

Phytoseiulus persimilis Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae)'de Pirimicarb Seleksiyonu ile Elde Edilen Direnç, Asetilkolinesteraz (AChE) Enzim Aktiviteleri ve Gen Bölgesinin Kısmi Dizilimi

Gizem BERBER¹ , Sibel YORULMAZ^{*2} 

¹ Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bilecik, Türkiye

² Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta, Türkiye

Öz: Tarım alanlarında zararlı tetranychid türlerin mücadelesinde öncelikli olarak kimyasal mücadele kullanılmaktadır. Bu zararlılar ile etkin bir şekilde beslenen avcı akar popülasyonlarında pestisitlerden etkilenmektedir. Bu çalışmada, *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) üzerinde laboratuvar koşullarında pirimicarb seleksiyon baskısı sonucu direnç, asetilkolinesteraz (AChE) enzimi ve mutasyonları arasındaki ilişkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma, yaprak disk metoduyla ilaçlama kulesi kullanılarak yapılmıştır. Yedi seleksiyon sonucunda avcı akarda belirlenen pirimicarb direnci 45.5 kata kadar artmıştır. IBP ve TPP sinerjistlerinin pirimicarb üzerinde herhangi bir etkisi belirlenememiştir. Başlangıç ve pirimicarb dirençli *P. persimilis* popülasyonlarında bakılan hedef bölge mutasyonları (F331W ve G119S) belirlenememiştir, ancak ileriki çalışmalarda farklı hedef bölge mutasyonlarının da incelenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir. Çalışma, *P. persimilis*'de pirimicarb direnci ve AChE nokta mutasyonları üzerinde yapılan ilk araştırma olması nedeniyle önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: *Phytoseiulus persimilis*, pirimicarb, AchE, mutasyon

Resistance Obtained by Pirimicarb Selection, Acetylcholinesterase (AChE) Enzyme Activities and Partial Sequence of the Gene Region in *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae)

Abstract: Chemical control is primarily used in the management of tetranychid species agricultural areas. Predatory mite populations that feed on these pests are also affected by the pesticides. In this study, it was aimed to determine the relationships between resistance, acetylcholinesterase (AChE) enzyme and mutations as a result of pirimicarb selection pressure on *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) under laboratory conditions. The study was carried out using the spray tower with the leaf disc method. As a result of seven selections, pirimicarb resistance increased up to 45.5-fold. No effect of IBP and TPP synergists on pirimicarb weredetermined. The target site mutations (F331W and G119S) examined in the initial and pirimicarb resistant *P. persimilis* populations were also not determined, but it is thought that it would be useful to examine different target site mutations in future studies. The study, is the first to investigate pirimicarb resistance and AChE point mutations in *P. persimilis*.

Keywords: *Phytoseiulus persimilis*, pirimicarb, AchE, mutation

GİRİŞ

Phytoseiidae familyası içerisinde yer alan avcı akarlar, tarım alanlarında birçok zararlının biyolojik mücadelesinde etkin olarak kullanılmaktadır. *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae), bu familya içerisinde en çok dikkat çeken ve üzerinde araştırma yapılan tür olmuştur (Migeon ve ark., 2019). *P. persimilis* hızlı hareket etme yeteneğine sahip, *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae)'ye özelleşmiş, dünyada etkin bir şekilde kullanılan avcı akardır (van Lenteren ve ark., 2018). *P. persimilis* bu zararlının mücadelesinde ilk olarak 1968 yılında kullanılmış (Van Lenteren 1968), o tarihten itibaren günümüze kadar da özellikle örtüaltı üretimde *T. urticae* mücadelesinde kullanımı giderek artmaktadır. Ancak biyolojik mücadelede bu avcı akarın başarısını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Özellikle üretim alanları içerisinde kullanılan geniş insektisitler avcı akarları olumsuz etkilemekte ve biyolojik mücadele başarısını düşürmektedir. Entegre Zararlı Yönetim (IPM) programı, zararlıların kontrolünde daha az ve spesifik kimyasal kullanımını hedefleyen, doğal düşmanların korunduğu, çevreyle dost ve

ekonomik bir mücadele sistemidir (Cock ve ark., 2010). IPM programları içerisinde kullanılan spesifik insektisitlerin yararlı türler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, programın sağlıklı bir şekilde yürütülebilmesi açısından önem taşımaktadır (Desneux ve ark., 2007). Çünkü insektisitler ve akarisitler, phytoseiid akarlar üzerinde yan etkilere sebep olabildiği gibi seleksiyon baskısı sonucunda direnç gelişimine de neden olabilmektedirler (Bostanian & Akalach, 2006; Cong ve ark., 2016; Ditillo ve ark., 2016; Duso ve ark., 2008; Wu & Hoy, 2016). Pestisit direnci, kimyasal mücadeleyi etkisiz kılması nedeniyle genellikle olumsuz bir özellik gibi görülmesine karşın, doğal düşmanlarda daha uzun süre hayatta kalmayı desteklediği için olumlu bir özellik olarak öne çıkmaktadır (Ghazy ve ark., 2016). IPM programları içerisinde kimyasallara karşı doğrudan ya da dolaylı olarak

***Sorumlu Yazar:** sibelyorulmaz@isparta.edu.tr

Bu araştırma Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nce desteklenmiştir (Proje No: 2020-BTAP2-0081).

Geliş Tarihi: 17 Ekim 2022

Kabul Tarihi: 7 Nisan 2023

direnç geliştirmiş avcı akarların mücadelede daha aktif bir şekilde kullanılabilmesi düşünülmektedir (Albayrak ve ark., 2022).

Tarım zararlıları ile mücadelede, asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörü olarak görev yapan organik fosforlu (OP) ve pirimicarbın da üyesi olduğu karbamatlı insektisitler *T. urticae*'nin mücadelesinde ilk kullanılan pestisit grupları arasında yer almaktadır (Adesanya ve ark., 2021). Farklı kimyasal yapılara sahip olmalarına rağmen, OP ve karbamatlı insektisitlerin her ikisi de AChE'yi inhibe etmektedir. Böceklerde sinirsel uyarıların sürekliliğini sağlayan asetilkolin maddesinin hidrolize olabilmesi için AChE enzimi gerekmektedir (Kwon ve ark., 2010). Akarisit etkisi bulunmayan pirimicarb özellikle sokucu-emici ağız yapısına sahip zararlıların mücadelesinde kullanıldığı için, aynı alan içerisinde bulunan akarların da bu etken maddeden etkilenmeleri söz konusudur. Bu bağlamda *T. urticae*'nin AChE enzim inhibitörü olan bu grup insektisitlere karşı direnç geliştirdiği birçok çalışmada rapor edilmiştir (Smisaaert, 1964; Leeuwen ve ark., 2009; Grbić ve ark., 2011). Bu nedenle, aynı üretim alanları içerisinde zararlının mücadelesinde kullanılan phytoseiid akarlar üzerinde de bu grup insektisitlerin benzer etkilere yol açabileceği düşünülmüş ve araştırmaya değer görülmüştür.

Insektisit direnç gelişiminde rol oynayan en önemli mekanizmalardan birisi de pestisit etki yeri mutasyonlarıdır. Mutasyonlar, kimyasalın hedef etki yerinde yapısal değişikliklere sebep olmakta ve insektisit toksik etkisini düşürmektedir (Van Leeuwen ve Dermauw, 2016). Bu mekanizmaya örnek olarak, sadece tek bir direnç mutasyonunun 15.000-kat insektisit direncine neden olduğu durumlar ortaya koyulmuştur (Douris ve ark., 2016).

T. urticae'de OP ve karbamatlı grup insektisitlerin etkisiyle AChE bölgesinde meydana gelen mutasyonların belirlendiği çalışmalar bulunmaktadır (Anazawa ve ark., 2003; Ilias ve ark., 2014; Khajehali ve ark., 2010; Lee ve ark., 2015; Xu ve ark., 2018). Zararlılarda AChE bölgesinde hedef bölge mutasyonu ya da ace gen duplikasyonlarına bağlı olarak direnç gelişebilmektedir (Lee ve ark., 2015). AChE enzim artışına bağlı olarak tetranychid ve phytoseiid akarlarda insektisit direnç gelişimi uzun yıllardan beri bilinmektedir (Anber ve Overmeer, 1988; Smisaaert 1964). AChE bölgesinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda gelişen direnç tespiti tetranychid akarlarda daha eskilere dayanmakla birlikte, phytoseiid akarlarda yeni ve sınırlıdır. Bir phytoseiid türü olan *Kampimodromus aberrans* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae)'da OP direnci ve AChE bölgesinde oluşan G119S mutasyonu arasındaki ilişki son yıllarda belirlenmiştir (Cassanelli ve ark., 2015). Bu nedenle phytoseiid akarlarda insektisit direnç gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların belirlenmesi önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, IPM programları içerisinde *T. urticae* mücadelesinde kullanılan *P. persimilis*'de seleksiyon sonucu pirimicarb direnç gelişimi ve AChE enzim aktivitesi araştırılmıştır. Ayrıca pirimicarba dirençli avcı akarda AChE bölgesindeki mutasyonlar PCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Insektisit

Çalışmada, IRAC etki mekanizması sınıflandırmasına göre 1B grubunda yer alan pirimicarb etken maddeli formülasyon (PANZHER®, 50 g/ 100 L su WP) kullanılmıştır.

Phytoseiulus persimilis Orijini ve Üretimi

Pirimicarb ile seleksiyon çalışmalarında başlangıç popülasyonu olarak kullanılan *P. persimilis*, fasulye ve biber üretim alanlarından (Hatay/Türkiye) toplanmıştır (Şekeroğlu ve Kazak, 1993). Avcı akar böcek yetiştirme kabinlerinde herhangi bir pestisite maruz kalmadan yetiştirilmiştir. *P. persimilis* ve besin olarak kullanılan *T. urticae* popülasyonlarının üretimi 26±2°C sıcaklık, %60±5 orantılı nem ve 16 saat aydınlatma koşulları sağlanan iklim odalarında ve fasulye (*Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto) bitkisi üzerinde yapılmıştır.

Seleksiyon Çalışmaları

Phytoseiulus persimilis'in başlangıç popülasyonunda pirimicarb direnç gelişiminin sağlanabilmesi amacıyla seleksiyon çalışmaları yapılmıştır. Seleksiyon çalışmaları öncesinde avcı akarda pirimicarb etken maddesi için LC değerleri belirlenmiştir. Pirimicarb etken maddesinin akarisit etkisi bulunmamasından dolayı uygulama dozu belirlenirken ilk dozda %90'dan az kontrol grubunda ise %10'dan fazla ölüm olmayan doz kullanılmıştır. LC denemeleri 1 kontrol+6 veya 7 doz, her doz için 3 tekerrür olacak şekilde kurulmuştur. Her pirimicarb dozu için bir önceki doz %50 oranında saf su ile seyreltilmiştir. Kontrol grubuna sadece saf su uygulaması yapılmıştır. Yaprak diskler (3 cm) tabanında su agarı bulunan 9 cm'lik Petri kapları içerisine yerleştirilmiştir. Her tekerrür için Petri içerisine 25 adet avcı akar ergini eklenmiştir. Bekleme süresi boyunca *P. persimilis*'in beslenebilmesi amacıyla Petri içerisine *T. urticae* bireyleri eklenmiştir. Petri hazırlanan pirimicarb dozları ile ilaçlama kulesi (Burkard, Rickmansworth, Hertfordshire, United Kingdom) yardımıyla yaprak yüzeyine 1 bar basınçta tüm yaprak yüzeyine 2 mL ilaç gelecek şekilde ilaçlanmıştır. Seleksiyon denemelerinde ilaçlama kulesi kullanılarak yaprak yüzeyine 1.6-1.8mg/cm² pirimicarb uygulanmıştır. Uygulama yapılan yapraklar yukarıda koşulları verilen iklim odalarına alınmıştır. 24 saat sonra belirlenen ölüm oranları dikkate alınarak, LC50 değerleri, %95 güven aralıkları ve

eğimler, probit analizi ile hesaplanmıştır (POLO; LeOra Software, Berkeley, CA).

Probit sonuçları doğrultusunda elde edilen LC60 verileri seleksiyon dozları olarak kullanılmıştır. Seleksiyon denemelerinde yukarıda anlatılan metot kullanılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra canlı kalan bireyler üzerinde av *T. urticae* bireyleri bulunan temiz bir bitki üzerine aktarılmıştır. LC60 dozu her seleksiyon popülasyonu için yeniden belirlenerek popülasyonlar seleksiyon baskısına maruz bırakılarak direnç çalışmaları yapılmıştır. Selekte edilmiş popülasyonlarda pirimicarb direnç oranları, her seleksiyon sonrası belirlenen LC50 değerlerinin başlangıç popülasyonunun LC50 değerine oranlanması ile belirlenmiştir.

Pirimicarb+ Sinerjist Uygulamaları

Pirimicarb+sinerjist çalışmalarında Van Pottelberge ve ark., (2009) tarafından önerilen metot uyarılarak kullanılmıştır. Sinerjist çalışmaları için, S-Benzyl-O, O-diisopropylphosphorothioate (IBP) (100µl/1) ve triphenylphosphate (TPP) (62.5 mg/l) sinerjistleri ve dozları kullanılmıştır (Kim ve ark., 2004). Sinerjistler N,N-dimethylformamide ve emulgator içerisinde (3:1,wt:wt) çözdürülmüştür. Sinerjist+pirimicarb bioassay çalışmaları için daha önce seleksiyon çalışmalarında kullanılan metot kullanılmıştır. Yalnızca hazırlanan sinerjist dozları avcı akarlar ilaçlama kulesi yardımıyla yaprak yüzeyine 1 bar basınçta tüm yaprak yüzeyine 2 mL ilaç gelecek şekilde püskürtülmüştür. Kontrol grubuna yalnızca sinerjist uygulaması yapılmıştır. Sinerjist uygulamasından 2 saat sonra avcı akarlar hazırlanan pirimicarb konsantrasyonları ile ilaçlanmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra ölü-canlı sayımları yapılmış ve elde edilen ölüm oranlarından yararlanılarak lethal konsantrasyon değerleri belirlenmiştir. Sinerjistik etki oranı yalnızca pirimicarb uygulanan denemede belirlenen LC50 değerinin, sinerjist+pirimicarb uygulanan deneme de belirlenen LC50 değerine oranlanması ile belirlenmiştir.

Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi

Asetilkolinesteraz enzim aktivitesi Stumpf ve ark., (2001) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. 50 ergin avcı akar dişisi 500 µl 0.1 M, pH 7.5 olan fosfat buffer içinde ezilmiştir. Mikroplaka hücrelerine 100 µl acetylcholine iodide (ATChI),

100 µl 5.5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ve 100 µl supernatant eklenmiştir. 300 µl'lik final konsantrasyonunda ATChI ve DTNB 0.5 mM hacimde bulunmaktadır. Absorvanstaki değişim Versamax kinetic microplate reader'da (Molecular Devices) 412 nm 23 oC'de 20 dk ölçülmüştür.

Asetilkolinesteraz enzim aktivitesi belirlenmesinde enzim okumaları dört tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Avcı akar popülasyonlarının toplam protein miktarları Bradford (1976) tarafından önerilen yöntem ile belirlenmiştir. Örneklerin asetilkolinesteraz enzim aktivitesi sonuçları mOD min1 mg-1 olarak verilmiştir. Popülasyonların enzim aktiviteleri arasındaki farklar Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

DNA İzolasyonu ve Asetilkolinesteraz Mutasyonlarının Belirlenmesi

DNA izolasyonu için QIAGEN DNeasy Blood ve TissueKits kullanılmıştır. 50 adet ergin dişi phytoseiid akar 1.5ml'lik tüpe aktarılmıştır. Ardından üzerine 180 µl Buffer ATL ve 20 µl Proteinaz K eklenip önceden steril edilmiş plastik eziciler yardımıyla ezilmiştir. Daha sonra, tüp içerisine 200 µl Buffer AL ve 200 µl %96-100'lük ethanol eklenmiştir. Elde edilen tüm sıvı 8000 rpm'de 1 dakika süresince santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası filtreden alta geçen sıvı atılmıştır. Sonrasında, örnekler sırasıyla 500µl Buffer AW1 (yıkama sonrası 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj) ve 500µl Buffer AW2 (yıkama sonrası 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj) sıvıları ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında DNeasy Mini spin column filtresi, 2ml'lik steril tüplere yerleştirilip, 100-200µl elüsyon sıvısı ile yıkanıp, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA elde edilmiştir. PCR çalışmaları için kullanmak üzere elde edilen DNA'ların kalitesi spektrofotometre aracılığıyla belirlenmiştir. Elde edilen DNA'lar uygun genlerin çoğaltılması amacıyla PCR işleminde kullanılmıştır. Çalışmada AChE bölgesindeki mutasyonların belirlenmesi amacıyla kullanılan primerler Tablo 1'de verilmiştir.

Kullanılmış olan PCR (BioRad T100) koşulları; 94°C' de 2 dk/ 5 döngü- 94°C' de 30s, 50°C' de 30s, 72°C' de 60s/ 5 döngü- 94°C' de 30s, 50°C' de 30s (her döngüde +1°C), 72°C' de 60s/ 20 döngü- 94°C' de 30s, 55°C' de 30s, 72°C' de 60s/ ve 72°C' de 10 dk. şeklinde olmuştur (Cassanelli vd., 2015).

Tablo 1. AchE bölgesinde taranan mutasyonlar ve kullanılan primerler (Cassanelli ve ark., 2015)

Primer	5'-3' dizilimi	Hedef Gen	Mutasyon
KaAChEF11	AATGCGATTCGACATCCTGTGCC	Asetilkolinesteraz	G119S
KaAChER11	AAAGTCCGTTGTTCCGGTTGCC		
KaAChEF12	AAACTCGCGGAGGAAGTCAAGTGT	Asetilkolinesteraz	F331W
KaAChER12	CCAACAATCTTGTGACGGCATCT		

BULGULAR ve TARTIŞMA

Pirimicarb Seleksiyon Sonuçları

Phytoseiulus persimilis'in başlangıç popülasyonunda pirimicarb ile yedi kez seleksiyon sonucunda 45,5 kat direnç

elde edilmiştir (Tablo 2). Başlangıç popülasyonunda LC50 değeri 10.0mg a.i. L-1 iken yedinci seleksiyon sonucunda 455,0 mg a.i. L-1 değerine yükselmiştir. Son seleksiyon popülasyonu P7 olarak adlandırılmıştır.

Tablo 2. Laboratuvar koşullarında pirimicarb ile yedi kez selekte edilen bir *Phytoseiulus persimilis* popülasyonunda her seleksiyon sonrasında belirlenen LC50,60, değerleri ve direnç oranları

Popülasyon	n*	Eğim±SH	LC ₅₀ (mg e.m. L ⁻¹) (95% GA)	LC ₆₀ (mg e.m. L ⁻¹) (95% GA)	df	x ²	R**
Başlangıç	480	0,842±0,110	10,0 5,0-15,0	20,0 15,0-35,0	6	2,2	-
P1	602	1,552±0,133	55,0 35,8-70,5	85,0 55,8-100,2	5	3,5	5,5
P2	603	1,885±0,171	80,6 47,5-98,3	110,6 80,7-130,8	5	1,5	8,6
P3	589	2,151±0,202	130,0 100,2-150,4	170,5 155,6-190,5	6	1,8	13,0
P4	596	1,899±0,177	135,4 112,8-160,7	185,0 168,2-201,3	5	1,8	13,5
P5	605	2,520±0,226	215,9 198,3-230,5	270,0 243,5-295,6	6	2,7	21,5
P6	602	2,029±0,178	255,8 212,6-285,5	325,6 298,6-345,0	6	2,4	25,5
P7	576	2,121±0,168	455,0 386,5-475,2	521,0 425,0-580,4	6	1,5	45,5

*: Toplam birey sayısı

** : Direnç oran

T. urticae mücadelesinde AChE inhibitörü ol duğu bilinen OP ve karbamatlı insektisitler uzun süredir kullanılmaktadır. Bu nedenle dünyada bu iki grup insektisit içerisinde yer alan 30'dan fazla etken maddeye karşı *T. urticae*'de direnç rapor edilmiştir (Van Leeuwen ve ark., 2010). Yapılan araştırmalar aynı alan içerisinde bulunan phytoseiid akarların da uygulanan bu grup insektisitlere karşı direnç geliştirdiğini göstermektedir (Anber ve Oppenoorth, 1989; Anber ve Overmeer, 1988; Bonafos ve ark., 2008; Cross ve Berrie, 1994; Fitzgerald ve ark., 1999). Çalışmada ise laboratuvar koşullarında pirimicarb ile 7 kez seleksiyon sonucu elde edilen *P. persimilis* popülasyonunda direnç oranı 45.5kata kadar artmıştır. Chlorpyrifosun avcı akarlar üzerindeki direnç ve etkilerinin, bu türlerin türlere ve pestisitlere maruz kalma geçmişine bağlı olarak büyük ölçüde değişebileceği bildirilmiştir (Barbar ve ark., 2007; Pogoda ve ark., 2001). Chlorpyrifos ile benzer etki mekanizmasına sahip pirimicarb için de sonucun aynı olduğu düşünülmektedir. *P. persimilis*'in başlangıç popülasyonunun uzun süre pestisitlere maruz kalmaması sebebiyle pirimicarb direncinin orta seviyede kaldığı; ancak tarla koşullarında daha fazla seleksiyon sonucunda direncin daha yüksek seviyelere ulaşabileceği düşünülmektedir.

Pirimicarb+Sinerjist Sonuçları

Pirimicarb ile 7 kez selekte edilmiş P7 popülasyonunda pirimicarb+IBP uygulaması sonucunda 1,03 kat, pirimicarb+TPP uygulaması sonucunda ise 1,13 kat sinerjistik etki oranı belirlenmiştir (Tablo 3). Başlangıç popülasyonunda ise pirimicarb+IBP uygulaması sonucunda 1,10 kat, pirimicarb+TPP uygulaması sonucunda ise 1,08 kat sinerjistik etki oranı bulunmuştur. Her iki popülasyon için de sinerjist uygulaması sonucunda belirlenen LC50 değerleri ile sadece pirimicarb uygulaması sonucunda belirlenen LC50 değerleri arasında güven aralıklarına göre önemli bir fark belirlenmemiştir.

Sinerjist çalışmaları, zararlılarda metabolik insektisit direncini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar arasında bulunmaktadır. Yapılan çalışmada, IBP ve TPP sinerjistlerinin pirimicarb üzerinde herhangi bir etkisi belirlenmemiştir. Ay ve Yorulmaz (2010) yaptıkları çalışmada chlorpyrifos'un *T. urticae*'ye karşı chlorpyrifos etkinliğinin IBP ve TPP sinerjistleri ile ilişkisi olmadığını belirlemiştir. Chlorpyrifos ile benzer etki mekanizmasına sahip olan pirimicarb için de benzer bir sonuç elde edilmiştir.

Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Sonuçları

Yapılan çalışma sonucunda, *P. persimilis*'in başlangıç popülasyonu ile pirimicarb dirençli popülasyonunda belirlenen AChE enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır (Tablo 4).

AChE enzim aktivite sonuçları dikkate alındığında *P. persimilis*'de pirimicarb direnç gelişimi üzerinde farklı enzim mekanizmaların etkisinin olabileceği sonucunu düşündürmektedir.

Tablo 3. *Phytoseiulus persimilis* popülasyonlarında pirimicarb ve pirimicarb + sinerjistlerin sinerjistik etki oranları

Uygulama	n*	Eğim±SH	LC ₅₀ (mg e.m. L ⁻¹) (95% GA)	df	x ²	SR**
P7 popülasyonu						
Pirimicarb (Sinerjistsiz)	600	2,121±0,168	455,0 386,5-475,2	6	1,5	-
Pirimicarb +IBP	603	1,336±0,207	440,0 396,0-466,5	6	1,9	1,03
Pirimicarb +TPP	529	1,435±0,128	400,0 352,6-420,5	5	2,5	1,13
Başlangıç popülasyonu						
Pirimicarb (Sinerjistsiz)	480	0,842±0,110	10,0 5,0-15,0	6	2,2	-
Pirimicarb + IBP	595	1,785±0,138	9,0 6,8-13,5	5	2,8	1,10
Pirimicarb + TPP	585	1,112±0,338	9,2 7,5-13,3	6	2,4	1,08

*: Birey Sayısı

** : Sinerjistik etki oranı

Tablo 4. *Phytoseiulus persimilis* popülasyonlarının AChE enzim aktiviteleri

Popülasyon	N*	mOD/min/mg protein
P7	4	0,0618 (±0,002) a
Başlangıç	4	0,0540 (±0,001) a

*Tekerrür sayısı

Asetilkolinesteraz Mutasyon Sonuçları

AChE enziminin kinetik olarak belirlenmesinden sonra hedef bölge içerisindeki oluşabilecek mutasyonları belirlemek amacıyla moleküler çalışmalar yapılmıştır. *Phytoseiulus persimilis*'de başlangıç ve pirimicarb dirençli popülasyonlarda yapılan genomik DNA izolasyonları ve istenen bölgenin PCR ile çoğaltılmasından sonra olası mutasyonların taranması için sekans analizi yapılmış ve hedef yeri aminoasitleri karşılaştırılmıştır (Şekil 1,2).

Önceki çalışmalarda direnç ile ilişkilendirilen aminoasit yerlerinde (119, 280, 328, 331; *Torpedo californica* numaralandırmasına göre) herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. Bu bağlamda, pirimicarb seleksiyonu sonrası elde edilen P7 popülasyonunda herhangi bir aminoasit değişikliği belirlenmemiştir (Şekil 1-2). Pirimicarb dirençli *T. urticae* popülasyonunda F aminoasidinin T aminoasidine

dönüştüğü görülmektedir. Ancak *P. persimilis*'de başlangıç ve P7 popülasyonlarında herhangi bir aminoasit değişikliği görülmemektedir. Bu nedenle artan direncin hedef yeri mutasyonları dışındaki mekanizmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

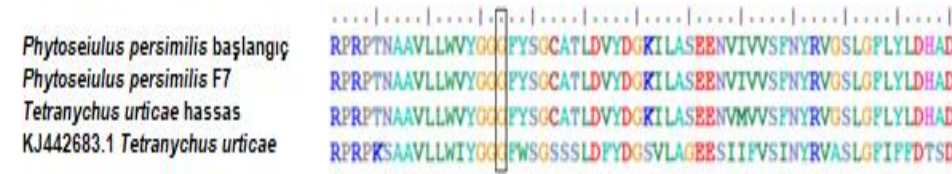
F331W mutasyonunun birçok akar ve böcek türünde organik fosforlu insektisitlere karşı dirence yol açtığı bilinmektedir (Anazawa ve ark., 2003; Khajehali ve ark., 2010; D. H. Kwon ve ark., 2010). Ayrıca F331W mutasyonun organik fosforuların bağlanma yeri açısından çok önemli bir yerde olduğu ve bu mutasyonun yüksek insektisit direnci oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir (Oh ve ark., 2006). Ayrıca son yıllarda avcı akar *K. aberrans* türünde organik fosforlu insektisit direncinde, hedef bölge mutasyonu olarak G119S mutasyonu tespit edilmiştir (Cassanelli ve ark., 2015). Bu nedenle bu çalışmada başlangıç ve pirimicarb dirençli *P.*

persimilis popülasyonlarında F331W ve G119S mutasyonları araştırılmıştır. Ancak *P. persimilis*'de her iki mutasyonda belirlenememiştir. Khajehali ve ark., (2010), *T. urticae*'de organik fosforlu insektisitlere karşı görülen direncin AChE nokta mutasyonlarını araştırdıkları çalışmada F331W mutasyonunun yanı sıra, T280A, G328A, A201S mutasyonlarının da etkili olduklarını belirlemiştir. Organik fosforlu insektisit direnci üzerinde farklı mutasyonların etkilerinin de bulunması sebebiyle, *P. persimilis*'de pirimicarb direnci üzerinde de diğer mutasyonların etkili

olabilecekleri düşünülmektedir. Bu nedenle ileriki çalışmalarda bu hedef bölge mutasyonlarının da incelenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir. Hedef bölgeyle ilgili zararlılar üzerinde yapılmış birçok çalışma olmasına rağmen avcı akarlarda bu alanda yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır (Cassanelli ve ark., 2015; Cong ve ark., 2016). Bu nedenle, bu çalışma *P. persimilis*'de pirimicarb direnci ve AChE nokta mutasyonları üzerinde yapılan ilk araştırma olması nedeniyle önem taşımaktadır



Şekil 1. *Phytoseiulus persimilis* asetilkolinesteraz geninin kısmi dizilimi (Kare içerisinde gösterilen aminoasitler (280, 328, 331) önceki çalışmalarda *Tetranychus urticae*'de direnç ile ilişkilendirilmiştir (Khajehali ve ark., 2010)



Şekil 2. *Phytoseiulus persimilis* asetilkolinesteraz geninin kısmi dizilimi (Kare içerisinde gösterilen aminoasit (119) önceki çalışmalarda *Tetranychus urticae*'nin hassas ve dirençli popülasyonları ile ilişkilendirilmiştir (Khajehali ve ark., 2010)

SONUÇ

Fitofag akarların kimyasal mücadelesinde en önemli problemlerden biriside akarların uygulanan pestisitlere karşı hızla direnç geliştirmesidir. Bu zararlıları baskı altına alabilmek için IPM programlarının uygulanması ve bu programlarda avcı akarların kullanımı önem taşımaktadır (Ahmad ve ark., 2013). Ancak IPM programları içerisinde yapılan pestisit uygulamaları tarımsal ekosistemler içerisinde bulunan ya da salımı yapılan avcı akarların başarısını etkilemektedir (Pozzebon ve ark., 2014). Bu nedenle, bazı pestisitlere karşı direnç geliştirmiş avcı akarların kullanımı zararlıların aşırı çoğalmasını önleyerek ekonomik kaybı azaltabilir (Benavent-Albarracín ve ark., 2020). Bu teori ile ilişkili olarak çalışmada, *P. persimilis*'de pirimicarb direncinin biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları belirlenmesi amaçlanmıştır.

Pirimicarb ve asetilkolinesteraz etkili diğer insektisitler doğada uzun yıllar kullanılmış ve günümüzde de kullanılmaya devam edilmektedir. Kırmızı örümcekler ve tarımsal üretimde zarar yapan diğer tüm böcekler ile mücadelede biyolojik mücadelenin tek başına yetersiz kalması kimyasal mücadeleyi kaçınılmaz kılmaktadır. İnsektisit kullanımının artması sonucunda doğada insektisitlerin hedef aldığı fitofag zararlıların yanında faydalı böcek ve akarlarda bu insektisitlerin etkisine maruz kalmakta ve popülasyon yoğunlukları azalmaktadır. Doğal dengede varlıklarını sürdürebilmeleri için direnç geliştirmek zorunda kalan faydalı böcek ve akarların laboratuvar koşullarında direnç kazandırıldıktan sonra salımları yapıldığı taktirde entegre mücadele kapsamında uygulanan pestisitlerden daha az etkilenip arazide varlıklarını daha uzun süre devam ettirebilecekleri düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmayı 2020-BTAP2-0081 proje ile maddi olarak destekleyen Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz. Ayrıca moleküler çalışmalar sırasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Emre İNAK'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Adesanya AW, Lavine MD, Moural TW, Lavine LC, Zhu F, Walsh DB (2021) Mechanisms and management of acaricide resistance for *Tetranychus urticae* in agroecosystems. *Journal of Pest Science*, 94(3): 639-663.
- Ahmad S, Pozzebon A, Duso C (2013) Augmentative releases of the predatory mite *Kampimodromus aberrans* in organic and conventional apple orchards. *Crop Protection*, 52: 47-56.
- Albayrak T, Yorulmaz S, İnak E, Toprak U, Van Leeuwen T (2022) Pirimicarb resistance and associated mechanisms in field-collected and selected populations of *Neoseiulus californicus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 180, 104984.
- Anazawa Y, Tomita T, Aiki Y, Kozaki T, Kono Y (2003) Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 33(5): 509-514.
- Anber H, Oppenoorth F (1989) A mutant esterase degrading organophosphates in a resistant strain of the predacious mite *Amblyseius potentillae* (Garman). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 33(3): 283-297.
- Anber H, Overmeer W. (1988) Resistance to organophosphates and carbamates in the predacious mite *Amblyseius potentillae* (Garman) due to insensitive acetylcholinesterase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 31(1): 91-98.
- Ay R, Yorulmaz S (2010) Inheritance and detoxification enzyme levels in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) strain selected with chlorpyrifos. *Journal of Pest Science*, 83(2): 85-93.
- Barbar Z, Tixier MS, Kreiter S (2007) Assessment of pesticide susceptibility for *Typhlodromus exilaratus* and *Typhlodromus phialatus* strains (Acari: Phytoseiidae) from vineyards in the south of France. *Experimental and Applied Acarology*, 42(2): 95-105.
- Benavent-Albarracín L, Alonso M, Catalán J, Urbaneja A, Davies TGE, Williamson MS, González-Cabrera J (2020) Mutations in the voltage-gated sodium channel gene associated with deltamethrin resistance in commercially sourced *Phytoseiulus persimilis*. *Insect molecular biology*, 29(4): 373-380.
- Bonafos R, Vignes V, Serrano E, Auger P (2008) Resistance monitoring to deltamethrin and chlorpyrifos-ethyl in 13 populations of *Typhlodromus pyri* Scheuten (Acari: Phytoseiidae) from vineyards in the southwest of France. *Crop Protection*, 27(3-5): 855-858.
- Bostanian NJ, Akalach M (2006) The effect of indoxacarb and five other insecticides on *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae), *Amblyseius fallacis* (Acari: Phytoseiidae) and nymphs of *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(4): 334-339.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Cassanelli S, Ahmad S, Duso C, Tirello P, Pozzebon A (2015) A single nucleotide polymorphism in the acetylcholinesterase gene of the predatory mite *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae) is associated with chlorpyrifos resistance. *Biological Control*, 90: 75-82.
- Cock MJ, van Lenteren JC, Brodeur J, Barratt BI, Bigler F, Bolckmans K, Cònsoli FL, Haas F, Mason PG, Parra JRP (2010) Do new access and benefit sharing procedures under the convention on biological diversity threaten the future of biological control? *BioControl*, 55(2): 199-218.
- Cong L, Chen F, Yu S, Ding L, Yang J, Luo R, Tian H, Li H, Liu H, Ran C (2016) Transcriptome and difference analysis of fenpropathrin resistant predatory mite, *Neoseiulus barkeri* (Hughes). *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6): 704.
- Cross J, Berrie A (1994) Effects of repeated foliar sprays of insecticides or fungicides on organophosphate-resistant strains of the orchard predatory mite *Typhlodromus pyri* on apple. *Crop Protection*, 13(1): 39-44.
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual review of entomology*, 52(1): 81-106.
- Ditillo J, Kennedy G, Walgenbach J (2016) Effects of insecticides and fungicides commonly used in tomato production on *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). *Journal of economic entomology*, 2016, 234.
- Douris V, Steinbach D, Panteleri R, Livadaras I, Pickett JA, Van Leeuwen T, Nauen R, 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 Sciences*, 113(51): 14692-14697.
- Duso C, Malagnini V, Pozzebon A, Castagnoli M, Liguori M, Simoni S (2008) Comparative toxicity of botanical and reduced-risk insecticides to Mediterranean populations of *Tetranychus urticae* and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae). *Biological Control*, 47(1): 16-21.

- Fitzgerald J, Solomon M, Polesny F (1999) The predatory mite *Typhlodromus pyri*; biological characteristics and resistance to insecticides in different mite strains. IOBC WPRS BULLETIN, 22(7): 161-168.
- Ghazy NA, Osakabe M, Negm MW, Schausberger P, GotoHT, Amano H (2016) Phytoseiid mites under environmental stress. Biological Control, 96: 120-134.
- Grbić M, Van Leeuwen T, Clark RM, Rombauts S, Rouzé P, Grbić V, Osborne EJ, Dermauw W, Thi Ngoc PC, Ortego F (2011) The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. Nature, 479(7374): 487-492.
- Ilias A, Vontas J, Tsagkarakou A (2014) Global distribution and origin of target site insecticide resistance mutations in *Tetranychus urticae*. Insect biochemistry and molecular biology, 48: 17-28.
- Khajehali J, Van Leeuwen T, Grispou M, Morou E, Alout H, Weill M, Tirry L, Vontas J, Tsagkarakou A (2010) Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 66(2): 220-228.
- Kim YJ, Lee SH, LeeSW, AhnYJ (2004) Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 60(10): 1001-1006.
- Kwon D, Clark J, Lee S (2010) Extensive gene duplication of acetylcholinesterase associated with organophosphate resistance in the two-spotted spider mite. Insect molecular biology, 19(2): 195-204.
- Kwon DH, ImJS, Ahn JJ, Lee JH, Clark JM, Lee SH (2010) Acetylcholinesterase point mutations putatively associated with monocrotophos resistance in the two-spotted spider mite. Pesticide Biochemistry and Physiology, 96(1): 36-42.
- Lee SH, Kim YH, KwonDH, ChaDJ, KimJH (2015) Mutation and duplication of arthropod acetylcholinesterase: implications for pesticide resistance and tolerance. Pesticide Biochemistry and Physiology, 120: 118-124.
- Migeon A, TixierMS, Navajas M, Litskas VD, Stavrinides MC (2019) A predator-prey system: *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): worldwide occurrence datasets. Acarologia, 59(3): 301-307.
- Oh SH, KozakiT, Mizuno H, TomitaT, KonoY (2006) Expression of Ace-paralogous acetylcholinesterase of *Culex tritaeniorhynchus* with an amino acid substitution conferring insecticide insensitivity in baculovirus-insect cell system. Pesticide Biochemistry and Physiology, 85(1): 46-51.
- Pogoda M, Pree D, Marshall D (2001) Effects of encapsulation on the toxicity of insecticides to the Oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) and the predator *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae). The Canadian Entomologist, 133(6): 819-826.
- Pozzebon A, Ahmad S, Tirello P, Lorenzon M, Duso C (2014) Does pollen availability mitigate the impact of pesticides on generalist predatory mites? BioControl, 59(5): 585-596.
- Smitsaert H (1964) Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. Science, 143(3602): 129-131.
- Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L (2010) Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. Insect biochemistry and molecular biology, 40(8): 563-572.
- Van Leeuwen T, Dermauw W (2016) The molecular evolution of xenobiotic metabolism and resistance in chelicerate mites. Annual review of entomology, 61: 475-498.
- Van Lenteren J, WoetsJ (1988) Biological and integrated pest-control in greenhouses. Annual review of Entomology, 33(1): 239-269.
- van Lenteren JC, BolckmansK, Köhl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A (2018) Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. BioControl, 63(1): 39-59.
- Van Pottelberge S, Khajehali J, Van Leeuwen T, Tirry L (2009) Effects of spiroticlofen on reproduction in a susceptible and resistant strain of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Experimental and Applied Acarology, 47(4): 301-309.
- Wu K, Hoy MA (2016) The glutathione-S-transferase, cytochrome P450 and carboxyl/cholinesterase gene superfamilies in predatory mite *Metaseiulus occidentalis*. PloS one, 11(7): e0160009.
- Xu D, HeY, ZhangY, XieW, WuQ, WangS (2018) Status of pesticide resistance and associated mutations in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, in China. Pesticide Biochemistry and Physiology, 150: 89-96.