., Filho, M., F., S., 2004. Selection for Fenpyroximate Resistance and Susceptibility, Inheritance, Cross-resistance and Stability of Fenpyroximate Resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Appl. Entomol. Zool., 39 (2): 293-302.

Sato, M., E., Silva, M., Z., Raga, A., Filho, M., F., S., 2005. Abamectin Resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): Selection, Cross-Resistance and Stability of Resistance. Neotropical Entomology, 34 (6): 991-998.

Sato, M., E., Tanaka, T., Miyata, T., 2006. Monooxygenase Activity in Methidathion Resistant and Susceptible Populations of *Amblyseius womersleyi* (Acari: Phytoseiidae). Exp. Appl. Acarol., 39: 13-24.

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.

Stumpf, N. ve Nauen, R., 2001. Cross-Resistance, Inheritance and Biochemistry of Mitochondrial Electron Transport Inhibitör-Acaricide Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol. 94(6): 1577-1583.

Stumpf, N. ve Nauen, R., 2002. Biochemical Markers Linked to Abamaectin Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 72: 111-121.

Stumpf, N., Zebitz, C., P-W., Kraus, W., Moores, G., D., Nauen, R., 2001. Resistance to Organophosphates and Biochemical Genotyping of Acetylcholinesterases in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 69: 131-142.

Suh, E., Koh, S., H., Lee, J., H., Shin, K., I., Cho, K., 2006. Evulation of Resistance Pattern to Fenpyroximate and Pyridaben in *Tetranychus urticae* Collected from Greenhouses and Apple Orchards Using Lethal Concentration-Slope Relationship. Experimental and Applied Acarology, 38: 151-165.

Szlendak, E., Conyers, C., Muggleton, J., Thind, B., B., 2000. Pirimiphos-methyl Resistance in Two Stored Product Mites, *Acarus siro* and *Acarus farris*, as Detcted by Impregnated Paper Bioassay and Esterase Activity Assay. Experimental and Applied Acarology, 24: 45-54.

Toros, S., Maden, S., Sözeri, S., 2001. Tarımsal Savaşım Yöntem ve İlaçları. Ankara Üniversitesi Ziraat FakültesiYayınları, No: 1520, 417s. Ankara.

Tsagkarakou, A., Navajas, M., Rousset, F., Pasteur, N., 1999. Genetic Differentiation in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Greenhouses in France. Experimental & Applied Acarology, 23: 365-378.

Tsagkarakou, A., Pasteur, N., Cuany, A., Chevillon, C., Navajas, M., 2002. Mechanisms of Resistance to Organophosphates in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Greece. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32: 417-427.

Uğurlu, S., 2001. *Heliothis armigera* (HUBN.) (Lepidoptera: Noctuidae)' nin Değişik Populasyonlarının Bazı İnsektisitlere Karşı Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi, Doktora Tezi, 86s, Ankara.

Uygun, **N.,** Ulusoy, M.R., ve Karaca, İ., 2002. Meyve ve Bağ Zararlıları Ders Kitabı, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Genel Yayın No:252, Ders Kitapları Yayın No:A-81,Adana.

Ünal, G., Gürkan , M. O., 2001. İnsektisitler Kimyasal Yapıları, Toksikolojileri ve Ekotoksikolojileri , 1. Baskı , Ankara, 159 S.

Vontas, J., G., Enayati, A., A., Small, G., J., Hemingway, J., 2000. A Simple Biochemical Assay for Glutathione S-Transferase Activity and Its Possible Field Application for Screening Glutathione S-Transferase- Based Insecticide Resistance. Pesticide Biochemistry and Physiology, 68: 184-192.

Yang, X., Buschman, L., L., Zhu., K., Y., Margolies, D., C., 2002. Susceptibility and Detoxifying Enzyme Activity in Two Spider Mite Species (Acari: Tetranychidae) After Selection with Three Insecticides. J. Econ. Entomol. 95(2): 399-406.

Young, S., J., Gunning, R., V., Moores, G., D., 2005. The effect of Piperonyl Butoxide on Pyrethroid Resistance Associated Esterases in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Management Science, 61: 397-401.

Wang, L. ve Wu, Y., 2007. Cross-Resistance and Biochemical Mechanisms of Abamectin Resitance in the B-type *Bemisia tabaci*. J. Appl. Entomol. 131(2), 98-103.

Wheelock, C., E., Shan, G., Ottea, J., 2005. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. J. Pestic. Sci., 30(2): 75-3.

EKLER

EK.1

Elektroforez yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

A. % 7.5' lik poliakrilamid jel' in hazırlanması

1. Stok akrilamid solüsyonu, 30g akrilamid ve 0.8g bis-akrilamid tartılır, saf su ile hacmi 100 ml' ye tamamlanır. Whatman 1 nol filtreden süzüldükten sonra koyu renkli bir şişeye konrak +4 ^{o}C saklanabilir.

2. Yoğun jel buffer: 1.5 M Tris-HCL, Ph: 8
18.5 g Tris base yaklaşık 80 ml saf su' da çözdürülür ve pH 8.8' e HCL ile ayarladıktan sonra hacim 100 ml' ye tamamlanır ve +4 ^{o}C' de saklanır.

3. Seyreltik jel buffer: 0.5 M Tris-HCL Ph: 6.8
6 g Tris base yaklaşık 80 ml saf suda çözdürülür ve pH 6.8' e HCL ile ayarlandıktan sonra hacim 100 ml' ye tamamlanır ve +4 ^{o}C' de saklanır.

4. % 10 Amonyum persulfate çözeltisi
10 g Amonyum persulfate 100 ml saf su' da çözdürülür ve +4 ^{o}C' de en fazla 7 gün saklanabilir.

Yukarıda açıklanan çözeltiler hazırlandıktan sonra, aşağıda açıklanan miktarlarda karıştırılarak % 7.5' lik poliakrilamid jel hazırlanır.
7.5 ml stok akrilamid
7.5 ml Yoğun jel buffer
14.85 ml saf su
150 µl % 10 amonyumpersulfate
15 µl TEMED
Taze olarak hazıranan bu çözelti, el oluşturmak için hemen kullanılmalıdır.
% 3.5'lik poliakriamid jelin hazırlanması:
1.5 ml stok akriamid

3 ml seyreltik jel buffer

7.4 ml saf su

100 µl % 10' luk amonyum persulfate

15 µl TEMED karıştırılarak % 3.5' lik poliakrilamid jel hazırlanır. Bu çözelti taze hazırlanmalı ve hemen kullanılmalıdır.

B. Elektrot Buffer (Glycine buffer, pH: 8.3)

3 g Tris base ve 14.4 glycine saf suda çözdürülür ve hacim 1 l' ye tamamlanır. Son hacmin pH' sı 8.3' e ayarlanmalıdır.

C. Boya Solusyonu

Bunun için önce % 1 aseton içeren 0.2 M fosfat buffer hazırlanmalıdır.

1) 0.2 M fosfat buffer (pH: 6.5)

Fosfat buffer için öncelikle A ve B şeklinde iki çözelti hazırlanmalıdır.

a) 0.2 M NaH_2PO_4 için 31.21 g NaH_2PO_4 tartılır, 1 l' ye % 1 aseton içeren saf su ile tamamlanır.

b) 0.2 M Na_2HPO_4 için, 71.64 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ tartılır, 1 l' ye % 1 aseton içeren saf su ile tamamlanır.

c) 62.5 ml A çözeltisi 37.5 B çözeltisi ile karıştırılır ve pH kontrol edilir ve son hacim % 1 aseton içeren saf su ile 200 ml' ye tamamlanır.

2) % 0.02 (w/v) α-naphthylacetat çözeltisi:

% 0.04g α-naphthylacetat tartılarak 200 ml 0.2 M fosfat buffer içerisinde çözdürülür ve whatman kağıdı ile süzülür.

3) % 0.4 (w/v) Fast blue BB salt çözeltisi:

0.4 g fast blue salt tartılır ve 2 nolu çözeltinin 100ml' si içerisinde çözdürülür. Bu çözelti hazırlanınca whatman kağıdında süzülür ve taze olarak kullanılır.

D. Fikzasyon sıvısı:

70 ml' lik asetik asit 1 l saf su ile tamamlanır.

EK. 2

Microplate reader' da esteraz enziminin kinetik olarak okunmasında kullanılan çözeltiler

1) 0.1 M sodium fosfat buffer (pH: 7.5)
Sodium fosfat buffer hazırlamak için öncelikle A ve B şeklinde iki çözelti hazırlanmalıdır.

a) 13.9 gr NaH_2PO_4 tartılır ve 500 ml destile suda çözülerek A çözeltisi hazırlanır.
b) 53.65 gr $Na_2HPO_4.2H_2O$ tartılır ve 1 lt destile suda çözülerek B çözeltisi hazırlanır.

048 ml A çözeltisi ve 252 ml B çözeltisi karıştırılarak 0.1 M pH: 7.5' a ayarlanır ve hacim saf su ile 600 ml' ye tamamlanır.

2) 0.2 M sodium fosfat buffer (pH: 6)
Öncelikle Ave B şeklinde iki çözelti hazırlanmalıdır.

a) 27.8 gr NaH_2PO_4 tartılır ve 1lt destile suda çözülerek A çözeltisi hazırlanır.
b) 71.7 gr $Na_2HPO_4.2H_2O$ tartılır ve 1 lt destile suda çözülerek B çözeltisi hazırlanır.

87.7 ml A çözeltisi ve 12.3 ml B çözeltisi karıştırılır ve son hacim destile su ile 200 ml' ye tamamlanır.

EK. 3

Microplate reader' da GST enziminin kinetik olarak okunmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1) 0.05 M Tris HCL Buffer (pH: 7.5)
0.788 gr Tris HCL tartılır. Hacim 100 ml' ye tamamlanarak pH: 7.5' e ayarlanır.

2) GSH
0.0368 gr gluthation tartılır 10 ml Tris HCl buffer da çözülür.

3) CDNB
0.242 gr CDNB tartılır ve 10 ml ethanol' de çözülür. Bu çözeltiden 10 µl alınarak 990 µl Tris HCL buffer içerisinde çözülür.