

## Milbemectin ile Seleksiyon Yapılmış *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae) Popülasyonunda Direnç, Direnç Kalıtımı ve Bazı Detoksifikasyon Enzimlerinin Belirlenmesi<sup>1</sup>

Mehmet Ali İNANICI Recep AY\*

Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta  
\*Sorumlu yazar e-mail: recepay@sdu.edu.tr

Geliş tarihi: 15.12.2017, Yayına kabul tarihi:14.03.2018

Bu çalışmada *Panonychus ulmi* (Koch)'nin milbemectin'e karşı oluşturduğu direnç gelişimi, direnç kalıtımı ve biyokimyasal direnç mekanizması incelenmiştir. Bu amaçla hassas popülasyon HS de milbemectin ilacı ile seleksiyon yapılmıştır. Çalışmada ilaçlama kulesi-yaprak disk yöntemi kullanılmıştır. Öncelikli olarak HS popülasyonunda milbemectin LC<sub>50</sub> ve LC<sub>70</sub> değerleri belirlenmiştir. İlk seleksiyon dozu olarak LC<sub>70</sub> dozu kullanılmış, sonraki seleksiyon dozları ise her seferinde 1.5 kat artırarak uygulanmıştır. Beşinci seleksiyon sonunda, dirençli popülasyonda direnç kalıtım çalışmaları ve biyokimyasal çalışmalar yapılmıştır.

*Panonychus ulmi* hassas popülasyonunda milbemectin LC<sub>50</sub> ve LC<sub>70</sub> dozları sırasıyla 0.117 ve 0.264 µl/ 100 ml su olarak bulunmuştur. HS popülasyonun 5 seleksiyon sonunda LC<sub>50</sub> değeri 0.870 µl/ 100 ml suya ve direnç oranında 7.43 kata artmıştır. Direnç kalıtım çalışmalarında, M5 ♂ X GSS ♀ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F1 dişilerinde, D = 0.56; GSS ♂ X M5 ♀ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F1 dişilerinde ise, D = 0.06 olarak bulunmuştur. Biyokimyasal çalışmalarda ise esterez, Glutathion S-Transferaz (GST) enzimi ve Cytochrome P450 (P450) enzimleri sırasıyla α-naftyl asetat, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ve 7-ethoxycoumarin (7-EC) substratları ile belirlenmiştir. Seleksiyon popülasyonunda (M5) esterez, GST ve P450 enzimleri sırasıyla başlangıç popülasyona göre 1.67, 0.57 ve 2.09 kat artmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Panonychus ulmi*, milbemectin, direnç, esterez, GST, P450

### Determination of Resistance, Inheritance and Some Detoxification Enzymes in *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae) Population Selected with Milbemectin

In this study, development of resistance, resistance inheritance and biochemical resistance mechanism of milbemectin in *Panonychus ulmi* (Koch) have been investigated. For this purpose, the susceptible population HS was also selected with milbemectin. LC<sub>50</sub> and LC<sub>70</sub> values of milbemectin in the HS population were determined primarily. As the first selection dose LC<sub>70</sub> value was used. Subsequent selection doses have been increased 1.5-fold each time. At the end of the fifth selection, resistance inheritance studies and biochemical studies were carried out in resistant populations.

In the susceptible *Panonychus ulmi* population, LC<sub>50</sub> and LC<sub>70</sub> doses of milbemectin were found as 0.117 and 0.264 µl / 100 ml water, respectively. At the result of 5 selection in HS populations, the LC<sub>50</sub> value increased to 0.870 µl / 100 ml water and the resistance rate increased to 7.43-fold. In resistance inheritance studies, in F1 females obtained from M5 ♂ X GSS ♀ and GSS ♂ X M5 ♀ reciprocal crossing that was found as D = 0.56, D = 0.06, respectively. In biochemical studies, enzymes of esterase, glutathione S-transferase (GST) and Cytochrome P450 (P450) were identified by α-naphthyl acetate, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and 7-ethoxycoumarin (7-EC) substrates. In the selection population (M5), esterase, GST and P450 enzymes increased by 1.67, 0.57 and 2.09-fold, respectively, when compared to the parental population.

**Keywords:** *Panonychus ulmi*, milbemectin, resistance, esterase, GST, P450

<sup>1</sup> Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 4528-YL1-15 nolu proje ile desteklenmiştir ve birinci yazarın Yüksek Lisan tezinin bir bölümüdür.

## Giriş

Kırmızıörümcekler elma üretiminde önemli derecede kayıplara neden olan zararlılardır. Bunlardan biri olan *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae), Rosaceae familyasına ait elma, armut, erik, şeftali gibi ekonomik değeri yüksek olan meyve ağaçlarında ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Croft, 1975). *P. ulmi* diğer kırmızıörümcekler gibi yapraklar üzerinde styletleri ile sokup emme suretiyle yaprak dokusunda bronzlaşmalara, solmalara (Kramer and Nauen, 2011) ve bitkinin fotosentez yapabilmesi için gerekli yaprak alanının azalmasına neden olmaktadır (Van Leeuwen et al., 2005).

Günümüzde üreticiler zararlılarla savaşında uygulamasının kolay olması ve kısa sürede etki göstermesinden dolayı genellikle kimyasal savaşımı tercih etmektedirler. Kimyasal savaşımın en önemli olumsuz yönlerinden biri de zararlı popülasyonlarının kullanılan ilaçlara direnç geliştirmesidir. Kırmızıörümceklerin yüksek üreme yetenekleri, kısa hayat döngüleri ve aynı grup akarisitlerin sık kullanılmaları sonucu akarisitlere kısa sürede direnç geliştirebilmektedirler (Van Leeuwen et al., 2005). Direnç, tarla koşullarında aynı ilacın uygulama dozunun seleksiyon baskısına maruz kalan popülasyonunun aynı dozda canlı kalma yeteneğini geliştirmesi ya da popülasyonda meydana gelen genetik değişim olarak tanımlanmaktadır (Brown, 1958).

Popülasyonlarda direnç geliştikten sonra direnci kırmak, geriye döndürmek zordur ve geriye dönüşümü zaman alacaktır. Bu nedenle, zararlılarda savaşında direnç gelişmeden önce direnç gelişimini engellemek veya geciktirmek daha önemlidir. Bunun için, öncelikle zararlıların direnç mekanizmaları, ilaçların etki yollarının ve uygulama faktörleri tespit edilmelidir (Ay ve ark., 2013). Böceklerde direnç mekanizmasını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Kırmızıörümceklerde de böceklerde olduğu gibi estera, monooksijenaz ve glutatyon S-transferaz gibi enzimlerin detoksifikasyonu sonucunda metabolik direnç gelişmektedir

(Tsagkarakou et al., 1999; Ay ve Yorulmaz, 2009).

Elma bahçelerinde Elma içkurdundan sonra en fazla savaşım yapılan zararlılar arasında kırmızıörümcekler yer almaktadır. Milbemectin, *P. ulmi* ile savaşında yeni ruhsat almış bir akarisit ve direnç mekanizması bilinmemektedir. Zararlılarla savaşında direnç kalıtım tipinin ve direnç mekanizmasının bilinmesi kimyasal savaşında bu problemlerin ortadan kalkmasını ve ilaçlama maliyetinin düşmesine olanak sağlayacaktır. Bu bilgiler dikkate alındığında zararlılarla kimyasal savaşım da pestisitlere direnç gelişiminin geciktirilmesi, engellenmesi hatta direnç problemlerinin ortadan kaldırarak üretim maliyetinin minimum seviyeye indirilmesi ancak direnç mekanizmasının bilinmesi ile sağlanacağından bu çalışmada milbemectin ile seleksiyon yapılmış *P. ulmi* popülasyonlarının direnç, direnç kalıtımı ve detoksifikasyon enzimleri üzerine araştırmalar yapılmıştır.

## Materyal ve Yöntem

### Materyal

*Panonychus ulmi* popülasyonunun orijini ve yetiştirilmesi

Denemelerde, 1990 yılından bu yana ilaçsız ortamda yetiştirilen *P. ulmi*'nin hassas popülasyonu Bayer CropScience (Almanya) firmasından 2011 yılında sağlanmıştır. *Panonychus ulmi* popülasyonları içi su dolu küvetler içerisindeki elma (*Malus domestica* Brockhausen) ve erik (*Prunus domestica* Angeleno) fidanlarında yetiştirilmiş ve halen üretimi devam ettirilmektedir. *P. ulmi* popülasyonlarının yetiştirildiği iklimlendirme odası  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklık,  $60 \pm 5\%$  nem ve 16:8 A/K fotoperiyot koşullarına ayarlanmıştır.

### İnsektisit

Bu çalışmada milbemectin (9.3 g/l) etkili maddeye sahip milbeknock EC kullanılmıştır. Milbemectin, macrocyclic lactone ailesinin milbemisin grubu içinde yer alan bir akarisit. Milbemisinler, *Streptomyces hygroscopicus* (Jensen) (Actinomycetales:

Streptomycetaceae bakterisinin bir fermantasyon ürünüdür ve GABA-kapılı ve glutamat-kapılı klorid kanallarına etki eder (İnak ve Çobanoğlu., 2016). Milbemectin akar ve akar yumurtalarına karşı akarisidal, *Caenorhabditis elegans*' a karşı nematosidal etkinliğe sahip milbemisin A3 (%30) ve milbemisin A4 (%70) karışımı bir ilaçtır (Anonim, 2013).

### **Yöntem**

#### *Biyoassay çalışmaları*

Biyoassay çalışmalarında Ay ve Yorulmaz (2010)'ın uyguladıkları metot uyarlanarak kullanılmıştır. *P. ulmi*'nin milbemectin'e karşı LC<sub>50</sub> ve LC<sub>90</sub> değerlerini belirlemek için öncelikle deneme ilacının ön çalışmalarla yaklaşık % 90-99 ölüm veren dozlar saptanmıştır. Belirlenen bu doz her seferinde 1/2 oranında seyreltilerek en az 6 doz elde edilmiştir. LC değerlerinin belirlendiği çalışmalarda bu dozların popülasyonlarda yaklaşık % 10 ve % 95-99 ölüm veren dozlar arasında dağılım göstermesine özen gösterilmiştir. Denemeler her bir dozda ve kontrol (saf su uygulanan)'de 3'er tekerrür olacak şekilde kurulmuştur.

Bunun için tabanı ıslatılmış pamukla kaplı 9 cm çapındaki petriyer üzerinde hazırlanan yaprak üzerine yaklaşık 25 adet *P. ulmi* ergin dişileri binoküler altında bir fırça yardımı ile aktarılmıştır. Bu petriyer hazırlanan milbemectin konsantrasyonları ile ilaçlama kulesinde 1 bar basınç da ilaçlanmıştır. Her petriye 2 ml ilaç püskürtülmüştür. Kontrole sadece saf su uygulanmıştır. Petriyer yaklaşık 30 dk. havalandırılarak, 26 ± 1 °C sıcaklık, %60-65 nem ve 16:8 fotoperiyodik koşullarına sahip iklim kabinlerin aktarılmıştır. Ölü canlı değerlendirmesi 72 saat sonra yapılmıştır. *P. ulmi* popülasyonlarının 72 saat sonra belirlenen ölüm verilerinden yararlanılarak POLO bilgisayar paket programında (LeOra Software, 1994) LC<sub>50</sub> ve LC<sub>90</sub> değerleri belirlenmiştir. Direnç geliştiren seleksiyon popülasyonlarının LC<sub>50</sub> değerlerinin hassas popülasyona ait (başlangıç popülasyonu) LC<sub>50</sub> değerine oranlanması ile akarisit için popülasyonların direnç oranları elde edilmiştir.

#### *Seleksiyon çalışmaları*

Hassas *P. ulmi* popülasyonun LC değerleri belirlendikten sonra LC<sub>70</sub> değerleri ilaçların uygulanması bölümünde anlatılan metoda göre yaklaşık 40 petride ıslak pamuk üzerindeki yaprak üzerine aktarılan ergin bireye uygulanmıştır. Uygulama yapılan her bir petriye de yaklaşık 40-50 ergin dişi birey olmasına özen gösterilmiştir. Uygulamadan 72 saat sonra canlı kalan bireyler uygulama yapılmamış erik yapraklarına aktarılmıştır ve üremeye bırakılmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanarak popülasyonun hızlı bir şekilde artması sağlanmıştır (Ay ve Yorulmaz, 2010). Popülasyon yeterli birey sayısına ulaşınca hassas popülasyonun LC<sub>70</sub> değeri 1.5 kat artırılarak yeni seleksiyon dozu olarak belirlenmiştir. Her seleksiyonda bir önceki seleksiyon dozu 1.5 kat artırılarak uygulanarak seleksiyona devam edilmiştir.

#### *Biyokimyasal Çalışmalar*

Microplate assay ile toplam esteraz, glutathion S-transferaz (GST) ve monoksijenaz (P450) enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

#### *Microplate assay ile toplam esteraz enzimi*

*aktivitesinin incelenmesi:* Kinetik esteraz aktivitesinin belirlenmesinde  $\alpha$  – naphthylacetate kullanılarak 96 hücreli düztabanlı mikroplakada Stumpf and Nauen, (2002)'in geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. 20 adet ergin dişi %0.1 Triton X-100 içeren 100  $\mu$ l 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  $\mu$ l mikroplakanın hücrelerine konulmuştur. Çalışma 200  $\mu$ l substrat solüsyonunun eklenmesiyle başlatılmıştır. Substrat solüsyonu 30 mg Fastblue RR tuzunun 50 ml 0.2 M sodyum fosfat buffer' da çözülmesi ve bu karışıma 500  $\mu$ l 100 Mm  $\alpha$  – naphthylacetate'in ilavesiyle elde edilmiştir. Enzim aktivitesi 25 °C ve 450 nm' de 10 dakika süreyle okunmuştur. Kontrol hücreleri ise homojenatsız olarak okunmuştur.

*Microplate Assay ile Glutathion S-Transferaz (GST) enzimi aktivitesinin incelenmesi:* *Panonychus ulmi* popülasyonlarında GST enziminin kinetik olarak belirlenmesinde Stumpf and Nauen, (2002)' in geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. 30 ergin dişi 300 µl Tris HCL buffer (0.05M, pH7.5) içinde eppendorf tüplerde ezilmiştir. 100 µl supernatant 10000 g 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 hazırlanmış ve final konsantrasyonda 0.4 mM CDNB ve reduced glutathion (GSH) Tris HCL buffer de hazırlanmış ve final konsantrasyonda 4 mM GSH olması sağlanmıştır. Kontrol hücrelerinde ise sadece CDNB ve GSH homojenatsız okunmuştur. Absorvanstaki değişim 340 nm de 25 °C de 5 dk' da okunarak belirlenmiştir.

*Sitokrom (P450) enzimi aktivitesinin incelenmesi:* P450 enziminin florimetrik belirlemede Rauch and Nauen (2002)'in uygulamış olduğu metot uyarlanarak kullanılmıştır. *P. ulmi*'nin 100 adet dişi, 200 µl sodyum fosfat buffer (0.1 M, PH:7.6) içerisinde homojenize edilmiştir. Bu homojenattan 50 µl alınarak mikrolake hücrelerine koyulmuş ve üzerine 40 µl sodyum fosfat buffer eklenmiştir. Sonrasında her bir hücreye 2 µl 7-ethoxycoumarin (7-EC) ve 10 µl sulu NADPH eklenerek, final konsantrasyonda 0.4 mM 7-EC ve 1 mM NADP olması sağlanmıştır. Daha sonra bu karışım 30 °C' de 30 dakika 44 g de çalkalanarak inkübe edilmiş ve ardından karışımdan NADPH uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla 10 µl glutathion oksidaz (100 mM su içerisinde) ve 13 µl glutathion redüktaz (1.3 U) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra bu reaksiyon % 50'lik 125 µl asetonitril [Trizma-base buffer (0.05 M PH:10) içerisinde] kullanılarak durdurulmuştur. Florimetre'de enzim okuması 390 nm ve 465 nm boyunda gerçekleştirilmiştir. P450 okumaları 4 tekerrürlü olarak uygulanmıştır. Kontrolle ise homojenat konmadan okunmuştur.

Enzim aktiviteleri Bradford (1976) yöntemiyle BSA (bovine serum albumin) kullanılarak mOD/min/mg protein veya RFU/30min/mg protein olarak hesaplanmıştır. Elde edilen mOD/min/mg protein veya RFU/30min/mg protein değerleri SAS, (1999) programında GLM (General Linear Model) prosedürü kullanılarak analiz edilmiştir. Ortalamalar arasındaki fark T testi ile belirlenmiştir.

#### *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 petrilere tabanına pamuk konulmuş ve ıslatılmıştır. Tabanı pamukla kaplı petrilere temiz erik yaprağı alt yüzeyi yukarı gelecek şekilde konulmuştur. 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 haploiderkekler tarafından döllenmesi sağlanmıştır. 5 gün sonra yapraklar üzerindeki ergin bireyler uzaklaştırılmış ve dişi bireylerin bırakmış oldukları yumurtalar açıldıktan sonra yeni nimfler saksılardaki erik bitkileri üzerine aktarılmıştır. Bu şekilde F1 döller elde edilmiştir. Bireyler ergin olduğunda LC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiş ve hassas popülasyonun LC<sub>50</sub> değeri ile karşılaştırılmıştır (Van Leeuwen et al., 2004). Her iki çaprazlamadan sonra F1 dişilerinde direncin kalıtımı;  $D = (2X_2 - X_1 - X_3) / (X_1 - X_3)$  formülü ile hesaplanmıştır (Sato et al., 2004). X<sub>1</sub>= Dirençli ırkın LC<sub>50</sub> değerinin log<sub>10</sub>' u, X<sub>2</sub>= F1 dişilerinin LC<sub>50</sub> değerinin log<sub>10</sub>' u, X<sub>3</sub>= Hassas ırkın LC<sub>50</sub> değerinin log<sub>10</sub>' u, ifade etmektedir. Dominantlık derecesi -1 ile +1 arasında değişmektedir. -1<D>0: eksik çekinik karakter, 0: Baskınlık yok (nötr), 0<D>+1:

eksik dominant karakter anlamına gelmektedir.

## Bulgular

### Bioassay ve Seleksiyon sonuçları

*Panonychus ulmi* hassas popülasyonu milbemectin ile 5 kez seleksiyon yapılarak

direnç gelişimi ve direnç mekanizması belirlenmiştir. Elde edilen popülasyon bireyleri M5 olarak adlandırılmıştır. Hassas HS popülasyonundan elde edilen LC<sub>70</sub> dozu ilk seleksiyon dozu olarak kullanılmış ve daha sonraki seleksiyonlarda bu doz her seferinde 1.5 kat artırılarak seleksiyon dozu olarak kullanılmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Hassas *Panonychus ulmi* popülasyonuna uygulanan seleksiyon dozları

Table 1. Selection doses applied to susceptible *Panonychus ulmi* population

Popülasyon Population	Dozlar (µl/ 100 ml su) Dose (µl/ 100 ml water)
Hassas popülasyonu (LC <sub>70</sub> değeri) Susceptible population (LC <sub>70</sub> value)	0.264
1. seleksiyon 1 <sup>st</sup> selection	0.264
2. seleksiyon 2 <sup>nd</sup> selection	0.264x1.5=0.396
3. seleksiyon 3 <sup>rd</sup> selection	0.396X1.5=0.594
4. seleksiyon 4 <sup>th</sup> selection	0.594X1.5=0.891
5. seleksiyon 5 <sup>th</sup> selection	0.891X1.5=1.336

Hassas popülasyondan 5. seleksiyon sonucunda dirençli popülasyon (M5) elde edilmiştir. *P. ulmi* hassas popülasyonu LC<sub>50</sub> değeri 0.117 mg µl/ 100ml su'dan, 5. seleksiyon sonucunda 0.870 µl/ 100 ml su'ye yükselmiştir. LC<sub>90</sub> değeri ise 0.851 µl/

100 ml su'dan 3.888 µl/ 100 ml su'ya artmıştır (Çizelge 2). Hassas HS popülasyonu ile dirençli M5 popülasyonu karşılaştırıldığında, M5 popülasyonu milbemectine karşı LC<sub>50</sub> değerine göre 7.43 kat direnç geliştirdiği belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Hassas ve dirençli *Panonychus ulmi* popülasyonlarının milbemectin'e karşı göstermiş oldukları LC<sub>50,90</sub> değerleri ve direnç oranları

Table 2. LC<sub>50,90</sub> values and resistance rates of susceptible and resistant *Panonychus ulmi* populations against milbemectin

Popülasyon Population	n*	Eğim±se Slope±se	LC <sub>50</sub> (µL/ 100 ml su) 0.95 güven aralığı LC <sub>50</sub> (µL/ 100 ml water) 0.95 confidence interval	LC <sub>90</sub> (µL/ 100 ml su) 0.95 güven aralığı LC <sub>90</sub> (µL/ 100 ml water) 0.95 confidence interval	RR** (LC <sub>50</sub> )	RR*** (LC <sub>90</sub> )
<b>HS</b>	505	1.490±0.26	0.117 (0.065-0.173)	0.851 (0.549-1.795)	-	-
<b>M5</b>	440	1.971±0.46	0.870 (0.532-1.148)	3.888 (2.552-10.797)	7.43	4.56

\*Denemede kullanılan birey sayısı, \*\*LC<sub>50</sub> göre direnç oranı, \*\*\*LC<sub>90</sub> göre direnç oranı

\*The number of individuals used in the experiment, \*\* The resistance ratio according to LC<sub>50</sub>, \*\*\* The resistance ratio according to LC<sub>90</sub>

### Biyokimyasal çalışma sonuçları

Popülasyonların mikroplaka okuyucular ile toplam esterase enzim aktivitesi α-naftyl asetat ile girdiği reaksiyonda 10 dakika süreyle kinetik olarak belirlenmiştir. Esterase enzim aktivitesi mOD/min/mg protein olarak hesaplanmıştır. Hassas ve M5

popülasyonlarının esterase enzimlerinin mikroplaka okuyucuda kinetik olarak okunması sonucuna göre esterase enzim aktivitesi 1.67 kat artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 3) (P<0.05).

Popülasyonların mikroplaka okuyucular ile GST enzim aktiviteleri CDNB ile girdiği reaksiyonda 5 dakika süreyle kinetik olarak belirlenmiştir. GST enzim aktivitesi mOD/min/mg protein olarak belirlenmiştir. Hassas HS popülasyonun GST enzim aktivitesi 4.46 mOD/min/mg protein bulunurken, M5 popülasyonun ki 2.36 mOD/min/mg protein olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre GST enzim aktiviteleri M5 popülasyonunda hassas popülasyona göre yaklaşık % 50 azalmıştır

ve aradaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 3).

P450 enzim aktivitesi 7-ethoxycoumarin (7-EC) ile girdiği reaksiyonda microplate assay ile florometrik olarak belirlenmiştir ve RFU/30min/mg protein olarak hesaplanmıştır. *P. ulmi* hassas popülasyonunda P450 enzim aktivitesi 5 seleksiyon sonucunda 2.09 kat artarak, 0.349 RFU/30min/mg protein'den 0.731 RFU/30min/mg protein'e çıkmıştır (Çizelge 3). P450 enzim aktivitesindeki bu artış istatistiki olarak önemli bulunmuştur.

Çizelge 3. *Panonychus ulmi*'nin hassas ve dirençli popülasyonlarının detoksifikasyon enzim aktiviteleri

Table 3. Detoxification enzyme activities of susceptible and resistant populations of *Panonychus ulmi*

Popülasyon Population	N*	Esteraz ** Esterase	N*	R/S***	GST **	R/S***	N*	P450 **	R/S***
HS	8	14.0 B	4	-	4.46 A	-	4	0.349(±0,04) B	-
M5	8	23.4 A	4	1.67	2.36 B	0.57	4	0.731(±0,04) A	2,09

\*Tekerrür sayısı

\*\*Farklı olan harfler popülasyonlar arasındaki farklılıkların istatistiki olarak önemli olduğunu gösterir. (P< 0.05),

\*\*\*M5 popülasyonunun enzim aktivitesi/ Hassas popülasyonun enzim düzeyi aktivitesi (Esteraz ve GST enzim aktiviteleri mOD/min/mgprotein olarak, P450 enzim aktivitesi ise RFU/30min/mgprotein olarak hesaplanmıştır)

\* Repeat number

\*\* Different letters indicate statistically significant differences between populations (P < 0.05),

\*\*\* Enzyme activity of the M5 population / enzyme activity of the susceptible population (Esterase and GST enzyme activities was calculated as mOD / min / mg protein, P450 enzyme activity was calculated as RFU / 30 min / mg protein)

#### Direnç kalıtım çalışmaları

Milbemectin dirençli M5 popülasyonu ile GSS (hassas) popülasyon arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır. Ancak çaprazlamadan hemen önce dirençli M5 popülasyonun LC<sub>50</sub> değeri yeniden biyoassay denemelerle kontrol edilmiş ve LC<sub>50</sub> değeri 0.870 µl/100 ml sudan 0.448 µl/100 ml suya düşmüştür ve gerekli hesaplamalarda buna göre yapılmıştır. Çaprazlamalar sonucunda elde edilen F1 dölllerinin LC<sub>50</sub> değerleri ve direnç oranları Çizelge 4' de verilmiştir. M5 ♂ X GSS ♀ çaprazlamasından elde edilen F1 dölllerinin direnç oranı 2.86 kat olarak bulunmuştur. GSS ♂ X M5 ♀ çaprazlamasından elde edilen F1 dölllerinde direnç oranları ise 2.03 kat olarak belirlenmiştir. Çaprazlama

popülasyonlarının milbemectin direnç oranlarının başlangıç popülasyonuna göre önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Her iki çaprazlamadan sonra, M5 ♂ X GSS ♀ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F1 dişilerinde, D = 0.56; GSS ♂ X M5 ♀ resiprokal çaprazlamasından elde edilen F1 dişilerinde, D = 0.06 olarak bulunmuştur. Her iki çaprazlamadan da belirlenen D değerleri 0<D< 1 değerleri arasında bulunmuştur. Bu sonuçlara göre M5 ♂ X GSS ♀ çaprazlamasına milbemectin için direnç kalıtımının eksik dominant olduğu, GSS ♂ X M5 ♀ çaprazlamasına göre ise nötre yakın olduğu belirlenmiştir. Bunlara ilaveten bu sonuçlara göre milbemectin direncinin erkekler dişilere göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4. Resiprokal F1 dişilerinde milbemectin'e karşı belirlenen LC<sub>50</sub> değerleri, direnç oranları ve dominantlık dereceleriTable 4. LC<sub>50</sub> values and resistance ratio of milbemectin on female adults of the HS and M5 population and their reciprocal crosses

Popülasyon Population	n	Eğim±SE Slope±SE	LC <sub>50</sub> (µl/100 ml su) 0.95 güven aralığı LC <sub>50</sub> (µl/100 ml water) 0.95 confidence interval	LC <sub>50</sub> direnç oranı LC <sub>50</sub> resistance rate	D*
M5	440	1.971±0.46	0,448 (0.532-1,148)	3,83	-
F1(M5♂X HS ♂)	396	1.44±0.28	0.335 (0.193-0.479)	2.86	0,56
F1(HS♂X M5 ♂)	682	1.056±0.12	0.238 (0.128-0.456)	2.03	0,06
Hassas	505	1.490±0.26	0.117 (0.065-0.173)	-	

\*D: dominantlık derecesi, \*D: degree of dominance

### Tartışma ve Sonuç

*Panonychus ulmi* elma bahçelerinde ekonomik kayıplara neden olan önemli zararlılardan birisidir. Üreticiler diğer akarlar ve zararlılarda olduğu gibi bu zararlıya karşıda savaşımında kimyasal savaşımı tercih etmektedirler. *P. ulmi*'de diğer akarlar gibi kısa sürede döl vermeleri ve yüksek üreme güçleri nedeniyle kullanılan tarım ilaçlarına karşı kısa sürede direnç geliştirebilmektedirler. Yapılan bu çalışmada milbemectin ile 5 kez selekte edilen hassas *P. ulmi* popülasyonunda LC<sub>50</sub> değeri 0.117 µl/ 100ml su'dan 0.870µl/ 100ml su'ya çıkarak 7.43 kat direnç kazanmıştır. *P. ulmi*'nin yapılan bir çok araştırmada değişik ilaçlara karşı direnç geliştirgi görülmüştür. Nauen et al., (2001) yapmış oldukları çalışma *P. ulmi*'nin iki farklı ırkında hexythiazox, clofentezine, azocyclotin, deltamethrin, chlorpyrifos, pyridaben, fenpyroximate ve abamectin ilaçlarına karşı 0.23 kat - >4300 kat arasında değişen oranlarda direnç geliştirdiğini belirtmişlerdir. Pree and Wagner (1987) Güney Ontario'da 1984 yılında 45 bahçeden topladıkları *P. ulmi* popülasyonunun % 29'unun cyhexatin'e 2 popülasyonunda dicofol'a direnç geliştirdiğini rapor etmişlerdir. Kramer and Nauen (2011) 2009 ve 2010 yıllarında Avrupa'dan farklı ülkelerden topladıkları 60 dan fazla *P. ulmi* populasynunda spirodiclofen'e duyarlılığı belirlemişler, bazı popülasyonlarda 60 kata kadar direnç belirlemişlerdir. Ayrıca

spirodiclofen ile seleksiyon yaptıkları bir tarla popülasyonunda 7000 kat direnç geliştiğini bulmuşlardır.

Bu çalışmada kullanılan milbemectin'in insektisit ve akarisit özelliği vardır ve ülkemizde kırmızıörümceklere karşı ruhsatlıdır. Bu akarisit *P. ulmi*'de direnci ile ilgili bir çalışma yoktur, ancak aynı familyadan *Tetranychus urticae* Koch (Acar: Tetranychidae) ile birçok çalışma vardır. Nicastro et al., (2010) milbemectin ile 5 kez selekte ettikleri *T. urticae*'de LC<sub>50</sub> değerinin 7.33 mg/l'den 184 mg/l'ye arttığını ve direnç oranının da 25 kata çıktığını belirtmişlerdir. Lee et al., (2003) 6 farklı kesme çiçek serasından topladıkları *T. urticae* popülasyonunda milbemectin'e karşı erginlerde 1.8-14.6 kat, yumurtalarda ise 0.4-17.2 kat arasında direnç geliştiğini bildirmişlerdir. Yorulmaz-Salman ve ark. (2013) elma bahçelerinden topladıkları 3 avcı akar *Neoseiulus californicus* popülasyonlarında milbemectin'e karşı 6.52 - 7.25 kat direnç bulmuşlardır.

Zararlılarla etkili bir kimyasal savaşım için direnç kalıtım tipinin ve direnç mekanizmalarının bilinmesi çok önemlidir. Direnç kalıtım çalışmalarında elde edilen verilere göre M5 ♂ X HS ♀ çaprazlamasına milbemectin için direnç kalıtımının eksik dominant olduğu, HS ♂X M5 ♀ çaprazlamasına göre ise nötr yakın olduğu belirlenmiştir. Yani *P. ulmi*'de direnç kalıtımının erkeklerle eksik baskın taşındığı görülmüştür. Yapılan bu çalışmada seleksiyon dışı bireylerden yapıldığı için

direnç artışı sınırlı olmuştur. Stumpf ve Nauen (2001) yaptıkları çalışmada *T. urticae*'de pyradaben ve fenpyroximate direnç kalıtımının her iki cinsiyetinde rol oynadığını ancak dişilerin daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ay ve Yorulmaz (2010) *T. urticae* chlorpyrifos kalıtımının ebeveynin cinsiyetine bağlı olmadığını ve eksik dominant karakterli olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmanın ve literatür de verilen sonuçlara göre ilaçların zararlı türlerde kalıtım tipi ilaca ve zararlı türüne göre değişmektedir.

Direnç yönetim programlarında etkili bir direnç yönetimi için direnç mekanizmalarının analiz edilmesi gerekir. Tarım ürünlerinde zararlı böcek akarlarda genel olarak dört tip direnç mekanizması vardır. Bunlar sırasıyla morfolojik (penetrasyon) direnç, davranışsal direnç, metabolik direnç ve hedef yeri mutasyonu şeklinde özetlenebilir. Özellikle bu mekanizmalardan son ikisi önemlidir ve geriye dönüşümü daha zordur. Yapılan bu çalışmada milbemectin ile seleksiyon yapılan *P. ulmi* popülasyonunda hassas popülasyon HS'ye göre esteraz enzimi ve P450 enzimi önemli derecede artarken, GST enzimi önemli derece de azalmıştır. Benzer bir sonuçta Yorulmaz ve Ay (2009) abamectin ile 15 selekte ettikleri *T. urticae*'de bulmuşlardır. Bahsedile çalışmada abamectin ile selekte edilen *T. urticae* popülasyonunda direnç oranı 35 kata çıkarken, esteraz ve P450 enzimlerinin aktiviteleri dirençli popülasyonda artmış, ancak GST enzim aktivitesi ise azalmıştır. Yorulmaz-Salman ve ark. (2013) elma bahçelerinden topladıkları 3 avcı akar *Neoseiulus californicus* popülasyonlarında milbemectine karşı düşük oranda dirençli olduklarını ve esteraz, GST ve P450 enzimlerinin dirençli popülasyonlarda önemli derecede yüksek çıktığını bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarına GTS aktivitesi hariç benzemektedir. Ancak bu çalışmada incelenen popülasyonlar tarla popülasyonlarıdır ve başka ilaçlarda maruz kalmış olabilirler. Bu çalışmanın dışında milbemectin'in direnç mekanizması ile ilişkin çalışma bulunamamıştır. Özellikle üretiminin zor olması nedeniyle *P. ulmi*'de

ilaçların direnç mekanizması ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Ancak aynı familyadan *T. urticae* ile ilgili birçok ilacın biyokimyasal ve moleküler direnç mekanizması çalışılmıştır. Tirello et al. (2012) kesme çiçek seralarında topladıkları üç *T. urticae* popülasyonunda tebufenpyrad (direnç oranı—RR, RR<sub>50</sub> = 48.4 and 163.6 kat), fenpyroximate (RR<sub>50</sub> = 74.1 and 25.9 kat), abamectin (bir popülasyonda, RR<sub>50</sub> = 1,294.1 kat)'e karşı yüksek oran da direnç belirlemişler ve bu popülasyonlarda detoksifikasyon enzimleri esteraz, GST ve P450'nin hassas popülasyona göre yüksek oranda bulunduğunu ve potansiyel direnç mekanizması olabileceğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak elde edilen bu verilere göre, *P. ulmi*'de milbemectin direnç kalıtımı erkek bireyler ile eksik dominant olarak taşınmakta ve direnç mekanizmasında ise esteraz ve P450 enzimi rol oynamaya potansiyeli vardır.

## Kaynaklar

- Anonim, (2013).  
<http://www.philagro.co.za/wp-content/uploads/2013/08/milbeknock-info.pdf> Erişim Tarihi: 05/10/2017
- Ay, R. ve Yorulmaz, S. 2009. Bifenthrin'e Dirençli *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de Çoklu Direnç, Direnç Kalıtımı ve Sitokrom P450 Aktivitesinin Belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni 2009, 49 (2): 67-78. <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/bitkor/article/view/1011001304/1011001269>
- Ay, R., Yorulmaz, S. 2010. Inheritance and Detoxification Enzyme Levels in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) Strain Selected with Chlorpyrifos. J Pest. Sci., 2010, 83:85-93. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10340-009-0274-9>
- Ay, R., Yorulmaz Salman, S., İşçi, M. ve Yaman Y. 2013. Böceklerde İnsektisit Direnç Yönetimi. I. Bitki Koruma Ürünleri ve Makineleri Kongresi. 2-5 Nisan 2013. Antalya.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of



- Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle Of Protein – Dye B Inding. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>
- Brown, W. 1958. Insecticide Resistance in Artropods'. W.H.O., 1958, 240p. Genewe. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19592900438>
- Croft, B. A. 1975. Integrated Control of Apple Mites. Michigan State University Extension Service Bulletin, 1975, 825, 12.
- İnak E., Çobanoğlu S. 2016. Akarisitler ve Etki Mekanizmaları. Türk. Entomol. Bült., 2016, 6(4): 371-382. <http://dergipark.gov.tr/entoteb/issue/30024/324157>
- Kramer, T. and Nauen, R. 2011. Monitoring of Spirodiclofen Susceptibility in Field Populations of European Red Mites, *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae), and The Cross-Resistance Pattern of a Laboratory Selected Strain. Pest Management Science. 2011, 67(10): 1285-1293. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.2184/full>
- Lee, Y. S., Song, M. H., Ahn, K. S., Lee, K. Y., Kim, J. W., Kim, G. H. 2003. Monitoring of Acaricide Resistance in Two-Spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae*) Populations from Rose Greenhouses in Korea. Journal of Asia-Pacific Entomology. 2003, 6(1): 91-96. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226861508601739>
- LeOra Software. 1994. POLO-PC: A User's Guide to Probitor Logit Analysis LeOra Software, 28 p., Berkeley, CA. <http://www.skypig.info/pdf/Polo/6.pdf>
- Nauen, R., Stumpf, N., Elbert, A., Zebitz, C. P. W., Kraus, W. 2001. Acaricide Toxicity and Resistance in Larvae of Different Strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). Pest Management Science, 2001, 57(3): 253-261. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.280/full>
- Nicastro, R. L., Sato, M. E., Da Silva, M. Z. 2010. Milbemectin Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): Selection, Stability and Cross-Resistance to Abamectin. Experimental and Applied Acarology, 2010, 50(3): 231-241. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10493-009-9304-9>
- Pree, D. J., Wagner, H. W. 1987. Occurrence of Cyhexatin and Dicofol Resistance in The European Red Mite, *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae), in Southern Ontario. The Canadian Entomologist, 1987, 119(3): 287-290. <https://www.cambridge.org/core/journals/canadian-entomologist/article/occurrence-of-cyhexatin-and-dicofol-resistance-in-the-european-red-mite-panonychus-ulmi-koch-acari-tetranychidae-in-southern-ontario/0705C1631B93FFC18A4015961090B82A>
- Rauch, N. & Nauen, R. 2002. Spirodiclofen Resistance Risk Assessment in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): A Biochemical Approach. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2002, 74(2): 91-101. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357502001505>
- SAS. 1999. Statistical Analysis System User' Guide Statistics. SAS Institute Inc. Cary NC 27513USA. [https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/91pdf/sasdoc\\_91/stat\\_ug\\_7313.pdf](https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/91pdf/sasdoc_91/stat_ug_7313.pdf)
- Sato M. E., Miyata T., Da Silva M., Raga A., De Souza Filho M.G., 2004. Selections for Fenpyroximate Resistance and Susceptibility, and Inheritance, Cross-Resistance and Stability of Fenpyroximate Resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Appl. Entomol. Zool. 2004, 39 (2): 293–302. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/aez/39/2/39\\_2\\_293/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/aez/39/2/39_2_293/_article/-char/ja/)

- Stumpf, N. ve Nauen, R. 2001. Cross-Resistance, Inheritance, and Biochemistry of Mitochondrial Electron Transport Inhibitor-Acaricide Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology, 2001, 94(6): 1577-1583. <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1603/0022-0493-94.6.1577>
- Stumpf, N. ve Nauen, R. 2002. Biochemical Markers Linked to Abamectin Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Pesticide Biochemistry and Physiology 2002, 72: 111-121. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357501925830>
- Tirello, P., Pozzebon, A., Cassanelli, S., Van Leeuwen, T., Duso, C. 2012. Resistance to Acaricides in Italian Strains of *Tetranychus urticae*: Toxicological and Enzymatic Assays. Experimental and Applied Acarology, 2012, 57(1): 53-64. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10493-012-9536-y>
- Tsagkarakou, A., M. Navajas, F. Rousset and N. Pasteur. 1999. Genetic Differentiation in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Greenhouses in France. Exp. Appl. Acarol. 1999, 23: 365-378. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-1343-6\\_12](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-1343-6_12)
- Van Leeuwen, T., Stillatus, V., Tirry, L. 2004. Genetic Analysis and Cross-Resistance Spectrum of A Laboratory-Selected Chlorfenapyr Resistant Strain of Two-Spotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae). Experimental and Applied Acarology. 2004, 32(4): 249-261. <https://link.springer.com/article/10.1023%2FB%3A0000023240.01937.6d?LI=true>
- Van Leeuwen, T., Van Pottelberge, S., ve Tirry, L. 2005. Comparative Acaricide Susceptibility and Detoxifying Enzyme Activities in Field Collected Resistant and Susceptible Strains of *Tetranychus urticae*. Pest Management Science. 2005, 61(5): 499-507. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1001/full>
- Yorulmaz, S., Ay, R. 2009. Multiple Resistance, Detoxifying Enzyme Activity, and Inheritance of Abamectin Resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 2009, 33(4), 393-402. <https://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/abstract.htm?id=10395>
- Yorulmaz Salman, S., Yaman, Y., Aydınli F. ve Ay, R. 2013. Avcı Akar *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) Popülasyonlarının Milbemectin'e Karşı Direnç Düzeyleri, Sinerjistleri ve Detoksifikasyon Enzimlerinin Belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi – Journal of Agricultural Sciences. 2013, 19:207-218. [http://tarimbilimleri.agri.ankara.edu.tr/2013/19\\_3/6.makale.pdf](http://tarimbilimleri.agri.ankara.edu.tr/2013/19_3/6.makale.pdf)