



Araştırma Makalesi/Research Article

İki Noktalı Kırmızıörümcek *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de Diflovidazin Direnci ve I1017F Mutasyonu

Sibel Yorulmaz^{1*}  Emre İnak²  Tuba Albayrak¹  Zeynep Selvioğlu¹ 

¹Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta

²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ankara

*Sorumlu yazar: sibelyorulmaz@isparta.edu.tr

Geliş Tarihi: 06.04.2021

Kabul Tarihi: 23.09.2021

Öz

İki noktalı kırmızıörümcek *Tetranychus urticae* birçok üründe önemli kayıplara neden olan polifag bir zararlıdır. Ülkemizde bu zararlının kontrolünde kimyasal mücadele ilk sırada yer almaktadır. Diflovidazin etken maddesi akarisit olup, ülkemizde yakın bir tarihte Avrupa kırmızıörümceği *Panonychus ulmi* (Acari:Tetranychidae)'ye karşı elmada ruhsat almıştır. Ancak elma bahçelerinde dönemsel olarak *Tetranychus urticae* zararı olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle diflovidazinin *Tetranychus urticae* üzerindeki etkilerinin ne olduğunun bilinmesi son derece önem taşımaktadır. Bu çalışmada diflovidazin etken maddesinin laboratuvar koşullarında seleksiyon baskısı sonucunda *T. urticae*'de direnç gelişimi ve dirençle ilişkili olabileceği düşünülen I1017F mutasyonunun moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hassas *T. urticae* popülasyonunda diflovidazin tarla uygulama dozu ile bioassay denemeler kurularak LC değerleri belirlenmiştir. Belirlenen LC₆₀ değerleri ile kırmızıörümcek popülasyonu selekte edilerek dirençli popülasyon elde edilmeye çalışılmıştır. Son seleksiyon popülasyonunda PCR çalışmaları ile I1017F mutasyon varlığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda diflovidazin ile üç kez selekte edilmiş *T. urticae* popülasyonunda 9,68 kat direnç gelişimi belirlenmiştir. Ancak moleküler çalışmalar sonucunda diflovidazin dirençli popülasyonda I1017F mutasyonu bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Tetranychus urticae*, Diflovidazin, Direnç, Mutasyon

Two spotted spider mites Diflovidazine Resistance and I1017F Mutation in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)

Abstract

Two spotted spider mites *Tetranychus urticae* is a polyphagous pest that causes significant losses in many agricultural products. Chemical control takes the first place in the control of this pest species in Turkey. The active ingredient of diflovidazine is an acaricide and has recently been licensed in apple orchards against the European red spider mite, *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae) in Turkey. However, it is known that there is a periodic damage to *T. urticae* in apple orchards. Therefore, knowing the effects of diflovidazine on *T. urticae* is of utmost importance. In this study, it was aimed to determine the I1017F mutation which has been thought to be associated with insecticide resistance in *T. urticae* as a result of the selection pressure of diflovidazine active substance under laboratory conditions. For this purpose, in the susceptible *T. urticae* population, bioassay experiments were established with diflovidazine field application dose and LC values were determined. Resistant population was obtained by selection with the determination of LC₆₀ values. In the last population, the presence of I1017F mutation has been determined with the help of PCR studies. At the end of the study, 9.68-fold resistance development was determined in *T. urticae* population that was selected three times with diflovidazine. However, as a result of molecular studies, the I1017F mutation was not found in the diflovidazine resistant population.

Keywords: *Tetranychus urticae*, Diflovidazine, Resistance, Mutation

Giriş

Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae), tarımsal üretimde önemli ekonomik kayıplara yol açan fitofag bir akar türüdür. İki noktalı kırmızıörümcek polifag bir zararlı olup, sebze, meyve ağaçları, endüstri bitkileri ve süs bitkilerinde verim kayıplarına neden olmaktadır (Keçeci, 2008). Bu tür sokucu emici ağız yapısına sahip olduğu için, stiletleri ile bitkilerin yaprak özsuyunu sokup emerek yaşamını devam ettirmektedir (Jeppson, 1975). Emgi sonucunda yapraklarda sararma, kıvrılma, özümlemede gerileme ve yaprak dökümü görülmektedir. Ülkemizde *T. urticae*'nin



kontrolünde genellikle kimyasal mücadele yapılmakta ve zararlıya karşı birçok ruhsatlı akarisit bulunmaktadır. Ülkemizde kırmızıörümcek mücadelesinde 2006 yılında 902 ton olan akarisit kullanımı 2017 yılında 2452 tona ulaşmıştır (Anonim, 2018). Dünyada ise 2013 yılında dünya akarisit marketi değerinin 900 milyon Euro olduğu belirtilmiştir. (Van Leeuwen ve ark., 2015). *T. urticae*, döl sayısının çok olması, fazla yumurta bırakması, kısa yaşam döngüsü, arhenotoki üreme şekli ile çoğalması ve detoksifikasyon enzim yetenekleri sayesinde çok kısa süre içerisinde akarisitlere karşı direnç geliştirebilmektedir (Van Leeuwen ve ark., 2010). Bunun yanı sıra kimyasalların önerilen dozlarda kullanılmaması, farklı etki mekanizmalı akarisitlerin rotasyona sokulmaması ve ilaçlamanın tekniğine uygun yapılmaması gibi nedenler de zararlıda direnç gelişimini hızlandırmaktadır.

Pestisitlerin, Artropodlara etkisinin araştırılmasında fenotipik hassasiyet belirleme çalışmalarının yanında genotipik mekanizmaları bilme gerekliliğinin anlaşılması ile birlikte direnç çalışmalarında moleküler tekniklerin kullanımı gittikçe yaygınlaşmıştır. Böcek ve akarlarda insektisit direnç gelişiminde rol oynayan en önemli mekanizmalarından birisi de mutasyonlar ya da tek nükleotit polimorfizmidir. İnsektisit direncine yol açan mutasyonlar genetik varyasyon kökenli olabildiği gibi, yeni oluşan (de novo) bir nükleotit değişimi kaynaklı olarak da ortaya çıkabilmektedir (Hawkins ve ark., 2019). Mutasyonlar, insektisit/akaristin hedef etki yerinde yapısal değişiklikler yaparak toksik etkinin düşüşüne sebep olmaktadır (Van Leeuwen ve Dermauw, 2016). Öyle ki, genetik olarak aynı iki popülasyonda, sadece tek bir direnç mutasyonunun 15.000-kat insektisit direncine neden olduğu durumlar ortaya koyulmuştur (Douris ve ark., 2016). Genel olarak insektisit direnç mutasyonları, 1) Gendeki protein kodlayan dizilimi etkileyenler ve bu nedenle gen ürününün yapısını değiştirenler, 2) Gen ekspresyonunda artışa neden olanlar, 3) Gen ekspresyonunda düşüşe neden olanlar olarak sınıflandırılabilir (Feyereisen ve ark., 2015).

Artropodlarda direnç oluşum vakalarının %90'ından fazlası hedef bölge mutasyonlarından ya da detoksifikasyon enzim aktivitesi artışlarından kaynaklanmaktadır (Van Leeuwen ve ark., 2009; Van Leeuwen ve Dermauw, 2016). Zararlılarda insektisit direnç çalışmaları önceki yıllarda klasik metotlar ile yapılmasına karşın, moleküler tekniklerdeki yenilikler çalışmaların detayını arttırmayı sağlamıştır. Fitofag böcek ve akarlarda özellikle hedef bölge mutasyonlarının tespiti ve çalışmalar ile doğrulanması zararlı mücadelesinde kritik rol oynamaktadır. Direnç ile ilişkili olan mutasyonlarının tespit edilmesi, hızlı ve doğru bir şekilde popülasyonların dayanıklılık durumu ile ilgili bilgi vermektedir. Ayrıca, direnç mekanizmalarının anlaşılması ile birlikte, Entegre Mücadelede çok önemli olan biyolojik-kimyasal mücadelenin birlikte uygulanabilirliği ile ilgili rasyonel veriler elde edilebilecektir.

Diflovidazin IRAC (Insecticide Resistant Action Comite) sınıflandırmasına göre 10A grubu içerisinde yer alan ve büyüme düzenleyici olarak görev yapan bir akarisitir. Diflovidazin etken maddesi ülkemizde 2012 yılında elmada *Panonychus ulmi*'ye karşı ruhsatlandırılmıştır. Ancak elma bahçeleri içerisinde *T. urticae*'de zaman zaman ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Bu nedenle uygulanan diflovidazin etken maddesinin *T. urticae* üzerinde de etki yapabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, diflovidazin etken maddesinin *T. urticae*'de direnç gelişimi ve direncin büyüme düzenleyici akarisit direnci ile ilişkili olan I1017F mutasyonu ile bağlantısı belirlenmiştir.

Materyal ve Yöntem

***Tetranychus urticae* Popülasyonunun Orijini ve Yetiştirilmesi**

Çalışmada kullanılacak olan hassas *Tetranychus urticae*'nin kırmızı formu popülasyonu Bayer firmasından (Almanya) 2001 yılında elde edilmiştir. Popülasyon Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümündeki iklim odalarında herhangi bir pestisit baskısı olmadan 26±1°C sıcaklıkta, %60-65 orantılı nem ve 16:8 saat ışıklandırma periyodunda yetiştirilmektedir.

İnsektisit

Çalışmada diflovidazin etken maddesi içeren Flumite® (200 SC) (200 g/l) ticari preparatı kullanılmıştır.

Seleksiyon çalışmaları

Seleksiyon çalışmalarında Yorulmaz Salman ve Sarıtaş, (2014) tarafından uygulanan metod kullanılmıştır. Çalışmalarda *T. urticae*'nin hassas popülasyonu diflovidazin seleksiyonu için başlangıç popülasyonu olarak kullanılmıştır. Seleksiyon işlemi için öncelikle *T. urticae* popülasyonunda



diflovidazin'e karşı LC₅₀ değeri belirlenmiştir. Bu amaçla tüm denemelerden önce petri içerisinde fasulye yaprak diskleri üzerine aktarılan ergin dişilerin bıraktığı yumurtaların açılması sonucu elde edilen aynı yaştaki akar larvaları denemelerde kullanılmıştır. LC₅₀ denemeleri 1 kontrol+7 doz, her doz için 3 tekerrür olacak şekilde kurulmuştur. Diflovidazin uygulama dozu belirlenirken ilk dozda %90'dan az kontrol grubunda ise %10'dan fazla ölüm olmaması dikkate alınmıştır. Deneme süresinde yaprağın nem ihtiyacını karşılayabilmesi amacıyla Petri içerisine agar dökülerek soğutulmuştur. Agar üzerine ise 3 cm çapında fasulye yaprak diskleri konulmuştur. Her petri içerisine 25 adet *T. urticae* larvası eklenmiştir. Her doz için %50 seyreltilerek hazırlanan ilaç konsantrasyonları ile petri ilaçlama kulesi yardımıyla 1 bar basınçta yaprak yüzeyine 2 mL ilaç gelecek şekilde ilaçlama yapılmıştır. Deneme sonucunda ölü- canlı sayımları 7 gün sonra yapılmıştır. Bu ölü-canlı verilerinden yararlanılarak kırmızıörümcek popülasyonlarının LC₅₀ değerleri PoloPlus bilgisayar paket programında hesaplanmıştır. *T. urticae* popülasyonu için seleksiyon dozu olarak LC₆₀ değerleri kullanılmıştır. Seleksiyon işlemi için, tabanında agar ortamı bulunan 9 cm. çapındaki petriiler üzerindeki yaprak disklere 50 adet *T. urticae* larvası aktarılmıştır. LC₆₀ dozu petrilere ilaçlama kulesinde 1 bar basınç altında yaprak üzerine 2 mL olacak şekilde uygulanmıştır. Petriiler 26±1°C sıcaklıkta %60-65 nem ve 16:8 (A/K) fotoperiyot koşullarında 7 gün süreyle bırakılmıştır. Uygulamadan 7 gün sonra canlı kalan bireyler temiz fasulye bitkisi üzerine aktarılmıştır. LC₆₀ dozu her seleksiyon popülasyonu için yeniden belirlenerek popülasyonlar seleksiyon baskısına maruz bırakılarak direnç kazandırılmıştır.

I1017F mutasyonunun belirlenmesi

Diflovidazin direnciyle bağlantılı olabileceği düşünülen I1017F mutasyonunun belirleme işlemleri hassas ve seleksiyon sonrası elde edilen dirençli *T. urticae* popülasyonlarında yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu için Qiagen DNeasy Blood ve Tissue Kit kullanılmıştır. Öncelikle, 1.5ml'lik steril tüplere 100-150 adet ergin kırmızıörümcek bireyi aktarılmıştır. Ardından 20 µL Proteinase K ve 200 µL Buffer ATL (Qiagen) eklenmiş ve akarlar homojenize edilmiştir. Ezme işleminden sonra tüpler 56 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 200 µL buffer AL eklenerek 10 dakika daha inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra %96'lık ethanol eklenerek bütün hacim kit ile birlikte sağlanan içerisinde DNA tutmayı sağlayan filtre bulunan Spin Columlara aktarılmıştır. Sonrasında sırasıyla 500 µL AW1 ve AW2 ile yıkanmış ve santrifüj edilmiştir. Son olarak filtreler steril tüplere konularak Elution buffer ile süzölmüş ve DNA elde edilmiştir.

DNA'nın kalite ve kantitesi spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop 2000) ile belirlenmiş ve uygun görülen DNA'lar ile gen çoğaltma işlemine geçilmiştir. Çalışmada Kitin Sentaz 1 (CHS1) genini çoğaltmak için kullanılan primerler; TuCHS1_F, 5'- CTTCACCGTCTGCCGTATTT - 3' ve TuCHS1_R, 5'- CTTTCGTCGTTTGGTTTGG – 3' dizilimindedir (Van Leeuwen ve ark., 2012).

PCR işlemi; 2 µL DNA, 0.5 µL her iki primerden, 6 µL FIREPol® Master Mix (Solis Biodyne), 21 µL ultra saf su içeren toplam 30 µL hacimde Bio-Rad T100™ marka termal döngüleyici ile gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları ise; 94°C' de 2 dakika, 35 döngü 95°C'de 30 s, 54°C' de 30 s, 72°C'de 30 s ve son olarak 72°C'de 5 d olarak kullanılmıştır (İnak ve ark., 2019).

PCR ürünleri %1.5-2'lik agaroz jel elektroforezde 50 dakika süreyle koşturulmuştur. Uygun görülen örnekler için dizileme hizmeti alınmıştır (BMLabosis, Ankara). Elde edilen dizilimler BioEdit programı (Hall ve ark., 2011) ile hizalanarak referans dizilim ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca sekans kromotografalarının ham halleri de kontrol edilerek, I1017F mutasyonun varlığı araştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Seleksiyon sonuçları

Tetranychus urticae'nin hassas popülasyonunda diflovidazin seleksiyonu sonucunda belirlenen LC₅₀ değerleri ve direnç oranları Çizelge 1'de verilmiştir. Seleksiyon sonucu *T. urticae*'de LC₅₀ değerleri 3.68 ile 35.65 mg/ml değerleri arasında değişmiştir. Diflovidazin seleksiyonu sonucu elde edilen Seleksiyon 3 popülasyonunda 9.68 kat direnç belirlenmiştir. Seleksiyon 1 popülasyonunda eğim değeri 1.415±0.428, Seleksiyon 2 popülasyonunda 1.451±0.131 ve Seleksiyon 3 popülasyonunda ise 1.441±0.122 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 1. *Tetranychus urticae*'de diflovidazin seleksiyonu, LC değerleri ve direnç oranları



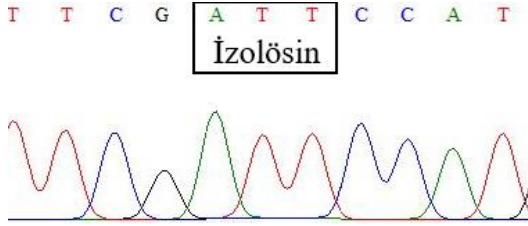
Popülasyon	n	Eğim	LC ₅₀	LC ₆₀	LC ₉₀	Direnç oranı
Hassas popülasyon	602	1.835±0.161	3.68	3.99	7.98	—
Seleksiyon 1	601	1.415±0.428	2.92-4.50 12.50 9.87-15.79	3.01-5.45 13.25 11.86-17.56	5.56-15.78 23.25 19.12-28.45	3.39
Seleksiyon 2	600	1.451±0.131	25.63 20.12-32.11	29.81 25.52-36.12	48.23 42.13-60.25	6.96
Seleksiyon 3	602	1.441±0.122	35.65 28.46-44.24	40.21 3.45-48.78	65.78 58.56-78.95	9.68

Akar büyüme düzenleyici akarisitler ergin öncesi dönemlere etkili olan ve yaygın kullanılan bir akarisit grubunu oluşturmaktadırlar (Douris ve ark., 2016). Literatürde *T. urticae*'de diflovidazin direncinin mekanizmasını belirlemeye yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak akar büyüme düzenleyici grubu içerisinde yer alan bazı akarisitlerle (etoxazole, hexythiazox, clofentezine gibi), ilgili yapılan araştırmalar mevcuttur. Zararlıların birkaç clofentezine uygulaması sonucunda bu akarSITE karşı direnç kazanabileceği belirtilmiştir (Herron ve ark. 1993). Yapılan başka bir çalışmada 23 tane *Panonychus ulmi* popülasyonunda clofentezine direnci belirlenirken, bu popülasyonlardan 19 tanesinde hexythiazoxa karşı çapraz direnç bulunmuştur (Thwaite, 1991). Nauen ve ark. (2001) çalışmalarında *T. urticae*'de seleksiyon baskısı sonucunda 770 kat clofentezine ve 1000 kat hexythiazox direnci geliştiğini bildirmişlerdir. Ay ve Kara (2011) laboratuvar koşullarında 12 kez seleksiyon sonucunda 105 kat clofentezine dirençli *T. urticae* elde etmişlerdir. Van Leeuwen ve ark. (2012) *T. urticae*'nin iki popülasyonunda 45 kat ve 375 kat etoxazole direnci belirlemişlerdir. Demaeght ve ark. (2014) *T. urticae* popülasyonunda 138 kat etoxazole, 2632 kat clofentezine ve 4166 kat hexythiazox direnci bulmuşlardır. Arazi ve laboratuvar koşullarında diflovidazinin de içinde yer aldığı büyüme düzenleyici grubu akarisit uygulamalarında seleksiyon baskısı sonucunda zararlı akarlarda yüksek oranda direnç gelişebildiği literatürde görülmektedir.

LC denemelerinden elde edilen eğim sonuçları zararlı popülasyonunun homojen ya da heterojen yapısı ile ilgili bilgi vermektedir. Buna göre eğim değeri >2 olan popülasyonların daha homojen yapıda olduğu, <2 olan popülasyonların ise daha heterojen yapıda oldukları bilinmektedir (Yu, 2008). Heterojen bir popülasyonda insektisit seleksiyon baskısı devam ettikçe popülasyon içerisinde hassas bireyler elemine olacağı için direnç geliştirme ihtimalinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Diflovidazin seleksiyonu sonucunda elde edilen 9.68 kat dirençli Seleksiyon 3 popülasyonunun eğim değerinin <2 olduğu görülmektedir. Bu sonuç dikkate alındığında heterojen yapıda özellik gösteren Seleksiyon 3 popülasyonunda diflovidazin baskısı devam ettiği sürece direncin artabileceği düşünülmektedir.

PCR Sonuçları

Leeuwen ve ark. (2020) tarımsal zararlı akarlarda insektisit ve akarisit direnç programlarının oluşturulabilmesi için moleküler tanının önemli olduğunu vurgulamışlardır. Bu nedenle son dönemlerde zararlı akar gruplarında akarisit direnç mekanizmalarının belirlenmesinde moleküler çalışmalarda hız kazanmıştır. Çalışmamızda PCR çalışmaları sonucundan 9.68 kat diflovidazin dirençli Seleksiyon 3 popülasyonunda 1017. pozisyon da ATT nükleotitlerinin varlığı yani hassas izolösün aminoasitinin bulunduğu belirlenmiştir. Moleküler çalışmalar incelendiğinde Seleksiyon 3 popülasyonunda I1017F mutasyonuna rastlanmadığı tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. PCR sonucu

Akar büyüme düzenleyici grup içerisinde yer alan akarisitlerin zararlıda moleküler hedef etki yerinin Kitin sentaz I geni (CHS1) olduğu ve bu gende meydana gelen I1017F mutasyonunun bu grup akarisitlere karşı dirence yol açtığı bilinmektedir (Van Leeuwen ve ark. 2012). Demaeht ve ark. (2014) *T. urticae*'de gelişen etoxazole, clofentezine ve hexythiazox dirençlerinde I1017F mutasyonunun rol oynadığını bildirmişlerdir. Literatürle benze şekilde büyüme düzenleyici akarisit direnç gelişiminden sorumlu olan I1017F mutasyonu ülkemiz *T. urticae* popülasyonlarında da tespit edilmiştir (Ilias ve ark., 2014; İnak ve ark., 2019; Alpkent ve ark., 2020). Ancak literatürde *T. urticae*'de diflovidazin direnci ve I1017F mutasyonu arasındaki ilişkinin belirlendiği çalışma bulunmamaktadır. Yapılan seleksiyon çalışması sonrası, diflovidazine karşı 9.38- kata kadar direnç artışı sağlanmış olsa da *T. urticae*'de I1017F mutasyonu tespit edilmemiştir. Bu nedenle diflovidazin direncinin detoksifikasyon enzimleri ya da diğer mekanizmalar tarafından gelişebileceği düşünülmektedir.

Sonuç ve Öneriler

Çalışma sonucunda *T. urticae*'de diflovidazin direnci ile akar büyüme düzenleyici grubu akarisitlerle bağlantısı olan I1017F mutasyonu arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ancak diflovidazin seleksiyonu sonucu elde edilen son popülasyonun yapısının heterojen olması nedeniyle seleksiyon baskısı devam ettikçe *T. urticae*'de direncin artabileceği düşünülmektedir. Clofentezine, hexythiazox ve etoxazolün de içerisinde yer aldığı bazı büyüme düzenleyici akarisitlere karşı gelişen direnç ile zararlıda CHS1 bölgesi üzerinde meydana gelen I1017F mutasyonu arasında bir bağlantı bulunmaktadır. Bu nedenle diflovidazin etken maddeli preparatların özellikle elma bahçelerinde mutasyonla bağlantılı olduğu bilinen akarisitlerle dönüşümlü olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Ancak zararlılarda gelişebilecek diflovidazin direnci ile ilgili olarak direncin detoksifikasyon enzimleri ile olan ilişkisinin de belirlenmesi gerektiği düşünülmektedir. Özellikle akarlarla mücadele iyi bir direnç yönetim programlarının oluşturulabilmesi için akarisitlerin direnç mekanizmalarının belirlenmesine yönelik daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

- Alpkent, Y.N., İnak, E., Ulusoy, S., Ay, R., 2020. Acaricide resistance and mechanisms in *Tetranychus urticae* populations from greenhouses in Turkey. *Syst. Appl. Acarol.* 25(1): 155-168.
- Anonim, 2018. TÜİK web sitesi: www.tuik.gov.tr, Erişim tarihi:19.03.2019
- Ay, R., Kara, E., 2011. Toxicity, inheritance and biochemistry of clofentezine resistance in *Tetranychus urticae*. *Insect Sci.* 18:503–511.
- Demaeht, P., Osborne, E. J., Odman-Naresh, J., Grbić, M., Nauen, R., Merzendorfer, H., Clark, R.M., Van Leeuwen, T., 2014. High resolution genetic mapping uncovers chitin synthase-1 as the target-site of the structurally diverse mite growth inhibitors clofentezine, hexythiazox and etoxazole in *Tetranychus urticae*. *Insect Biochemis. Mol. Bio.* 51: 52-61.
- Douris, V., Steinbach, D., Panteleri, R., Livadaras, I., Pickett, J. A., Van Leeuwen, T., Vontas, J., 2016. Resistance mutation conserved between insects and mites unravels the benzoylurea insecticide mode of action on chitin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sci.* 113 (51): 14692-14697.
- Feyereisen, R., Dermauw, W., Val Leeuwen, T., 2015. Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. *Pest. Bio. Physiol.* 121: 61-77.
- Hawkins, N.J., Bass, C., Dixon, A., Neve, P., 2019. The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 94: 135–155.
- Herron, G., Woolley, L., Langfield, K. and Chen, Y., 1993. First detection of etoxazole resistance in Australian two-spotted mite *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) via bioassay and DNA methods. *Austral Entomol.* 57(3): 365-368.
- Ilias, A., Vontas, J., Tsagkarakou, A., 2014. Global distribution and origin of target site insecticide resistance



- mutations in *Tetranychus urticae*. Insect Biochem. Mol. Bio. 48: 17-28.
- İnak, E., Alpkent, Y. N., Çobanoğlu, S., Dermauw, W., Van Leeuwen, T., 2019. Resistance incidence and presence of resistance mutations in populations of *Tetranychus urticae* from vegetable crops in Turkey. Exper. App. Acarol. 78(3): 343-360.
- Jeppson, L. Keifer, R., Baker, H.H., E.W., 1975. Mites injurious to economic plants. Univ of California Press.
- Keçeci, M., 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları Cilt3. Sebzelelerde kırmızı örümcekler. Başak matbaacılık, Ankara.
- Nauen, R., Stumpf, N., Elbert, A., Zebitz, C.P.W. and Kraus, W., 2001. Acaricide toxicity and resistance in larvae of dif-ferent strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi*(Acari: Tetranychidae). Pest Management Sci. 57: 253–261.
- Thwaite, W.G., 1991. Resistance to clofentezine and hexythia-zox in *Panonychus ulmi* from apples in Australia. Exper. Appl. Acarol. 11: 73–80.
- Van Leeuwen, T., Demaeght, P., Osborne, E. J., Dermauw, W., Gohlke, S., Nauen, R., Clark, R.M., 2012. Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. Proceedings of the National Academy of Sci. 109(12): 4407-4412.
- Van Leeuwen, T., Dermauw, W., 2016. The molecular evolution of xenobiotic metabolism and resistance in chelicerate mites. Ann. Rev.Entomol. 61: 475-498.
- Van Leeuwen, T., Dermauw, W., Mavridis, K., Vontas, J., 2020. Significance and interpretation of molecular diagnosticfor insecticide resistance management of agricultural pests. Insect Sci. 39: 69-76.
- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W., Tirry, L., 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. Insect Biochem. Mol. Bio. 40(8): 563-572.
- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Tirry, L., 2009. Mechanisms of acaricide resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. In Biorational Control of Arthropod Pests (pp. 347-393). Springer, Dordrecht.
- Van Leeuwen, T., Tirry, L., Yamamoto, A., Nauen, R., Dermauw, W., 2015. The economic importance of acaricides in the control of phytophagous mites and an update on recent acaricide mode of action research. Pest. Biochem. Physiol. 121: 12–21. .
- Yorulmaz Salman, S., Sarıtaş, E., 2014. Acequinocyl resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): inheritance, synergists, cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. Inter.Jour. Acarol. 6: 248-435.
- Yu, S.J., 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Pres TaylorFrancis Group.