

**Bifenthrin'e dirençli *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de çoklu direnç, direnç kalıtımı ve Sitokrom P450 aktivitesinin belirlenmesi<sup>1</sup>**

Recep AY<sup>2</sup>      Sibel YORULMAZ<sup>2</sup>

**SUMMARY**

**The determination of multiple resistance, inheritance and cytochrome P450 activity in bifenthrin resistant *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)**

In this study, multiple resistance, inheritance and cytochrome P450 enzyme activity were determined in *Tetranychus urticae* Koch (SAK) population after 20 selections for bifenthrin resistance. Selection study and LC<sub>50, 60</sub> levels of SAK population of *T. urticae* were determined by dry film method. LC<sub>50</sub> level of the SAK population selected twenty times with bifenthrin was increased from 984.49 to 11914.40 µl l<sup>-1</sup> distilled water. Selected population showing 21.84 fold resistances was named as BIF 20 population. Bifenthrin resistant BIF 20 population showed low resistances against abamectin (4.73 fold), chlorpyrifos (4.72 fold), clofentezine (2.68 fold), propargite (2.04 fold) and fenpyroximate (1.72 fold). The inheritance of bifenthrin resistance with F1 females produced after reciprocal crosses between resistant and susceptible populations was found to be incompletely dominant and not sex-linked GSS, SAK and BIF 20 populations were investigated in terms of the enzyme activity of cytochrome P450. The cytochrome P450 activity increased from 0.00231 mOD/min/mg protein to 0.00310 mOD/min/mg protein in BIF 20 population which was resistant against bifenthrin.

**Key Words:** Bifenthrin, multiple-resistance, inheritance, monooxygenase, *Tetranychus urticae*

**ÖZET**

Bu çalışmada bifenthrin ile 20 kez selekte edilerek bifenthrine dirençli hale getirilen *Tetranychus urticae* Koch (SAK) popülasyonunda çoklu direnç, direnç kalıtımı ve sitokrom P450 aktivitesi belirlenmiştir. *T. urticae*'nin SAK

<sup>1</sup> Bu araştırma TÜBİTAK-TOVAG tarafından desteklenen 105O179 nolu projenin bir bölümüdür.

<sup>2</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Çünür/ISPARTA

Yazının Yayın Kuruluna Geliş Tarihi (Received): 19.10.2009

popülasyonunun  $LC_{50, 60}$  değerlerinin belirlenmesinde ve seleksiyon çalışmasında kuru film yöntemi kullanılmıştır. Bifenthrin ile 20 kez selekte edilen SAK popülasyonunun  $LC_{50}$  984.49  $\mu\text{l l}^{-1}$  su'dan 11914.40  $\mu\text{l l}^{-1}$  su'ya yükselmiştir. Bifenthrin'e 21.84 kat direnç geliştiren popülasyon BİF 20 popülasyonu olarak adlandırılmıştır. Bifenthrin dirençli BİF 20 popülasyonu abamectin (4.73 kat), chlorpyrifos (4.72 kat), clofentezine (2.68 kat), propargite (2.04 kat) ve fenpyroximate'e (1.72 kat) karşı düşük düzeyde direnç göstermiştir. BİF 20 ve hassas (GSS) popülasyon arasında yapılan resiprokal çaprazlamalar sonucu elde edilen F1 dişilerinde bifenthrin direncinin cinsiyete bağlı olmadan eksik dominant olarak taşındığı belirlenmiştir. GSS, SAK ve BİF 20 popülasyonlarında sitokrom P450 aktivitesi de incelenmiştir. Bifenthrin dirençli BİF 20 popülasyonunda sitokrom P450 aktivitesi 0.00231 mOD/min/mg protein' den 0.00310 mOD/min/mg protein'e yükselmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Bifenthrin, çoklu-direnç, kalıtım, monooksijenaz, *Tetranychus urticae*

## GİRİŞ

İki noktalı kırmızıörümcek, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) dünyada tarımsal alanlarda geniş ölçüde yayılmış önemli bir zararlı türdür (Gorman et al. 2001). *T. urticae*'nin kontrolünde uygulamasının kolay olması ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle kimyasal mücadele tercih edilmektedir. Kırmızıörümceklerin kısa yaşam döngüleri ve hızlı üreme güçleri nedeniyle birkaç uygulamadan sonra akarisitlere karşı direnç geliştirmeleri kimyasal kontrollerini zorlaştırmaktadır (Stumpf and Nauen 2001).

Böceklerde direnç mekanizmasını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Kırmızıörümceklerde de böceklerde olduğu gibi esteraz, monooksijenaz ve glutatyon S-transferaz gibi enzimlerin detoksifikasyonu sonucunda direnç gelişmektedir (Tsagkarakou et al. 2009). *T. urticae*'de piretroidlere karşı gelişen dirençte karboksilesteraz (COE) detoksifikasyonu (Ay ve Gürkan 2005, Van Leeuwen et al. 2005) ve monooksijenaz detoksifikasyonu (Van Leeuwen and Tirry 2007) önemlidir.

Akarisit özelliği de bulunan bifenthrin kontakt ve mide yoluyla etkili sentetik piretroidli bir insektisittir (Öncüer ve Durmuşoğlu 2008). Piretroid grubu insektisitler böceklerde sinir sistemi üzerine etkili olarak sodyum kanallarındaki geçişleri düzensizleştirmektedir. Bifenthrin Türkiye'de 1988 yılından beri kırmızıörümcekler de dahil birçok zararlıya karşı kullanılmaktadır (Anonim 2009).

Bu çalışmada laboratuvar koşullarında seleksiyon sonucu oluşturulan bifenthrin dirençli BİF 20 popülasyonu ve hassas GSS popülasyonu karşılaştırılarak direnç oranları hesaplanmıştır. Bifenthrin dirençli BİF 20 ve hassas GSS popülasyonlarında çoklu direnç, kalıtım ve sitokrom P450 enzim aktiviteleri incelenerek, bifenthrinin direnç mekanizması araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmanın ana materyalini *T. urticae* popülasyonları, değişik insektisit/akarisitler, ilaçlama kulesi (Burckard Manufacturing Co Ltd, Rickmansworth, Herts, UK), Versamax kinetik mikroplaka okuyucu (Molecular Devices) ile stereomikroskop oluşturmuştur. Denemelerde ayrıca barbunya bitkisi, plastik petri, mikroplaka, saksı, pamuk, fırça, değişik kimyasal maddeler ile değişik cam-plastik malzemeler kullanılmıştır.

### ***Tetranychus urticae* popülasyonları**

Denemede kullanılan *T. urticae* popülasyonu (SAK) Isparta ili Şarkikaraağaç ilçesinden 06.08.2003 tarihinde domates (*Lycopersicum esculantum* L.) serasından toplanmıştır. S.D.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü laboratuvarına getirilen *T. urticae* popülasyonu, barbunya (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisi üzerinde kültüre alınmış ve 06.08.2003 tarihinden 17.01.2007 tarihine kadar herhangi bir ilaç uygulanmadan yetiştirilmiştir. Bu tarihten sonra bifenthrin ile seleksiyon çalışmalarına başlanmış ve seleksiyon sonucu elde edilen popülasyona BIF 20 adı verilerek ayrı bir popülasyon olarak denemelerde kullanılmıştır. Ayrıca Rothamsted Research (İngiltere)'den 2001 yılında getirilen *T. urticae*'nin hassas ırkı (German Susceptible Strains, GSS) da denemelerde karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır.

Tüm popülasyonlar  $26\pm 2$  °C sıcaklıkta % 50-60 orantılı nem ve floresan lambalarla 16 saatlik ışıklanma, 8 saatlik karanlık sağlanan koşullarda barbunya bitkisi üzerinde yetiştirilmiştir.

### **İnsektisit/Akarisitler**

Biyoassay ve seleksiyon çalışmalarında, 100g/L bifenthrin içeren Talstar EC 100 (FMC) adlı formülasyon kullanılmıştır. Çoklu direncin belirlenmesi amacıyla BIF 20 ve GSS popülasyonları kullanılarak yürütülen biyoassay çalışmalarında ise Çizelge 1'de verilen farklı gruptan insektisit/akarisitler kullanılmıştır.

**ÇİZELGE 1.** Çoklu direnç çalışmalarında kullanılan insektisit/akarisitlere ait bilgiler

Aktif madde adı	Aktif madde oranı	Formülasyon şekli	İlacın adı	Firması
Abamectin	18g/l	EC	Agrimec	Syngenta
Amitraz	200g/l	EC	Kortraz	Koruma Tarım
Chlorpyrifos	480g/l	EC	Dursban 4	Dow AgroSciences
Clofentezine	500g/l	SC	Apollo	Flogaz
Fenpyroximate	50g/l	SC	Meteor	Syngenta
Propargite	588g/l	EC	Kormite	Koruma Tarım

### **Seleksiyon çalışması**

SAK popülasyonunun biyoassay çalışmalarında detayı verilen kuru film yöntemiyle LC değerleri belirlendikten sonra LC<sub>60</sub> değerlerinde ki bifenthrin formülasyonu su içerisinde çözdürülerek solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan

solüsyon biyoassay çalışmaları bölümünde anlatılan kuru film yöntemine göre 25 petriye uygulanmıştır. Uygulama yapılan her bir petriye 40-50 ergin dişi birey aktarılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra canlı kalan bireyler uygulama yapılmamış barbunya fasulyesi yapraklarına aktarılmıştır ve üremeye bırakılmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanarak popülasyonun hızlı bir şekilde artması sağlanmıştır. Popülasyon yeterli birey sayısına ulaşınca tekrar yeni popülasyonun LC<sub>60</sub> değeri belirlenmiş ve bu yeni popülasyonlara da yeni LC<sub>60</sub> değeri uygulanarak seleksiyon çalışmalarına devam edilmiştir.

### **Biyoassay çalışması**

Seleksiyon çalışmaları sonucu elde edilen popülasyonun bifenthrine direnç durumunun belirlenmesi amacıyla SAK ve BİF 20 ve GSS popülasyonlarında biyoassay çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca BİF 20 popülasyonunun Çizelge 1'de verilen 6 insektisit/akarisit karşı çoklu direnç geliştirip geliştirmediği de biyoassay ile incelenmiştir.

Insektisit/akarisitlerin uygulanmasında Yorulmaz ve Ay (2009)'dan alınan kuru film yöntemi geliştirilerek kullanılmıştır. İlaç formülasyonları bidestile su ile seyreltilerek stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stoktan ½ oranında yapılan seri seyreltmelerle diğer dozlar elde edilmiştir. Bu şekilde yapılan tüm seyreltmelerde ve kontrolde de bidestile su kullanılmıştır. İsektisit/akarisit konsantrasyonları hazırlandıktan sonra ilaçlama kulesinde 6 cm çapındaki plastik petrinin alt ve üst kapağına 1'er ml gelecek şekilde toplam 2 ml ilaçlı sıvı püskürtülmüştür. Kontrolde ise sadece bidestile su uygulanmıştır. İlaçlama kulesi 1 bar basınçta çalıştırılmıştır. Uygulama yapılan petriyer oda koşullarında yaklaşık 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Kırmızıörümceklerin kaçmasını önlemek için petrinin taban kısmının çevresine pencere bandı yapıştırılmış ve böylece petri kaplarının sıkıca kapanması sağlanmıştır. Uygulama yapılan petriyerin her birine bir fırça yardımı ile 25-30 adet dişi birey aktarılmış ve kapağı iyice kapatılmıştır. Daha sonra bu petriyer 26±2 °C sıcaklık, %50-55 orantılı nem, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık koşullara sahip odaya bırakılmıştır. Ölü ve canlı bireylerin sayımı 24 saat sonra stereomikroskop altında yapılmıştır. Denemeler 1 kontrol + 7 doz olarak kurulmuş ve her doz 3 tekerrürden oluşmuştur.

### **İstatistiksel değerlendirme**

*T. urticae* popülasyonlarının 24 saat sonra belirlenen ölüm verilerinden yararlanılarak POLO bilgisayar paket programında (LeOra Software 1994) denenen insektisit/akarisitlerin LC<sub>50</sub> ve LC<sub>60</sub> değerleri belirlenmiştir. Denemede kullanılan bütün popülasyonlar için LC<sub>50</sub> değerlerinin standart hassas popülasyona ait LC<sub>50</sub> değerine oranlanması ile her insektisit/akarisit için popülasyonların (çoklu) direnç oranları elde edilmiştir.

### **Direnç kalıtım çalışmaları**

Direncin döllerle aktarımını ve geriye dönüşümünü belirlemek için dirençli (BİF 20) ve hassas (GSS) popülasyonlar arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır. Resiprokal çaprazlamalar, dirençli popülasyonun dişi bireyleri ile

hassas popülasyonun erkek bireyleri ve hassas popülasyonun dişi bireyleri ile dirençli popülasyonun erkek bireyleri arasında çiftleşme sağlanarak yapılmıştır. Tabanı ıslatılmış pamukla kaplı 9 cm çapındaki petrilerin üzerine temiz barbunya fasulyesi yaprağı konulmuştur. Her bir petrideki yaprağın üzerine dirençli popülasyondan 20 adet deutonimf dişi birey ve hassas popülasyondan 30 adet ergin erkek birey aktarılmıştır. Resiprokal çaprazlamalar için 20 adet petri hazırlanmıştır. Aynı işlem dirençli popülasyondan erkek birey ve hassas popülasyondan dişi birey aktarılarak da tekrarlanmıştır. Bu süreçte diploid dişiler haploid erkekler tarafından döllenmiştir. 5 gün sonra yapraklar üzerindeki ergin bireyler uzaklaştırılmış ve dişi bireylerin bırakmış oldukları yumurtalar açıldıktan sonra yeni nimfler saksılardaki barbunya fasulyesi bitkileri üzerine aktarılmıştır. Bu şekilde F1 dölleri elde edilmiştir. Bireyler ergin olduğunda biyoassay ile bifenthrin uygulanarak LC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiş ve hassas popülasyonun LC<sub>50</sub> değeri ile karşılaştırılmıştır. Her iki çaprazlamadan sonra F1 dişilerinde direncin kalıtımı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Stone 1968' e atfen Sato et al. 2004).

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

Burada, X<sub>1</sub> dirençli popülasyonun, X<sub>2</sub> F1 dişilerinin, X<sub>3</sub> ise hassas popülasyonun LC<sub>50</sub> değerinin logaritmasını ifade etmektedir. Bu formüle göre baskınlık derecesi -1 < 0 > 1 arasında değişmekte olup, -1 çekinik direnci, 0 baskınlık olmadığını (nötr), +1 ise baskın direnci belirtmektedir.

#### **Microplate assay ile sitokrom P450 aktivitesinin incelenmesi**

Sitokrom P450 monooksijenaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde Rose ve ark. (1995)'in metodu *T. urticae*'ye uyarlanmış ve substrat olarak *p*-nitroanisole (PNOD) kullanılmıştır. Sitokrom P450 aktivitesi için denenecek popülasyondan yaklaşık 50 adet ergin dişi kırmızı örümcek ependorf tüpe alınarak 200 µl homojenizasyon bufferda [0.05 M Tris-HCl + % 1.15 KCl + 1mM EDTA pH (7.7)] ezilerek +4 °C'de 20000 g'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Daha sonra mikroplakanın her kuyucuğuna 90 µL enzim kaynağı+100 µL 2mM *p*-nitroanisole eklenerek karışım 30 °C'de 3 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon 10 µL 9.6 mM NADPH eklenerek başlatılmıştır. Enzim aktivitesi kinetik mikroplaka okuyucuda 405 nm'de 30 °C'de 15 dk 34 sn aralıklarla okunmuştur.

Protein miktarları, standart olarak bovine serum albumin (BSA) kullanılarak Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir. Elde edilen değerler SAS (1999) programında GLM (General Linear Model) prosedürü kullanılarak analiz edilmiştir. Ortalamalar arasındaki fark Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

### **SONUÇLAR**

*T. urticae*'nin SAK popülasyonunda bifenthrin ile 20 kez seleksiyon yapılmıştır. SAK popülasyonunun bifenthrin uygulandığında LC<sub>50</sub> değeri 984.49 µl

$l^{-1}$  iken, seleksiyon sonrası (BİF 20) bu değer 11914.40  $\mu l^{-1}$ 'ye yükselmiştir. Bifenthrin direnç oranı ise 1.81 kattan 21.84 kata artmıştır (Çizelge 2) (Ay ve Yorulmaz 2008).

**ÇİZELGE 2.** SAK, GSS ve seleksiyon popülasyonlarının bifenthrin'e karşı belirlenmiş LC değerleri ve direnç oranları (Ay and Yorulmaz 2008)

Popülasyon	n*	Eğim±se	LC <sub>50</sub> ( $\mu l^{-1}$ ) 0.95 güven aralığı	LC <sub>60</sub> ( $\mu l^{-1}$ ) 0.95 güven aralığı	LC <sub>50</sub> RR**
SAK	633	1,33±0,13	984,49 762,37 – 1227,31	1525,72 1223,72 – 1896,67	1,81
Seleksiyon 1	734	1,13±0,11	1173,17 701,02 – 1762,93	1964,37 1278,18 – 2971,73	2,15
Seleksiyon 2	630	1,04±0,10	1656,14 1233,38 – 2163,00	2889,75 2213,27 – 3821,23	3,04
Seleksiyon 3	726	1,17±0,10	1925,09 1522,85-2399,12	3164,50 253,923-400,026	3,53
Seleksiyon 4	715	1,08±0,10	2287,37 1756,93-2925,62	3919,53 3064,37-5105,88	4,19
Seleksiyon 5	688	0,95±0,10	3586,35 2559,24-4864,18	6598,43 4865,01-9112,96	6,57
Seleksiyon 6	721	1,12±0,12	7362,05 5574,74-9777,76	12388,00 9345,97-17276,84	13,50
Seleksiyon 7	720	1,09±1,10	6941,98 5340,39-8900,34	11849,10 9240,15-15486,58	12,73
Seleksiyon 8	631	1,38±0,11	7719,68 4798,66-12007,55	11777,22 9914,335-14139,22	14,15
Seleksiyon 9	726	1,28±0,11	5326,70 4119,10-6706,30	8386,10 6659,70-10565,90	9,77
Seleksiyon 10	727	1,03±0,10	8270,63 6318,43-10746,41	14569,23 11201,29-19610,25	15,16
Seleksiyon 11	730	1,08±0,10	8463,23 6544,68-10586,10	14533,95 11305,64-19176,49	15,52
Seleksiyon 12	724	1,00±0,09	8169,69 6292,40-10533,53	14620,74 11318,05-19563,96	14,98
Seleksiyon 13	722	1,11±0,10	9251,25 7169,20-11830,82	15648,75 12229,79-20552,51	16,96
Seleksiyon 14	721	1,07±0,105	11268,06 8550,53-14729,29	19379,54 14823,47-26178,93	20,66
Seleksiyon 15	723	1,10±0,10	11304,10 8715,90-14556,10	19207,60 14908,70-25498,40	20,72
Seleksiyon 16	723	1,09±0,10	11590,50 8962,95-14903,19	19769,96 15364,08-26244,16	21,25
Seleksiyon 17	723	1,12±0,10	11298,56 8673,92-14543,61	18990,41 14750,76-25041,11	20,71
Seleksiyon 18	722	1,22±0,10	9144,24 7304,10-11330,00	14732,15 11886,41-18553,85	16,76
Seleksiyon 19	720	1,36±0,11	9858,43 7942,41-12093,03	15106,56 12315,49-18717,63	18,07
BİF 20	723	1,21±0,11	11914,40 9392,40-14977,49	19275,87 15329,62-24724,87	21,84
GSS (hassas)	527	1,49±0,15	545,31 340,35 – 855,46	-	-

n\*: denemede kullanılan birey sayısı

\*\* Direnç oranı= Tarla popülasyonu LC<sub>50</sub> / Hassas popülasyon LC<sub>50</sub>

### Biyosay çalışmaları

Uygulanan 6 insektisit/akarisitin BİF 20 ve GSS popülasyonlarındaki LC<sub>50</sub> değerleri ve direnç oranları Çizelge 3'te verilmiştir. BİF 20 popülasyonunda abamectin, chlorpyrifos, clofentezine, fenpyroximate ve propargite'e karşı 1.72-4.73 kat direnç belirlenmiştir. Çizelge 3'te gerek LC<sub>50</sub>, gerekse direnç oranları incelendiğinde, amitraz kullanıldığında BİF 20 popülasyonunun GSS popülasyonuna göre daha hassas olduğu anlaşılmaktadır. BİF 20 popülasyonunda en yüksek direnç oranları 4.73 kat ile abamectin ve 4.72 kat ile chlorpyrifos karşı elde edilmiştir.

**ÇİZELGE 3.** BİF 20 ve GSS popülasyonlarına uygulanan insektisit/akarisitlerin LC<sub>50</sub> değerleri, direnç oranları ve eğimleri

İnsektisit/Akarisit	Popülasyon	n*	Eğim±se	LC <sub>50</sub> (µl l <sup>-1</sup> ) 0.95 güven aralığı	Direnç oranı**
Abamectin	GSS	721	1,09±0,09	11,03 8,67-14,02	-
	BİF 20	721	1,49±0,12	52,16 34,74-73,07	4,73
Amitraz	GSS	722	1,08±0,09	383,29 300,41-487,09	-
	BİF 20	720	1,17±0,10	312,73 213,26-443,53	<0
Chlorpyrifos	GSS	723	0,57±0,08	22,10 11,47-34,97	-
	BİF 20	724	1,35±0,11	104,45 83,22-128,98	4,72
Clofentezine	GSS	716	1,38±0,10	28,64 23,23-34,78	-
	BİF 20	720	1,52±0,12	76,95 61,18-94,49	2,68
Fenpyroximate	GSS	720	1,34±0,10	66,17 54,23-79,86	-
	BİF 20	720	1,46±0,12	113,73 89,67-140,54	1,72
Propargite	GSS	724	1,21±0,10	127,55 101,78-158,20	-
	BİF 20	723	1,34±0,11	260,78 207,95-322,09	2,04

\*: Denemede kullanılan birey sayısı

\*\* :Çoklu direnç oranları

### Direnç kalıtım sonuçları

Bifenthrin'e dirençli olan BİF 20 popülasyonu, hassas popülasyon GSS ile çaprazlanmış ve çaprazlama sonucu elde edilen F1 popülasyonlarının LC<sub>50</sub>

değerleri ve direnç oranları saptanmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4'te görülmektedir.

**ÇİZELGE 4.** GSS, BİF 20 ve F1 popülasyonlarına uygulanan bifenthrin'in LC<sub>50</sub> değerleri, direnç oranları ve eğimleri

Popülasyon	n*	Eğim±se	LC <sub>50</sub> (µl l <sup>-1</sup> ) 0.95 güven aralığı	Direnç oranı**	D***
BİF 20	723	1,21±0,11	<b>11914,40</b> 9392,40-14977,49	21,84	
F1 (BİF 20 dişi X GSS erkek)	723	1,38±0,11	<b>8999,19</b> 7190,78-11075,72	16,50	0,81
F1 (GSS dişi X BİF 20 erkek)	729	1,39±0,11	<b>6838,22</b> 4802,74-9283,85	12,54	0,63
GSS (hassas)	527	1,49±0,15	<b>545,31</b> 340,35 – 855,46	-	

\*Denemede kullanılan birey sayısı

\*\*Dirençli popülasyonun LC<sub>50</sub> / Hassas popülasyonun LC<sub>50</sub>.

\*\*\*Dominantlık derecesi

Çizelge 4'te görüldüğü gibi çaprazlama sonucunda elde edilen F1 bireylerinde LC<sub>50</sub> değerleri BİF 20 popülasyonuna göre oldukça azalmıştır. Direnç oranları bakımından BİF 20 popülasyonu 21.84 kat dirence sahip iken, F1 bireylerinde bu oran 16.50 ve 12.54 kate düşmüştür. F1 popülasyonlarının dominantlık derecesi ise 0.81 ve 0.63 olarak bulunmuştur. Bu değerler 1'den az olduğundan direnç kalıtımının cinsiyete bağlı olmadan eksik baskın karakterli taşıdığı belirlenmiştir.

#### Microplate assay ile sitokrom P450 aktivitesinin incelenmesi

GSS, SAK ve BİF 20 popülasyonlarının sitokrom P450 enzim aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 5'e verilmiştir.

Çizelge 5'te sitokrom P450 aktivitesinin GSS, SAK ve BİF 20 popülasyonlarında sırasıyla 0.00156, 0.00231 ve 0.00310 mOD/min/mg protein olduğu görülmektedir. BİF 20 popülasyonunun enzim aktivitesi diğer popülasyonlara göre artmıştır. Ancak yapılan istatistiki analiz sonuçlarına göre aynı grup içerisinde yer aldığından, bu fark istatistiki olarak önemli bulunmamıştır (P<0.005).

**ÇİZELGE 5.** GSS, SAK ve BİF 20 popülasyonlarının sitokrom P450 aktiviteyi

Popülasyon	n*	Spesifik aktivite (±SE) mOD/min/mg protein	R/S**
GSS	4	0,00156 (±0,0006) a***	1,00
SAK	3	0,00231 (± 0,0007) a	1,48
BİF 20	5	0,00310 (±0,0006) a	1,99

\* Tekerrür sayısı

\*\* Denenen popülasyonun enzim aktivitesi/ hassas popülasyonun enzim aktivitesi

\*\*\* Aynı harfler istatistiki olarak aynı grubu göstermektedir.



## TARTIŞMA VE KANI

Etkili bir direnç yönetim programı için zararlıların ilaçlara direnç geliştirip geliştirmeyeceği direnç belirleme yöntemlerine, direnç gelişiminin erken belirlenmesine ve direnç mekanizmalarının bilinmesine bağlıdır (Vontas et al. 2000).

Akgünlü (2005), Adana, Isparta, Diyarbakır, Mardin ve Urfa' dan farklı kültür bitkileri üzerinden toplanan 11 farklı *T. urticae* popülasyonla 1.396-7.957 kat arasında bifenthrin direnci belirlemiştir. Denememizde ise Isparta'dan toplanan SAK popülasyonunda bifenthrin seleksiyonuna bağlı olarak direnç oranı 1.81 kattan 21.84 kata artmıştır. Ay ve ark. (2005), tarladan ilk topladıklarında SAK popülasyonunda propargite karşı 1.0 kat, amitraz'a karşı 1.3 kat ve abamectin'e karşı 1.1 kat direnç belirlemiştir. Çalışmamızda, bifenthrin dirençli BİF 20 popülasyonunda ise abamectin, chlorpyrifos, clofentezine, fenpyroximate ve propargite'e, karşı 1.72-4.73 kat çoklu direnç oranı bulunmuştur. Amitraz'a karşı GSS'den daha düşük LC<sub>50</sub> değerine sahip bulunan BİF 20 de ise çoklu direnç belirlenmemiştir. Tsagkarakou ve ark. (2009), bifenthrin 2495 kat dirençli *T. urticae* popülasyonunda fluvalinate'e 1251 kat, fenprothrin'e 86 kat, DDT'ye 6.7 kat ve dicofol'e 200 kat direnç belirlemiştir. Ancak bifenthrin'e 1026 kat dirençli *T. urticae* popülasyonunda bu oranlar fluvalinate, fenprothrin ve DDT'de sırasıyla 968, 47 ve 2.3 kat olarak bulunmuş, dicofol'e karşı ise direnç gelişimi belirlenmemiştir.

BİF 20 popülasyonunda yürütülen kalıtım çalışmaları sonucunda, bifenthrin direncinin cinsiyete bağlı olmadan eksik dominant karakterli olarak taşındığı kanısına varılmıştır. Tsagkarakou ve ark. (2009), bifenthrin dirençli ve hassas *T. urticae* popülasyonları arasında yapılan çaprazlamalar sonucunda bifenthrin direncinin resesif olarak taşındığını belirlemiştir. Ancak çalışmalarının yeterli olmadığını ve tekrar edilmesi gerektiğini de belirtmektedirler. Devine ve ark. (2001)'in yürüttüğü çalışmada ise METI- akarisit direncinin ana ve babadan gelen ve tamamen dominant genlerle taşındığı belirlenmiştir.

Esteraz, GST ve sitokrom P450 enzimleri birçok piretroid ve organikfosforlu insektisit detoksifikasyonunda rol oynamaktadır (Konanz and Nauen 2004, Wheelock et al. 2005). Ay ve Yorulmaz (2008), bifenthrin dirençli BİF 20 popülasyonunda sinerjistlerden PBO, IBP ve TPP ile yaptıkları çalışma sonucunda sırasıyla 1.34, 1.75 ve 1.43 kat sinerjistik etki oranı belirlemiştir. Araştırmada esteraz enzimi jel elektroforez yöntemiyle incelenmiş ve BİF 20 popülasyonunun bant yoğunluğu ile sayısının başlangıç popülasyonuna göre arttığı belirlenmiştir. Esteraz ve glutatyon S-transferaz (GST) enzimlerinin mikroplaka okuyucuda kinetik olarak belirlenmesi sonucunda ise, BİF 20 popülasyonunda GSS popülasyonuna göre 2.49 kat esteraz ve 1.13 kat GST enzim aktivitesi belirlemiştir. Yapılan çalışmada BİF 20'de esteraz ve GST aktivitelerindeki

artış başlangıç popülasyonu (SAK) ve hassas GSS'ye göre istatistiki olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.005$ ). Çalışmamızda ise, BİF 20 popülasyonunda sitokrom P450 enzim seviyesi ana popülasyona göre yükselmiştir, ancak bu artış istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ( $P<0.005$ ).

Ay ve Gürkan (2005), pamuk tarlalarından topladıkları *T. urticae* popülasyonunda bifenthrin'e yüksek oranda direnç (669 kat) ve esteraz aktivitesi belirlemişlerdir. Van Leeuwen ve Tirry (2007), *T. urticae*'nin tarla popülasyonunda yüksek oranda bifenthrin direnci ve esteraz aktivitesi bulmuşlardır. Yang ve ark. (2002), bifenthrin ile selekte edilen *T. urticae* popülasyonunda esteraz seviyesinde artış belirlerken, GST aktivitesinin azaldığını bulmuştur. Young ve ark. (2005), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)'nin tarla popülasyonunda PBO'nun piretroid direncini düzenlediğini belirtmektedir. Esteraz ve P450 aktivitelerinin chlorfenapyr detoksifikasyonunda rol oynayabileceği Van Leeuwen ve ark. (2006) tarafından bildirilmektedir.

Sonuç olarak, bifenthrin'in direnç mekanizmasının anlaşılması, IPM programları içerisinde bu etkili maddenin kullanımına olanak sağlayacaktır. Ayrıca kırmızıörümceklerin hangi pestisit gruplarına karşı direnç kazandıklarını belirlemek için bu yöndeki çalışmalara devam edilmesi gerekmektedir. Böylece yüksek oranda direnç gelişimine neden olan pestisitler yerine, etki mekanizması farklı pestisitler alternatif olarak kullanılarak direnç yönetim programları oluşturulmalıdır.

## LİTERATÜR

- Akgünlü, F. Z. 2005. *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'nin Değişik Populasyonlarının Sentetik Pyretroidli İlaçlara Karşı Meydana Getirdiği Direncin İzlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 41s, Ankara.
- Anonim, 2009. Ruhsatlı Bitki Koruma Ürünleri. TC. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Sistem ofset. S. 402.
- Ay, R. and M. O. Gürkan, 2005. Resistance to Bifenthrin and Resistance Mechanisms of Different Strains of the Two-Spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae* Koch) from Turkey. *Phytoparasitica* **33**(3), 237–244.
- Ay, R., E. Sökeli, I. Karaca and M. O. Gürkan, 2005. Response to Some Acaricides of The Two-spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae* Koch) From Protected Vegetables in Isparta. *Turk J. Agric. For.* **29**: 165 - 171.
- Ay, R. and S. Yorulmaz, 2008. The Evaluation of the Esterase and Glutathion S-Transferase Enzymes in Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari:Tetranychidae) Selected with Bifenthrin. *Integrative Acarology Proceedings of the 6th European Association of Acarologists Congress*, 419-424, 21-25 July, Fransa.

- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitiv Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein–Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Devine, G. J., Barber, M. and Denholm, I. 2001. Incidence and Inheritance of Resistance to METI-acaricides in European Strains of the Two-spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae*) (Acari: Tetranychidae). *Pest Management Science*, 57: 443-448.
- Gorman, K., F., Hewitt, Denholm I., and G. J. Devine, 2001. New Developments in Insecticide Resistance in the Glasshouse Whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) and the Two-spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae*) in the UK. *Pest Management Science*, 58: 123-130.
- 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(2): 49-57.
- LeOra Software, 1994. POLO-PC: A User’s Guide to Probit or Logit Analysis. LeOra Software, 28 p., Berkeley, CA.
- Öncüer, C. ve E. Durmuşoğlu, 2008. Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, No: 28, 472s. Aydın.
- Rose, R. L., Barbhैया, R., Roe, G., Rock and E. Hodgson, 1995. Cytochrome P-450-Associated Insecticide resistance and The Development of Biochemical Diagnostic Assays in *Heliothis virescens*. *Pesticide Biochemical Physiology*, 51:,178–191.
- SAS, 1999. Statistical Analysis Systems User’ s Guide (8<sup>th</sup> ed). SAS Institute INC., Raleigh, North Carolina, USA..
- Sato, M, E, T, Miyata, M-D, Silva, A, Raga, 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.*, 39 (2), 293-302.
- Stumpf, N. and Nauen, R. 2001. Cross-Resistance, Inheritance and Biochemistry of Mitochondrial Electron Transport Inhibitor-Acaricide Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal Econ. Entomology*, 94(6): 1577-1583.
- Tsagkarakou, A., Leeuwen, T. V., Khajehalit, A., Grispou, M., Williamsons, M. S., L. Tirry, and J. Vontas, 2009. Identification of Pyrethroid Resistance Associated Mutations in the Para Sodium Channel of the Two Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae). *Insect Molecular Biology*, 18(5): 583-593.
- Van Leeuwen, T., S. V. 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., S. V. Pottelberge, and L. Tirry, 2006. Biochemical Analysis of a Chlorfenapyr- Selected Resistant Strain of *Tetranychus urticae* Koch. *Pest Management Science*, 62: 425-433.

- 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.
- 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 Pesticide Science*, 30(2): 75-3.
- Yang, X., Buschman, L. L., 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 Econ. Entomology*, 95(2): 399-406.
- Yorulmaz, S. and R. Ay, 2009. Multiple Resistance, Detoxifying Enzyme Activities and Inheritance of Abamectin Resistance of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Turkey Journal of Agriculture and Forestry*, 33 (4): 393-402.
- Young, S. J., R. V. Gunning, and G. D. Moores, 2005. The effect of Piperonyl Butoxide on Pyrethroid Resistance Associated Esterases in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 61: 397-401.