



Amitraz'a Dirençli *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de Çoklu Direnç, Kalıtım, Sinerjizm ve Detoksifikasyon Mekanizmaları*

Recep AY¹

Fatma Ebru KARA¹

Geliş Tarihi: 04.11.2008

Kabul Tarihi: 15.07.2009

Öz: Antalya ilinde fasulye serasından Mayıs 2003'de toplanmış olan *Tetranychus urticae* Koch'nin BEŞ popülasyonuna amitraz ilacı ilaçlama kulesi-petri kabı yöntemi ile uygulanarak LC değerleri belirlenmiştir. BEŞ popülasyonu amitraz ile her seleksiyon popülasyonu için belirlenen LC₆₀ değerleriyle 15 kez seleksiyon yapılmıştır. Elde edilen dirençli popülasyon AMT 15 olarak isimlendirilmiştir. LC₅₀ değerlerine göre, 15 seleksiyon sonrasında bu popülasyonun hassas (GSS) popülasyona göre direnç oranı 32.02 kat olarak bulunmuştur. Dirençli AMT 15 popülasyonuna 3 farklı sinerjist, piperonyl butoxide (PBO), triphenyl phosphate (TPP) veya S-benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) + amitraz uygulanmıştır. Amitraz ile en yüksek sinerjistik etkiyi PBO göstermiştir. Diğerlerinin sinerjistik etkisi sınırlı kalmıştır. AMT 15 popülasyonunun diğer bazı ilaçlara çoklu direnç geliştirip geliştirmedeği de incelenmiştir. AMT popülasyonunda en yüksek çoklu direnç oranı abamectin (8.38 kat) ve propargite (6.37 kat)'e karşı belirlenmiştir. AMT 15 popülasyonunda yalnızca bifenthrin'e karşı hassasiyet belirlenmiştir. Resiprokal çaprazlama çalışmalarında AMT 15 popülasyonun direnç kalıtımının eksik dominant karakterli olduğu belirlenmiştir. Mikroplate reader ile yapılan kinetik okumalarda AMT 15 popülasyonun da selekte edildikleri BEŞ popülasyonuna göre esteraz (2.19 kat), glutation S-transferase (GST) (1.07 kat) ve sitokrom P450 monooksijenaz (P450) (29.24 kat) enzim aktivitelerinde önemli miktarda artış belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Tetranychus urticae*, amitraz, çoklu direnç, sinerjist, direnç kalıtımı, detoksifikasyon

Mechanisms of Multiple Resistance, Inheritance, Synergism and Detoxification in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) Resistant to Amitraz

Abstract: The LC values of *Tetranychus urticae* Koch BEŞ populations collected from Antalya province in bean greenhouse on May 2003 were determined using by spray tower – petri dish method. The BEŞ population was selected 15 times with amitraz by LC₆₀ values determined for each selected population. The resistant population was named as AMT 15. The resistance rate of this population after 15 selections was found 32.02 fold compared to the susceptible (GSS) population according to their LC₅₀ values. Different synergists, piperonyl butoxide (PBO), triphenyl phosphate (TPP) and S-benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) + amitraz were applied to the AMT 15 resistant populations. PBO presented the highest synergistic effect with amitraz in AMT 15 population. The synergistic effects of the other synergists remained limited. Whether multi-resistance developed against some pesticides in the resistant AMT 15 population investigated. The highest multi-resistance rate in AMT population was found against abamectin (8.34 fold) and propargite (6.37 fold). The only susceptibility in AMT 15 population was determined to bifenthrin. The reciprocal crossing investigations revealed the resistance inheritance as incompletely dominant. The kinetic readings with microplate reader pointed significant increases in esterase (2.19 fold), glutathione – S – transferase (GST) (1.07 fold) and cytochrome P450 monooxygenase (P450) (29.24 fold), enzyme activities in AMT 15 population compared to the parental populations.

Key Words: *Tetranychus urticae*, amitraz, multiple resistance, synergist, resistance inheritance, detoxification

Giriş

Tetranychus urticae Koch. (Acari:Tetranychidae) endüstri bitkilerinde, süs bitkilerinde, meyve bahçelerinde, tarla ve örtüaltı sebze üretim alanlarında ürün kaybına neden olan önemli bir

zararlıdır. *T. urticae* örtü altı sebze alanlarında yıl boyunca uygun yaşama ortamı bulmasından dolayı yüksek yoğunluğa ulaşarak önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

*Bu araştırma TÜBİTAK-TOVAG tarafından desteklenen 105O179 nolu projenin bir bölümüdür.

¹ Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü-İsparta

T. urticae' nin savaşımında uygulamasının kolay olması, kısa sürede etki göstermesi ve çoğu zaman tür teşhisine ihtiyaç duyulmaması nedeniyle kimyasal savaşım tercih edilmektedir (Ay ve ark. 2005). Ancak sürekli ve yoğun ilaç kullanımı çevre kirlenmesi, doğal dengenin bozulması ve zararlıların kısa sürede direnç geliştirmesi gibi birçok probleme neden olmaktadır. *Tetranychus urticae*'nin savaşımındaki en büyük problemlerden birisi de birçok akarısitede karşı kısa sürede direnç geliştirebilmesidir.

Amitraz kontakt ve solunum yolları etkili akarısitede ve insektisit olup, ülkemizde kırmızıörümcek ve bazı sebze zararlılarına karşı 1981 yılında ruhsatlandırılmış olup, 1988 yılından bu yana birçok üründe kırmızıörümcek kontrolünde kullanılmaktadır (Anonymous 2002). Yapılan bir çok araştırmada akar türlerinin amitraz'a karşı direnç geliştirdiği belirlenmiştir (Ay 2006, Kumral ve Kovancı 2007, Li ve ark. 2004, Fergusson-Kolmes ve ark. 1991, Van Leeuwen ve ark. 2005, Jonsson ve Hope 2007)

Insektisitlerin yaygın ve bilinçsiz kullanımı sonucu zararlılarda davranışsal, morfolojik, fizyolojik, çoklu direnç ve çapraz direnç olmak üzere 5 tip direnç görülmektedir. Bunlardan kırılması en zor olan fizyolojik direnç, zararlının fizyolojik faaliyetleri sonucu biyokimyasal yollarla meydana getirdikleri direnç şeklidir (Öncüer 2004). Fizyolojik direncin oluşmasında böcek bünyesinde bulunan esteraz, GST, P450 ve asetilkolinesteraz enzimlerinin etkili oldukları bilinmektedir. Direncin nedenlerinin belirlenmesinde, insektisitlerin etki mekanizmalarının bilinmesi gerekmektedir.

Kimyasallara karşı direnç geliştirmiş zararlılarda yoğun ilaç kullanımı, maliyeti artırarak ekonomik yönde çiftçiyi olumsuz etkilemekte ve çevre kirliliğine sebep olmaktadır. Direnç mekanizmalarının bilinmesi çapraz direnç oluşumunu belirlemeye yardım etmekte ve alternatif insektisitlerin seçimini kolaylaştırmaktadır. Direncin belirlenmesindeki en önemli amaç, en az düzeyde dayanıklılığa sebep olan insektisitlerin belirlenerek, üreticiye tavsiye edilebilmesini sağlamaktır. Bu çalışmada amitraz dirençli *T. urticae*' nin BEŞ popülasyonunda diğer bazı pestislere direnç geliştirip geliştirmede, direnç kalıtım tipi ve direnç mekanizması belirlenmiştir. Ayrıca dirençli popülasyonda amitraz direnci ile bazı sinerjilerle ilişkisi incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Çalışmanın ana materyalini iki noktalı kırmızıörümcek, *Tetranychus urticae* Koch'un BEŞ ve Rothamstad Experimental Station (İngiltere)' den sağlanan standart hassas (German Susceptible

Starins, GSS) popülasyonu, amitraz (kortraz) 200 g/l ilacı ve sinerjistler piperonyl butoxide (PBO), S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) ve triphenyl phosphate (TPP) oluşturmaktadır. TTP ve IBP esteraz enzimlerinin inhibitörüdür (Kang ve ark. 2006, Wang ve Wu 2007). PBO ise esteraz ve monooxygenaz enzim grubu içerisinde yer alan P 450 ve esteraz inhibitörüdür (Young ve ark. 2005, Van Leeuwen ve Tirry 2007).

Çalışmanın ana materyalini oluşturan BEŞ popülasyonu Antalya ili Kumluca ilçesi Beşikçi köyü fasülye serasından Mayıs 2003'de toplanmıştır. Toplanan popülasyonlar Mart 2006'ya kadar herhangi bir ilaç uygulamadan yetiştirilmiştir. *T. urticae*' nin hassas popülasyonu (German Susceptible Strains, GSS) Rothamstad Experimental Station (İngiltere)' den 1998'de getirilmiş ve laboratuvarında üretimi devam ettirilmektedir. Bu popülasyona 1965 yılından itibaren herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamıştır.

T. urticae popülasyonlarının laboratuvarında üretilmesinde konukçu bitki olarak barbunya fasülyesi kullanılmıştır.

Denemeler LC değerlerinin belirlenmesi, seleksiyon çalışmaları, çoklu direnç çalışmaları, sinerjist + pestisit çalışmaları ve direncin kalıtımının belirlendiği biyoassay çalışmaları ile dirençle ilişkili esteraz, glutation S-transferaz (GST) ve cytochrome P450 monooksijenaz (P450) enzim aktivitelerinin belirlendiği biyokimyasal çalışmalar olmak üzere iki ayrı bölümden oluşmuştur.

1. Biyoassay çalışmaları

Pestisit konsantrasyonlarının hazırlanması:

Pestisit konsantrasyonları saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Konsantrasyonlar hazırlanırken ön çalışmalar yapılmıştır. Bu ön çalışmalarda öncelikle % 90'dan fazla ölüm sağlayan bir doz belirlenmiştir. Daha sonra bu solüsyondan hazırlanan her doz bir önceki dozun yarısı olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan çözeltilerde yapılan tüm seyreltmelerde ve kontrolde saf su kullanılmıştır.

Pestisit uygulanması: Pestisitlerin uygulanmasında Kabir ve Chapman (1997) ve Ay (2005)'den alınan ilaçlama kulesi – petri kabı yöntemi uyarlanarak kullanılmıştır. Pestisit konsantrasyonları hazırlandıktan sonra ilaçlama kulesinde 6 cm çapındaki plastik petrinin alt ve üst kapağına 1 ml olmak üzere toplam 2 ml 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. Uygulama yapılan petrilerin her birine bir fırça yardımı ile 25 - 35 adet dişi birey aktarılmış ve kapağı iyice kapatılmıştır. Daha sonra bu petriler 26±2 °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. Popülasyonların LC değerlerinin belirlenmesi için 7 doz + 1 kontrol kullanılmıştır. Her doz 3 tekerrürden oluşmaktadır. *T. urticae* popülasyonlarının 24 saat sonra belirlenen ölüm verilerinden yararlanılarak POLO bilgisayar paket programında (LeOra Software, 1994) LC₅₀, LC₆₀ ve LC₉₀ değerleri belirlenmiştir. Denemede kullanılan bütün popülasyonlar için LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerinin standart hassas popülasyona ait LC₅₀ ve LC₉₀ değerine oranlanması ile her pestisit için popülasyonların direnç oranları elde edilmiştir.

Seleksiyon çalışmaları: Popülasyonların LC değerleri belirlendikten sonra LC₆₀ değerlerini içeren amitraz konsantrasyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyon 10-12 petriye uygulanmıştır. Uygulama yapılan her bir petriye 40-50 ergin dişi birey aktarılmış ve 24 saat sonra canlı kalan bireyler uygulama yapılmamış barbunya fasulyesi yapraklarına aktarılıp üremeye bırakılmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanarak popülasyonun hızlı bir şekilde artması sağlanmıştır. Popülasyon yeterli birey sayısına ulaştıktan sonra tekrar LC değerleri belirlenmiş ve bu popülasyonlara da kendi LC₆₀ değeri uygulanarak seleksiyon çalışmalarına devam edilmiştir (Yang ve ark. 2002).

Çoklu direnç çalışmaları: Seleksiyon çalışmaları ile amitraz'a direnç kazandırılmış popülasyonun seçilen 6 pestisite karşı çoklu direnç geliştirip geliştirmediği incelenmiştir. Bu amaçla önce bu pestisitlere karşı dirençli popülasyonların ve hassas popülasyonun LC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Denemeler 7 doz +1 kontrol deseninde üçer tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Herbir petriye 25-35 ergin dişi birey aktarılmıştır. Dirençli popülasyonlarının LC₅₀'lerinin hassas popülasyonun LC₅₀' sine oranlanmasıyla çoklu direnç oranları bulunmuştur.

Sinerjist + Pestisit çalışmaları: Direnç kazandırılan ve hassas popülasyon (GSS)'da bazı sinerjistlerin amitraz üzerine etkisi incelenmiştir. Sinerjistlerin uygulanmasında Kim ve ark. (2004)' den alınan metot değiştirilerek uygulanmıştır. Sinerjist çalışmalarında piperonyl butoxide (PBO), S-Benzyl-O,O-diisopropyl phosphorothioate (IBP) ve triphenyl phosphate (TPP) kullanılmıştır. Sinerjistler; PBO 125 µl/l, IBP 100 µl/l ve TPP 62.5 mg/l dozlarında hazırlanmıştır. Sinerjistler 1:1 oranında aseton: saf su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan sinerjist çözeltileri

ilaçlama kulesinde 6 cm çapındaki plastik petrinin alt ve üst kapağına 1 ml olmak üzere toplam 2 ml olarak püskürtülmüştür. Petriler 1 saat kurumaya bırakıldıktan sonra hazırlanan 7 farklı pestisit konsantrasyonu petrilerin tabanına ve kapağına uygulanmıştır. Kontrolde sadece sinerjist kullanılmıştır. Petrilere 25-35 adet dişi birey aktarılmıştır. Denemeler üçer tekerrürlü olarak yürütülmüştür. *T. urticae* popülasyonlarının 24 saat sonra belirlenen ölüm verilerinden yararlanılarak POLO bilgisayar paket programında LC₅₀ değerleri belirlenmiştir (LeOra Software 1994). Sinerjistik etki oranı= Sinerjistsiz LC₅₀ / Sinerjistli LC₅₀ formülü ile hesaplanmıştır (Kim ve ark. 2004).

Direnç kalıtım çalışmaları: Direncin döllerle aktarımını ve geriye dönüşümünü belirlemek için dirençli ve hassas popülasyonlar arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır. Çalışma için öncelikle hassas ve dirençli popülasyonların pestisitlere karşı duyarlılıkları belirlenmiştir. Daha sonra 9 cm çapındaki petrilerin tabanına pamuk konmuş ve ıslatılmıştır. Tabanı pamukla kaplı petrilere temiz barbunya fasulyesi yaprağı alt yüzeyi yukarı gelecek şekilde konmuştur. Dirençli popülasyonda resiprokal çaprazlamalar için 20 adet petri hazırlanmıştır. Her bir petrideki yaprağın üzerine dirençli popülasyondan 20 adet deutoniimf dişi birey ve hassas popülasyondan 30 adet ergin erkek birey aktarılmıştır. Ayrıca dirençli popülasyondan erkek birey ve hassas popülasyondan dişi birey aktararak işlemin tam tersi yapılmıştır. Bu süreçte diploid dişiler haploid erkekler tarafından döllenmiştir. 5 gün sonra yapraklar üzerindeki ergin bireyler uzaklaştırılmış ve dişi bireylerin bıraktıkları yumurtalar açıldıktan sonra yeni nimfler saksılardaki barbunya fasulyesi bitkileri üzerine aktarılmıştır. Bu şekilde F1 dölleri elde edilmiştir. Bireyler ergin olduğunda LC₅₀ değerleri belirlenmiş ve hassas popülasyonun LC₅₀ değeri ile karşılaştırılmıştır (Van Leeuwen ve ark. 2004). Her iki çaprazlamadan sonra F1 dişilerinde direncin kalıtımı; $D = (2X_2 - X_1 - X_3) / (X_1 - X_3)$ formülü ile hesaplanmıştır (Stone 1968' e atfen Sato ve ark. 2004). X₁= Dirençli ırkın LC₅₀ değerinin log₁₀' u, X₂= F1 dişilerinin LC₅₀ değerinin log₁₀' u, X₃= Hassas ırkın LC₅₀ değerinin log₁₀' u, ifade etmektedir. Baskınlık derecesi -1 ile +1 arasında değişmektedir. -1<D>0: eksik çekinik karakter, 0: Baskınlık yok (nötr), 0<D>+1: eksik dominant karakter anlamına gelmektedir.

2. Biyokimyasal çalışmalar

Microplate assay ile toplam esteraz, GST ve P450 enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Toplam esteraz enzimi aktivitesinin incelenmesi: Kinetik esteraz aktivitesinin belirlenmesinde α - naphtyl acetate kullanılarak 96 hücreli düz tabanlı mikropalakada Stumpf ve Nauen,

(2002)' in geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. 20 adet ergin dişi %0.1 Triton X-100 içeren 100 µl sodyum fosfat buffer (0.1M, pH 7.5) içinde eppendorf tüplerde ezilmiştir. Bu homojenat 10000 g ve +4 °C' da 5 dakika santrifüj edildikten sonra 10 kez seyreltilerek supernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Supernatant ve 0.2 M fosfat buffer (pH 6)' dan 25' er µl mikrolakanın 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' in ilavesiyle elde edilmiştir. Enzim aktivitesi 25 °C ve 450 nm' de 10 dakika süreyle okunmuştur. Kontrol hücreleri ise homojenatsız olarak okunmuştur.

GST enzimi aktivitesinin incelenmesi: *T. urticae* popülasyonlarında 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) içinde eppendorf tüplerde ezilmiştir. 100 µl supernatant 10000g ve +4 °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 mikrolate hücrelerine konulmuştur. CDNB % 0.1 (v/v) ethanolde hazırlanmıştır ve final konsantrasyonda 0.4 mM CDNB bulunmaktadır. Reduced glutathione (GSH) Tris HCL buffer de hazırlanmıştır ve final konsantrasyonda 4 mM GSH bulunmaktadır. Kontrol hücrelerinde ise sadece CDNB ve GSH homojenatsız okunmuştur. Absorbanstaki değişim 340 nm de 25 °C de 5 dk' da okunarak belirlenmiştir.

Monooksijenaz enzimi aktivitesinin incelenmesi: Sitokrom P450 monooksijenaz (P450) enziminin belirlenmesinde substrat olarak p-nitroanisol O- demethylation (PNOD) kullanılmıştır. Bu enzimin belirlenmesinde Rose ve ark. (1995) uyarlanarak kullanılmıştır. P450 aktivitesi için popülasyondan yaklaşık 50 adet kırmızıörümcek dişisi eppendorf tüpe alınarak 200 µl homojenizasyon buffer' da (0.05 M Tris-HCl + %1.15 KCl + 1mM EDTA pH (7.7)) ezilerek +4 °C' de 10000 g' de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. PNOD (p-nitroanisol) denemesi için mikrolatenin her kuyucuğuna 90 µL enzim kaynağı + 100 µL 2mM p-nitroanisol eklenerek karışım 30 °C' de 3 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon 10 µL 9.6 mM NADPH eklenerek başlatılmıştır. Enzim aktivitesi 405 nm' de 30 °C' de 15 dk 34 sn aralıklarla okunmuştur.

Her üç enzimin aktivitesi' de Bradford (1976)' a göre bovine serum albumin (BSA) 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 karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

Araştırma Bulguları

1. Biyoassay çalışmaları

Seleksiyon sonuçları: Amitraz ile *T. urticae*' nin BEŞ popülasyonu 15 kez seleksiyon yapılmıştır (Çizelge 1). BEŞ popülasyonun 15 seleksiyon sonunda amitraz' ın LC₅₀ değeri 1068.51' den 2378.27 µl/100 ml suya yükselmiştir. Amitraz direnç oranı ise 14.39 kattan 32.02 kata yükselmiştir. Amitraz ile seleksiyon yapılarak dirençli hale getirilen dirençli popülasyona AMT 15 ismi verilmiştir.

Çoklu direnç: AMT 15 popülasyonunda en yüksek çoklu direnç abamectin' e (8.38 kat) karşı belirlenmiştir. Abamectini 6.37 kat ile propargite, 3.53 kat ile chlorpyriphos, 3.43 kat ile clofentezine, 1.91 ile fenpyroximate takip etmiştir. Buna karşın bifenthrin' e hassasiyet olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2).

Sinerjist + amitraz sonuçları: Direnç kazandırılan AMT 15 ve hassas GSS popülasyonunda PBO, IBP ve TPP sinerjistlerinin amitraz ile birlikte sinerjistik etkileri incelenmiştir.

AMT 15 popülasyonuna amitraz ve PBO, IBP, TPP sinerjistleriyle yapılan uygulama sonucu PBO en yüksek sinerjistik etkiyi (1.47 kat) göstermiştir. Diğer sinerjistlerin etkisi ise sınırlı kalmıştır. Çalışmada GSS popülasyonunda elde edilen sonuçlara göre en yüksek sinerjistik etkinin IBP (1.64 kat) uygulaması sonucu elde edilmiştir. IBP sinerjistini TPP 1.27 kat ile takip etmiştir. PBO sinerjisti ise sinerjistik etki göstermemiştir (Çizelge 3).

Direnç kalıtım çalışmaları: GSS ve AMT 15 popülasyonlarının resiprokal çaprazlamaları sonucu elde edilen veriler Çizelge 4' de verilmiştir. Her iki çaprazlama sonucunda 0<D>1 arasında olduğu için amitraz direnç kalıtımının eksik dominant karakterli olduğu belirlenmiştir.

2. Biyokimyasal Çalışmalar

Biyokimyasal analizler sırasında BEŞ popülasyonunun toplam esteraz, GST ve P450 enzim aktiviteleri microplate yöntemiyle belirlenmiştir.

Çizelge 1. BEŞ popülasyonun ve seleksiyon popülasyonlarının amitraz'a karşı belirlenmiş LC değerleri ve direnç oranları

Popülasyon	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 ₉₀ RR	LC ₉₀ RR
Beş	744	1.19±0.13	1068.51 626.42- 1640.23	1741.30 1110.06-2737.01	12637.31 6864.76-36053.20	14.39	20.49
Seleksiyon 1	734	1.02±0.10	1537.24 1175.15-2055.36	2718.51 2034.72-3881.46	27489.28 15544.20-62244.65	20.70	44.57
Seleksiyon 2	724	1.04±0.10	1682.12 1308.16-2225.10	2364.643 1857.48-3145.13	28065.91 16125.80-61526.97	22.65	45.51
Seleksiyon 3	724	1.00±0.10	1753.91 1333.99-2361.90	3126.206 2324.32-4513.13	32638.779 18145.61-76206.50	23.62	52.92
Seleksiyon 4	633	1.00±0.10	1801.96 1370.54-2426.61	3211.85 2388.01-4636.77	33532.99 18642.75-78294.34	24.26	54.37
Seleksiyon 5	528	0.92±0.10	1870.09 1375.54-2653.80	3519.59 2496.09-5531.89	45820.807 22456.43-136066.83	25.18	74.29
Seleksiyon 6	724	1.16±0.11	1814.56 1401.71-2394.09	2992.84 2372.99-3932.19	22805.49 13675.038-47393.868	24.43	36.97
Seleksiyon 7	719	1.99±0.11	1806.96 986.77-3325.89	3250.19 1857.18-7056.57	35209.81 13407.38-26948.11	24.33	57.09
Seleksiyon 8	713	1.34±0.12	2125.19 1681.11-2699.60	3283.211 2588.95-4309.65	19184.44 12730.86-33746.47	28.61	31.10
Seleksiyon 9	719	1.33±0.13	2218.35 1707.94-2851.15	3430.35 2671.55-4519.61	20120.58 13276.70-36251.40	29.87	32.62
Seleksiyon 10	720	1.43±0.13	1891.68 1156.01-2903.08	2839.50 1841.40-4979.67	14761.59 8133.41-43626.57	25.47	23.93
Seleksiyon 11	721	1.49±0.12	1800.48 1239.98-2591.24	2657.35 2182.04-3296.98	12899.51 7539.28-31654.94	24.24	20.91
Seleksiyon 12	721	1.68±0.15	1912.47 1171.80-2887.22	2701.87 1767.34-4266.10	10982.92 6391.07-30492.59	25.75	17.72
Seleksiyon 13	720	1.59±0.12	1876.54 1169.56-2981.33	2708.40 1749.59-4647.73	12007.50 6465.72-39088.49	25.26	19.47
Seleksiyon 14	720	1.51±0.12	2128.70 1377.14-3250.93	3127.01 2086.18-5107.95	14892.28 8207.21-43840.78	28.66	24.14
AMT 15	720	1.67±0.13	2378.27 1672.23-3356.63	3372.90 2417.26-4982.79	13926.63 8529.159-31308.917	32.02	22.58
GSS (hassas)	655	1.39±0.14	74.26 43.35 - 121.44		616.71 307.60 - 2588.46	-	-

n*: denemede kullanılan birey sayısı, ** Direnç oranı= Tarla popülasyonu LC₅₀ veya LC₉₀/ Hassas popülasyon LC₅₀ veya LC₉₀

Çizelge 2. Amitraz'a dirençli AMT 15 popülasyonun diğer pestisitlere karşı gösterdiği LC₅₀ değerleri ve direnç oranları

Pestisit	Popülasyon	n*	Eğim ± se	LC ₅₀ (µl/100ml) 0.95 güven aralığı	LC ₅₀ direnç oranı**
Chlorpyrifos	GSS	720	1.77±0.13	2.59 2.13-3.08	-
	AMT 15	720	1.16 ± 0.10	9.16 6.54-12.45	3.53
Abamectin	GSS	721	1.09±0.09	1.10 0.86-1.40	-
	AMT 15	720	1.33 ± 0.10	9.25 6.95-12.25	8.38
Clofentezine	GSS	716	1.38±0.10	2.86 2.32-3.47	-
	AMT 15	720	1.13 ± 0.11	9.83 7.80-12.23	3.43
Fenpyroximate	GSS	720	1.34±0.10	6.61 5.42-7.98	-
	AMT 15	720	1.175± 0.10	12.70 10.13-15.85	1.91
Propargite	GSS	724	1.21±0.10	12.75 10.17-15.82	-
	AMT 15	720	1.62 ± 0.12	81.30 60.678-107.981	6.37
Bifenthrin	GSS	527	1.49±0.15	54.53 34.03 - 85.54	-
	AMT 15	720	1.228 ± 0.103	15.45 12.36 -19.14	-

n*: denemede kullanılan birey sayısı

** Direnç oranı= Tarla popülasyonu LC₅₀ / Hassas popülasyon LC₅₀

Çizelge 3. Amitraz'e dirençli AMT 15 popülasyonunda amitraz ve amitraz +sinerjist'lerin LC₅₀ 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*
AMT 15					
Amitraz (sinerjistsiz)	720	1.67±0.13	2378.27 1672.23-3356.63	13926.63 8529.15-31308.91	—
Amitraz +PBO	720	1.11±0.10	1612.90 1163.38-2226.56	22580.804 12714.32-54620.85	1.47
Amitraz +IBP	720	1.38±0.11	2136.34 1610.34-2858.77	18112.67 11249.80-36639.71	1.11
Amitraz +TPP	720	1.32±0.11	2093.37 1679.07-2606.19	19420.67 13346.09-32093.92	1.13
GSS					
Amitraz (sinerjistsiz)	724	1.50±0.11	30.03 24.63 – 36.20	212.66 160.26 – 304.95	—
Amitraz +PBO	721	1.74±0.13	30.08 24.79 – 36.00	162.75 126.700 – 223.45	—
Amitraz +IBP	719	1.37±0.11	18.24 14.25 – 22.73	156.69 115.52 - 231.94	1.64
Amitraz +TPP	720	1.43±0.11	23.52 18.98 – 28.71	184.50 136.63 – 271.71	1.27

*Sinerjist etki oranı(SR)= amitraz (sinerjistsiz) LC₅₀/ amitraz + sinerjist LC₅₀

Çizelge 4. GSS, AMT 15, F1 popülasyonlarını amitraz'a karşı belirlenmiş LC değerleri ve direnç oranları

Popülasyon	n*	Eğim ± se	LC ₅₀ (µl/100ml) 0.95 güven aralığı	LC ₉₀ (µl/100ml) 0.95 güven aralığı	LC50 RR**	D***
AMT 15	720	1.67±0.13	2378.27 1672.23-3356.63	13926.63 8529.15-31308.91	79.18	—
F₁ (AMT 15 ♀ X GSS ♂)	720	1.45 ±0.11	1024.032 747.397-1366.145	7763.230 5067.035-14552.749	13.78	0,64
F₁ (GSS ♀ X AMT 15 ♂)	723	1.42 ±0.11	1092.38 877.21-1338.63	8728.523 6422.660-12984.692	14.71	0.61
GSS (hassas)	724	1.50±0.11	30.03 24.63 – 36.20	212.66 160.26 – 304.95	—	—

n* : denemede kullanılan birey sayısı

**Direnç oranı = Dirençli popülasyonu LC₅₀ / Hassas popülasyonun LC₅₀,

***Dominantlık derecesi

Toplam esteraz, GST ve P450 enzimlerinin aktivitelerinin incelenmesi: GSS, BEŞ ve AMT 15 popülasyonlarında toplam esteraz, GST ve P450 enzimlerinin aktivitelerine ait sonuçlar Çizelge 5'de verilmiştir. Her üç enzimin aktivitesi de amitraz dirençli AMT 15 popülasyonunda başlangıç popülasyonu BEŞ'e göre istatistiksel olarak önemli miktarda artmıştır. Her üç enzimin de aktivitesi başlangıç ve hassas popülasyonda istatistiksel olarak aynı olmuştur (P>0.05). AMT 15 popülasyonunda en fazla artan enzim aktivitesi P450 enziminde olmuştur. AMT 15 popülasyonunda hassas popülasyon GSS'ye göre 29.24 kat P450 enzim aktivitesi belirlenmiştir.

Tartışma

Etkili bir direnç yönetim programı için zararlıların pestisitlere direnç geliştirip geliştirmeyeceği, direnç belirlene yöntemlerine, direnç gelişiminin erken belirlenmesine ve direnç mekanizmalarının bilinmesine bağlıdır (Vontas ve ark. 2000). Esteraz, GST ve P 450 enzimleri bir çok pretroid ve organik fosforlu insektisit detoksifikasyonunda rol oynamaktadır (Wheelock ve ark. 2005; Konanz ve Nauen 2004). Bu çalışmada amitraz karşı *T. urticae*'nin popülasyonunda direnç gelişimi, direnç kalıtımı, amitraz'ın bazı sinerjistler ile etkileşimi ve bazı enzimlerin bu pestisitlerin detoksifikasyonunda rol oynayıp oynamadığı incelenmiştir.

Çizelge 5. GSS, BEŞ ve AMT 15 popülasyonlarının esteraz, GST ve P450 enzimlerinin aktiviteleri^a

Enzime	Popülasyon	n ^b	Enzim aktivitesi (±SE) mOD/min/mg proteins	R/S ^c
Esterase	GSS	5	10.35 (±0.82) b	1.00
	BEŞ	4	12.65 (±0.82) b	1.22
	AMT 15	3	22.75 (±0.95) a	2.19
GST	GSS	5	13.73(±0.32) ab	1.00
	BEŞ	5	13.58 6 (±0.32) b	0.99
	AMT 15	5	14.67 (±0.32) a	1.07
P450	GSS	4	0.00157 (±0.004) b	1.00
	BEŞ 2	3	0.00195 (±0.005) b	1.24
	AMT 15	4	0.04590 (±0.004) a	29.24

^a enzim aktivitelerini gösteren rakamların yanındaki harfler her enzim grubunun kendi içinde geçerlidir (P<0.05).

^b n tekrür sayısı

^cR/S: dirençli popülasyonun enzim aktivitesi/ hassas popülasyonun enzim aktivitesi

T. urticae'nin AMT 15 adı verilen popülasyonu, BEŞ popülasyonun amitraz ile seleksiyonu sonucu elde edilmiştir. AMT 15 popülasyonun direnç oranı GSS' ye göre 32.02 kat olarak belirlenmiştir. Ay (2005), Antalya' daki seralardan topladığı 6 *T. urticae* popülasyonu üzerinde yaptığı duyarlılık çalışmasında amitraz' a karşı 1.15 kat ile 34.09 kat arasında duyarlılık kaybı belirlemiştir. AMT 15 popülasyonunda uygulanan 6 kimyasal arasında, en fazla 8.38 kat direnç oranı ile abamectin'e ikinci sırada ise 6.37 kat ile propargite karşı çoklu direnç belirlenmiştir. Ay (2006) BEŞ popülasyonu 2003 yılında laboratuvara ilk getirdiğinde abamectine 1.71 kat, propargite ise 1.56 kat dirençli oluşunu rapor etmiştir. Chlorpyriphos, clofentezine ve fenpyroximate'e ise düşük oranda çoklu direnç bulunmuştur. Bu sonuçlara göre daha önce amitraz uygulaması yapılmış Bifenthrin'e ise hassasiyet oluştuğu saptanmıştır. Van Leeuwen ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada amitraz kullanılan alanlarda chlorfenapyr kullanımının direnç riski taşıdığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre daha önce amitraz uygulaması yapılmış alanlarda bifenthrin etkili maddesi içeren ilaçlar kullanılabilir. Bifenthrin' e karşı oluşan duyarlılık daha az pestisit kullanılmasına olanak sağlayacaktır. AMT 15 popülasyonunda yapılan resiprokal çaprazlama sonucu elde edilen verilere göre GSS ♂ × AMT 15 ♀ ve GSS ♀ × AMT 15 ♂ bireylerinden elde edilen F₁ popülasyonlarının D değerleri sırasıyla 0,64 ve 0.61 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar direncin cinsiyete bağlı olmadan eksik dominant karakterli taşıdığını göstermektedir. Amitraz direncinin *Panonychus citri* (McGregor)'da eksik dominant karakterli olduğu belirtilmiştir (Inoue 1984). Li ve ark. (2005) ise amitraz direncinin *Boophilus microplus* (Canestrini), eksik çekinik genle taşıdığını bildirmişlerdir. Jonsson ve Hope (2007) ise amitraz direnç kalıtım karakterinin *B. microplus*'da belirsiz olduğunu rapor etmiştir. Van Leeuwen ve ark. (2006), *T. urticae*'nin bifenazete dirençli erkek ve hassas dişileri çaprazladıklarında bifenazete direncinin dominant karakterli, buna karşın hasas erkek ve

dirençli dişileri çaprazladıklarında çekinik karakterli olduğunu bildirmişlerdir. Mikroplate readerla yapılan enzim okumalarında da en az esteraz enzimi aktivitesi 10.35 mOD/min/mg ile GSS popülasyonunda görüldürken AMT 15 popülasyonunda 22,74 mOD/min/mg ile en yüksek enzim aktivitesi belirlenmiştir. AMT 15 popülasyonunda hassas GSS ve başlangıç popülasyon BEŞ popülasyonuna göre GST enzimi aktivitesinde önemli ölçüde artış olmuştur. Ancak AMT popülasyonunda en fazla artış P450 enziminde olmuştur (29.25 kat). AMT 15 popülasyonunda yapılan sinerjistik uygulamalarında en yüksek sinerjistik etkinin PBO tarafından yapıldığı ve IBP ve TPP sinerjistiklerinin birbirlerine çok yakın sonuçlar vererek yaklaşık aynı sinerjistik etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. GSS popülasyonuna yapılan sinerjistik + amitraz uygulamasında ise en yüksek etkinin 1,64 kat ile IBP tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlarda amitraz direncinin her üç enzim tarafından da belli oranda kontrol edildiğini özellikle P450'inin amitraz direncinde etkili bir direnç mekanizması olduğunu göstermektedir. Amitrazın PBO ile yüksek sinerjistik etki göstermesi de bunu desteklemektedir. Li ve ark. (2004) amitraz dirençli ve hassas *Boophilus microplus* popülasyonları ile yaptıkları çalışmada TPP ve PBO'nun amitraz ile önemli derecede sinerjistik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Jonsson ve Hope (2007) *B. microplus*'da amitraz direnç mekanizmasının bilinmediğini belirtmiştir. Buna karşın *T. urticae*'de bir çok akarisit direnci ile detoksifikasyon enzimleri arasında pozitif ilişki olduğu ortaya konmuştur. Kim ve ark. (2004) *T. urticae*'de fenpyroximate direncinde P450 ve esteraz enziminin rol oynadığını ve PBO'nun fenpyroximate ile yüksek derecede sinerjistik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar IBP ve TPP'nin fenpyroximate dirençli *T. urticae*'de sırasıyla 3.6 ve 4.4 kat sinerjistik etki gösterdiğini fakat hassas popülasyonda sinerjistik etki göstermediğini rapor etmişlerdir. Van Leeuwen ve Tirry (2007) *T. urticae*'de bifenthrin direncinde esteraz enziminin rol oynadığını

bildirmiştir. Van Pottelberge ve ark. (2009) *T. urticae*'de spirodiclofen direncinde P450, esteraz ve GST enzimlerinin rol oynadığını belirlemiştir. Amitraz'ın *T. urticae*'de kalıtım tipi ve direnç mekanizması ile ilgili literatür bulunamamıştır. Bu konu ile ilgili veriler ilk defa sunulmaktadır.

Sonuç olarak, kırmızıörümceklerin hangi pestisit gruplarına karşı direnç kazandıklarını belirlemek için bu yöndeki çalışmalara devam edilmesi gerekmektedir. Böylece yüksek oranda direnç gelişimine neden olan pestisit yerine etki mekanizması farklı pestisitler alternatif olarak kullanılarak direnç yönetim programları oluşturulmalıdır.

Kaynaklar

- 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. *Journal of Pest Science* 78: 139-143.
- Ay, R., E. Sökeli, İ. Karaca and M. O. Gürkan. 2005. Response to some acaricides of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) from protected vegetables in İsparta. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29: 165-171.
- Ay, R. 2006. Antalya ili örtüaltı sebze üretim alanlarında zararlı olan *Tetranychus urticae* Koch populasyonlarının bazı akarisitlere karşı tepkileri. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 12 (3): 301-306.
- Anonymous. 2002. Bitki Koruma Ürünleri. TİSİT.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Fergusson-Kolmes, L. A., J. G. Scott and T. J. Dennehy. 1991. Dicofol resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and pharmacokinetics. *Journal of Economic Entomology* 84: 41-48.
- Inoue, K. 1984. Resistance to amitraz in the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) in relation to population genetics. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 28: 260-268.
- Jonsson N. N. and M. Hope. 2007. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 146: 193-198.
- Kabir, K.H. and R. B. Chapman. (1997) Operational and biological factors influencing responses of spider mites (Acari: Tetranychidae) to propargite by using the petri dish - Potter tower method. *Journal of Economic Entomology* 90:272-277.
- Kang, C.Y., G. Wu and T. Miyata. 2006. Synergism of enzyme inhibitors and mechanisms of insecticide resistance in *Bemisia tabaci*. (Gennadius.) (Hom., Aleyrodidae). *Journal of Applied Entomology* 130: 377 – 385.
- Kim, Y. J., S. H. Lee, S. W. Lee and Y. J. Ahn. 2004. Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): Cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. *Pest Management Science* 60: 1001-1006.
- Konanz, S. and R. Nauen. 2004. Purification and partial characterization of a glutathione S-transferase from the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 79: 49-57.
- Kumral, N. A. and B. Kovancı. 2007. Susceptibility of female populations of *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae) to some acaricides in apple orchards. *Journal of Pest Science* 80: 131-137.
- LeOra Software, 1994. POLO-PC: A User's Guide to Probit or Logit Analysis LeOra Software, 28 p., Berkeley, CA.
- Li, A. Y., Davey, R. B., Miller, R. J. and J. E. George. 2004. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 41(2):193-200.
- Li, A. Y., Davey, R. B., Miller, R. J. and J. E. George. 2005. Mode of inheritance of amitraz resistance in a Brazilian strain of the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* 37: 183-198.
- Öncüer, C. 2004. Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, No: 19, 424s. Aydın.
- Rose, R., L. Barbhaya, R. Roe, G. Rock and E. Hodgson. 1995. Cytochrome P-450-associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 51: 178-191.
- SAS, 1999. Statistical Analysis Systems User's Guide (8th ed). SAS Institute INC., Raleigh, North Carolina, USA.
- Sato, M. E., T. Miyata, M-D. Silva, A. Raga and M. F. S. Filho. 2004. Selection for fenpyroximate resistance and susceptibility, inheritance, cross-resistance and stability of fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Appl. Entomol. Zool.* 390 293-302.
- Stumpf, N. and R. Nauen. 2002. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72: 111-121.

- Van Leeuwen, T., V. Stillatus and L. Tirry. 2004. Genetic analysis and cross-resistance spectrum of a laboratory-selected chlorfenapyr resistant strain of two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Experimental & Applied Acarology*, 32: 249-261.
- Van Leeuwen, T., S. Van Pottelberge and L. Tirry. 2005. Comparative Acaricide Susceptibility and Detoxifying Enzyme Activities in Field-Collected Resistant and Susceptible Strains of *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science* 61: 499-507.
- Van Leeuwen, T., L. Tirry and R. Nauen. 2006. Complete maternal inheritance of bifentate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and its implications in mode of action considerations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 869-877.
- Van Leeuwen, T. and L. Tirry. 2007. Esterase-mediated bifenthrin resistance in a multiresistant strain of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science* 63:150-156.
- Van Pottelberge, S., T. Van Leeuwen, J. Khajehali and L. Tirry. 2009. Genetic and biochemical analysis of a laboratory-selected spiroticlofen-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Pest Management Science* 65: 358-366.
- Wang, L. and Y. Wu. 2007. Cross-resistance and biochemical mechanisms of abamectin resistance in the B-type *Bemisia tabaci*. *Journal of Applied Entomology* 131: 98-103.
- Vontas, J. G., A. A. Enayati, G. J. Small and J. Hemingway. 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.
- Wheelock, C., E., G. Shan and J. Ottea. 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *Journal of Pest Science* 30: 75-3.
- Yang, X., L. L. Buschman, K. Y. Zhu and D. C. Margolies. 2002. Susceptibility and detoxifying enzyme activity in two spider mite species (Acari : Tetranychidae) after selection with three insecticides. *Journal of Economic Entomology* 95 (2): 399 - 406.
- Young, S. J., R. V. Gunning and D. G. Moores. 2005. The effect of piperonyl butoxide on pyrethroid – resistance – associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) *Pest Management Science*. 61:397 – 401.

İletişim Adresi:

Recep AY
Süleyman Demirel Üniversitesi
Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü-Isparta
Tel: 0 246 211 48 52
E-posta: recepay@ziraat.sdu.edu.tr