

İnceleme ve Değerlendirmede Bilimsel Olarak Katkıda Bulunanlar
(Scientific Advisory Board)

- ADAMSKI, Z., Poland
AKBULUT, Mikail, Kayseri
AKYAZI, Faruk, Ordu
AMBROZIAK, A. K., Poland
ARMENGAUD, C., France
ASSING, V., Germany
ATLIHAN, Remzi, Van
AYDIN, Gökhan, Isparta
AZİZOĞLU, Uğur, Erciyes
BAŞHAN, Mehmet, Diyarbakır
BAYRAM, Ahmet, Diyarbakır
BORDERA, S., Spain
BUTT, T., UK
BÜYÜKGÜZEL, Ender, Zonguldak
BÜYÜKGÜZEL, Kemal, Zonguldak
CANHİLAL, Ramazan, Erciyes
CİVELEK, Hasan Sungur, Muğla
ÇAKMAK, İbrahim, Aydın
ÇALMAŞUR, Önder, Erzurum
ÇETİNTAŞ, Ramazan, Kahramanmaraş
ÇIKMAN, Emine, Şanlıurfa
DAĞLI, Fatih, Antalya
DEVİRAN, Zübeyir, Antalya
DOĞAN, Salih, Erzincan
DURMUŞOĞLU, Enver, İzmir
DURSUN, Ahmet, Amasya
ELMA Fatmanur, Konya
ELMALI, Meryem, Konya
ER, Mehmet Kubilay, Kahramanmaraş
ERDEM, Meltem, Zonguldak
ERLER, Fedai, Antalya
EROĞLU, Mahmut, Trabzon
FERİZLİ, Ahmet Güray, Ankara
FRIEDBERG, A., Israel
GARONNA, A. P., Italy
GAUGLER, R. USA
GÖKÇE, Ayhan, Niğde
GÖZEL, Uğur, Çanakkale
GÜRBÜZ, Mehmet Faruk, Isparta
HAMBÄCK, P., Sweden
HYRŠL, P., Czech Republic
IŞIKBER, Ali Arda, Kahramanmaraş
JAPOSHVILI, George, Isparta
JUSSILA, R., Finland
KARAKOÇ, Ömer Cem, Çankırı
KARUT, Kamil, Adana
KAŞKAVALLI, Galip, İzmir
KAYDAN, Bora, Van
KAZAK, Cengiz, Adana
KAZAN, Kemal, Australia
KEPENEKÇİ, İlker, Ankara
KESKİN, Bekir, İzmir
KHANJANI, M., Iran
KIVAN, Müjgan, Tekirdağ
KOÇAK, Erhan, Isparta
KORNEYEV, V. Ukraine
KUBIC, S., Czech Republic
KUMRAL, Nabi Alper, Bursa
LEGALOV, A. A., Russia
LIETTI, M. M., Argentina
MÁCA, J., Czech Republic
MENNAN, Sevilhan, Samsun
MERTLIK, J., USA
NAYAK, M. K., Australia
OOSTERBROEK, P., Holland
OPERMAN, C. H., USA
ÖZBEK, Hikmet, Erzurum
ÖZDER, Nihal, Tekirdağ
ÖZGEN, İnanç, Elazığ
ÖZGÖKÇE, Salih, Van
ÖZSEMERÇİ, Fatma, İzmir
PELLIZZARİ, G., Italy
PLATIA, G., Italy
SAĞLAM, Özgür, Tekirdağ
SANCHEZ-PENA, S., Mexico
SARIKAYA, Oğuzhan, Isparta
SERTKAYA, Erdal, Hatay
SHAPIRO-ILAN, D., USA
SOLODOVNIKOV, A., Denmark
SÖĞÜT, Mehmet Ali, Isparta
STANLEY D. W., USA
SULLIVAN, Sebahat, Samsun
TEZCAN, Serdar, İzmir
TOKTAY, Halil, Niğde
TOMONOVIC, Z., Serbia
TOZLU, Göksel, Erzurum
TUNCA, Hilal, Ankara
TUNÇBİLEK, Aydın Şüzü, Kayseri
ÜNLÜ, Levent, Konya
VAVRE, F., France
VELİOĞLU, Sibel, Ankara
WANI, A. A., India
YANAR Dürdane, Tokat
YEFREMOVA, Z., Israel
YURTCAN, Murat, Edirne
ZCHORI-FEIN, E., Israel
ZEYBEKOĞLU, Ünal, Samsun
ZHANG, Y., Z., China
ZHAO, S., China

İçindekiler (Contents)

Orijinal araştırmalar (Original articles)

Mortality effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on *Spodoptera littoralis* larvae co-injected with the bacteria, *Serratia marcescens*

Eikosanoid biyosentezi inhibitörleri *Serratia marcescens* bakterisi ile birlikte *Spodoptera littoralis* larvalarına uygulandığında larvalar üzerindeki ölüm etksi

Hasan TUNAZ, Mustafa KÜSEK..... 121-127

Determining phosphine resistance in rust red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera : Tenebrionidae) populations from Turkey

Türkiye Un Biti *Tribolium castaneum* (Herbst.) popülasyonlarında fosfin direncinin belirlenmesi
Erhan KOÇAK, David SCHLIPALIUS, Ramandeep KAUR, Andrew TUCK, Paul EBERT, Pat COLLINS,
Abdullah YILMAZ..... 129-136

Insecticide resistance in two populations of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) from Turkey

Türkiye'deki iki *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) popülasyonunda insektisit direnci
Melis YALÇIN, Serhan MERMER, Leyla Didem KOZACI, Cafer TURGUT..... 137-145

Comparison of Alticini (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) species diversity in different habitats selected from Bafa Lake Natural Park (Aydın) basin with a new record for Turkish fauna

Türkiye faunası için yeni bir kayıtla birlikte Bafa Gölü Tabiat Parkı (Aydın)'ndan seçilmiş farklı habitatların
Alticini (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) tür çeşitliliğinin kıyaslanması

Fatma BAYRAM, Ebru Gül ASLAN..... 147-157

Contributions to leafminer (Diptera: Agromyzidae) fauna and new records of plant pests and weeds in Turkey

Türkiye galerisineği faunasına katkılar ve bitki zararlıları ve yabancı ot zararlılarına yeni kayıtlar
Oktay DURSUN, Hasan Sungur CIVELEK, Miroslav BARTÁK, Štěpán KUBÍK, Eyyüp Mennan YILDIRIM,
Miloř ČERNÝ..... 159-169

Improvement of leaf miner [*Liriomyza cicerina* Rond. (Diptera: Agromyzidae)] resistance in *Cicer* species

Cicer türlerinde yaprak galeri sineğine [*Liriomyza cicerina* Rond. (Diptera: Agromyzidae)] dayanıklılığın geliştirilmesi
Cengiz İKTEN, Fatma Öncü CEYLAN, Cengiz TOKER..... 171-178

Türkiye için yeni bir zararlı *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae)

Ricania simulans (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae) a new pest for Turkey

Kibar AK, Şaban GÜÇLÜ, Cafer EKEN, Reyhan SEKBAN..... 179-186

Bademde yüksek konsantrasyonlarda ozon gazı uygulamasının *Plodia interpunctella* (Hübner) ve *Ephestia cautella* (Walker)'ya karşı etkinliği

Efficacy of gaseous ozone at high concentrations against *Plodia interpunctella* (Hübner) and
Ephestia cautella (Walker) in Almond

Ali A. İŞIKBER, M. Serdar ÖZTEKİN, K. Sinan DAYISOYLU, Ahmet D. DUMAN, Selda EROĞLU..... 187-198

Bozyazı ilçesi (Mersin) muz seralarında önemli bitki paraziti nematodların (*Helicotylenchus multicinctus*, *H. dihystra* ve *Meloidogyne* spp.) (Nemata) popülasyon değişimlerinin araştırılması

Investigation on population dynamics of important plant parasitic nematodes (*Helicotylenchus multicinctus*,
H. dihystra and *Meloidogyne* spp. (Nemata) in banana greenhouses grown in Bozyazı (Mersin)

Ece B. KASAPOĞLU, Gürkan YORAZ, İbrahim Halil ELEKÇIOĐLU..... 199-207

Biber hat ve çeşitlerinin *Meloidogyne incognita*'ya karşı dayanıklılığı

Resistance of pepper lines against *Meloidogyne incognita*

Adem ÖZARSLANDAN, Hasan PINAR, Atilla ATA, Davut KELEŞ..... 209-215

Orijinal araştırma (Original article)

**Mortality effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on
Spodoptera littoralis larvae co-injected with the bacteria, *Serratia marcescens*¹**

Eikosanoit biyosentezi inhibitörleri *Serratia marcescens* bakterisi ile birlikte *Spodoptera littoralis* larvalarına uygulandığında larvalar üzerindeki ölüm etkisi

Hasan TUNAZ^{2*}

Mustafa KÜSEK²

Summary

The first step of the cellular defense reactions to bacterial, fungal and some viral infections in insects is nodulation. We posed the hypothesis that *Spodoptera littoralis*, expresses melanoic nodulation reactions to bacterial challenge and that injecting *S. littoralis* larvae with eicosanoid biosynthesis inhibitors (EBIs) plus bacteria would increase larval mortality. Injecting larvae with EBIs, immediately before intrahemocoelic injections of the bacterium, *Serratia marcescens*, sharply reduced the nodulation response to bacterial challenges. Separate treatments with specific inhibitors including dexamethasone (a phospholipase A₂ inhibitor), indomethacin, naproxen, ibuprofen, (cyclooxygenase inhibitors), esculetin (a lipoxygenase inhibitor) and Phenidone (dual cyclooxygenase/lipoxygenase inhibitor) impaired the ability of *S. littoralis* to form nodules in reaction to bacterial challenge. All concentrations of *S. marcescens* alone, applied to *S. littoralis*, caused low mortality of the larvae. However, an increased mortality of the larvae was seen when *S. marcescens* was co-injected with the EBIs with different modes of action. These findings support our hypothesis that virulent effects of entomopathogenic bacteria can be increased when *S. littoralis* immune systems were suppressed.

Keywords: Insect cellular immunity, nodulation, eicosanoid, bacteria, *Spodoptera littoralis*

Özet

Böceklerde bakteri, fungus ve bazı virüs hastalıklarına karşı oluşan hüresel bağışıklıklardan ilki nodülasyon reaksiyonudur. Bu çalışmada *Spodoptera littoralis* larvalarında *Serratia marcescens* bakterisine karşı oluşan nodülasyon reaksiyonu, bakterinin larvalar üzerindeki ölüm etkisi ve bakteri ile birlikte eikosanoit biyosentezi inhibitörleri larvalara uygulandığında larvaların ölüm oranını etkileyip etkilemeyeceği test edilmiştir. *S. littoralis* larvalarına bakteri uygulamasında hemen önce eikosanoit biyosentezi inhibitörleri enjekte edildiğinde böceklerde bakteriye karşı oluşan nodül sayısında önemli derecede azalma olmuştur. Tüm *S. Marcescens* bakteri konsantrasyonları larvalara tek başına uygulandığında düşük oranda larva ölümü ortaya çıkmıştır. Diğer taraftan *S. marcescens* bakterisi ile birlikte eikosanoit biyosentezi inhibitörleri *S. littoralis* larvalarına uygulandığında larvalar üzerindeki ölüm oranı yalnız bakteri uygulanan larvalara oranla önemli derecede yükselmiştir. Bu bulgular böceklerin bağışıklık sistemi baskı altına alındığında, *S. marcescens* bakterisinin entomopatojen etkisinin arttığını göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Böcek hüresel bağışıklığı, nodülasyon, eikosanoit, bakteri, *Spodoptera littoralis*

¹ This study was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK Project no: 110O159)

² KSÜ, Faculty of Agriculture, Plant Protection Department, Kahramanmaraş/TURKEY

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: htunaz@ksu.edu.tr

Alınış (Received): 12.12.2014 Kabul ediliş (Accepted): 17.03.2015 Çevrimiçi Yayın Tarihi (Published Online): 06.04.2015

Introduction

Insect defense systems to microbial infection produce humoral and hemocytic (cellular) reactions (Gillespie et al., 1997; Stanley, 2000; Satyavathi et al., 2014; Stanley & Kim, 2014). Humoral reactions, antibacterial proteins, such as cecropins, attacins, dipterocins, and defensins, take hours for their full expression (Leulier et al., 2003; Stanley & Miller, 2006). On the other hand, hemocytic responses are very quick, typically occur within minutes of an infection cycle and involve direct interactions between circulating hemocytes and infecting microbes (Stanley & Miller, 2006; Satyavathi et al., 2014). Specific cellular defense mechanisms include phagocytosis, nodulation and encapsulation (Strand, 2008).

Eicosanoids are oxygenated metabolites of arachidonic acid and two other polyunsaturated fatty acids, the structures and biosynthesis of which are outlined elsewhere (Stanley, 2000; Stanley & Kim, 2014). Eicosanoids are very well understood in the contexts of human and animal medicine, where they mediate many pathophysiological events, such as inflammation. Eicosanoids are also important for many actions in invertebrates, as reviewed (Stanley, 2000; Stanley & Kim, 2014).

Stanley-Samuelson et al. (1991) first time showed that eicosanoids mediate one or more cellular reactions responsible for clearing bacterial infections from hemolymph circulation. After this work, more detailed research was done to determine which of the several cellular defense reactions depend on eicosanoid biosynthesis. Miller et al. (1994) hypothesized that eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections. After these findings, Stanley and his colleagues developed the hypothesis that eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in most, if not all, insect species, now known as the eicosanoid hypothesis (Stanley, 2000). Several research groups have tested the hypothesis for many insect species, as summarized in reviews (Stanley, 2006; Stanley & Miller, 2006; Stanley & Kim, 2014). All experimental work has strongly supported the idea.

Howard et al. (1998) tested the influence of bacterial species on nodule formation in insects. Their result showed that nodulation intensity varies according to the species of infecting bacteria. Mandato et al. (1997) found that cell spreading, a distinct phase of nodulation, and phagocytosis are mediated by eicosanoids in wax moths, *Galleria mellonella*. The eicosanoid hypothesis is also supported by another line of work on humoral immunity. Morishima et al. (1997) found that biosynthesis of anti-bacterial proteins also depends on eicosanoids in the silkworm, *Bombyx mori*. The other role of eicosanoids in insect cellular immunity were tested by Dean et al. (2002) and Lord et al. (2002). They suggested that besides bacteria, eicosanoids mediate *Manduca sexta* cellular response to the fungal pathogens, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. These findings uniformly support the eicosanoid hypothesis. Connick et al. (2001) tested the role of eicosanoid biosynthesis inhibitors when co-applied with pathogen bacteria, *Serratia marcescens* for insect pest control. Their results showed that increased mortality of the termites, *Coptotermes formosanus* was seen when the bacteria were co-applied with eicosanoid biosynthesis inhibitors. Similarly, Tunaz (2006) tested influence of different fungal species on nodule formation and on mortality of *Pieris brassicae* larvae and to determine whether injecting *P. brassicae* larvae with EBIs plus fungus would influence larval mortality. Again his result showed that increased and faster mortality of *P. brassicae* larvae was seen when the fungi were co-applied with eicosanoid biosynthesis inhibitors. Moreover, Tunaz & Küsek (2012) showed that increased mortality of *Blattella germanica* adults was seen when the bacteria, *S. marcescens*, were co-applied with eicosanoid biosynthesis inhibitors.

Therefore, the objectives of this study were to determine influence of the bacterium, *S. marcescens*, on nodule formation and on mortality of larvae of *S. littoralis* and if injection of larvae with EBIs plus the bacterium would kill the larvae faster or higher numbers than would the bacterium alone.

Materials and Methods

Organisms

Spodoptera littoralis were reared on a culture (38 g agar, 2600 ml distil water, 300 g corn flour, 120 g wheat embryo, 100 g yeast, 20 g casein, 14 g wesson salt, 8 g sorbic acid, 4 g nipagin, 600 mg streptomisin, 18 g ascorbic acid and 80 mg vitamin complex) and maintained in the laboratory at 25 ± 2 °C and 65 ± 5 % relative humidity (RH). The larvae (5. instars) were tested for each bioassays at 25 ± 2 °C and 65 ± 5 % RH.

The pathogen used is a non-pigmented strain of an entomopathogenic bacterium, *Serratia marcescens* (Miller & Stanley, 1998). The bacteria were grown in 50 ml of nutrient agar in environmental horizontal shaker at 37°C and 100 rev/min. The bacteria were grown at concentration of 10^9 cell/ml and used 5 µl to the each insect from different concentration of 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 cell/ml.

Reagents

The phospholipase A_2 (PLA₂) inhibitor dexamethasone {(11β, 16α)-9- fluoro-11,17,21-trihydroxy-16-methylpregna-1,4-dione}, the cyclooxygenase inhibitors ibuprofen {α-methyl-4(2-methylpropyl) benzeneacetic acid}, indomethacin {1-P-(chlorobenzyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolyl-acetic acid} and naproxen {O-2-(6-methoxy-naphthyl) propionic acid}, the dual cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitor phenidone {1-pheny-3-pyrazolidinone}, and the 5- and 12- lipoxygenase inhibitor, esculetin {6,7-dihydroxycoumarin} were all purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Influence of eicosanoid biosynthesis inhibitors on nodulation

We divided larvae of *S. littoralis* into groups and injected individuals in each group with either the phospholipase A_2 inhibitor dexamethasone, the cyclooxygenase inhibitors indomethacin, naproxen, ibuprofen, and the dual cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitor phenidone, or lipoxygenase inhibitor esculetin, all in standard dosages of 104 µg in 4 µl of ethanol. Control insects were injected with 4 µl of ethanol. Following injections, the larvae of the *S. littoralis* were infected with 10^9 *S. marcescens* cell in 5 µl saline using a 50 µl Hamilton 701 micro-syringe. Control insects were injected with 5 µl saline containing (0.85 % NaCl). All the injections were applied into one side of abdomen (laterally just under the cuticle) of *S. littoralis* larvae for injecting directly into the hemolymph circulation. Each test was replicated three times and ten larvae were used for each replicate. At 6 hour post injection (hpi), the larvae of the *S. littoralis* were anesthetized and nodulation was assessed. For nodulation assessment, larvae of the *S. littoralis* were anesthetized by chilling on ice, then their hemocoels were exposed. Melanized, brownish black nodules were counted under a stereo microscope at 45x. The nodules were distinct, and direct counting reliably reflected the extent of the nodulation response to infections. After the first counting, the alimentary canal was removed. Nodules in the previously unexposed areas and remaining internal tissues were then counted.

Influence of the bacteria concentrations on mortality of *S. littoralis* larvae

Different concentrations (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 cell/ml) of the bacteria were injected into one side of abdomen (laterally just under the cuticle) of *S. littoralis* larvae using a 50 µl Hamilton 701 micro-syringe. The larvae of *S. littoralis* (10 larvae for each concentration of bacterial cell) were injected with different concentration of *S. marcescens* cell in 5 µl saline using a 50 µl Hamilton 701 micro-syringe. Control insects were injected with 5 µl saline containing (0.85 % NaCl). Each test was replicated three times and ten larvae were used for each replicate. After injection the larvae were kept on room temperature. Mortality was assessed during the seven days after injections. Mortality was identified as the larvae unable to move when placed on their dorsal side and unable to respond to prodding.

Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on mortality of *S. littoralis* larvae when co-injected with the bacteria

Spodoptera littoralis larvae were divided into groups and individuals in each group were injected with either PLA₂ inhibitor dexamethasone, three of the cyclooxygenase inhibitor, naproxen, indomethacin and ibuprofen, the dual cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitor phenidone, or the lipoxygenase inhibitor esculetin, all in standard dosages of 104 µg in 4 µl EtOH. Control insects were injected with 4 µl EtOH. Following injections, the larvae were injected with 10⁹ *S. marcescens* cell. Each test was replicated three times and ten larvae were used for each replicate. After injection the larvae were kept on room temperature as described. Mortality was assessed at selected times after injections as described above.

Statistical Analysis

Data on nodulation and mortality were analyzed using the General Linear Models procedure, and mean comparisons were made using Least Significant Difference (LSD) test ($p \leq 0.0001$) (SAS Institute Inc., 1989).

Results

Influence of eicosanoid biosynthesis inhibitors on nodulation

Figure 1 shows that, compared to control (EtOH) larvae of *S. littoralis*, the nodulation response to bacterial infections was significantly reduced in all experimental *S. littoralis* groups (LSD, $p < 0.0001$). There were no significant differences among the effects of individual inhibitors.

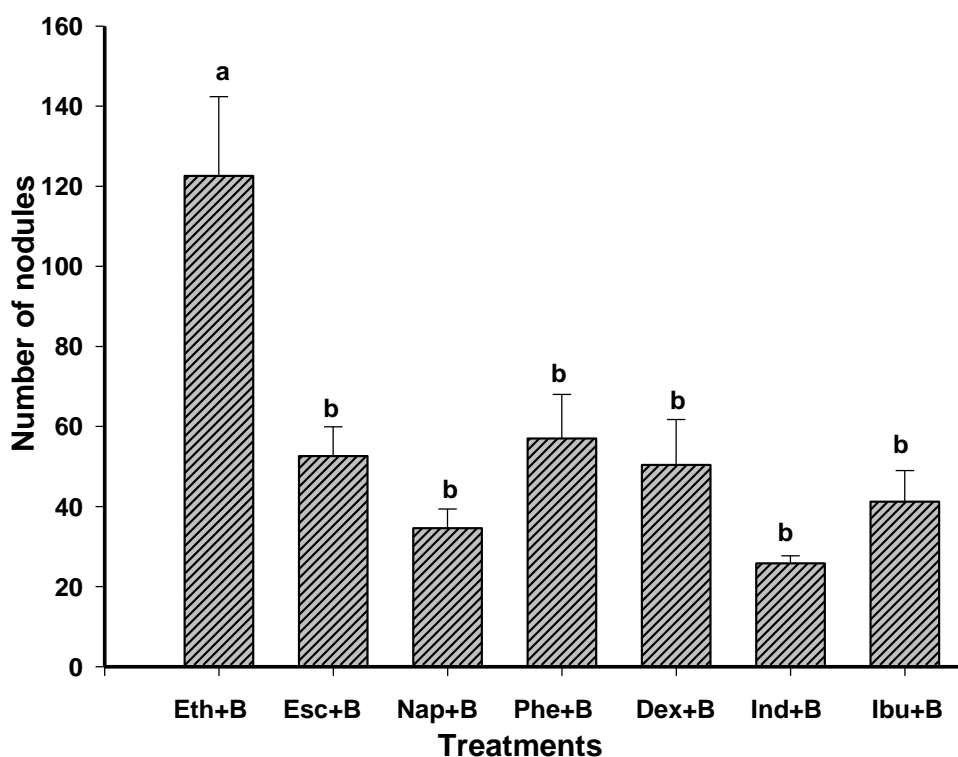


Figure 1. Effect of treating *Spodoptera littoralis* larvae with individual eicosanoid biosynthesis inhibitors on nodule formation in response to infections with, *Serratia marcescens*. Each point indicates the mean number of nodules found in each insect, and the error bars represent \pm SEM. Histogram bars with same letter are not significantly different from each other (LSD, $p \leq 0.01$).

Concentration-response for *S. marcescens* on mortality of *S. littoralis* larvae

Table 1 indicates that the mortality due to *S. marcescens* cell was relatively low with all the concentrations of the bacteria. Although experimental data do not show in a strictly linear manner, we recorded increased mortality with increased concentrations of *S. marcescens* and increased time, from approximately 7 % mortality on day 1 to 20 % mortality on day 7 at 10^6 cell/larvae and at 10^8 cell/larvae, larval mortality reached a high of 30 % by day 7. At the highest concentrations, 10^8 and 10^9 cell/larvae, we recorded 23-30 % mortality after 7 days, which is significantly different (LSD, $p < 0.0001$) than mortality of the control larvae (3 % mortality by day 7).

Table 1. The influence of increasing concentration of *Serratia marcescens* cell on % mortality of *Spodoptera littoralis* with respect to time (days)(\pm standart error)

Bacterial concentration	Mortality (%) in Time						
	1 st day	2 nd day	3 rd day	4 th day	5 th day	6 th day	7 th day
10^9 cell/ml	0 \pm 0 ^a	6.6 \pm 6.6 ^{ab}	6.6 \pm 6.6 ^{ab}	10 \pm 5.7 ^{ab}	10 \pm 5.7 ^{ab}	13.3 \pm 3.3 ^b	23.3 \pm 13.3 ^b
10^8 cell/ml	6.6 \pm 6.6 ^a	13.3 \pm 6.6 ^b	13.3 \pm 6.6 ^b	16.6 \pm 8.8 ^b	16.6 \pm 8.8 ^b	20 \pm 5.7 ^b	30 \pm 11.5 ^b
10^7 cell/ml	0 \pm 0 ^a	3.3 \pm 3.3 ^a	3.3 \pm 3.3 ^a	3.3 \pm 3.3 ^a	3.3 \pm 3.3 ^a	6.6 \pm 3.3 ^a	6.6 \pm 3.3 ^a
10^6 cell/ml	6.6 \pm 3.3 ^a	10 \pm 0 ^b	10 \pm 0 ^b	13.3 \pm 3.3 ^b	16.6 \pm 6.6 ^b	20 \pm 5.7 ^b	20 \pm 5.7 ^b
Control (saline)	3.3 \pm 3.3 ^a	3.3 \pm 3.3 ^a	3.3 \pm 3.3 ^a	3.3 \pm 3.3 ^a	3.3 \pm 3.3 ^a	3.3 \pm 3.3 ^a	3.3 \pm 3.3 ^a

* Means in the same column followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.0001$) as determined by LSD-test.

Effects of co-injected bacterial cell and EBIs on mortality of *S. littoralis* larvae

EBIs strongly enhanced absolute mortality and the speed of kill due to bacterial challenge (Table 2). High mortality (66-93 %) obtained in larvae treated with the all inhibitors plus the concentration (10^9 cell/larvae) of bacteria by 24 hpi. Very low mortality (0-13 %) was recorded in controls (only bacteria and EtOH+ bacteria) at 24 hpi. Co-injections of some of EBIs plus bacteria led to quite high mortality of larvae, from 87 % mortality with ibuprofen to over 90 % mortality with dexamethasone and esculetin by 24 hpi, whereas the control larvae produced significantly less mortality at 24 hpi (LSD, $p < 0.0001$).

Table 2. Effect of eicosanoid biosynthesis inhibitors on % mortality of *Spodoptera littoralis* larvae infected with *Serratia marcescens*(\pm standart error)

Eicosanoid biosynthesis inhibitors+bacterial concentration	Mortality (%) in Time	
	6 hours	24 hours
Only bacteria (10^9 cell/ml)	0 \pm 0 ^a	0 \pm 0 ^a
EtOH+ bacteria (10^9 cell/ml)	0 \pm 0 ^a	13.3 \pm 6.6 ^b
Phenidone+ bacteria (10^9 cell/ml)	6.6 \pm 6.6 ^a	66.6 \pm 17.6 ^c
Naproxen+ bacteria (10^9 cell/ml)	6.6 \pm 6.6 ^a	80 \pm 11.5 ^{cd}
Esculetin+ bacteria (10^9 cell/ml)	6.6 \pm 6.6 ^a	93.3 \pm 6.6 ^d
Dexamethasone+ bacteria (10^9 cell/ml)	6.6 \pm 6.6 ^a	93.3 \pm 6.6 ^d
Indomethacin+bacteria (10^9 cell/ml)	0 \pm 0 ^a	73.3 \pm 6.6 ^c
Ibuprofen+ bacteria (10^9 cell/ml)	6.6 \pm 6.6 ^a	86.6 \pm 13.3 ^{cd}

* Means in the same column followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.0001$) as determined by LSD-test.

Discussion

The data reported in this paper strongly support the idea that EBIs significantly increased insect larval mortality due to pathogenic bacterial challenge. First, six different eicosanoid biosynthesis inhibitors significantly reduced nodulation when compared to control treatments. Second, relative to control larvae, the bacteria caused relatively low larval mortality. Moreover, treating larvae with any of six EBIs substantially increased mortality due to bacterial challenge. We infer from these data that disabling immune signaling by inhibiting eicosanoid synthesis renders insects unable to protect themselves from bacterial challenge and that the lack of immune protection is lethal.

The idea that eicosanoids mediate insect cellular immunity was first suggested by Stanley-Samuelson et al. (1991). They showed that when eicosanoid biosynthesis is inhibited by EBIs, *M. sexta* larvae could not clear the pathogenic bacterium, *S. marcescens* from their hemolymph. More important, this situation increased insect mortality. Since after this first paper, several laboratory groups have indicated eicosanoids are involved in nodulation formation (Stanley, 2006; Stanley & Miller, 2006; Stanley & Kim, 2014). There is now considerable evidence for the involvement of eicosanoids in insect immune reactions to bacteria, fungal, protozoan and parasitoid challenge in a wide range of insects. Dean et al. (2002) and Lord et al. (2002) tested the hypothesis that eicosanoids mediate nodulation reactions to fungal infection in *M. sexta*. They found that eicosanoids act in *M. sexta* nodulation response to *B. bassiana* and *M. anisopliae*. Connick et al. (2001) suggested that there were synergistic effects of EBIs with the bacterium, *S. marcescens* on mortality of termites; *Coptotermes formosanus*. Similarly, Tunaz (2006) tested influence of different fungal species on nodule formation and on mortality of *P. brassicae* larvae and to determine whether injecting *P. brassicae* larvae with EBIs plus fungus would influence larval mortality. Again his result showed that increased and faster mortality of *P. brassicae* larvae was seen when the fungi were co-applied with eicosanoid biosynthesis inhibitors. Additionally, Tunaz & Küsek (2012) showed that increased mortality of *B. germanica* adults was seen when the bacteria, *S. marcescens* were co-applied with eicosanoid biosynthesis inhibitors. Similar to these works, we suggested that there were synergistic effects of EBIs with the bacterium, *S. marcescens* on mortality of *S. littoralis*. The bacterial concentration-response experiment (*S. marcescens*) on larval mortality showed that mortality was relatively low without EBIs.

The pharmacological chemicals we used inhibit different eicosanoid biosynthetic pathways in mammals. Dexamethasone inhibits phospholipase A₂ which releases arachidonic from membrane phospholipids; naproxen, indomethacin and ibuprofen inhibit cyclooxygenase; esculetin inhibits lipoxygenase; and phenidone inhibits both cyclooxygenase and lipoxygenase (Stanley, 2000). Hence, because all the inhibitors we tested enhanced the susceptibility of *S. littoralis* to the injected bacteria, it is possible that both cyclooxygenase and lipoxygenase pathways are involved in mediating the immunomodulatory effects of eicosanoids in this insect. Finally, the results supported the hypothesis. Eicosanoid biosynthesis inhibitors led to increased larval mortality, which supports the concept that biological control programs can be enhanced by engineering gene-silencing constructs into crop plants.

Acknowledgement

The authors thank the Scientific and Research Council of Turkey (Ankara) for financial support.

References

- Connick, W.J., W.L.A. Osbring, M.S. Wright, K.S. Williams, D.J. Daigle, D.L. Boykin & A.R. Lax, 2001. Increased mortality of *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) exposed to eicosanoid biosynthesis inhibitors and *Serratia marcescens* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). *Environmental Entomology*. 30:449-455.
- Dean, P., J.C. Gadsden, E.H. Richards, J.P. Edwards, A.K. Charnley & S.E. Reynolds, 2002. Modulation by eicosanoid biosynthesis inhibitors of immune responses by the insect *Manduca sexta* to the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 79: 93-101.
- Gillespie, J.A., M.R. Kanaost & T. Trenzcek, 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 47: 611-643.
- Howard, R.W., J.S. Miller & D.W. Stanley, 1998. The influence of bacterial species and intensity of infections on nodule formations in insect. *Journal of Insect Physiology*. 44: 157-164.
- Leulier, F., C. Parquet, S. Pili-Floury, J.H. Ryu, M. Caroff, W.J. Lee, D. Mengin-Lecreux & B. Lemaitre, 2003. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nature Immunology* 4: 478-484.
- Lord, J.J., S. Anderson & D.W. Stanley, 2002. Eicosanoids mediate *Manduca sexta* cellular response to the fungal pathogen *Beauveria bassiana*: A role for the lipoyxygenase pathway. *A.R.C. Unit of Reproductive Physiology and Biochemistry*. 51: 46-54.
- Mandato, C.A., W.L. Diehl-Jones, S.J. Moore & R.G.H. Downer, 1997. The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*. 43: 1-8.
- Miller, J.S., T. Nguyen & D.W. Stanley-Samuelson, 1994. Eicosanoids mediate insect nodulation responses to bacterial infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 12418-12422.
- Miller, J.S. & D.W. Stanley, 1998. "The Nodule Formation Reaction to Bacterial Infection: Assessing the Role of Eicosanoids, 265-270". In: *Techniques in Insect Immunity* (Eds: A. Wiesner, A. G. Dumphy & V. J. Marmaras). SOS publications, Fair Haven, Cornell University NJ. 304 pp.
- Morishima, I., Y. Yamano, K. Inoue & N. Matsuo, 1997. Eicosanoids mediate induction of immune genes in the fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. *FEBS Letters*, 419: 83-86.
- SAS Institute Inc. 1989. SAS/STAT^R User's Guide, Version 6, 4th Ed., vol 2. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Satyavathi, V.V., A Minz & J. Nagaraju, 2014. Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cell. Sign.* 26: 1753-1763.
- Stanley-Samuelson, D.W., E. Jensen, K.W. Nickerson, K. Tiebel, C.L. Ogg & R.W. Howard, 1991. Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 1064-1068.
- Stanley, D.W. 2000. *Eicosanoids in Invertebrate Signal Transduction Systems*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Stanley, D.W. 2006. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: Biological significance. *Annual Review of Entomology*. 51:25-44.
- Stanley, D.W. & J.S. Miller, 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 119: 1-13.
- Stanley, D.W. & Y. Kim, 2014. Eicosanoid signaling in insects: from discovery to plant protection. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33: 20-63.
- Strand, M.R. 2008. "Insect Hemocytes and Their Role in Immunity, 25-47". In: *Insect Immunology* (Ed: N.E. Beckage), Academic Press, Elsevier, Amsterdam. 360 pp.
- Tunaz, H. 2006. Eicosanoid biosynthesis inhibitors influence mortality of *Pieris brassicae* larvae co-injected with fungal conidia. *A.R.C. Unit of Reproductive Physiology and Biochemistry*. 63: 93-100.
- Tunaz, H. & M. Küsek, 2012. "The role of eicosanoid biosynthesis inhibitors on mortality of *Blattella germanica* adults co-injected with the bacteria; *Serratia marcescens*, 29-32". Second International Symposium of Biopesticides and Ecotoxicological Network (September 24-26, 2012 Bangkok), Thailand.

Original araştırma (Original article)

**Determining phosphine resistance in rust red flour beetle,
Tribolium castaneum (Herbst.) (Coleoptera : Tenebrionidae)
populations from Turkey¹**

Türkiye Un Biti *Tribolium castaneum* (Herbst.) popülasyonlarında fosfin direncinin belirlenmesi

Erhan KOÇAK^{2*}
Andrew TUCK⁴

David SCHLIPALIUS³
Paul EBERT⁴ Pat COLLINS³

Ramandeep KAUR³
Abdullah YILMAZ⁵

Summary

Fumigation with phosphine gas is the primary method of controlling stored grain pests. In Turkey, phosphine has been used extensively since the 1950's. Even though high levels of phosphine resistance have been detected in several key stored products pests across the world, it has never been studied in Turkey despite this long history of phosphine use. High-level phosphine resistance has been detected and genetically characterised previously in the rust red flour beetle, *Tribolium castaneum* in other countries. Since this pest is also a common problem in stored grain environment in Turkey, the current study was undertaken for the first time, to investigate the distribution and strength of phosphine resistance in *T. castaneum*. Four strains of *T. castaneum* were tested through bioassays for determining the weak and strong phosphine resistance phenotypes on the basis of the response of adults to discriminating phosphine concentrations of 0.03 mg/L and 0.25 mg/L, for 20 hour exposures respectively. Phenotype testing showed all strains exhibited some level of phosphine resistance with a maximum level of 196 fold. Sequencing and genetic testing of seven field-collected strains showed that all of them carried a strong resistance allele in at the *rph2* locus similar to the one previously reported. Our results show that strong resistance to phosphine is common in Turkish strains of *T. castaneum*.

Keywords: Wheat, phosphine resistance, *Tribolium castaneum*, molecular diagnostic, dihydrolipoamide dehydrogenase, *dld*

Özet

Depolanmış hububattaki zararlılarla mücadeledeki ana yöntem fosfin gazı ile fumigasyondur. Fosfin gazı Türkiye'de 1950'li yıllardan beri yoğun olarak kullanılmaktadır. Fosfinin uzun yıllardan beri depolanmış hububatta kullanımına ve dünyada da pek çok ülkede yüksek seviyelerde fosfin direncinin belirlenmiş olmasına rağmen Türkiye'de bugüne kadar bu konuda herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Yüksek seviyelerde fosfin direnci, un biti *Tribolium castaneum*'da belirlenerek direnç yapısı genetik olarak tanımlanmıştır. Bu zararlı Türkiye'de depolanmış buğdayda yaygın bir zararlı konumunda olduğundan, bu ilk çalışma fosfin direncinin *T. castaneum*'daki durumunu ve ülkedeki dağılımını ortaya koymak üzere yürütülmüştür. Dört popülasyon, zayıf ve kuvvetli direnç için sırasıyla ayırıcı fosfin konsantrasyonları olan 0.03mg/L ve 0.25mg/L dozları ile 20 saat süreyle uygulama temeline dayanan bioassaylerle test edilmişlerdir. Bu testlerde popülasyonların tümünde direnç olduğu ve direnç oranının 196 kata kadar ulaştığı belirlenmiştir. Yapılan genetik çalışmalar ve sekans, tüm popülasyonların kuvvetli direnç allellerine sahip olduklarını ve bu popülasyonların daha önce literatürde rapor edilenlere benzer olarak *rph2* lokusundaki direnç allelini taşıdıklarını göstermiştir. Çalışma sonuçlarımız, *T. castaneum*'un Türkiye popülasyonlarında fosfine karşı güçlü bir direncin yaygın olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Buğday, fosfin direnci, *Tribolium castaneum*, moleküler tanımlama, dihydrolipoamide dehydrogenase, *dld*

¹ The study was presented as oral presentation at the V. Turkish Plant Protection Congress, Antalya - Turkey, February 3-5, 2014.

² Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Süleyman Demirel University, Isparta, Turkey.

³ Agri-Science Queensland, Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Brisbane, Qld, Australia.

⁴ School of Biological Sciences, University of Queensland, St Lucia, Qld, Australia.

⁵ Plant Protection Central Research Institute, Yenimahalle - Ankara, Turkey.

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: erhankocak@sdu.edu.tr

Alınış (Received): 10.02.2015 Kabul edilmiş (Accepted): 20.03.2015 Çevrimiçi Yayın Tarihi (Published Online): 10.04.2015

Introduction

The Rust Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst.) is a serious pest of stored grains and grain products across the world (Bell, 2000). Currently, fumigation with phosphine is the primary method of control of this species across the world. Phosphine remains the fumigant of choice throughout the world including Turkey over several decades for disinfestation of stored products because of its low cost, residue free treatment, lack of viable alternative and ease of application (Heseltine & Thompson, 1957; Zettler & Arthur, 2000; Anonymous, 2014).

Extensive use of phosphine has led to the development of resistance in key pest species (Collins et al., 2002; Daghli et al., 2002). Phosphine resistance in *T. castaneum* was first reported through the global survey by FAO in 1972-73 (Champ & Dyte, 1976). Ten years later, resistance levels in *T. castaneum* were increased to 48.1% in developing countries (Taylor & Halliday, 1986). Resistance to phosphine is an increasing problem and there have been widespread reports of resistance in *T. castaneum* in Australia (Attia & Greening, 1981; Daghli & Collins, 1999; Jagadeesan et al., 2012), Brasil (Sartori et al., 1990; Pimentel et al., 2007), Morocco (Benhalima et al., 2004), India (Rajendran, 1999), China (Champ & Dyte, 1976; Cao et al., 1999; Zeng, 1999), Bangladesh (Mills, 1983), Malaysia (Rahim & Sulaiman, 1999; Rahim et al., 2004), Pakistan (Taylor, 1986; Ansell, 1992; Ahmad et al., 2013), USA (Zettler et al., 1989; Opit et al., 2012) and Thailand (Jittanun & Chongrattanameteekul, 2014).

Only recently, Schlipalius et al. (2012) discovered that mutations in the dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD) gene in *Rhizopertha dominica* (F.) and *T. castaneum* are the cause of phosphine resistance at the *rph2* locus. This breakthrough research has enabled us to directly detect resistance frequencies in field collected populations at the *rph2* locus.

In the current research, we aimed to investigate the distribution and strength of phosphine resistance on *T. castaneum* for the first time in Turkey.

Materials and Methods

T. castaneum samples were collected from grain storages in Ankara (Sincan and Ayaş distric), Konya (Karatay distric), Şanlıurfa, Elazığ, Karaman and Mersin provinces (Table 3). At least 30 individuals from each province were collected, out of which 10 adults were preserved in 96% ethanol for DNA extraction. Remaining insects were cultured on wheat flour + yeast (20: 1 w/w) at constant regimes of 25°C±1 and 60±5% RH. Both live and ethanol preserved materials were imported to a QC-3 Quarantine Laboratory of Postharvest Grain Protection Unit - Ecosciences Precinct (Agri-Science Queensland, Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Brisbane, Qld, Australia) through appropriate quarantine permit. On arrival, the live samples were put into cultures in whole wheat flour and yeast 20:1 and maintained at constant regimes of 30±1°C and 55±5% relative humidity (RH).

Phenotype characterisation by bioassay

All bioassay studies were carried out at the Postharvest Grain Protection Unit of the Department of Agriculture Fisheries and Forestry in Brisbane, Queensland, Australia. Phosphine gas was generated by dissolving commercially available aluminium phosphide tablets (Fumitoxin®, Nufarm Australia Limited) in 5% sulphuric acid solution and its concentration was determined by Perkin Elmer Clarus 580 gas chromatography (USA) using a thermal conductivity detector (TCD) with Nitrogen (N₂) as the standard. Bioassays were undertaken by placing plastic cups containing 50 adults (1-2 weeks old) inside gastight desiccators (4.0-6.0 L) and injecting phosphine through a rubber septum in the lid using a gastight syringe (Manual Gas Chromatography Syringe, Hamilton® Company, USA).

Phenotypic resistance levels were determined for progeny of field collected adults from Ankara, Konya and Şanlıurfa provinces using a modified FAO method (FAO, 1975). Response of field strains to phosphine were examined by phosphine fumigation at low dose (0.03 mg/L) and high dose (0.25 mg/L) at 25±1°C and 70±5 % RH for 20 h. Each assay was replicated twice. After fumigation, mortality was assessed following a recovery period of seven days in whole wheat flour at 25±1°C and 55±5% RH. The results were evaluated and presented in Table 1.

Table 1. Interpretation of Phosphine bioassay results

Low dose (0.03 mg/L)	High dose (0.25 mg/L)	Classification
No survivors	No survivors	Susceptible
Survivors	No survivors	Weak resistance
Survivors	Survivors	Strong resistance

Probit analysis

After the initial resistance screening strains from Şanlıurfa and Ankara (Ayaş district), which showed a strong resistance phenotype were reared at $25\pm 1^\circ\text{C}$ and $55\pm 5\%$ RH. Thereafter, these populations were subjected to a series of doses of phosphine to determine their relative strengths of resistance by using probit analysis. The doses for probit analysis were: control (air), 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 10.0, 12.0 and 14.0 mg/L of phosphine for 20 h. For each strain, a total of 1000 individuals were divided into 50 individuals per dose with two replications per dose. After fumigation, mortality was assessed following a recovery period of seven days in whole wheat flour at $25\pm 1^\circ\text{C}$ and $55\pm 5\%$ RH. The percentage responding to all test levels were corrected using Abbott's formula (Abbott, 1925). If control mortality was greater than 10%, the results were discarded and that test was repeated.

Probit analysis was performed and the LC_{50} and $LC_{99.99}$ values were calculated using the Genstat 9 (PC/Windows XP) program (Payne, 2004). Resistance ratios of field strains were calculated using Australian susceptible *T. castaneum* strain (QTC4) as a reference.

Determination of nucleotide variants in the *dld* gene

This process followed the same as described previously by Schlipalius et al. (2012). Total RNA was extracted from 15 individuals of the Ankara (Ayaş) and Şanlıurfa strong resistant strains using an Isolate mini RNA kit (Bioline). Complementary DNA (cDNA) synthesis was generated using a Superscript III cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The coding region of the *T. castaneum* *dld* gene was amplified from the cDNA (5x Buffer 4 μl , 50 mM MgCl_2 0.6 μl , 2.5 mM dNTPs 0.6 μl , H_2O (Gibco®) 10.55 μl , Taq 0.25 μl , 1 μl forward (AGAGGTCACCTCGATAATG) and reverse (CGGAAAAAATGGGCAGC) RPH2 primers using the following PCR conditions: denaturation for 3 min at 95°C , followed by 40 cycles of 95°C for 20 s, 50°C for 30 s and 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 5 min. The PCR product was visualised using 1% agarose gel with TAE buffer. This was run in the gel at 150 volts for 40 min.

Following amplification the DNA fragment was purified and prepared for sequencing using a QiagenQIAquick PCR Purification Micro-centrifuge column according to the manufacturer's protocol. Sequencing was performed in AGRF (Australian Genome Research Facility).

Determination of *rph2* allele frequencies in Turkish populations

Molecular characterisation was carried out in the School of Biological Sciences, University of Queensland, Australia. The *rph2* genotype that is responsible for resistance was tested from strains collected from Ankara (Ayaş and Sincan district), Konya, Karaman, Mersin, Elazığ and Şanlıurfa. The marker amplification allowed us to calculate genotype frequency (homozygous and heterozygous resistant, homozygous susceptible) in the samples.

Genomic DNA was extracted from individual insect samples using a Chelex-100 DNA extraction protocol (Schlipalius et al., 2001). A 368 bp fragment of the *dld* gene containing the nucleotide variant corresponding to P45S variant previously reported (Schlipalius et al., 2012, Kaur et al., 2015) was amplified by PCR in a reaction containing reaction concentrations of Terra PCR buffer 6 μl , restriction enzyme (MboI) 1 μl , ddH_2O 3 μl and primers Mdu *rph2* Fwd and Rev. The cycling conditions were: denaturation for 3 min at 95°C , followed by 40 cycles of 95°C for 20 s, 55°C for 20 s and 72°C for 30 s, and a final extension at 7 min. The MboI restriction enzyme was subsequently used to determine resistance genotypes in a cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker assay which recognizes the specific nucleotide variation that corresponds to the P45S variant that has been reported to confer resistance at the *rph2* locus and gives two fragments 296 bp and 72 bp in length (Kaur et al., 2015).

Results and Discussion

Phenotype characterisation of resistance in Turkish strains

The discriminative dose assays showed that all strains exhibited some level of phosphine resistance. While the Ankara (Sincan) strain showed weak resistance phenotype, the Ankara (Ayaş district), Konya and Şanlıurfa strains exhibited strong resistance. The resistance ratios of Şanlıurfa and Ankara (Ayaş district) strains, which showed strong resistance, were at least 196.43 and 136.23-fold, respectively (Table 2). However, since these strains were not selected to homozygosity for resistance, indicated by the broad 95% fiducial limits, these resistance ratios are indicative only and would be expected to increase under further selection. The first FAO worldwide survey found that the most resistant strain was only 12 times more resistant than the susceptible reference (Champ & Dyte, 1976). During the following decades, it has been revealed that high levels of phosphine resistance were found to be 80-fold in Pakistan (Ahmad et al., 2013), 186-fold in Brasil (Pimentel et al., 2007), 119-fold in USA (Opit et al., 2012), and 400-fold in Australia (Jagadeesan, 2012). However, the calculation of resistance ratios is a function of both the response of the susceptible reference strains used as well as the frequency of the resistance alleles in the strains being assayed and so it is difficult to interpret whether these resistances are in fact similar or not. However, given that the *rph1* gene appears to confer only a weak (~4-fold) resistance phenotype, would be reasonable to assume that all these strains would have strong resistance alleles present at the *rph2* locus.

Table 2. Dose –response results of *Tribolium castaneum* strains with phosphine

Location	No. tested ^a	Slope ± SE	LC ₅₀ (95% FL) (mg/L)	LC _{99.9} (95% FL) (mg/L)	df ^b	χ ²	P	RR ^c
Şanlıurfa	900	3.030 ± 0.282	1.375 (1.081-1.699)	14.390 (9.463-27.010)	7	17.32	0.015	196.43
Ankara (Ayaş)	360	2.940 ± 0.331	0.954 (0.767-1.155)	10.730 (6.989-20.550)	7	1.110	0.993	136.23

^aNumber of insects subjected to phosphine bioassay, excluding control.

^bDegrees of freedom.

^cResistance Ratio (RR) = Resistance Ratio (LC₅₀ of resistant /LC₅₀ of susceptible strain). RR was calculated wrt QTC4 (LC₅₀ = 0.007 mg/L)

Determination of nucleotide variants in the *dld* gene

Sequencing of the expressed *dld* gene showed that there was an amino acid variant (P45S) present in the Şanlıurfa (TC 38) and Ankara - Ayaş (TC 48) strains that have previously been reported (Figure 1). We used a CAPS marker assay that discriminated the genotypes at this particular *rph2* resistance variant to determine the presence of this allele in *T. castaneum* collected from seven different locations within Turkey: Ankara (Ayaş - Sincan distric), Elazığ, Karaman, Konya, Mersin and Şanlıurfa (Table 3).

The action mechanism of phosphine in insects is to reduce the impact of acetylcholinesterase enzyme in the nervous system, block the dehydrogenase glycerophosphate enzyme in mitochondria and deactivate "Complex IV". Also, there is a direct redox relationship between phosphine and cysteine in reactive disulfide, breaking down the sulfide redox bonds in cysteines by blocking the glutathione reductase enzyme (Nisa et al., 2011). One nucleotide changing (Cysteine to Threonine) between susceptible and resistant individuals resulted to transformation of proline to serine (Figure 1). Because of this mutation, phosphine resistance has been occurred.

QTC4_DLD reference translation	MQSAIRNVVSSSLKIRCNRGALTVFHHRQYSTTHDADLVVIGSGPGGYVA	50
Turkish_38 DLD translation	MQSAIRNVVSSSLKIRCNRGALTVFHHRQYSTTHDADLVVIGSGGGYVA	50
Turkish_48 DLD translation	MQSAIRNVVSSSLKIRCNRGALTVFHHRQYSTTHDADLVVIGSGGGYVA	50
QTC4_DLD reference translation	SIKAAQLGLKTVCIEKEPTLGGTCLNVGCIPSKALLNNSHYHMAHSGDL	100
Turkish_38 DLD translation	SIKAAQLGLKTVCIEKEPTLGGTCLNVGCIPSKALLNNSHYHMAHSGDL	100
Turkish_48 DLD translation	SIKAAQLGLKTVCIEKEPTLGGTCLNVGCIPSKALLNNSHYHMAHSGDL	100
QTC4_DLD reference translation	GARGISVDNVRLDLKLMGQKENAVKALTGGIAQLFKKNKVTLINGHGKI	150
Turkish_38 DLD translation	GARGISVDNVRLDLKLMGQKENAVKALTGGIAQLFKKNKVTLINGHGKI	150
Turkish_48 DLD translation	GARGISVDNVRLDLKLMGQKENAVKALTGGIAQLFKKNKVTLINGHGKI	150
QTC4_DLD reference translation	TGVNQVTALKPDGSSEVVNTKNVLIATGSEVTPFPGIEIDEEQIVSSTGA	200
Turkish_38 DLD translation	TGVNQVTALKPDGSSEVVNTKNVLIATGSEVTPFPGIEIDEEQIVSSTGA	200
Turkish_48 DLD translation	TGVNQVTALKPDGSSEVVNTKNVLIATGSEVTPFPGIEIDEEQIVSSTGA	200

Figure 1. Sequencing of the expressed *dld* gene showing an amino acid variant (P45S) in the Şanlıurfa (TC 38) and Ankara - Ayaş (TC 48) strains.

Determination of *rph2* allele frequencies in Turkish populations

The P45S resistance variant was detected from all the strains assayed. It was observed that 77.4% of all the individuals assayed carried at least one *rph2* resistance allele (32.3% homozygous resistant + 45.1% heterozygous resistant). This result shows that the specific P45S allele of *rph2* responsible for strong phosphine resistance previously reported to be in other regions of the world (Schlipalius et al., 2012; Jagadeesan et al., 2012; Kaur et al., 2015; Chen et al., 2015) is in relatively high frequency in Turkish strains of *T. castaneum* collected from grain storages of Konya, Şanlıurfa, Mersin, Elazığ, Karaman and Ankara provinces (Figure 2).

Table 3. The resistance allele in *Tribolium castaneum* collected from seven different locations within Turkey

Province	Result	Genotype
Ankara – Ayaş	Heterozygous	Resistant
	Heterozygous	Resistant
	Heterozygous	Resistant
	Homozygous	Susceptible
	Homozygous	Susceptible
Ankara – Sincan	Heterozygous	Resistant
	Heterozygous	Resistant
	Homozygous	Susceptible
	Homozygous	Susceptible
	Homozygous	Susceptible
Elazığ	Heterozygous	Resistant
	Heterozygous	Resistant
	Homozygous	Resistant
	Homozygous	Susceptible
Karaman	Heterozygous	Resistant
	Heterozygous	Resistant
	Heterozygous	Resistant
	Heterozygous	Resistant
	Homozygous	Susceptible
Konya - Karatay	Homozygous	Resistant
	Homozygous	Resistant
	Homozygous	Resistant
	Homozygous	Resistant
	Heterozygous	Resistant
Mersin	Homozygous	Resistant
	Heterozygous	Resistant
Şanlıurfa	Homozygous	Resistant
	Homozygous	Resistant
	Homozygous	Resistant
	Homozygous	Resistant
	Heterozygous	Resistant

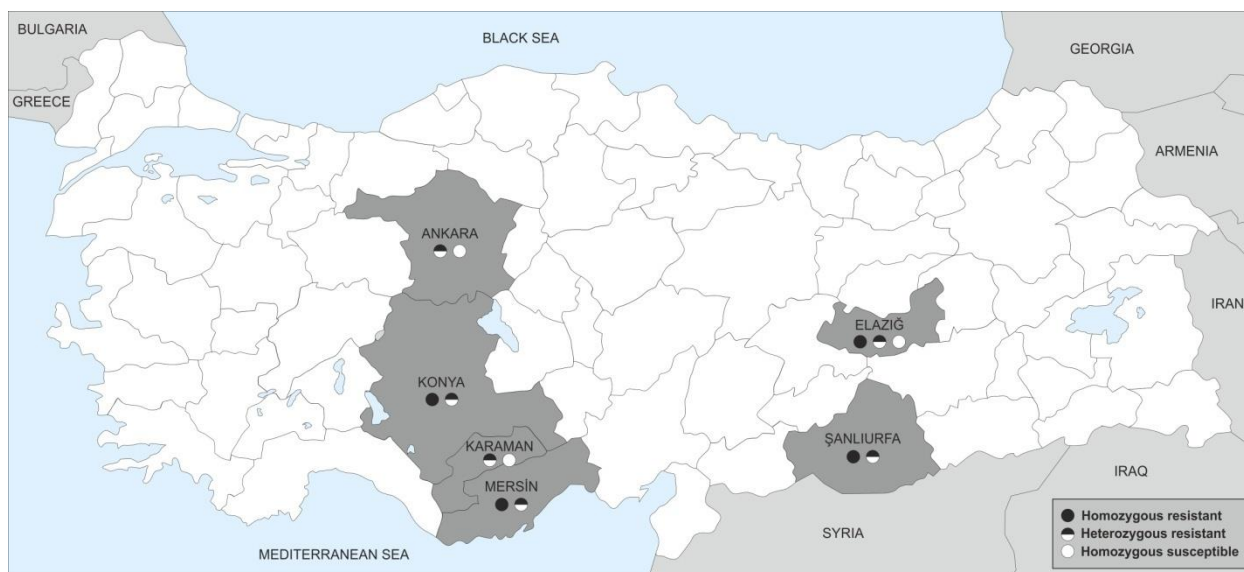


Figure 2. The presence of resistance allele in *Tribolium castaneum* collected from different provinces within Turkey.

The high frequency of the P45S resistance allele in the Eurasian region suggests that this allele may be the most common allele worldwide, even though it is likely to independently arising in all the multiple regions it has been found. The reasons for this phenomenon may include the suggestion that the P45S allele confers the strongest phosphine resistance phenotype, and also possibly confers the least fitness cost. This would allow survival under strong selection pressures and maintenance in insect populations that breed outside of storages and are not exposed to phosphine. It has been noted that some *rph2* alleles reported in *T. castaneum* do carry significant fitness costs (Jagadeesan et al., 2013), however this has yet to be studied in detail for the P45S allele.

In present research, it was highlighted for the first time that strong level of resistance has been developed in *T. castaneum* in Turkey over these years. Due to the limited number of populations involved in the current study, we suggest that a more comprehensive study on characterisation of phosphine resistance is urgently needed across Turkey; that should involve other key pest species such as *R. dominica*, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens), *Sitophilus oryzae* (L.) and *S. granarius* (L.). It is important to note that without this basic information, it is hard to undertake any resistance management strategies.

References

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2): 265–267.
- Anonymous, 2014. (Web page: <http://www.agrosanita.com.tr/teknikbilgiler>). (Date accessed: June 25, 2014).
- Ahmad, A., M. Ahmed, Nourullah, G.M. Ali, M. Abbas & S. Arif, 2013. Monitoring of resistance against phosphine in stored grain insect pests in Sindh. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 16 (11): 1501-1507.
- Ansell, M.R., 1992. The Mode of Inheritance to Phosphine in Two Species of Stored Products Beetles. Ph.D Dissertation, University of Reading, Reading, UK..
- Attia, F.I. & H.G. Greening, 1981. Survey of resistance to phosphine in Coleopterous pests of grains and stored products in New South Wales. *General and Applied Entomology*. 4: 98-101.
- Benhalima, H., M.Q. Chaudhry, K. A. Mills & N.R. Price. 2004. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. *Journal of Stored Product Research*, 40: 241–249.
- Bell, C.H., 2000. Fumigation in the 21st century. *Crop Protection*. 19: 563–569.

- Cao Y., J. Zhang & M. Bengston, 1999. "Studies on a quick method to measure resistance of four strains of *Tribolium castaneum* (Herbst) to phosphine, 603-606". In: Proceedings of the Seventh International Working Conference on Stored-product Protection (Eds.: J. Zuxun, L. Quan, L. Yongsheng, T. Xianchang & G. Lianghua), (14–19 October 1998, Beijing, China). Sichuan Publishing House of Science & Technology, Chengdu, China.
- Champ, B.R. & C.E. Dyte, 1976. Report on the FAO Global Survey of Pesticide Susceptibility of Stored Grain Pests. FAO Plant Protection and Production Services, No. 5, FAO Rome, 297 p.
- Chen, Z., D. Schlipalius, G. Opit, B. Subramanyam & T. W. Phillips, 2015. Diagnostic molecular markers for phosphine resistance in U.S. populations of *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica*. PLoS ONE (in press, accepted Feb 2015).
- Collins P.J., G.J. Daghli, M. Bengston, T.M. Lambkin & H. Pavic, 2002. Genetics of resistance to phosphine in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera : Bostrichidae). Journal of Economic Entomology, 95(4): 862-869.
- Daghli, G.J. & P.J. Collins, 1999. "Improving the relevance of assays for phosphine resistance, 584–593". In: Proceedings of the Seventh International Working Conference on Stored-product Protection (Eds.: J. Zuxun, L. Quan, L. Yongsheng, T. Xianchang & G. Lianghua), (14–19 October 1998, Beijing, China). Sichuan Publishing House of Science & Technology, Chengdu, China.
- Daghli G.J., P.J. Collins, H. Pavic & R.A. Kopittke, 2002. Effects of time and concentration on mortality of phosphine-resistant *Sitophilus oryzae* (L) fumigated with phosphine. Pest Management Science, 58(10): 1015-1021.
- FAO Method No. 16, 1975. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative method for adults of some major pest species of stored cereals, with methyl bromide and phosphine. Plant Protection Bulletin FAO, 23 (1):12–25.
- Heseltine, H. K. & R.H. Thompson, 1957. The use of aluminium phosphide tablets for the fumigation of grain. Milling, 129: 676-783.
- Jagadeesan, R., P.J. Collins, G.J. Daghli, P.R. Ebert & D.I. Schlipalius, 2012. Phosphine resistance in the Rust red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae): Inheritance, gene interactions and fitness costs. PLoS ONE, 7(2): e31582.
- Jagadeesan, R., A. Fotheringham, P.R. Ebert & D.I. Schlipalius, 2013. Rapid genome wide mapping of phosphine resistance loci by a simple regional averaging analysis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. BMC Genomics, 14:650.
- Jittanun, C. & W. Chongrattanateekul, 2014. Phosphine resistance in Thai local strains of *Tribolium castaneum* (Herbst) and their response to synthetic pheromone. Kasetsart Journal (Natural Science), 48: 9–16.
- Kaur, R., S. Mohankumar, R. Jagadeesan, G. J. Daghli, M. K. Nayak, H. R. Naik, S. Ramasamy, C. Subramanian, P. R. Ebert & D. I. Schlipalius, 2015. Phosphine resistance in India is characterised by a dihydroliipoamide dehydrogenase variant that is otherwise unobserved in eukaryotes. Heredity (in press- accepted Feb 2015)
- Mills, K.A., 1983. Resistance to the fumigant hydrogen phosphide in some stored-product species associated with repeated inadequate treatments. Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie, 4: 98-101.
- Mills, K.A., E.J. Donahaye, S. Navarro & J.G. Leesch, 2001. Phosphine Resistance: Where to Now? 2001. 128 Proc Int Conf on Controlled Atmospheres and Fumigation in Stored Products, Fresno, California.
- Nisa, S. N., I. Bhattacharya, A.G. Tuck, D. Schlipalius & P.R. Ebert, 2011. Mechanisms of Phosphine Toxicity. Journal of Toxicology, 1-9, Article ID 494168.
- Opit, G., T. Phillips, M. Aikins, & M. Hasan, 2012. Phosphine resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* from stored wheat in Oklahoma. Journal of Economic Entomology, 105: 1107-1114.
- Payne, R.W., 2004. GenStat for Windows Release 9. VSN International Oxford, UK; 2004.
- Pimentel, M., L. Faroni, M. Totola & R. Guedes, 2007. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. Pest Management Science, 63: 876-881.
- Rahim, M. & Z. Sulaiman, 1999. Survey of resistance of stored grain pests to phosphine in Malaysia. Proceedings of International Conference on Plant Protection in the Tropics, 5: 226–229.

- Rahim, M., M.E. Faridah & M. Rasali, 2004. Current status of phosphine resistance in stored grain insects in Malaysia. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 32(1): 101–107.
- Rajendran, S., 1999. "Phosphine resistance in stored grain insect pests in India, 635-641". In: *Proceedings of the Seventh International Working Conference on Stored-product Protection* (Eds.: J. Zuxun, L. Quan, L. Yongsheng, T. Xianchang & G. Lianghua), (14–19 October 1998, Beijing, China). Sichuan Publishing House of Science & Technology, Chengdu, China.
- Sartori, M.R., I.A. Pacheco & R.M. Vilar, 1990. "Resistance to phosphine in stored grain insects in Brazil, 1041-1050". In: *5th International Working Conference on Stored Product Protection* (Eds.: F. Fleurrat-Lessard & P. Ducom), INRA/SDPV, Bordeaux.
- Schlipalius, D.I., J. Waldron, B.J. Carroll, P.J. Collins & P.R. Ebert, 2001. A DNA fingerprinting procedure for ultra high-throughput genetic analysis of insects. *Insect Molecular Biology*, 10(6): 579–585.
- Schlipalius D.I., N. Valmas, A.G. Tuck, R. Jagadeesan, L.Ma, R. Kaur, A. Goldinger, C. Anderson, J. Kuang, S. Zuryn, Y.S. Mau, Q. Cheng, P.J. Collins, M.K. Nayak, H.J. Schirra, M.A. Hilliard & P.R. Ebert, 2012. A core metabolic enzyme mediates resistance to phosphine gas. *Science*, 338 (6108): 807-810.
- Taylor, R.W.D., 1986. "Response of field strains of some insect pests of stored products, 132-140". In: *Proc. GASGA Seminar on Fumigation Technology in Developing Countries*, Tropical Development Research Institute, London.
- Taylor, R.W.D. & D. Halliday, 1986. "The geographical spread of resistance to phosphine by coleopterous pests of stored products, 607–613". In: *Proceedings of the Crop Protection Conference, Pest and Diseases* (17–20 November 1986) Brighton, Metropole, England.
- Zeng, L., 1999. "Development and countermeasures of phosphine resistance in stored grain insects in Guangdong, China, 642–647". In: *Proceedings of the Seventh International Working Conference on Stored-product Protection* (Eds.: J. Zuxun, L. Quan, L. Yongsheng, T. Xianchang & G. Lianghua), (14–19 October 1998, Beijing, China). Sichuan Publishing House of Science & Technology, Chengdu, China.
- Zettler J.L., W.R. Halliday & F.H. Arthur, 1989. Phosphine resistance in insects infesting stored peanuts in South Eastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 82(6): 1508-1511
- Zettler, J.L. & F.H. Arthur, 2000. Chemical control of stored product insects with fumigants and residual treatments. *Crop Protection*, 19: 577-582.

Original araştırma (Original article)

Insecticide resistance in two populations of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) from Turkey

Türkiye'deki iki *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) populasyonunda insektisit direnci

Melis YALÇIN¹ Serhan MERMER¹ Leyla Didem KOZACI² Cafer TURGUT^{1*}

Summary

In this study, the resistance of two (Aydın and Urla) populations of *T. absoluta* against five commonly used insecticides (indoxacarb, spinosad, azadirachtin, chlorantraniliprole and metaflumizone) were determined. Further, the activity of insecticide detoxifying enzymes [glutathione-S-transferase (GST) and esterase (EST)] was also evaluated to confirm the resistance. Aydın population of *T. absoluta* had higher resistant values 8-fold, 3.79-fold, 6.4-fold and 1.84-fold for indoxacarb, metaflumizone, spinosad and chlorantraniliprole, respectively against all insecticides except azadirachtin compared to the Urla population. It was determined that in comparison with *T. absoluta* population from Aydın, the Urla population can be more susceptible to other insecticides except azadirachtin. GST enzyme activity was 1.5-fold higher in Aydın than the Urla populations, however, EST enzyme had similar activity in both the populations. The results of study imply that *T. absoluta* populations from Aydın (Turkey) can be resistant against indoxacarb, metaflumizone, spinosad and chlorantraniliprole. Increased GST enzyme activity in resistant populations confirms this resistance development. Insecticides of plant origin like azadirachtin, for which least insecticide resistance was recorded, may be applied in combination with other methods to effectively control *T. absoluta*.

Keywords: *Tuta absoluta*, resistance, enzymes, leaf dip

Özet

Bu çalışmada *T. absoluta*'nın iki populasyonunun (Aydın ve Urla) en çok kullanılan 5 insektisite karşı (indoxacarb, spinosad, azadirachtin, chlorantraniliprol ve metaflumizon) direnç durumları tespit edilmiştir. Ayrıca detoksifikasyon enzimlerinin [glutathione-S-transferaz (GST) ve esteraz (EST)] aktiviteleri de direnci doğrulamak için saptanmıştır. *T. absoluta* Aydın populasyonunun azadirachtin hariç diğer insektisitlere karşı (Urla populasyonuna göre) sırasıyla indoxacarb, metaflumizon, spinosad ve chlorantraniliprol'e karşı 8, 3.79, 6.4 ve 1.84 kat direnç geliştirdiği gözlenmiştir. Aydın populasyonu ile karşılaştırıldığında Urla populasyonunun azadirachtin hariç diğer insektisitlere karşı daha duyarlı olabileceği saptanmıştır. GST enzim aktivitesi Urla populasyonuna göre Aydın populasyonunda 1.5-kat fazla iken, EST enzimi için her iki populasyonda benzer sonuçlar bulunmuştur. Çalışmanın sonuçları, Aydın (Türkiye)'dan alınan bir *T. absoluta* populasyonunun indoxacarb, metaflumizon, spinosad ve chlorantraniliprol'e karşı dirençli olabileceğine işaret etmektedir. Dirençli populasyondaki artan GST enzim aktivitesi, bu direnç gelişimini doğrulamaktadır. En az insektisit direnci rapor edilmiş olan bitkisel kaynaklı insektisit azadirachtin diğer metodlarla birlikte bu zararlının etkili bir şekilde kontrol edilmesinde uygulanabilir.

Anahtar sözcükler: *Tuta absoluta*, direnç, enzimler, yaprak daldırma

¹ Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

² Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: cturgut@adu.edu.tr

Alınış (Received): 26.02.2015 Kabul edilmiş (Accepted): 21.04.2015 Çevrimiçi Yayın Tarihi (Published Online): 30.04.2015

Introduction

Tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) was first detected in South America (Silva et al., 2011) then it was recognized in eastern Spain in 2006. It rapidly invaded European and the North African Mediterranean Basin Countries (Desneux et al., 2010, 2011). By August 2009, it had been detected in the Urla region of Turkey (Kılıç, 2010). From there, it dispersed to Antalya Kumluca Turkey in January 2010 (Erlor et al., 2010) and has now spread to Aydın, Turkey.

Tuta absoluta is the main pest of tomato which damages the leaves, stalks, flowers and fruits. If no preventative measures are adopted, this pest can destroy 80-100% tomato crops in both greenhouse and open-field tomato production (Desneux et al., 2010). Each insect can lay 260 eggs on the leaves of tomato plant; often resulting in up to 12 generations of insects (Silva et al., 2011). Larvae produce large galleries in tomato plant leaves, burrows stalks, buds and fruits (Cáceres, 1992; Lietti et al., 2005). Because of the leaf mines, the yield of the tomato might be greatly reduced. For instance, significant crop losses were reported in Spain, Italy and Greece (Roditakis et al., 2013b). Crop reduction due to leaf damage was identified as key reason for reduced export of tomatoes from USA, Canada, China and India (Desneux et al., 2011).

Due to its impact, different techniques were implemented for the management of this pest, such as monitoring with pheromone traps or using natural enemies. The most substantial control method has been the application of insecticides for sufficient and rapid control. However, repeated chemical control often results in the resistance development in insects to the registered active ingredients. Resistance is accelerated by multiple applications of the insecticide. Reports have shown that some producers apply insecticide 36 times during vegetation period (Picanço et al., 1995). Other researchers have documented the resistance mechanisms and levels of this pest (Lietti et al., 2005; Durmuşoğlu et al., 2011; Dağlı et al., 2012)

Recent studies have reported insecticide resistance development of *T. absoluta* in diverse tomato production regions. For example, field populations of Adana and Antalya strain of *T. absoluta* showed low resistance to abamectin insecticide while Ankara strain of *T. absoluta* was not resistant to abamectin (Konus, 2014). Low or no resistance levels were found toward pyrethroids, abamectin, spinosad, *Bacillus thuringiensis* and the mixture deltamethrin+ triazophos, however indoxacarb and chitin synthesis inhibitors showed high resistance (Silva et al., 2011). *T. absoluta* has also shown resistance to indoxacarb and chlorantraniliprole in three laboratories from different countries (Greece, Spain and Italy) (Roditakis et al., 2013b). *T. absoluta* insecticide resistance has been attributed to the combination of the insecticide's mode of action and its detoxification by special enzymes. A variety of enzymes and their roles against insecticides have been studied. For instance, the registered insecticide spinosad, has a unique and powerful action mechanism on lepidopteran larvae (Reyes et al., 2012), is a nicotinic acetylcholine receptor (n AchR). Allosteric activators have been found to directly impact the activity of esterases (IRAC, 2013). Metaflumizone, which is specifically developed against Lepidoptera species, is a voltage-gated sodium channel blocker. Indoxacarb is also a voltage-gated sodium channel blocker and is bioactivated by esterases in the target insects (Ahmad & Hollingworth, 2004). Although azadirachtin has unknown modes of action, the insects may become more resistant owing to the role of neem in reducing enzyme levels through blockage of protein synthesis (Lowery & Smirle, 2000). Chlorantraniliprole has a novel mode of action, ryanodine receptor modulator, it controls external Ca²⁺ entry and ryanodine receptor channels (RyRs).

The aim of this study was to evaluate the toxicities of five insecticides on two populations of *T. absoluta* in order to establish if there are differences in susceptibility in those populations.

Materials and Methods

Biological material (*Tuta absoluta* / insects + rearing + plant material)

Tuta absoluta populations were collected from tomato infested fields in Urla (Kuşçular, Yağcılar) and Aydın (Sultanhisar, İncirliova, Germencik) Turkey during summer in 2011 and 2012. Larvae infested leaves were collected, transferred to cages (40 x 40 x 40 cm), and kept in a climate chamber which had a constant temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, relative humidity 65% and 16:8 h light: dark photoperiod. Larvae were then fed with tomato leaves from plants cultivated under greenhouse conditions without any insecticide treatment. In the cages water, sugar, and pollen mixture was used to endorse adult population.

The Newton tomato variety was used in the experiment. The plants were irrigated and inspected every second day. Infested leaves were removed and destroyed to prevent cross breeding from unknown strain. Tomatoes leaves without insecticides were used in this study to prevent any bias due to the presence of mites. Urla and Aydın populations were reared in different climate chambers to prevent cross contamination. The insects from these climatic chambers were collected when the adults reached an age of 13-15 days. If the number of eggs were not adequate, plants were then removed and new plants were placed for the insects' oviposition progress. After 8 days, second instar larvae were collected and used for the experiments.

Insecticides

The insecticides chlorantraniliprole (Altacor^R 35 WG), metaflumizone (Alverde^R SC) and indoxacarb (Avaunt150SC) were provided by BASF. Spinosad (Laser SC 480 g/l) was provided by Dow Agrosciences. Azadirachtin 10 g/l (Neemazal^R-T/S) was provided by Trifolion-M GmbH Germany.

Bioassay

Toxicity of insecticides on *T. absoluta* was evaluated by the IRAC method (IRAC, 2013). Second instar larvae (4-5 mm in size) were collected from infested leaves of tomato plants in the cages. It was ensured that larvae had never been in starvation stress. F2 generation larvae were obtained and these were used to homogenize the larvae which was recommended in IRAC 022 method. Tomato leaves were collected from top third of the plant ensuring similar size and placed in a moist paper towel to avoid wilting. Commercial insecticide formulations were used in a leaf dip bioassay which is the most efficient method for detection of the toxicity of insecticide formulations for *T. absoluta* (Galdino et al., 2011). The control leaves dipped in the solvent without the insecticide and other leaves were dipped individually in the different solutions for 3 seconds with agitation, making sure that the surfaces of the leaves were covered by respective insecticides; then the treated leaves were dried. Two petri cups per concentration, and six concentrations plus one control per insecticide were used. It is summed up a total of 14 petri cups per insecticide. This method was applied for 5 insecticides individually. The bottom of each cup was covered with moistened filter paper and these were then labeled according to the solution used. The insecticide treated two leaves were then placed individually in the respective petri cups. Two insecticide treated leaves were placed in 9 cm diameter petri dishes.

By using a fine soft brush, 10 larvae were put on each leaf, with two leaves used for each insecticide concentration. Six different concentrations were used for each insecticide. Leaves not treated with insecticides and the same numbers of larvae were used as a control. Mortality was calculated after 72 h using a fine soft brush. If larvae did not move when brushed, they were assumed as dead, while if they moved they were assumed as alive. Also, if they were moribund larvae, they were assumed alive.

Activities of the two enzymes glutathion S transferase (GST) and esterase (EST) of second instar larvae were measured. Larvae extracts were prepared using Reyes method (Reyes et al., 2012). Protein contents of larvae extracts were determined by Bradford method (Bradford, 1976). The same number of larvae was used for evaluating EST and GST enzyme activity. Thirty larvae for each replication were collected from the leaves of tomatoes, with analysis repeated six times for each treatment. Thus for each

sampling site, 180 larvae were collected. They were homogenized on ice in 50 µl Hepes buffer (50 mM, pH 7.0) by using pestils. Homogenates were centrifuged at 15,000 g for 15 min at 4 °C. The supernatants of each sample were used to measure enzyme activity.

Substrate β-naphthyl acetate (β-NA) was used to determine esterase activity according to Walker (1998). Absorbance was determined by a micro plate ELISA spectrophotometer reader. Each well contained 10 µl extract and 185 µl β-NA (0.03 mM, final concentration in well). After 20 min incubation at 30 °C, 55 µl Fast Garnet (0.4%) and SDS (2.5%) were added to the solution. Absorbance at 590 nm of each well was measured after 20 min incubation in the dark room. EST activity was determined as n mol β-NA mg protein⁻¹ min⁻¹.

GST activity was determined by using monochlorobimane (MCB) as a substrate. Thirty µl of extract, 168 µl and 100 mM GSH in Hepes Buffer (50 mM pH 7.0) and 2 µl 30 mM MCB were added to each well. Fluorescence was measured after 20 min incubation at 22 °C with 450 nm emission and 380 nm excitation filter. Activities were determined as unit activity mg protein⁻¹ min⁻¹ because of the absence of bimane- glutathione adduct.

Data analysis

Insecticide bioassay data were subjected to probit analysis, using Polo Plus Program (LeOra Software). The LC₅₀ and LC₉₀ values, linearity of dose-mortality response and slope were computed (Robertson et al., 2003). The mortality values of the control treatment of each insecticide were used to perform the probit analysis, for calculating the regression line, the slope and the LCs' for each insecticide. The LCs' of the susceptible population was used for the calculation of the Resistance Factor (RF) for each insecticide. The population which has a minor value of LC assumed as susceptible population since there was no susceptible strain available for this insect to evaluate resistance factor.

The mean activity values of the two enzymes, EST and GST were calculated by Student Newman Keuls analyses with SPSS program (Abdi & Williams, 2010). This test offered comparison of the enzyme values of Urla and Aydin populations.

Results

Resistance factors of insecticides

Aydin and Urla populations of *T. absoluta* responded differently to applied insecticides in the experiment (Table 1). In contrast to Urla population of *T. absoluta*, the Aydin population was found to have developed a resistance against all insecticides (except azadirachtin). On the other hand, Urla populations were noted to have a weak resistance only against azadirachtin. The highest insecticide resistance in *T. absoluta* Aydin populations was found against indoxacarb followed by spinosad. LC₅₀ resistance ratio of indoxacarb was eight fold higher in Aydin population compared to Urla population. LC₅₀ and LC₉₀ values for indoxacarb were 215.26 mg L⁻¹ and 695.64 mg L⁻¹ in Aydin population, respectively. On the other hand, LC₅₀ value was 26.81 mg L⁻¹ and LC₉₀ value was 144.61 mg L⁻¹ in Urla population. The resistance factor of azadirachtin was the lowest among the insecticides studied (Table 1). LC₅₀ values of Aydin and Urla populations were 19.18 mg L⁻¹ and 23.60 mg L⁻¹, respectively. *T. absoluta* exhibited three-fold increase in LC₅₀ by metaflumizone in Aydin population as compared with Urla. For metaflumizone, LC₅₀ values of 2091.4 mg L⁻¹ and 550.47 mg L⁻¹ were found for Aydin and Urla populations, respectively. RF values indicated that the Aydin population of *T. absoluta* was six fold higher resistant than the Urla population for spinosad and the resistance factor of Aydin was also higher. LC₅₀ values for Aydin and Urla were found to be 0.7 mg L⁻¹ and 0.11 mg L⁻¹, respectively. The LC₅₀ ratio of the Aydin population to the Urla population for chlorantranilprole was 1.84, and its LC₅₀ values were 15.35 mg L⁻¹ and 8.36 mg L⁻¹ for Aydin and Urla, respectively.

Table 1. Toxicity data of indoxacarb, azadirachtin, metaflumizone, chlorantraniliprole and spinosad against Aydın and Urla population of *Tuta absoluta*

	Number Tested	Slope	X ²	LC ₅₀ (95% CL)	LC ₉₀ (95% CL)	RF(95% CL)
Indoxacarb						
Aydın	140	1.940	1.300	215.26 (162-360)	695.64 (399-2704)	
Urla	140	1.700	2.800	26.81 (13-39)	144.61 (91-394)	
Aydın/Urla						8.02 (4.4-14.4)
Azadirachtin						
Aydın	140	1.060	1.508	19.18 (10-42)	303.00 (93-19343)	
Urla	140	1.800	6.600	23.60 (10-60)	115.23 (49-2888)	
Urla/Aydın						1.23 (0.2-1.1)
Metaflumizone						
Aydın	140	1.270	0.140	2091.40 (1160-12092)	21356.00 (5721-531398)	
Urla	140	1.807	0.356	550.47 (374-795)	2818.20 (1653-8360)	
Aydın/Urla						3.79 (1.6-5.6)
Spinosad						
Aydın	140	1.751	0.463	0.70 (0.140-2.770)	275.00 (37-25985)	
Urla	140	0.305	0.495	0.11 (0.013-0.440)	66.00 (10-4812)	
Aydın/Urla						6.40 (0.6-49.5)
Chlorantraniliprole						
Aydın	140	0.210	0.848	15.35 (10.950-21.360)	63.25 (40-144)	
Urla	140	0.200	1.220	8.36 (5.390-11.570)	34.34 (22-73)	
Aydın/Urla						1.84 (1.1-2.8)

LC₅₀ in mg L⁻¹; LC₉₀ in mg L⁻¹; RF= Resistance Factor (LC₅₀value of insecticide in Aydın/ LC₅₀value of insecticide in Urla or LC₅₀value of insecticide in Urla / LC₅₀value of insecticide in Aydın).

EST and GST activities

EST activities of the Aydın and the Urla populations were 0.110±0.02 n mol β-NA/mg protein/min and 0.097±0.03 n mol β-NA/mg protein/min, respectively (Figure 1.A). There was no significant difference (p>0.05) between the EST activities of the Aydın and Urla populations of *T. absoluta*. GST activities of the Aydın and Urla populations were 1.905±0.55 unit activity/mg protein/min and 1.237±0.718 unit activity/mg protein /min, respectively (Figure 1.B). Aydın population showed a significant lower value of GST activity (P< 0.05) than the Urla population.

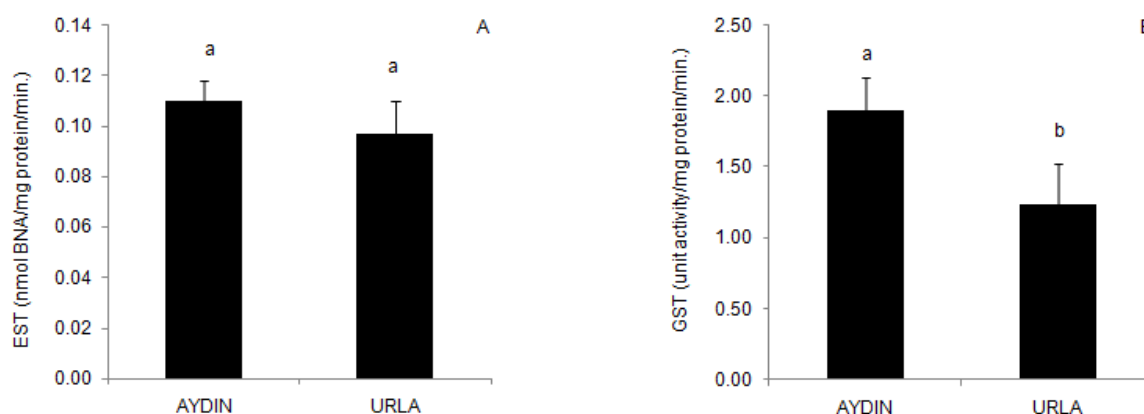


Figure 1. A) Esterase activity ranges of *T. absoluta* populations in Aydin and Urla, B) Glutathion-S-transferase activity ranges of *Tuta absoluta* populations in Aydin and Urla.

Different letters on the bars indicate statistical differences ($P < 0.05$), Student Newman Keuls Analysis.

Discussion

In this study, the toxicities of five insecticides registered to control *T. absoluta* in two population from Turkey were determined, and the possible responsible enzymes for induction of insecticide resistance were investigated. Previously, several resistance studies have been done due to the spatial dependence of *T. absoluta*. For example, in Brazil, the use of pyrethroid and organophosphorus compounds was suggested to be avoided due to the high resistance ratio of *T. absoluta* to those compounds (Branco et al., 2001). Deltamethrin was found the least toxic to *T. absoluta* while mevinphos was found as the most toxic compound in Africa and Chile (Salazar & Araya, 2001). Previously, resistance to indoxacarb was estimated since this insecticide was registered worldwide for the control of moths. In this study, it was observed that indoxacarb resistance was 8.02-fold higher in the Aydin population in relation to Urla. Recent studies have also reported cases of insecticide resistances in *T. absoluta* from many parts of world. For example, in a study from Greece, Roditakis et al. (2013a) found LC_{50} values of indoxacarb for resistant *T. absoluta* populations 4, 10 and 12-fold higher compared with the susceptible populations. Similarly, Silva et al. (2011) reported 27.5-fold resistance development against indoxacarb in resistant populations than the susceptible populations. The resistance ratio of indoxacarb was found 15-fold higher compared with a laboratory susceptible population for *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) (Silva et al., 2011). The increased resistance was attributed to the activity of GST enzyme (Ahmad et al., 2008).

According to our studies, metaflumizone was comparable between the study groups in the experiment. *T. absoluta* showed 3.79-fold resistance in Aydin compared to the Urla population. Roditakis et al. (2013b) reported that *T. absoluta* showed 5-fold resistance to metaflumizone in Crete province of Greece when compared to the susceptible strain. Contrarily, metaflumizone was reported effective against *T. absoluta* in Italy (Nannini et al., 2011). Although metaflumizone is a new semicarbazone insecticide, frequent usage of this insecticide could have led to the development of resistance in *T. absoluta*.

Currently, historically used insecticides are being replaced by novel ones because of the cross and multiple resistances among insect pests (Metcalfe, 1967; Singh et al., 2005; Cordova et al., 2006; Rattan, 2010). Spinosad is one among the alternative class of insecticides such as organophosphates, carbamates and pyrethroids (Cleveland et al., 2002). Spinosad which is most commonly used against a range of insects including Lepidoptera (El-Mageed & Elgohary, 2006) was found an effective insecticide

for *T. absoluta* when the sample sites were compared in our studies. The Urla populations were susceptible to this insecticide while the Aydın population had 6-fold resistance with respect to the Urla population. In another study, it was established that resistance to spinosad, which is a neurotoxic insecticide, ranged between 1.2 to 4.8-fold in Brazil (Silva et al., 2011). Reyes et al. (2012) reported that four of the five field populations showed significantly lower susceptibility to spinosad, when compared with the susceptible strain. In a study from Egypt, it was determined that spinosad resistance could contribute to a decrease in AchE activity (El-Mageed & Elgohary, 2006). Further, EST and mixed function oxidase (MFO) can also reduce the efficacy of spinosad in *T. absoluta* (Reyes et al., 2012). The lower variability of LC₅₀ was observed between Urla and Aydın for Azadirachtin i.e. 1.23. Previously, researchers have reported that effectiveness of azadirachtin against *T. absoluta*. For example, in a study from Brazil, the azadirachtin was found to cause almost complete mortality of *T. absoluta* populations (Tomé et al., 2013). The other studies also report a higher mortality of this insect pest through application of azadirachtin (Gonçalves-Gervásio & Vendramim, 2007; Durmuşoğlu et al., 2011). Many studies have reported the resistance development in insect pest against chlorantraniliprole (Astor & Scals, 2009; Roditakis et al., 2013a; Roditakis et al., 2013b). In our study, *T. absoluta* showed 1.83-fold resistance to chlorantraniliprole, whereas European populations of *T. absoluta* showed 1 to 6-fold resistance to chlorantraniliprole (Roditakis et al., 2013b).

In this study, the results regarding insecticide detoxifying enzymes support the observed resistance ratios of insecticides. Aydın population was found to possess significantly higher GST activity compared to the Urla population. In accordance with our results, some recent studies confirm an increased enzyme activity in the insecticide resistant insect populations. For example, 1.3-fold higher GST activity was reported for the *T. absoluta* populations which had developed a resistance against abamectin in two provinces of Turkey (Konus, 2014). Another study from South America indicated that enzymes (oxidase, GST, EST) activities differed significantly in susceptible and resistant populations of *T. absoluta* (Reyes et al., 2012). Radwan & Taha (2012) had reported that dinotefuran, imidacloprid, fenoxycarb, phenthoate and thiocyclam insecticides exposure causes reduction or increase in the activity of AchE and GST enzymes.

In conclusion, the susceptibility of *T. absoluta* to registered insecticides has decreased in certain agricultural fields of Turkey. This insect may become a major pest of several crops if proper alternative control measures are not adopted. The resistance development in *T. absoluta* was confirmed by increased activity of GST enzyme. According to the results from the two population, azadirachtin was found to have developed no or very weak resistance against *T. absoluta* populations which may be due to a different mode of action of this insecticide. Future research work may be carried out to evaluate the synergistic relationship between enzymes to develop alternative management strategies.

Acknowledgements

The authors would like to thank to the technical staff of the Plant Protection Department of Agricultural Engineering Faculty for collecting and rearing the insects, and Elizabeth L. Hill (Lancaster University, UK) and Khawar Jabran for proof reading. This study was supported by Adnan Menderes University Research Foundation (Project No: ZRF 12038).

References

- Abdi, H. & L. J. Williams, 2010. Newman-Keuls Test and Tukey Test, Thousand Oaks, CA.
- Ahmad, M. & R. M. Hollingworth, 2004. Synergism of insecticides provides evidence of metabolic mechanisms of resistance in the obliquebanded leafroller *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Management Science*, 60: 465-473.
- Ahmad, M., A. H. Sayyed, M. A. Saleem & M. Ahmad, 2008. Evidence for field evolved resistance to newer insecticides in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. *Crop Protection*, 27: 1367-1372.
- Astor, E. & D. Scals, 2009. The control of *Tuta absoluta* with insecticides compatible with integrated pest management programmes and the prevention of resistance. *Agricola Vergel: Fruticultura, Horticultura, Floricultura, Citricultura, Vid, Arroz*, 28: 492-495.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Branco, M. C., F. H. França, M. A. Medeiros & T. L. Jose-Guilherme, 2001. Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das crucíferas: um estudo de caso. *Horticultura Brasileira*, 19: 60-63.
- Cáceres, S., 1992. La polilla del tomate en Corrientes. *Biología y control. Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista, INTA*, 19.
- Cleveland, C. B., M. A. Mayes & S. A. Cryer, 2002. An ecological risk assessment for spinosad use on cotton. *Pest Management Science*, 58: 70-84.
- Cordova, D., E. A. Benner, M. D. Sacher, J. J. Rauh, J. S. Sopa, G. P. Lahm, T. P. Selby, T. M. Stevenson, L. Flexner, S. Gutteridge, D. F. Rhoades, L. Wu, R. M. Smith & Y. Tao, 2006. Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84 (3): 196-214.
- Dağlı, F., C. İkten, E. Sert & E. Bölünecek, 2012. Susceptibility of tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) populations from Turkey to 7 different insecticides in laboratory bioassay. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 42 (2): 305-311.
- Desneux, N., E. Wajnberg, K. G. Wyckhuys, G. BurgioArpaia, C. Narváez-Vasquez, J. González-Cabrera, D. Catalán Ruescas, E. Tabone, J. Frandon, J. Pizzol, C. Poncet, T. Cabello & A. Urbaneja, 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, 83: 197-215.
- Desneux, N., M. Luna, T. Guillemaud & A. Urbaneja, 2011. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *Journal of Pest Science*, 84: 403-408.
- Durmuşoğlu, E., A. Hatipoğlu & H. Balcı, 2011. Bazı bitkisel kökenli insektisitlerin laboratuvar koşullarında *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) larvalarına etkileri. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 35: 651-663.
- El-Mageed, A. E. M. A. & L. R. A. Elgohary, 2006. Impact of Spinosad on some enzymatic activities of the Cotton leafworm. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9: 713-716.
- Erler, F., M. Can, M. Erdogan, A. O. Ates & T. Pradier, 2010. New record of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on greenhouse-grown tomato in southwestern Turkey (Antalya). *Journal of Entomological Science*, 45: 392-393.
- Galdino, T. V. S., M. C. Picanço, E. G. F. Morais, N. R. Silva, G. A. R. Silva & M. C. Lopes, 2011. Bioassay method for toxicity studies of insecticide formulations to *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917). *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 869-877.
- Gonçalves-Gervásio, R. C. R. & J. D. Vendramim, 2007. Bioatividade do extrato aquoso de sementes de nim sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em três formas de aplicação. *Ciência e Agrotecnologia*, 31: 28-34.
- IRAC, 2013. Lepidoptera insecticide mode of action classification: a key to effective insecticide resistance management, Vol. 2013. (Web page: <http://www.ircac-online.org/documents/lepidoptera-moa-poster/?ext=pdf> (Date accessed: January 2015))
- Kılıç, T., 2010. First record of *Tuta absoluta* in Turkey. *Phytoparasitica*, 38: 243-244.

- Konuş, M., 2014. Analysing resistance of different *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) strains to abamectin insecticide. Turkish Journal of Biochemistry, 39 (3): 291-297.
- Lietti, M. M. M., E. Botto & R. A. Alzogaray, 2005. Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Neotropical Entomology, 34, 113-119.
- Lowery, D. T. & M. J. Smirle, 2000. Toxicity of insecticides to obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana*, larvae and adults exposed previously to neem seed oil. Entomologia Experimentalis et Applicata, 95: 201-207.
- Metcalf, R. L., 1967. Mode of action of insecticide synergists. Annual Review of Entomology, 12: 229-256.
- Nannini, M., F. Foddi, G. Murgia, R. Pesci & F. Sanna, 2011. Insecticide efficacy trials for managements of the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), a new tomato pest in Sardinia (Italy). Acta Horticulturae (ISHS), 917: 47-53.
- Picanço, M. C., R. N. C. Guedes, G. L. D. Leite, P. C. R. Fontes & E. A. Silva, 1995. Incidência de *Scrobipalpus* *absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro sob diferentes sistemas de tutoramento e controle químico de pragas. Horticultura Brasileira, 13: 180-183.
- Radwan, E. M. M. & H. Taha, 2012. Toxic and biochemical effects of different insecticides on the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, 4 (1): 1-10.
- Rattan, R. S., 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. Crop protection, 29 (9): 913-920.
- Reyes, M., K. Rocha, L. Alarcón, M. Siegwart & B. Sauphanor, 2012. Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. Pesticide Biochemistry and Physiology, 102: 45-50.
- Robertson, J. L., R. M. Russell, H. Preisler & N. E. Savin, 2003. Poloplus: probit and logit analysis user's guide. - LeOra software, Boca Raton, Florida, USA.
- Roditakis, E., C. Skarmoutsou & M. Staurakaki, 2013a. Toxicity of insecticides to populations of tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) from Greece. Pest Management Science, 69: 834-840.
- Roditakis, E., C. Skarmoutsou, M. Staurakaki, M. del Rosario Martínez-Aguirre, L. García-Vidal, P., Bielza, K. Haddi, C. Rapisarda, J.-L. Rison, A. Bassi, & L. A. Teixeira, 2013b. Determination of baseline susceptibility of European populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) to indoxacarb and chlorantraniliprole using a novel dip bioassay method. Pest Management Science, 69: 217-227.
- Salazar, E. R. & J. E. Araya, 2001. Respuesta De La Polilla Del Tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), a Insecticidas en Arica. Agricultura Técnica, 61: 429-435.
- Silva, G. A., M. C. Picanço, L. Bacci, A. L. B. Crespo, J. F. Rosado & R. N. C. Guedes, 2011. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. Pest Management Science, 67: 913-920.
- Singh, P., V. K. Singh & D. K. Singh, 2005. Effect of binary combination of some plant-derived molluscicides with MGK-264 or piperonyl butoxide on the reproduction of the snail *Lymnaea acuminata*. Pest Management Science, 61 (2): 204-208.
- Tomé, H. V. V., J. C. Martins, A. S. Corrêa, T. V. S. Galdino, M.C. Picanço & R.N.C. Guedes, 2013. Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. Crop Protection, 46: 63-69.
- Walker, C. H., 1998. "Birds, 326-338". In: Handbook of Ecotoxicology (Ed. P. Calow), Blackwell Science Ltd., Oxford, United Kingdom, 885 pp.

Orijinal araştırma (Original article)

Comparison of Alticini (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) species diversity in different habitats selected from Bafa Lake Natural Park (Aydın) basin with a new record for Turkish fauna¹

Türkiye faunası için yeni bir kayıtle birlikte Bafa Gölü Tabiat Parkı (Aydın)'ndan seçilmiş farklı habitatların Alticini (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) tür çeşitliliğinin kıyaslanması

Fatma BAYRAM²

Ebru Gül ASLAN^{2*}

Summary

Alticini species composition, richness and abundance were studied comparatively in four different habitats with different floristic characteristics chosen from Bafa Lake Natural Park. The study was conducted regularly at 15-day intervals during 2012 and 2013. A total of 480 individuals belonging to 10 genera and 55 species of Alticini were collected. Among them *Longitarsus aeruginosus* (Foudras, 1860) (Coleoptera: Chrysomelidae) was determined as new record for the Alticini fauna of Turkey and is presented with related figures. According to Shannon-Wiener, Simpson and Berger-Parker indices of diversity, Meadow area 1 (MA1) was detected as the most diverse habitat. Jaccard and Bray-Curtis similarity indices showed that Alticini communities in Olive grove area 1 (OGA1) and Meadow area 1 (MA1) were more closely related. Data gathered from regular samplings were also displayed by graphics obtained from analyses of Rarefaction and Abundance plot k-dominance. The reasons affecting species diversity of areas were discussed.

Keywords: Alticini, diversity, Bafa Lake Natural Park, new record, Turkey

Özet

Bafa Gölü Tabiat Parkı'ndan seçilen farklı floristik özelliklere sahip dört alanın Alticini tür kompozisyonu, çeşitliliği ve benzerliği karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Araştırma 2012 ve 2013 yılları boyunca 15 günlük periyotlarla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 10 cinse bağlı 55 türe ait toplam 480 Alticini bireyi toplanmıştır. Bu türlerden *Longitarsus aeruginosus* (Foudras, 1860) (Coleoptera: Chrysomelidae) Türkiye Alticini faunası için yeni kayıt olarak belirlenmiştir ve ilgili şekillerle birlikte sunulmuştur. Shannon-Wiener, Simpson ve Berger-Parker çeşitlilik indekslerine göre Çayırılık Alan 1 tür çeşitliliği en yüksek alan olarak tespit edilmiştir. Jaccard ve Bray-Curtis benzerlik indeksleri, Çayırılık Alan 1 ve Zeytinlik Alan 1'in daha yakın ilişkili olduğunu göstermiştir. Sonuçlar Rarefaction ve Abundance plot k-dominance analizlerinden elde edilen grafiklerle de desteklenmiştir. Alanların tür çeşitliliğini etkileyen muhtemel sebepler tartışılmıştır.

Anahtar sözcükler: Alticini, çeşitlilik, Bafa Gölü Tabiat Parkı, yeni kayıt, Türkiye

¹ This study is a part of the first author's master thesis and was supported by Department of Scientific Research Project Management of Süleyman Demirel University (SDUBAP), with the project number 3313-YL2-12

² Süleyman Demirel University, Faculty of Arts and Science, Biology Department, 32260, Isparta, Turkey

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: ebruaslan@sdu.edu.tr

Alınış (Received): 14.11.2014 Kabul ediliş (Accepted): 06.05.2015 Çevrimiçi Yayın Tarihi (Published Online): 05.06.2015

Introduction

The flea beetles, tribe Alticini, make a highly diverse group of leaf beetles comprising of around 600 genera and 11,000 described species. The total number of Palearctic flea beetle fauna has reached to 2400 species, classified in 64 genera (Biondi & D'Alessandro, 2012; Kang et al., 2013; Konstantinov et al., 2013; Nadein, 2013). Turkish Alticini fauna contains 22 genera and about 340 species (Ekiz et al., 2013; Özdikmen et al., 2014). Despite some efforts to identify the actual number of species, studies focusing on Alticini species diversity and composition patterns are still very limited in Turkey.

Members of Alticini are highly specialized phytophagous insects, most of them being mono- or oligophagous (Biondi et al., 2013). Adult flea beetles feed on various parts of the plants, including leaves and non-woody stems (Konstantinov & Tishechkin, 2004). Some of them are serious agricultural pests causing direct damage or transmitting viruses, however several species are beneficial due to their importance as biological control agents of weeds (Booth et al., 1990; Jolivet & Verma, 2002). The remarkable diversity of the group is correlated with their specific feeding habits. Huge population densities on their host plants have made alticines considerable ecologically and economically important. Detailed knowledge of species diversity patterns is therefore important for conservation biology, biodiversity monitoring and community ecology (Aslan, 2010).

Natural parks are landscape protected by means of long-term planning, use and agriculture. These valuable landscapes are preserved in their present state and promoted for tourism purposes. Currently, a total of 189 natural parks are located in Turkey (MFWA, 2013) and Bafa Lake is one of them. The natural parks are of great importance for the diversity of phytophagous insects because of their rich floristic composition. However, detailed faunistical studies on Alticini group are absent or very limited in especially western parts of Turkey. Bafa Lake is also important being a protected wetland area with high plant diversity. So, the aims of this study are to: (i) survey the Alticini fauna of Bafa Lake Natural Park located in western Turkey, (ii) compare the species diversity and faunal similarity among different habitats with several characteristics chosen from the lake basin, and (iii) add one more species to the Alticini fauna of Turkey.

Material and methods

Study site

The survey was carried out in Bafa Lake Natural Park situated in the Aegean Region of Turkey around the borders of Söke District (Aydın) and Muğla Province (Fig.1). Bafa Lake is located between 37° 28' N and 37° 32' N longitudes – 27° 22' E and 27°32' E latitudes, covering an area of 65–70 km², and at an altitude of 2.5–3 m. Its maximum depth changes seasonally between 20-23 m (Öztürk et al., 2002).

The lake was formerly a bay of the Aegean Sea, later isolated from the sea as a result of alluvium blockage of the opening of Latmos Bay caused by alluvial deposits of the Greater Menderes River. Bafa Lake (including its surroundings) was declared as Natural Park by the Turkish government in 1994. It is also included in the list of international RAMSAR agreement which was organized for protecting the important wetlands (MFWA, 2013).

Four sites bordering the lake and representing different floristic compositions were selected for the inventory. The main characteristics of these habitats are as follows:

Meadow area 1 (MA1) is located in the east coast of Bafa Lake. It has a flat bottom area and is entirely covered with grassy vegetation. The site is mostly dominated by members of plant families viz., Lamiaceae, Poaceae, and Fabaceae. Open areas like that without woods and larger groups of trees tend to have great proportions of herbs. Likewise it has a quite rich floristic composition as compared to other sites.

Meadow area 2 (MA2) is located in the north coast of the lake. Plants belonging to Malvaceae and Poaceae families are mainly dominant in this area. It has a virtually uniform herbaceous cover as compared to MA1.

Olive grove area 1 (OGA1) is located in the south-east coast of Bafa Lake. Olive trees, one of the representatives of the typical Mediterranean climate, are especially common in the southern parts of the lake. Beside olive trees, members from the families Poaceae, Boraginaceae, Lamiaceae and Brassicaceae form the widespread plant species of the area.

Olive grove area 2 (OGA2) is located in the southwest coast of the lake and situated on the side of the Greater Menderes Basin. Shrubby plants, such as juniper and carob, constitute the majority of the vegetation. The area is much exposed to human impact compared to others.



Figure 1. Location of the Bafa Lake showing the study sites around the natural park.

Sampling method and collection

Field surveys were performed at 15-day intervals from March to September in 2012 and February to November in 2013. Adult flea beetles were collected from various plants using an entomological sweep-net and mouth aspirator. Sampling was performed in each study site respectively each consisted of 750 sweeps of the net. Collected beetles were taken to the laboratory to be mounted and labeled. Specimens were identified to species level under a LEICA EZ4 stereo-microscope using the taxonomic keys and figures given by Čížek & Doguet (2008), Warchałowski (2010) and Konstantinov et al. (2011). The insect samples are deposited at the Biology Department of Süleyman Demirel University, Isparta, Turkey.

Data analysis

Species composition, diversity and similarity of Alticini communities in the four study sites of Bafa Lake Natural Park were examined by using the program BioDiversity Pro (McAleece et al., 1997). The Shannon-Wiener (H'), Simpson ($1/D$) (for measuring diversity), and Berger-Parker ($1/d$) (considering the dominance) were used as the alpha-diversity indices (Equations 1-3). The Jaccard (C_j) and Bray-Curtis (C_N) indices were used to determine the degree of similarity in species composition between the Alticini communities of different sites (Equations 4 and 5). The similarity dendrograms obtained from the results of cluster analysis were plotted (Magurran, 2004). Sample-based rarefaction curves and k-dominance plots were created to describe Alticini communities in more detail.

Shannon-Wiener diversity index is defined as

$$H' = -\sum p_i \ln(p_i) \quad (1)$$

Simpson index is defined as

$$D = \sum p_i^2 \quad (2)$$

Berger-Parker index is defined as

$$d = \frac{N_{max}}{N} \quad (3)$$

The quantity p_i is the proportion of individuals found in the i th species, S is the number of species, N is the total number of individuals, N_{max} is the number of individuals in the most abundant species (Magurran, 2004). For Simpson's index and Berger-Parker index of dominance, the reciprocal forms ($1/D$ and $1/d$) were used so that an increase in the value of index accompanies an increase in diversity and a reduction in dominance.

Cluster analyses were performed by using Jaccard and Bray-Curtis indices in order to determine the similarity among the sites.

Jaccard index is defined as

$$C_j = \frac{a}{a+b+c} \quad (4)$$

Bray-Curtis index is defined as

$$1-C_N \quad (C_N = \frac{2jN}{N_a + N_b}) \quad (5)$$

where N_a is the total number of individuals in area A, N_b is the total number of individuals in area B, and $2jN$ is the sum of the lower of the two abundances for species found in both areas (Magurran, 2004).

Results

Species diversity and composition

A total of 480 flea beetles belonging to 10 genera and 55 species were recorded as a result of field studies carried out during two years in four different sites selected from surroundings of Bafa Lake Natural Park (Table 1).

Table 1. List of Alticini species collected from the four sites in Bafa Lake Natural Park

Species	MA1	MA2	OGA1	OGA2	Total number	Relative Abundance (%)
<i>Phyllotreta</i> Chevrolat						
<i>P. punctulata</i> (Marsham)	4				4	0.83
<i>P. atra</i> (Fabricius)	7				7	1.46
<i>P. fallaciosa</i> Heikertinger		4			4	0.83
<i>P. bulgarica</i> Gruev		5			5	1.04
<i>P. erysimi</i> Weise				6	6	1.25
<i>P. lativittata</i> Kutschera				2	2	0.42

Table 1. List of Alticini species collected from the four sites in Bafa Lake Natural Park (continued)

Species	MA1	MA2	OGA1	OGA2	Total number	Relative Abundance (%)
<i>P. nigripes</i> (Fabricius)			5		5	1.04
<i>P. vittula</i> (Redtenbacher)		4			4	0.83
<i>P. corrugate</i> Reiche				11	11	2.29
<i>Aphthona</i> Chevrolat						
<i>A. warchalowskii</i> Fritzlär			3		3	0.63
<i>A. kuntzei</i> Roubal				2	2	0.42
<i>A. pygmaea</i> (Kutschera)		5			5	1.04
<i>Longitarsus</i> Berthold						
<i>L. albineus</i> (Foudras)			24	27	51	10.63
<i>L. baeticus</i> Leonardi	9	7	8	16	40	8.33
<i>L. anchusae</i> (Paykull)			7		7	1.46
<i>L. aeruginosus</i> (Foudras)	13				13	2.71
<i>L. pellucidus</i> (Foudras)			4		4	0.83
<i>L. tabidus</i> (Fabricius)	3		8		11	2.29
<i>L. cerinthes</i> (Schrank)				2	2	0.42
<i>L. ochroleucus</i> (Marsham)				5	5	1.04
<i>L. nigrofasciatus</i> (Goeze)				3	3	0.63
<i>L. luridus</i> (Scopoli)	5	3		8	16	3.33
<i>L. angelikae</i> Fritzlär				4	4	0.83
<i>L. foudrasi</i> Weise		2			2	0.42
<i>L. fallax</i> Weise		2			2	0.42
<i>L. aeneicollis</i> (Faldermann)	5				5	1.04
<i>L. atricillus</i> (Linnaeus)	2				2	0.42
<i>L. succineus</i> (Foudras)	2				2	0.42
<i>L. ballotae</i> (Marsham)	8		6		14	2.92
<i>L. bertii</i> Leonardi	2				2	0.42
<i>L. lycopi</i> (Foudras)	7				7	1.46
<i>L. karlheinzi</i> Warchalowski		6			6	1.25
<i>Altica</i> Muller						
<i>A. oleracea</i> (Linnaeus)		3			3	0.63
<i>Podagrica</i> Chevrolat						
<i>P. fuscicornis</i> (Linnaeus)	7		5		12	2.50
<i>Dibolia</i> Latreille						
<i>D. occultans</i> (Koch)	2				2	0.42

Table 1. List of Alticini species collected from the four sites in Bafa Lake Natural Park (continued)

Species	MA1	MA2	OGA1	OGA2	Total number	Relative Abundance (%)
<i>D. carpathica</i> Weise	2				2	0.42
<i>D. depressiuscula</i> Letzner		4			4	0.83
<i>D. cynoglossi</i> (Koch)		2			2	0.42
<i>Psylliodes</i> Berthold						
<i>P. aerea</i> Foudras	3				3	0.63
<i>P. toelgi</i> Heikertinger	3		3		6	1.25
<i>P. cuprea</i> (Koch)	7	4	9		20	4.17
<i>P. isatidis</i> Heikertinger	24	19	20	4	67	13.96
<i>P. circumdata</i> (Redtenbacher)	4			9	13	2.71
<i>P. wrasei</i> Leonardi & Arnold	20		6		26	5.42
<i>P. napi</i> (Fabricius)	3				3	0.63
<i>P. gibbosa</i> Allard	2				2	0.42
<i>P. anatolicus</i> Gök & Cilbiroglu		1			1	0.21
<i>P. chrysocephalus</i> (Linnaeus)		5			5	1.04
<i>P. ozisiki</i> Leonardi & Arnold		8			8	1.67
<i>Crepidodera</i> Chevrolat						
<i>C. aurea</i> (Geoffroy)	6				6	1.25
<i>C. aurata</i> (Marsham)			2		2	0.42
<i>Hermaeophaga</i> Foudras						
<i>H. ruficollis</i> (Lucas)		3			3	0.63
<i>Chaetocnema</i> Stephens						
<i>C. tibialis</i> (Illiger)	15		9		24	5.00
<i>C. coyei</i> (Allard)	4				4	0.83
<i>C. obesa</i> (Boieldieu)		6			6	1.25
Number of individuals	169	93	119	99	480	
Number of species	26	19	15	13	55	

Species composition and abundance varied within the sites of natural park where MA1 contained 26 species, MA2 contained 19 species, OGA1 contained 15 species and OGA2 contained 13 species in total. *Longitarsus* Berthold, *Psylliodes* Latreille and *Phyllotreta* Chevrolat were the most common Alticini genera in the study area, respectively. *Longitarsus* was the most species-rich and abundant genus during the whole study period with a percentage of 41% among all others (Fig. 2). *Longitarsus albineus* (Foudras), *L. baeticus* Leonardi, *Psylliodes isatidis* Heikertinger, *P. cuprea* (Koch), *P. wrasei* Leonardi & Arnold and *Chaetocnema tibialis* (Illiger) were determined as the most abundant species, comprising about 48% of the total specimens collected during study.

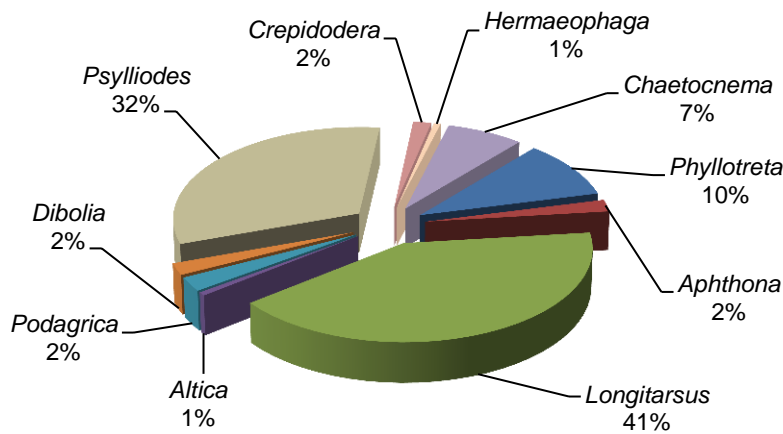


Figure 2. Percentages of collected genera based on species number.

Of the total number of specimens, 35% were collected in site MA1, 25% in OGA1, 21% in OGA2, and 19% in MA2. According to Shannon-Wiener, Simpson and Berger-Parker indices of diversity, MA1 was the most diverse area having the highest number of species and individuals (Table 2). The lowest diversity was recorded from OGA2 in parallel with species numbers. MA2 had the highest value of evenness which means that this site has individuals more equally distributed among species. Although MA2 has the lowest number of individuals, high evenness value accompanied with high species number ranked it above the sites OGA1 and OGA2.

Table 2. Results of the alpha-diversity indices of Alticipi communities in the four sites

Indices	MA1	MA2	OGA1	OGA2
S	26	19	15	13
N	169	93	119	99
Shannon-Wiener (H')	1.287	1.184	1.076	0.971
Simpson (1/D)	16.355	13.538	10.355	7.664
Berger-Parker (1/d)	7.042	4.895	4.958	3.667

Analyses of rarefaction and abundance plot k-dominance also showed similar results indicating MA1 as the most diverse. In the analysis of rarefaction, the most diverse site is located at the top of the graph (Fig. 3a). However, sites with higher diversities are ranged at undermost in the analysis of abundance plot k-dominance in which species are ranked with cumulative abundances (Fig. 3b).

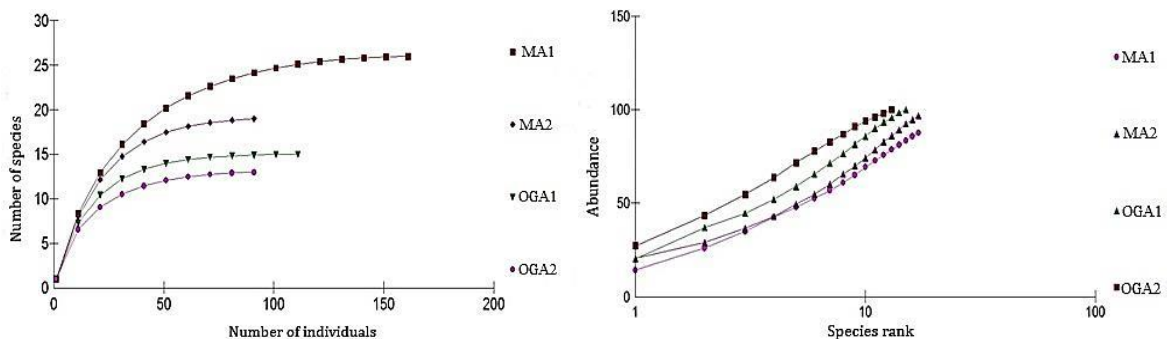


Figure 3. (a) Sample-based rarefaction curves for the flea beetles of the studied sites (b) Diagram of k-dominance of flea beetles in the studied sites.

Faunal similarity

Both Jaccard and Bray-Curtis similarity indices indicated that Alticini communities in OGA1 and MA1 were more closely related (Fig. 4).

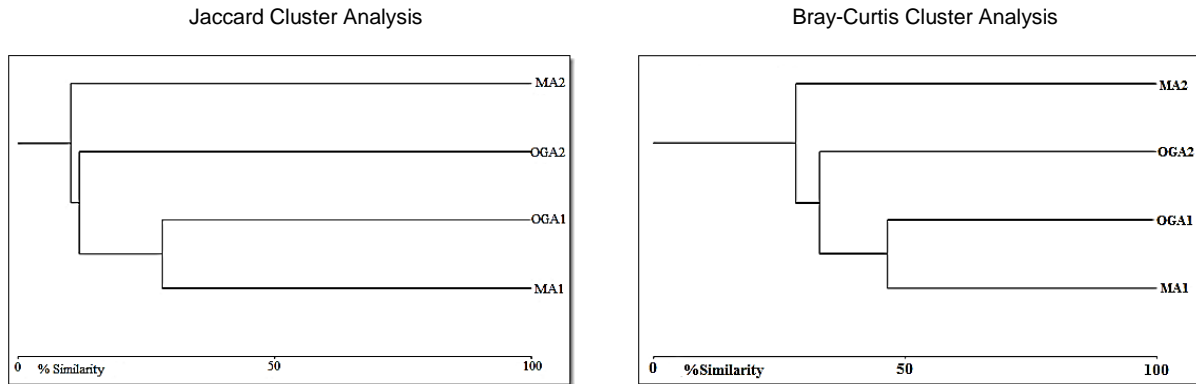


Figure 4. Similarity between Alticini communities inhabiting the four sites, based on species composition (Jaccard) and quantitative data (Bray-Curtis).

Cluster analysis based on species composition (Jaccard's index) revealed a similarity of 28% between the Alticini communities of the two sites. However, according to Bray-Curtis index which takes into account both species composition and number of individuals, the similarity rate was 46% (Table 3).

Table 3. The similarity indices (Jaccard and Bray-Curtis) of Alticini species compositions between the sites

	Jaccard				Bray-Curtis			
	MA1	MA2	OGA1	OGA2	MA1	MA2	OGA1	OGA2
MA1	*	9.76	28.13	11.43	*	25.19	46.53	16.42
MA2	*	*	9.68	10.34	*	*	28.30	14.58
OGA1	*	*	*	12	*	*	*	33.03
OGA2	*	*	*	*	*	*	*	*

Among the species collected from Bafa Lake Natural Park, some samples belonging to the genus *Longitarsus* were noticed by the authors of which evaluation revealed that these were specimens of *L. aeruginosus*, unknown from Turkey till now. The new record is briefly reviewed below.

***Longitarsus aeruginosus* (Foudras, 1860) (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae)**

Material examined: Aydın, Bafa Lake Natural Park, 30 m, 16.VIII.2013, 9♂♂, 4♀♀.

Known distribution: Albania, Andorra, Austria, Belgium, Belarus, France, Great Britain, Germany, Greece, Italy, Luxembourg, Malta, The Netherlands, Portugal, Spain, Cyprus (Löbl & Smetana, 2010).

Diagnostic notes: It is completely yellowish-brown; about 2.4-2.8 mm in length, upper side finely and shallowly punctuate. Aedeagus very similar to that of *Longitarsus succineus* (Foudras 1860) but clearly differs from it in lateral view; spermatheca quite typical, especially in the structure and morphology of the ductus (Fig. 5). Specimens are larger and darker than *L. succineus*, also there are various setae on apex of each elytron.

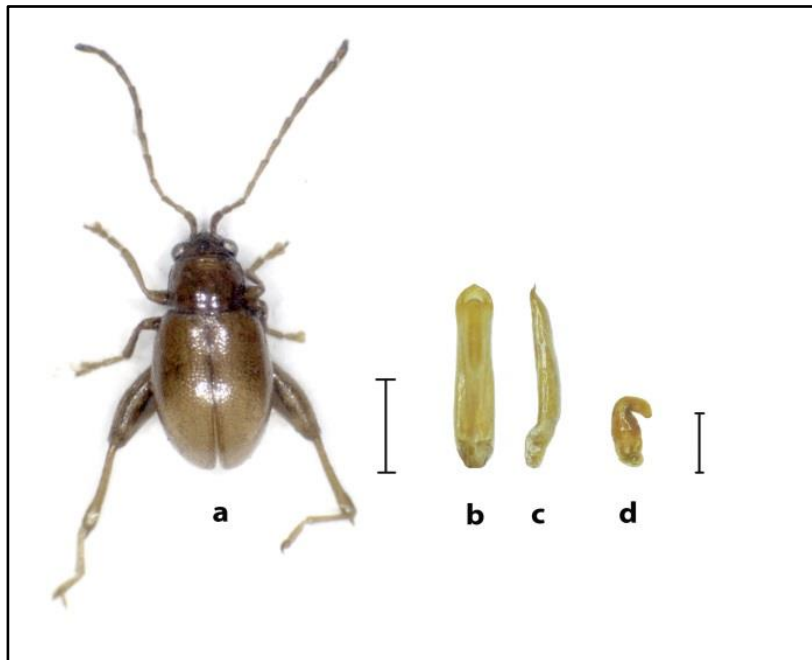


Figure 5. *Longitarsus aeruginosus* habitus and genitalia. (a) habitus (Scale bar: 1 mm) (b) aedeagus ventral view (c) aedeagus lateral view (d) spermatheca (Scale bar: 0.4 mm).

Host plant record: It was not possible to determine the exact host plant association of *L. aeruginosus* in the study area, because samples were collected from several plants by sweeping. However, previous host plant record for this species was given as *Eupatorium cannabinum* L. belonging to the family Asteraceae (Döberl, 1994; Warchalowski, 1996).

Discussion

Totally, 55 flea beetle species were recorded from Bafa Lake Natural Park one of which, *L. aeruginosus*, is new record for Alticini fauna of Turkey. The flea beetles reported from the study area in the present study represent about 16% of the whole Turkish Alticini.

The species composition of phytophagous beetles may vary considerably between sites because of the differences in some determinants for insect species diversity such as host plant abundance, distribution and species richness. Flea beetles are highly specialized phytophagous insects; therefore the Alticini diversity is closely associated with the herbaceous vegetation diversity and abundance (Aslan, 2010). In this study, Meadow area 1 (MA1) was identified as the most diverse site. The main reason of this is the high plant diversity in the area and less anthropogenic impacts compared to others. The composition of Alticini communities in the sites also changed based on the richness and availability of host plant species, or their alternatives existing at each site. The differences in the species composition of the two meadow communities can be explained by differences in the floristic composition and plant density at the sites which probably resulted from different humidity and soil conditions. Olive grove area 2 (OGA2) has the lowest species diversity. This is because; the area has mostly uniform herbaceous cover and is much disturbed by grazing and human activities such as mowing, fertilizing, and draining.

Cluster analyses using Bray-Curtis and Jaccard similarity indices showed that, among the four areas studied, the highest similarities of species compositions were found between MA1 and OGA1. These two areas present similar vegetation structure thus, are more similar in species composition. According to results from Jaccard cluster analysis, MA2 and OGA1 were clearly separated from other sites. However, Bray-Curtis cluster analysis with respect to species abundance revealed a low degree of

similarity between the communities MA2 and OGA2. This difference arise from the point that Bray-Curtis index takes into account both species composition and number of individuals while Jaccard index works only on shared species. OGA2 is located close to the Greater Menderes Basin and therefore is exposed to more olive cultivation and fishing activities. These factors are probably responsible for the low species richness and distant faunistic composition of the Olive grove area 2.

Longitarsus albineus, *L. baeticus*, *P. isatidis*, *P. cuprea*, *P. wrasei* and *C. tibialis* were the most frequent and abundant species collected from Bafa Lake Natural Park throughout the field studies lasted two years. *Longitarsus* was remarkably dominant within the whole genera in all collections. This may be due to the broader trophic spectrum and ecological tolerance of the genus members in addition to their ability of using various habitats.

Phyllotreta lativittata Kutschera, *Aphthona kuntzei* Roubal, *Longitarsus cerinthes* (Schrank), *L. nigrofasciatus* (Goeze), *L. foudrasi* Weise, *L. fallax* Weise, *L. atricillus* (Linnaeus), *L. succineus*, *L. bertii* Leonardi, *Dibolia occultans* (Koch), *D. carpathica* Weise, *D. cynoglossi* (Koch), *Psylliodes anatolicus* Gök & Cilbiroglu, *P. gibbosa* Allard and *Hermæophaga ruficollis* (Lucas) occurred more rarely in the study sites during field surveys represented by single or double specimens. These rare species are either accidental species, coming from the vegetation nearby the study sites, or generalist species, that are not specialized on feeding on distinct plant species.

In this study, Alticini species composition and diversity among four different sites of Bafa Lake Natural Park which is one of the important protected areas of Turkey were comparatively investigated. Species richness and number of individuals in grasslands including the two meadow areas were higher than olive grove areas. So, we can say that grasslands have higher species diversity in terms of chrysomelids agreed in many other studies (Řehounek, 2002; Waşowska, 2004; Aslan & Ayvaz, 2009; Aslan, 2010). One more aim of the present study was to search for any Alticini species specialized to feed on olive trees. But, during the field surveys conducted between 2012 and 2013 in the chosen olive grove areas, we didn't ever observe such an association. Consequently, of the factors that have impact on the diversity of Alticini communities, the influence of the vegetation richness and structure is the greatest. As the presented results show, the vegetation diversity and occurrence of actual host plants decides the flea beetle diversity or similarity of particular areas.

Acknowledgements

The study was supported by the Department of Scientific Research Project Management of Süleyman Demirel University (SDUBAP), with the project number 3313-YL2-12. We also thank Ayçin Yılmaz for her valuable assist with taking insect photos.

References

- Aslan, E. G. & Y. Ayvaz, 2009. Diversity of Alticinae (Coleoptera: Chrysomelidae) in Kasnak Oak Forest Nature Reserve, Isparta, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 33: 251-262.
- Aslan, E. G., 2010. Comparative diversity of Alticinae (Coleoptera: Chrysomelidae) between Çıgılıkara and Dibek Nature Reserves in Antalya, Turkey. *Biologia*, 65 (2): 316-324.
- Biondi, M & P. D'Alessandro, 2012. Afrotropical flea beetle genera: a key to their identification, updated catalogue and biogeographical analysis (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini). *ZooKeys*, 253: 1-158.
- Biondi, M., F. Urbani & P. D'Alessandro, 2013. Endemism patterns in the Italian leaf beetle fauna (Coleoptera: Chrysomelidae). *ZooKeys*, 332: 177-205.
- Booth, R. G., M. L. Cox & R. B. Madge, 1990. *Guides to Insect of Importance to Man 3. Coleoptera*. Cambridge University Press, United Kingdom, 384pp.
- Čížek, P & S. Doguet, 2008. Klíč k Určování Dřepčků (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae) Česka a Slovenska. Mestske Muzeum Nove Mesto Nad Metuji, Slovenska, 232pp.

- Döberl, M. 1994. "Unterfamilie: Alticinae. 17-144". In: Die Käfer Mitteleuropas (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae): (Eds. G. A. Lohse & W. Lucht) 3. Supplement band. Goecke & Evers. Krefeld, Germany. 403 pp.
- Ekiz, A. N., İ. Şen, E. G. Aslan & A. Gök, 2013. Checklist of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) of Turkey, excluding Bruchinae. *Journal of Natural History*, 47 (33-34): 2213-2287.
- MFWA (Ministry of Forestry and Water Affairs), General Directorate of Nature Conservation and National Parks, 2013. Türkiye'nin tabiat parkları listesi. (<http://www.milliparklar.gov.tr/belge/tp.pdf>), (Date accessed: 10.10.2014).
- Jolivet, P. & K. K. Verma, 2002. *Biology of Leaf Beetles*. Intercept Publisher, United Kingdom, 332pp.
- Kang, M. H., J. Park & J. E. Lee, 2013. First record of the genus *Hyphasis* Harold (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae) in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 16: 293-295.
- Konstantinov, A. S. & A. Tishechkin, 2004. The first nearctic leaf litter flea beetle (Coleoptera, Chrysomelidae) from the Great Smoky Mountains national park. *The Coleopterist Bulletin*, 58: 71-76.
- Konstantinov, A. S., A. Baselga, V. V. Grebennikov, J. Prena & S. W. Lingafelter, 2011. Revision of the Palearctic *Chaetocnema* Species (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini). Pensoft Publishers, Bulgaria, 363pp.
- Konstantinov, A., M. L. Chamorro, K. D. Prathapan, S. Ge & X. Yang, 2013. Moss-inhabiting flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini) with description of a new genus from Cangshan, China. *Journal of Natural History*, 47: 37-41.
- Löbl, I & A. Smetana, 2010. *Catalogue of Palaearctic Coleoptera: Chrysomeloidea*, Volume 6. Apollo Books, Stenstrup, 924 pp.
- Magurran, A. E., 2004. *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing, United Kingdom, 256 pp.
- McAleece, N., J. Lamshead, G. Paterson & J. D. Gage, 1997. *Biodiversity Professional Statistics Analysis Software*. Jointly developed by the Scottish Association for Marine Science and the Natural History Museum, London.
- Nadein, S. K., 2013. Febrina: a new subtribe of Alticini with cladistic analysis based on morphology (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae). *Systematic Entomology*, 38: 491-506.
- Özdikmen, H., N. Mercan, N. Cihan, G. Kaya, N. N. Topcu & M. Kavak, 2014. The importance of superfamily Chrysomeloidea for Turkish biodiversity (Coleoptera). *Munis Entomology & Zoology Journal*, 9: 17-45.
- Öztürk, B., J. M. Pautiers, H. M. Sarı & M. Özbek, 2002. On the occurrence of *Mytilaster marioni* (Locard, 1889) (Mollusca:Bivalvia:Mytilidae) in Bafa Lake (Turkey), with a redescription of the species. *Hydrobiologia*, 485: 123-131.
- Řehounek, J., 2002. Comparative study of the leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) in chosen localities in the district of Nymburk. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rerum Naturalium (2001- 2002) Biologica*, 39-40: 123-130.
- Warchalowski, A., 1996. Übersicht der westpaläarktischen Arten der Gattung *Longitarsus* Berthold, 1827 (Coleoptera: Chrysomelidae: Halticinae). *Genus, Supplement*, 266 pp.
- Warchalowski, A., 2010. *The Palearctic Chrysomelidae: Identification Keys, Vol: 2*. Natura Optima Dux Foundation, Warszawa, 685pp.
- Wąsowska, M., 2004. Impact of humidity and mowing on chrysomelid communities (Coleoptera, Chrysomelidae) in meadows of the Wierzbanówka Valley (Pogorze Wielickie hills, Southern Poland). *Biologia*, 59 (5): 601- 611.

Orijinal araştırma (Original article)

Contributions to leafminer (Diptera: Agromyzidae) fauna and new records of plant pests and weeds in Turkey¹

Türkiye galerisineği faunasına katkılar ve bitki zararlıları ve yabancı ot zararlılarına yeni kayıtlar

Oktay DURSUN²

Hasan Sungur CIVELEK^{2*}

Miroslav BARTÁK³

Štěpán KUBÍK³

Eyyüp Mennan YILDIRIM⁴

Miloš ČERNÝ⁵

Summary

This study was conducted between 2011- 2013 in Muğla province in Turkey to determine the biodiversity of family Agromyzidae. Specimens were collected from cultured and non-cultured plants by sweeping net, Malaise trap and rearing methods in different localities. Altogether 19 new records of Agromyzidae species for Turkey belonging to 7 genera were found. Number of Agromyzidae species increased from 189 species to 208 species as result of this study. Altogether 13 important actual or potential pests were identified among these newly found species and four of them have potential for the weed control.

Keywords: Agromyzidae, leafminer, new records, distribution, Turkey

Özet

Bu çalışma 2011- 2013 yılları arasında Muğla ilinde Agromyzidae familyası tür çeşitliliğini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Galerisineği örnekleri tarım ve tarım dışı alanlardan atrap, malaise tuzağı ve kültüre alma yöntemi kullanılarak farklı lokasyonlardan toplanmışlardır. Çalışmanın sonucunda 7 cinse ait toplam 19 tür Türkiye faunası için yeni kayıt olarak bulunmuştur. Bu çalışma ile birlikte daha önce 189 olarak bilinen galerisineği tür sayısı 208'e yükselmiştir. Bulunan türlerden bazıları önemli kültür bitkisi zararlılarından ve bazıları da yabancı otların biyolojik kontrolünde kullanıma potansiyeline sahip olan türler olarak bilinmektedir. Bu türlerden 13 tanesi tarımsal üretimde zararlı iken 4 tanesi de yabancı ot kontrolünde potansiyeli olan türlerdir.

Anahtar sözcükler: Agromyzidae, galerisineği, yeni kayıt, yayılış, Türkiye

¹ This study is a part of results of Ph.D Thesis of Oktay DURSUN and it was supported by Department of "Scientific Research Projects (BAP)" of Mugla Sıtkı Koçman University (Project number: 2012/132)

² Mugla Sıtkı Koçman University, Faculty of Science, Biology Department, Mugla, Turkey

³ Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, CZ-16521 Praha 6-Suchdol, Czech Republic

⁴ Adnan Menderes University, Sultanhisar Vocational Collage, Aydın, Turkey

⁵ CZ-76363 Halenkovice 1, Czech Republic

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: chasan@mu.edu.tr

Alınış (Received): 16.01.2015 Kabul ediliş (Accepted): 21.05.2015 Çevrimiçi Yayın Tarihi (Published Online): 20.06.2015

Introduction

The Agromyzidae is one of the most species-rich families of Diptera with over 3000 species worldwide. About 1210 species occur in the Palearctic region and more than 900 species of the family occur in Europe (Spencer, 1989; Gu et al., 1991; Pakalniškis, 1992, 1994, 1996, 2000; Woodley & Janzen, 1995; Sasakawa, 1997, Scheirs et al., 1999; Černý, 2001, 2005a, b, 2007a, b; Černý & Merz, 2005, 2006, 2007; Çıkman & Sasakawa, 2008; Civelek, 1998, 2002, 2003, 2004; Civelek & Ulusoy, 2000; Civelek et al., 2000a, 2000b, 2007, 2008, 2009; Koçak & Sasakawa, 2010; Dursun et al., 2010; Çıkman & Sasakawa, 2011; Černý, 2012, 2013; Çıkman, 2012). Until now, only 189 species have been recorded in Turkey (Civelek, 1998, 2002, 2003, 2004; Civelek & Ulusoy, 2000; Civelek et al., 2000a, 2000b, 2007, 2008, 2009; Koçak & Sasakawa, 2010; Dursun et al., 2010; Çıkman & Sasakawa, 2011; Černý, 2012, 2013; Çıkman, 2012).

Larvae of most representatives of Agromyzidae are phytophagous. They feed and live on living plant tissues. Most of them feed on the leaf parenchyma. Most species produce a characteristic form of mine in the leaves; in some cases a mine type can help to identify the species. Some species are stem-borers or develop in roots, seeds or cause galls. *Phytobia* spp. develops in the cambium of some trees. About 150 agromyzid species are known as feeding on cultivated plants. Normally, pest species population do not reach to high levels, but sometimes outbreaks can occur. Some species belonging to *Liriomyza* genus can be serious pests in agricultural areas. Also adults are capable of transmitting some diseases from infected plants to healthy ones (Civelek & Önder, 1997). Also female egg laying may act as vector of diseases (Spencer, 1973; Zitter & Tsai, 1977; Matteoni & Broadbent, 1988; Černý et al., 2001).

The aim of this study was to contribute to the knowledge of the leafminer fauna of Turkey.

Material and Methods

This study was carried out between 2011- 2013 in Muğla province in Turkey. The leaf-mining fly specimens were collected from different localities including cultivated plants and wild plants by Oktay Dursun, Hasan Sungur Civelek, Eyyüp Mennan Yıldırım, Miroslav Barták and Štěpán Kubik. Coordinates and altitude data were noted with Global Positioning System.

The collecting methods were as follows: sweeping (SW), rearing from plants (RP) and Malaise trap (MT).

Slide preparations of male genitalia were made for species identification. The following general procedures were applied: the abdomen of each male was boiled in 10% KOH for 10 minutes, then transferred into 5% glacial acetic acid for 5 minutes and then transferred into 96% alcohol for 5 minutes. Later abdomen was dissected under a stereoscopic microscope. The male genitalia were transferred into euparal in order to preserve the material perpetually. Identifications were made by using Spencer (1972, 1973, 1976, 1989, 1990), Černý (2001, 2005a, b, 2007a, b) by Dr. Hasan Sungur CIVELEK, Ing. Miloš ČERNÝ and Oktay DURSUN. Specimens were stored in the Entomology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Mugla Sıtkı Koçman University, Turkey, Miloš Černý private collection, Halenkovice, Czech Republic, and collection of Czech University of Life Sciences, Prague.

Results

A total of 19 new species were recorded from Turkey. These species are listed below with their distribution and host data.

Subfamily: Agromyzinae

Genus: *Agromyza* Fallén, 1810

Agromyza mobilis Meigen, 1830

Material examined: 1♂, Muğla, Ula, Akyaka (37° 03' 16" N / 28° 19' 57" E), 6 m., 16-27.05.2011 (SW).

Hosts: *Bromus ramosus* Hudson, *Phleum pratense* Linneaus, *Triticum aestivum* Linneaus, (Poaceae) (Robbins, 1991, Spencer, 1972b).

Distribution: Andorra, Belgium, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, The Netherlands, Hungary, Italy, Japan, Latvia, Lithuania, Norway, Poland, Portugal, Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland, Ukraine, former Yugoslavia (Sasakawa 1961; Spencer, 1976; Scheirs et al, 1999; Černý & Merz, 2006; Černý, 2007b; Guglya, 2012; Martinez, 2012; Černý 2013).

Agromyza woerzi Groschke, 1957

Material examined: 1♂, Muğla, Ula, Akyaka (37° 03' 16" N / 28° 19' 35" E), 30 m., 30.04.2013 (SW); 1♂, Muğla, Kötekli, Mugla Sıtkı Koçman University Campus Area, (37° 09' 42" N / 28° 22' 21" E), 700 m., 10.05.2013 (MT)

Hosts: *Knautia* sp. (Caprifoliaceae) (Spencer, 1990).

Distribution: Belarus, Czech Republic, Germany, Latvia, Lithuania, Norway, Poland, Slovakia (Černý & Merz, 2006; Martinez, 2012).

Genus: *Ophiomyia* Braschnikov, 1897

Ophiomyia rostrata (Hendel, 1920)

Material examined: 2♂♂, Muğla, Ula, Akyaka (37° 03' 16" N / 28° 19' 35" E), 30 m., 30.04-09.05.2013 (SW).

Hosts: *Convolvulus arvensis* Linneaus (Convolvulaceae) (Ostrauskas et al., 2003).

Distribution: Austria, Bulgaria, Czech Republic, France, Great Britain, The Netherlands, Ireland, Lithuania, Poland, Spain, Sweden, Uzbekistan (Spencer, 1976; Černý & Merz, 2006; Martinez, 2012; Pitkin, 2014).

Ophiomyia slovacica Černý, 1994

Material examined: 1♂, Mugla, Fethiye, Kayaköy (36° 34' 77" N / 29° 04' 98" E), 140 m., 8.04.2007 (SW).

Hosts: *Vicia angustifolia* Reichard, *V. cracca* Linneaus, *V. villosa* Roth (Fabaceae) (Pakalniškis, 1996).

Distribution: Cyprus, Czech Republic, Lithuania, Slovakia, Ukraine (Černý, 1994; Černý & Vála, 2006; Pakalniškis, 1994; Martinez, 2012; Guglya, 2011, 2012).

Genus: *Hexomyza* Enderlein, 1936

Hexomyza simplicoides (Hendel, 1920)

Material examined: 1♂, Muğla, Ula, Akyaka (37° 03' 19" N / 28° 20' 07" E), 6 m., 07.05.2013 (SW).

Hosts: *Salix caprea* Linneaus (Salicaceae) (Spencer, 1976)

Distribution: Austria, China, Finland, France, Germany, Great Britain, The Netherlands, Hungary, Italy, Ireland, Japan, Kyrgyzstan, Lithuania, Poland, Slovakia, Spain, Switzerland, U.S.A. (Spencer, 1976; Černý, 2012; Martinez, 2012; Pitkin, 2014).

Subfamily: Phytomyzinae

Genus: *Amauromyza* Hendel, 1931

Subgenus: *Cephalomyza* Hendel, 1931

Amauromyza (Cephalomyza) labiatarum (Hendel 1920)

Material examined: 1♂, Muğla, Ula, Kapız (37° 05' 18" N / 28° 24' 48" E), 592 m., 23.04.2013 (RP from *Stachys* sp.)

Hosts: *Lamium* sp., *Melissa officinalis* Linneaus, *Mentha* sp. *Stachys* sp. (Lamiaceae) (Spencer, 1990; Ellis, 2014).

Distribution: Albania, Austria, Belgium, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Great Britain, Greece, The Netherlands, Hungary, Italy, Ireland, Lithuania, Luxembourg, Norway, Poland, Romania, Sweden, Slovakia, Switzerland (Spencer, 1976; de Bruyn & von Tschirnhaus, 1991; Černý & Merz, 2005; Černý, 2011; Martinez, 2012).

Amauromyza (Cephalomyza) monfalconensis (Strobl 1909)

Material examined: 1♂, Muğla, Sarnıç Village, Akbük (37° 01' 41" N / 28° 05' 49" E), 30 m., 11.05.2013 (SW).

Hosts: *Rumex* sp. (Polygonaceae) (Spencer, 1990).

Distribution: Austria, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Great Britain, Greece, The Netherlands, Hungary, Ireland, Italy, Lithuania, Norway, Portugal, Romania, Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland, Uzbekistan, former Yugoslavia (Spencer, 1976; Černý & Merz, 2006; Andersen 2012; Martinez, 2012; Černý, 2009, 2013; Kahanpää, 2014; Pitkin, 2014).

Genus: *Cerodontha* Rondani, 1861

Subgenus: *Cerodontha* Rondani, 1861

Cerodontha (Cerodontha) phragmitophila (Hering, 1935)

Material examined: 1 ♂, Muğla, Ula, Akyaka (37° 03' 08" N / 28° 20' 17"E), 4 m., 16.-22.09.2012 (SW).

Hosts: *Phragmites* sp. (Poaceae) (Spencer, 1990).

Distribution: Belgium, Bulgaria, Canary Isles, Cyprus, Czech Republic, Egypt, France, Hungary, Israel, Italy, Kazakhstan, Pakistan, Poland Spain, Uzbekistan, former Yugoslavia (Serbia, Kosovo, Voivodina, Montenegro) (Černý & Merz, 2006; Černý & Vála, 2006; Černý, 2011a, b; Martinez, 2012).

Subgenus: *Dizygomyza* Hendel, 1920

Cerodontha (Dizygomyza) brisiaca Nowakowski, 1973

Material examined: 1 ♂, Muğla, Ula (37° 12' 45" N / 28° 27' 42" E), 710 m., 01.05.2013 (SW).

Hosts: Unknown

Distribution: Austria, Czech Republic, Germany, Lithuania, Morocco, Poland (Černý & Merz, 2006; Martinez, 2012).

Cerodontha (Dizygomyza) fasciata (Strobl, 1880)

Material examined: 2 ♂♂, Muğla, Köyceğiz, Toparlar (36° 58' 39" N / 28° 39' 30" E), 60 m., 05.05.2013 (SW).

Hosts: *Poa chaixii* Villars (Poaceae) (Spencer, 1990).

Distribution: Andorra, Austria, Belgium, Bulgaria, Canada, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Great Britain, Greece, Hungary, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, North Korea, Norway, Poland, Slovakia, Spain, Sweden, United States, former Yugoslavia (Serbia, Kosovo, Voivodina, Montenegro), Switzerland (Spencer, 1976; Spencer, 1990; de Bruyn & von Tschirnhaus, 1991; Černý, 2005c; Černý & Merz, 2006; Černý, 2007a, b; Martinez, 2012; Pitkin, 2014).

Cerodontha (Dizygomyza) iraeos (Robineau-Desvoidy, 1851)

Material examined: 2 ♂♂, Muğla, Köyceğiz, Toparlar (36° 58' 39" N / 28° 39' 30" E), 60 m., 05.05.2013 (SW).

Hosts: *Iris pseudacorus* Linnaeus (Iridaceae) (Spencer, 1990).

Distribution: Albania, Austria, Belarus, Belgium, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France (including Corsica), Germany, Great Britain, The Netherlands, Hungary, Ireland, Latvia, Lithuania, Moldavia, Norway, Poland, Romania, Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland (Černý & Merz, 2006; Martinez, 2012; Pitkin, 2014).

Cerodontha (Dizygomyza) suturalis (Hendel, 1931)

Material examined: 1 ♂, Muğla, Köyceğiz, Toparlar (36° 58' 39" N / 28° 39' 30" E), 60 m., 05.05.2013; 1 ♂, Muğla, Ula, Akyaka, (37° 03' 19" N / 28° 20' 07" E), 6 m., 28.04.2013 (SW).

Hosts: *Bolboschoenus maritimus* (Linnaeus) Palla, *Carex hirta* Linnaeus (Cyperaceae) (Spencer, 1990).

Distribution: Albania, Austria, Belgium, Bulgaria, China, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Germany, Great Britain, Greece, France, Hungary, Ireland, Israel, Latvia, Lithuania, Poland, Slovakia, Sweden, Switzerland (Spencer, 1976; Spencer, 1990; de Bruyn & von Tschirnhaus, 1991; Černý & Merz, 2006; Černý & Vála, 2006; Černý, 2009, 2011a, b; Martinez, 2012; Pitkin, 2014).

Subgenus: *Icteromyza* Hendel, 1931

Cerodontha (Icteromyza) geniculata (Fallen, 1820)

Material examined: 1 ♂, Muğla, Köyceğiz, Ağla village, Gökçeova lake, (37° 03' 42" N / 28° 48' 28" E), 1750 m., 20.09.2012 (SW).

Hosts: *Eriophorum latifolium* Hoppe (Cyperaceae) (Spencer, 1990).

Distribution: Afghanistan, Austria, Bulgaria, China, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Great Britain, Hungary, The Netherlands, Hungary, India, Iran, Ireland, Israel, Italy, Japan, Lithuania, Mongolia, Poland, Romania, Russia: Siberia, Slovakia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, U.S.S.R. (Former), Tunisia, Ukraine, former Yugoslavia (Spencer, 1976; Ellis, 2014; Černý, 2010, 2011a, b; Martinez, 2012; Pitkin, 2014).

Cerodontha (Icteromyza) rozkosnyi Černý, 2007

Material examined: 2♂♂, Muğla, Ula, Akyaka (37° 03' 19" N / 28° 20' 07" E), 6 m., 05.05.2013 (SW).

Hosts: Unknown

Distribution: Czech Republic, Greece, Israel, Morocco, Romania (Černý, 2011a, b).

Subgenus: *Poemyza* Hendel, 1931

Cerodontha (Poemyza) muscina (Meigen, 1830)

Material examined: 3 ♂♂, Muğla, Ula, Akyaka (37° 03' 09" N / 28° 20' 17" E), 4 m., 23.-27.09.2012 (SW).

Hosts: *Dactylis* sp., *Festuca* sp., *Poa* sp. (Poaceae) (Spencer, 1990; Ellis, 2014)

Distribution: Andorra, Austria, Belarus, Belgium, Canada, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Great Britain, Greece, The Netherlands, Hungary, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Poland, Romania, Russia: Yakutia, Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland, U.S.A., former Yugoslavia (Spencer, 1976; de Bruyn & von Tschirnhaus, 1991; Černý & Merz, 2006; Černý, 2007b, 2011a; Ellis, 2014; Martinez, 2012; Pitkin, 2014).

Cerodontha (Poemyza) phragmitidis Nowakowski, 1967

Material examined: 2♂♂ 1♀, Muğla, Ula, Yenice- Marmaris intersection (37° 05' 59" N / 28°24' 16" E), 607 m., 15.06.2012 (SW).

Hosts: *Phragmites australis* (Cavalier) (Poaceae) (Spencer, 1990).

Distribution: Belgium, Czech Republic, Denmark, Estonia, France, Germany, Great Britain, Hungary, Ireland, Japan, Latvia, Lithuania, The Netherlands, Poland, Russia, Sweden (Scheirs & de Bruyn, 1992; Spencer, 1976; Martinez, 2012; Pitkin, 2014).

Genus: *Napomyza* Westwood, 1840

Napomyza scrophulariae Spencer, 1966

Material examined: 1♂, Muğla, Ula, Akyaka (37° 03' 19" N / 28° 20' 07" E), 6 m., 28/04-10/05/2013, 1♂, Muğla, Köyceğiz, Toparlar, (36° 58' 39" N / 28° 39' 30" E), 60 m., 05-07/05/2013 (SW); 2♂♂, Muğla, Kötekli, Muğla Sıtkı Koçman University Campus Area (37° 09' 42" N / 28° 22' 21" E), 700 m., 10.05.2013 (MT).

Hosts: *Digitalis purpurea* Linneaus (Plantaginaceae), *Mentha* sp. (Lamiaceae) (Spencer, 1972; Spencer, 1976)

Distribution: Andorra, Czech Republic, Denmark, France, Germany, Great Britain, Ireland, Israel, Lithuania, Morocco, Norway, Portugal, Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland (Spencer, 1976; Černý 2007b, 2013; Černý & Merz, 2006, 2007; Martinez, 2012; Pitkin, 2014).

Genus: *Phytomyza* Fallén, 1810*Phytomyza evanescens* Hendel, 1920

Material examined: 1 ♂, Muğla, Kötekli, Muğla Sıtkı Koçman University Campus Area (37° 09' 42" N / 28° 22' 21" E), 700 m., 10.05.2013 (MT).

Hosts: *Ranunculus lanuginosus* Linneaus (Ranunculaceae) (Spencer, 1972)

Distribution: Andorra, Austria, Belarus, Belgium, Canada, Czech Republic, Denmark (including Faroe Is.), Estonia, Finland, France, Germany, Hungary, Iceland, Italy, Lithuania, The Netherlands, Norway, Poland, Russia (including Yakutia), Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland, United States, Yugoslavia (Spencer, 1976; Černý, 2005c, 2007b; Martinez, 2012).

Phytomyza kyffhusana Hering, 1928

Material examined: 1 ♂, Muğla, Ula, Akyaka (37° 03' 08" N / 28° 20' 17"E), 4 m., 16.-22.09.2012 (SW).

Hosts: *Helichrysum* sp. (Asteraceae) (Pitkin, 2014).

Distribution: Austria, Czech Republic, Germany, Lithuania, Poland, Switzerland (Černý & Merz, 2005; Martinez, 2012).

Conclusion

All of the above mentioned 19 species were recorded for the first time in Turkish in the family, Agromyzidae fauna. In this way, the number of Agromyzidae species is now increased to 208 species from 189 species.

It has been estimated that although there are approximately 30.000 insect species contemporary known from Turkey, the actual number of species may be between 60.000 and 80.000 (Anonymous, 2009). This study registers 19 additional species that belong to Agromyzidae family. 13 are known to be pests that are capable to damage plants especially from Poaceae, Apiaceae, Fabaceae, Salicaceae, Lamiaceae, Polygonaceae, Iridaceae, Cyperaceae, Ranunculaceae and Asteraceae families (Spencer, 1990). Among the species registered in this study, it is known that *A. mobilis*, *C. (D.) fasciata* and *C. (P.) muscina* damage economically Poaceae species (Spencer, 1990; Ellis, 2014). Also *A. (C.) labiatarum* and *N. scrophulariae* may give rise to important losses in *Melissa officinalis* and *Mentha* sp. (Spencer, 1990). *Ophiomyia slovacica* is pest for the vetch (*Vicia* sp.) used as fodder (Pakalniškis, 1996; Guglya, 2013). In addition to that, it is known that *A. (C.) monfalconensis*, *C. (D) suturalis*, *C. (I.) geniculata*, *Phytomyza evanescens* and *Hexomyza simplicoides* species bring about economical losses to *Rumex* sp. (Polygonaceae), *Carex hirta*, *Eriohorum latifolium* (Cyperaceae), *Ranunculus lanuginosus* (Ranunculaceae) and *Salix caprea* (Salicaceae) plants, respectively (Spencer, 1990).

Biological control of weeds is successful in many situations. Using herbicides may affect negatively environment and human health (Kolpin et al., 1998). *Agromyza spenceri*, *C. (C.) phragmitophila* and *C. (P.) phragmitidis* feed on *Phragmites* spp. (common reed). Tewksbury et al. (2002) noticed their potential for control of *Phragmites* populations. Also *Ophiomyia rostrata* is the pest of *Convolvulus arvensis* (field bindweed) (Ostrauskas et al., 2003). We consider important that four of the newly found species maybe used as weed control agents.

Acknowledgements

The authors wish to thank Scientific Research Projects (BAP) of Muğla Sıtkı Koçman University for support of this study (Project number: 2012/132). The study was partly supported by S grant of MSMT (Ministry of Education, Sports and Youth – MB and SK).

References

- Andersen, A. 2012. On the Agromyzidae (Diptera) in Norway, Part 1. Norwegian Journal of Entomology, 59: 5-30.
- Anonymous, 2009. Republic of Turkey, Ministry of Environment and Forestry, UN Convention of Biological Diversity Fourth National Report (Web page: <https://www.cbd.int/doc/world/tr/tr-nr-04-en.pdf>) (Date accessed: November, 2014).
- Bruyn, L. De & M. Von. Tschirnhaus, 1991. "Agromyzidae, 70: 151-154". In: Catalogue of the Diptera of Belgium (Eds.: Grootaert P., L. de Bruyn & M. de Meyer). Studiedocumenten van het Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen, Brussel, 338 pp.
- Černý, M. & B. Merz, 2005. New records of Agromyzidae (Diptera) from Switzerland. Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, 78: 337-348
- Černý, M. & B. Merz, 2006. New records of Agromyzidae (Diptera) from the Palaearctic Region. Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, 79: 77-106.
- Černý, M. & M. Vála, 2006. "New records of Agromyzidae (Diptera) from Cyprus, 33-42". In: Dipterologica bohemoslovaca 13 (Ed.: J. Kinkorová). Acta Universitatis Carolinae Biologica, 50: 1-158.
- Černý, M. & B. Merz, 2007. New records of Agromyzidae (Diptera) from the West Palaearctic Region, with an updated checklist for Switzerland. Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, 80: 107-121.
- Černý, M., 2001. *Phytobia bohemica* sp. n. from the Czech Republic (Diptera: Agromyzidae). Folia Heyrovskyana, 9: 57-63.
- Černý, M., 2005a. *Amauromyza (Amauromyza) maltensis* sp. nov. (Diptera: Agromyzidae) with account of agromyzid mining flies from the Republic of Malta. Folia Heyrovskyana, 12: 85-104.
- Černý, M., 2005b. A new species of *Pseudonapomyza* from Egypt, with notes on distribution of some other Palearctic species of the genus (Diptera: Agromyzidae). Folia Facultates Scientiarum Naturalium Universitatis Masarykianae Brunensis Biology, 109: 95-100.
- Černý, M., 2005c. Additional notes on the fauna of Agromyzidae (Diptera) in Switzerland. Revue Suisse de Zoologie, 112 (4): 771-805.
- Černý, M., 2007a. Description of eight new species of Agromyzidae (Diptera) from North Korea, including new records. Studia Dipterologica, 14 (1): 209-229.
- Černý, M., 2007b. New faunistic records of Agromyzidae Fallén (Diptera) from Andorra including descriptions of three new species. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa, 41: 43-51.
- Černý, M., 2009. New faunistic data on the Agromyzidae (Diptera) from the West Palaearctic Region. Klapalekiana, 45: 9-21.
- Černý, M., 2011a. Agromyzidae (Diptera) in the vicinity of the Kerkini Lake with descriptions of eight new species from Greece. Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae, 51 (1): 299-347.
- Černý, M., 2011b. A review of the species of *Cerodontha* Rondani (Diptera: Agromyzidae) of Israel, with a new species of the subgenus *Poemyza* Hendel, 1931. Israel Journal of Entomology, 40: 117-143.
- Černý, M., 2012. The fauna of Agromyzidae (Diptera) in the Gemer region (Central Slovakia), with descriptions of three new species from Slovakia. Časopis Slezského Zemského Muzea Opava (A), 61: 49-76.
- Černý, M., 2013. Additional records of Agromyzidae (Diptera) from the West Palaearctic Region. Časopis Slezského Zemského Muzea Opava (A), 62: 281-288.

- Černý, M., M. Vála, & M. Barták, 2001. "Agromyzidae, 105: 349-364". In: Diptera in an Industrially Affected Region (North-Western Bohemia, Bílina and Duchcov Environs), II. (Eds.: Barták M. & J. Vaňhara). Folia Facultatis Scientiarum Naturalium Universitatis Masarykianae Brunensis: Biologia, 514 pp.
- Çıkman, E. & M. Sasakawa, 2008. The Turkish Agromyzidae (Diptera), with descriptions of four new species. Entomological Science, 11: 81-86.
- Çıkman, E. & M. Sasakawa, 2011. Contributions to the Agromyzidae (Diptera) fauna of Turkey. Turkish Journal of Zoology, 35: 71-78.
- Çıkman, E., 2012. Revised checklist of Turkish Agromyzidae (Diptera) with a new record. Turkish Bulletin of Entomology, 2 (3): 165-182.
- Civelek, H. S. & M. R. Ulusoy, 2000. A new record for the Turkish leafminer fauna: *Ophiomyia phaseoli* (Tryon, 1895). Turkish Journal of Entomology, 24: 163-166.
- Civelek, H. S., 1998. Systematic Studies on the Species of The Family Agromyzidae (Diptera) In Izmir Province. Ege University, Science Institute, PhD Thesis, Plant Protection Department, Bornova, Izmir, 187 pp.
- Civelek, H. S., 2002. New records for the Turkish leafminer fauna from Western Turkey. Insecta Mundi, 16: 49-55.
- Civelek, H. S., 2003. Checklist of Agromyzidae (Diptera) of Turkey, with a new record. Phytoparasitica, 31: 132-138.
- Civelek, H. S., 2004. Two new records for the Turkish Agromyzidae (Diptera) fauna. Turkish Journal of Entomology, 28: 15-19.
- Civelek, H. S., A. Tonguç, O. Özgül & O. Dursun, 2007. Contributions to the Turkish Agromyzidae (Diptera) fauna from Anatolian part of Turkey, with sixteen new records. Mitteilugendes Internationalen Entomologischen, 30: 21-28.
- Civelek, H. S., E. Çıkman & O. Dursun, 2009. Revised checklist of Turkish Agromyzidae (Diptera) fauna of Turkey with 29 new records. Turkish Journal of Zoology, 33: 349-358.
- Civelek, H. S., J. C. Deeming & F. Önder, 2000a. Some new records for Turkish leafminer (Diptera: Agromyzidae) fauna from Izmir province. Turkish Journal of Entomology, 24: 17-26.
- Civelek, H. S., F. Önder & J. C. Deeming, 2000b. Two new records for the Turkish *Amauromyza* Hendel (Diptera: Agromyzidae) fauna from Aegean Region (Turkey). Turkish Journal of Entomology, 24: 83-86.
- Civelek, H. S., O. Dursun, A. Eskin & G. Taç, 2008. A study on Agromyzidae (Diptera) fauna of Turkey and species list. Anadolu University, Journal of Science and Technology 9: 1-16.
- Dursun, O., A. Eskin & T. Atahan, 2010. Contributions to the Turkish Agromyzidae (Diptera) fauna with ten new records, Turkish Journal of Entomology, 34 (3): 299-306.
- Ellis, W.N., 2014. Leafminers and plant galls of Europe Bladmineerders en plantengallen van Europa. (Webpage: <http://www.bladmineerders.nl/minersf/dipteramin/amauromyza/labiatarum/labiatarum.htm>) (Date accessed: November, 2014).
- Gu, X., Z. Fan & M. Sasakawa, 1991. Descriptions of seven new species of Agromyzidae (Diptera) from China. Japanese Journal of Entomology, 59 (2): 331- 342.
- Guglya Y. A., 2011. A study of the fauna of leaf-miner flies of subfamily Agromyzinae (Diptera: Agromyzidae) of Ukraine. Report 1. 28 new species for the fauna of Ukraine. The Kharkov Entomological Society Gazette, 19 (2): 61-68.
- Guglya Y. A., 2012. A study of the fauna of leaf-miner flies of subfamily Agromyzinae (Diptera: Agromyzidae) of Ukraine. Report 2. 14 new species for the fauna of Ukraine. The first record of *Melanagromyza provecta* (de Meijere, 1910) for Europe. The Kharkov Entomological Society Gazette, 20 (2): 56-62.
- Guglya Y. A., 2013 . Mining Flies of the Genus *Ophiomyia* (Diptera, Agromyzidae) of Eastern Ukraine and Adjacent Territories: Review of Species with a Fasciculus, Vestnik zoologii, 47 (6): 9-31.
- Kahanpää, J. 2014: "Checklist of the leafminers (Diptera, Agromyzidae) of Finland 291-303". In: Checklist of the Diptera of Finland (Eds.: Kahanpää J & J. Salmela). ZooKeys 441, 408 pp.

- Koçak, E., M. Sasakawa., 2010. Two Species of *Melanagromyza* (Diptera: Agromyzidae), with Descriptions of Immature Stages from *Heracleum* (Apiaceae) and New Records from Turkey. *Entomological News*, 121 (3): 262-266.
- Kolpin, D. W., E. M. Thurman & S. M. Linhart, 1998. The environmental occurrence of herbicides: the importance of degradates in ground water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35: 385-390.
- Martinez M., 2012. Fauna Europaea: Agromyzidae. In Pape T. (ed.): Fauna Europaea: Diptera, Flies. Fauna Europaea, version 2.4, Available from, <http://www.faunaeur.org> (as of 18 February 2012).
- Matteoni, J. A. & A. B. Broadbent, 1988. Wounds caused by *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) as sites for infection of Chrysanthemum by *Pseudomonas cichorii*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 10: 47- 52.
- Ostrauskas, H., S. Pakalniškis & L. Taluntytė, 2003. The species composition of plant mining dipterous (Insecta: Diptera) of greenhouse surroundings in Lithuania. *Ekologija (Vilnius)*, 3: 3-11.
- Pakalniškis, S., 1992. Notes on Lithuanian Agromyzidae (Diptera) with the description of three species new to science. In *New and Rare for Lithuania Insect Species. Records and descriptions of 1992*. Vilnius, 47-55.
- Pakalniškis, S., 1994. The Lithuanian Agromyzidae (Diptera). Descriptions of 6 new species and other notes. *Acta Entomologica Lituanica*, 12: 5–34.
- Pakalniškis, S., 1996a. The Lithuanian Agromyzidae (Diptera). Descriptions of 4 new species and other notes. In *Lietuvos entomologø darbai*, Vilnius, 17- 34.
- Pakalniškis, S., 1996b. On the bionomics and knowledge of Agromyzidae (Diptera) feeding on plant stems. *Ekologija*, 3:36-42.
- Pakalniškis, S., 2000. New data on the bionomics and distribution of Agromyzidae (Diptera) with the description of a new species. *Acta Zoologica Lituanica*, 10: 59-62.
- Pitkin, B., 2014. The leaf and stem mines of British flies and other insects.(Web page: <http://www.ukflymines.co.uk/>) (Date accessed: November, 2014).
- Robbins, J., 1991. The leaf miners of Warwickshire with notes on other species occurring in the Midlands. Warwickshire Museum, Market Place, Warwick, CV34 4SA, 182 pp.
- Sasakawa, M., 1961. A Study of the Japanese Agromyzidae (Diptera). *Pacific Insects*, 3 (2-3): 307-472.
- Sasakawa, M., 1997. Lauxaniidae and Agromyzidae (Diptera) of the Ryukyus. *Esakia*, 37: 141-148.
- Scheirs, J, L. de Bruyn & M. von Tschirnhaus, 1995. Agromyzidae (Diptera) of the nature reserve "Hobokense polder": faunistics and life-history aspects. *Bulletinet Annales de la Société royale belge d'Entomologie*, 131: 191-205.
- Scheirs, J. & L. de Bruyn, 1992. Leafminers (Diptera; Agromyzidae) of *Phragmites australis* in Belgium. *Bulletin et Annales de la Société royale belge d'Entomologie*, 128: 310-315.
- Scheirs, J., L. de Bruyn & M. von Tschirnhaus, 1999. Agromyzidae (Diptera) of the nature reserve "Étang de Virelles": faunistics and life-history aspects. *Bulletinet Annales de la Société royale belge d'Entomologie*, 135: 152-158.
- Spencer, K. A., 1972. Handbooks for the Identification of British Insects: Diptera Agromyzidae. Royal entomological society of London. Published by the Society and Sold at its Rooms, Queen's Gate, London, 136 pp.
- Spencer, K. A., 1976. The Agromyzidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica*, 5: Part 1 (1-304), Part 2 (305-606). Scandinavian Science Press Ltd., Klampenborg, Denmark, 606 pp.
- Spencer, K. A., 1989. "Agromyzidae, 538-547". In: *Catalog of the Diptera of the Australasian and Oceanian Regions*, (Ed.: N. L. Evenhuis). Bishop Museum Press, Honolulu. E. J. Brill, Leiden, 1156 pp.
- Spencer, K. A., 1990. Host Specialization in the world Agromyzidae (Diptera). *Series Entomologica* 45: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Holland, 444 pp.
- Spencer, K. A., 1973. Agromyzidae (Diptera) of Economic Importance. *Series Entomologica*, 9, Dr. W. Junk, The Hague, The Netherlans, 418 pp.
- Spencer, K. A., 1969. Notes on European Agromyzidae (Diptera). 2. *Beiträge zur Entomologie*, 19: 5-26.

- Tewksbury, L., R. Casagrande, B. Blossey, P. Hafliger & M. Schwarzlander, 2002. Potential for biological control of *Phragmites australis* in north America. *Biological Control*, 23: 191-212.
- Woodley, N. E. & D. H. Janzen, 1995. A new species of *Melanagromyza* (Diptera: Agromyzidae) mining leaves of *Bromelia pinguin* (Bromeliaceae) in a dry forest in Costa Rica. *Journal of Natural History*, 29: 1329-1337.
- Yıldırım, E. M., A. Unay & H. S. Civelek, 2010. The effect of *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae) on some leaf characteristics of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Agriculture and Environment*, 8 (3&4): 839-841.
- Zitter, T. A. & J. H. Tsai, 1977. Transmission of three potyviruses by the leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae). *Plant Disease Report*, 61: 1025-1029.

Orijinal araştırma (Original article)

Improvement of leaf miner [*Liriomyza cicerina* Rond. (Diptera: Agromyzidae)] resistance in *Cicer* species

Cicer türlerinde yaprak galeri sineğine [*Liriomyza cicerina* Rond. (Diptera: Agromyzidae)] dayanıklılığın geliştirilmesi

Cengiz İKTEN^{1*}

Fatma Öncü CEYLAN²

Cengiz TOKER²

Summary

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) leaf miner [*Liriomyza cicerina* Rond. (Diptera: Agromyzidae)] is one of the main insect pests of chickpea since it causes substantial yield losses in Turkey. The most efficient practical, environmental and economical solutions to overcome leaf miner damage in chickpea is the utilization of resistant cultivars. The present study aims selecting resistance for leaf miner via mutation breeding in two *Cicer* species viz. *C. arietinum* L. and *C. reticulatum* Ladiz. Genotypes were irradiated with 200, 300 and 400 Gy gamma rays. A total of 20 genotypes consisting of eight mutants, nine breeding lines, and two susceptible controls and one resistant control were compared for resistance to leaf miner for two years. A highly pigmented mutant of *C. reticulatum* with multipinnate leaves was highly resistant to leaf miner comparing with the controls and breeding lines under field conditions. It may be useful to develop cultivars for resistance to leaf miner since *C. reticulatum* can be easily crossed with the cultivated chickpeas.

Keywords: Chickpea, *Cicer reticulatum*, leaf miner, *Liriomyza cicerina*

Özet

Nohut (*Cicer arietinum* L.) yaprak galeri sineği [*Liriomyza cicerina* Rond. (Diptera: Agromyzidae)] dikkate değer verim kayıplarına yol açtığı için Türkiye'deki en önemli ve yaygın zararlılardan biridir. Nohutta yaprak galeri sineği zararının üstesinden gelmek için en etkili, pratik, çevreci ve ekonomik çözümlerden biri dayanıklı çeşitler kullanılmasıdır. Bu çalışma *C. arietinum* ve *C. reticulatum* türlerinin dahil olduğu iki *Cicer* türünde mutasyon ıslahı ile yaprak galeri sineğine dayanıklı mutant seçmeyi amaçlamıştır. Genotipler 200, 300 ve 400 Gy gamma ışınları ile ışınlanmıştır. Sekiz mutant, dokuz ıslah hattı, iki hassas kontrol ve bir dayanıklı kontrolü içeren toplam 20 genotip yaprak galeri sineğine dayanıklılık için iki yıl karşılaştırılmışlardır. *C. reticulatum*'un koyu pigmentli ve çok yaprakcıklı bir mutantı yaprak galeri sineğine bulaşmış doğal epidemik koşullarında yaprak galeri sineğine karşı çok dayanıklı olarak bulunmuştur. *C. reticulatum* kültürü yapılan nohutlarla kolayca melezlenebildiği için yaprak galeri sineğine karşı dayanıklı çeşit geliştirmede kullanışlı olacaktır.

Anahtar sözcükler: Nohut, *Cicer reticulatum*, yaprak galeri sineği, *Liriomyza cicerina*

¹ Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Akdeniz University, TR-07070, Antalya, Turkey

² Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Akdeniz University, TR-07070, Antalya, Turkey

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: cikten@akdeniz.edu.tr

Alınış (Received): 05.02.2015 Kabul ediliş (Accepted): 03.06.2015 Çevrimiçi Yayın Tarihi (Published Online): 24.06.2015

Introduction

The genus *Cicer* L. consists of 49 taxa including 40 perennial and nine annual taxa along with the cultivated chickpea, *Cicer arietinum* L. (Van der Maesen et al., 2007; Donmez, 2011; Smykal et al., 2015). Based on their crossabilities, *Cicer* species have commonly been grouped into three gene pools. The primary gene pool of the cultivated chickpea consists of the *C. reticulatum* Ladiz. known as a progenitor of the cultivated chickpea (Ladizinsky & Adler, 1976) and *C. echinospermum* P.H. Davis. These two annual wild species can easily be crossed with the cultivated chickpea via conventional hybridization techniques (Muehlbauer et al., 1994). The cultivated chickpea contains two different groups as '*macrosperma*' or 'kabuli' and '*microsperma*' or 'desi' based on seed and plant characteristics (Muehlbauer & Singh, 1987).

The cultivated chickpea is placed first among cool season food legumes on the basis of harvested area in the world (FAOSTAT, 2013). Globally, the production is about 13.1 million t from 13.5 million ha areas, with an average yield of 968 kg per ha. In Turkey, 506,000 t chickpea is produced from 423,557 ha areas with an average yield of 1,195 kg per ha. Due to biotic and abiotic stresses, average seed yield is considered to be low globally.

Among biotic stresses, chickpea leaf miner [*Liriomyza cicerina* Rond. (Diptera: Agromyzidae)] is one of the most widespread insect pests in the Mediterranean region (Reed et al., 1987; Singh & Weigand, 1994; El-Bouhssini et al., 2008) including Turkey (Giray, 1970; Karman et al., 1970; Cikman & Civelek, 2006; Cikman et al., 2006; Toker et al., 2010; Toker et al., 2012b). It was recorded in the former USSR, Iraq, Iran, Afghanistan (Van der Maesen, 1979; Reed et al., 1987). The female flies puncture the leaves and leaflets with their ovipositors and inserts about six eggs into upper epidermis of leaf. After four days, when eggs hatched, the larvae bore in to leaves and mine tunnels through the parenchyma tissue (Giray, 1970; Reed et al., 1987). Yield reduction in chickpea due to leaf miner damage ranges from 20% to 40 % (Reed et al., 1987). Several integrated pest management (IPM) tools including cultural approaches, chemicals, host plant resistance and biological agents can be utilized for control of chickpea leaf miner. Chemical insecticides can bear both health and environmental risks. Also, the farmers living in marginal areas do not prefer to use chemical insecticides in chickpea fields due to increasing unit costs. For the control of leaf miner, the most suitable applications are believed to be cultural and biological practices, and host plant resistance (Weigand, 1990; Singh & Weigand, 2006). Hence, improvement of chickpea cultivars for resistance to leaf miner is an immense part of IPM and requires highly resistant parents. The present study deals with screening and selection for resistance to leaf miner via mutation breeding in two *Cicer* species.

Materials and Methods

Plant materials

The study utilized 20 genotypes containing mutants, improved lines selected for resistance to leaf miner and control lines (Table 1 and 2). In a previous study, three genotypes of *C. arietinum* L. and one genotype of *C. reticulatum* Ladiz. were subjected to 200, 300 and 400 Gy gamma rays from a ⁶⁰Co source in the Turkish Atomic Energy Agency (TAEK), Ankara, Turkey (Toker et al., 2005). Mutant generations from M₁ to M₅ were screened in the field for breeding characteristics as described by Toker et al. (2012a,b). Mutant selection criteria was based on changes of agronomic characters such as leaf shape, pod number, flower color and seed type of originating parent. In field screening process, some mutant lines showed differential response to leaf miner damage and these mutant lines were selected for further trials to elucidate their performance compared to ICARDA developed leaf miner resistance (LMR) lines (Table 2). In resistance trials, the mutant lines were in M₆ and M₇ generation and their appearances and resistance status were stable from generations to generations indicating homozygosity of mutant lines.

Table 1. Leaf shape of mutants *Cicer arietinum* and their parents

Mutant genotypes	Species	Parents of mutants	Irradiation dose	Leaf shape	
				Parent	Mutant
ACC 2208-1M	<i>C. arietinum</i>	CA 2969	200	Fern/Normal	Simple
ACC 5406M	<i>C. arietinum</i>	ICC 4951	400	Fern/Normal	Simple
ACC 3305-1M	<i>C. arietinum</i>	ICC 6119	300	Multipinnate	Simple
ACC 3305-2M	<i>C. arietinum</i>	ICC 6119	300	Multipinnate	Simple
ACC 3224M	<i>C. arietinum</i>	ICC 6119	200	Multipinnate	Multipinnate
ACC 3204M	<i>C. arietinum</i>	ICC 6119	200	Multipinnate	Multipinnate
ACC 3405M	<i>C. arietinum</i>	ICC 6119	400	Multipinnate	Multipinnate
AWC 612-1M	<i>C. reticulatum</i>	AWC 612	200	Fern/Normal	Multipinnate

Between 2010 and 2012 growing seasons, a total of 20 genotypes including eight mutants, nine breeding lines and three controls were screened for resistance to leaf miner (Table 1 and 2). The breeding lines affixed as LMR and FLIP from the International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA) were improved for resistance to leaf miner (Table 2). ICC 6119 was used as resistant control, while ILC 3397 and Sierra were used as susceptible controls (Table 2).

Table 2. Leaf shape of breeding *Cicer arietinum* and control lines

Breeding/Control lines	Species	Leaf shape	Breeding/Control lines	Species	Leaf shape
LMR 57	<i>C. arietinum</i>	Normal	LMR 200	<i>C. arietinum</i>	Multipinnate
LMR 60	<i>C. arietinum</i>	Normal	FLIP 2005-1C	<i>C. arietinum</i>	Normal
LMR 154	<i>C. arietinum</i>	Multipinnate	FLIP 2005-7C	<i>C. arietinum</i>	Normal
LMR 161	<i>C. arietinum</i>	Multipinnate	ICC 6119	<i>C. arietinum</i>	Multipinnate
LMR 162	<i>C. arietinum</i>	Multipinnate	Sierra	<i>C. arietinum</i>	Simple
LMR 165	<i>C. arietinum</i>	Normal	ILC 3397	<i>C. arietinum</i>	Normal

Agronomic practices

Before sowing, experimental area was fertilized with N, P and K (20:20:20) at a rate of 20 kg per ha. Weeds in the experimental areas were pulled by hand during seedling stage. Genotypes were grown in rainfed conditions without irrigation. The susceptible controls ILC 3397 and Sierra were repeated every two test rows. The plant materials were sown in two replicates in 4 m long rows with a row to row and plant to plant distance of 45 cm and 5 cm, respectively.

Evaluation of chickpea genotypes for resistance to leaf miner

Plants were evaluated for resistance to leaf miner under field conditions using a 1–9 scale as described by Toker et al. (2010) in Table 3.

Table 3. A visual 1-9 scale for resistance to leaf miner in *Cicer* species (Toker et al., 2010)

Resistance rating	Reaction to leaf miner	Appearance of genotypes
1	Very highly resistant	Free from any damage
2	Highly resistant	A few mines evident after careful observation
3	Resistant	A few mines in less than 20% of the leaflets, no defoliation
4	Moderately resistant	Mines present in 21 to 30% of the leaflets, no defoliation
5	Tolerant	Mines present in 31 to 40% of the leaflets, some defoliation in the lower half of plants
6	Moderately susceptible	Many mines in 41 to 50% of the leaflets, defoliation of 10% of the lower leaflets
7	Susceptible	Many mines in 51 to 70% of the leaflets, defoliation of 10 to 20% of the leaflets
8	Highly susceptible	Many mines in 70 to 90% of the leaflets, defoliation of 20 to 30% of the leaflets
9	Very highly susceptible	Many mines in almost all of the leaflets (90%) and defoliation greater than 31%

This scale is based on visual observations of two main damages caused by leaf miner. One is the extent of mines on chickpea leaflets and the other is defoliation rate of leaflets following mining damage. Screening was repeated during seedling, flowering and mid-podding stages and the highest visual scores were recorded for each genotype.

Agro-morphological characteristics

Some agro-morphological characteristics; days to flowering (DFL), plant height (PLH), canopy width (CAN), first pod height (FPH), stems per plant (SPP), pods per plant (PPP), biological yield (BIY), seed yield (SEY), 100-seed weight (HSW), pigmentation (PIG) or flower color (FLC) and leaf shape (LES) of the genotypes were recorded for assessment of relationships between leaf miner resistance (LMR) and agro-morphological characteristics.

Climatic conditions

Weather in the experimental plots during growing seasons was typically warm. Temperature gradually rises during spring months, while rainfall drastically drops in spring months. During the cropping season, maximum temperature reaches about 30°C during the flowering and 35°C during the pod filling stages.

Statistical analyses

MINITAB 13.1 was used for calculations of means \pm standard errors, analysis of variation (ANOVA), and correlations. Data on resistance to leaf miner was converted from scale to percentage prior to ANOVA.

Results and Discussion

Genotypic effects for resistance to leaf miner and agro-morphological characteristics were found to be statistically significant ($P < 0.01$). Genotype by year interaction was insignificant for resistance to leaf miner ($P < 0.05$). The scale data on resistance to leaf miner ranged from 1 to 9 score. Minimum and maximum values (range) for days to flowering (50%) were 43 and 64 days, respectively. Ranges for plant height and canopy width were detected between 9-59 cm and 15-49 cm, respectively. Range for first pod height was between 0 and 35 cm. Ranges for stems and pods per plant were found as 1-3 and 0-49, respectively. Range for biological yield per plant was recorded from 10 g to 890 g, whereas seed yield was found between 2 g and 352 g per plant. Range for 100-seed weight was between 12 g and 57 g (Table 4).

Table 4. Descriptive statistics and ANOVA for resistance to leaf miner and agro-morphological characteristics over 20 genotypes

Characteristics	Mean \pm SE	Minimum	Maximum	F values	Probability
Resistance to leaf miner (1-9)	4.96 \pm 0.2	1	9	86.99	>0.001
Days to flowering (50%)	50.39 \pm 0.3	43	64	3.91	>0.001
Plant height (cm)	45.54 \pm 0.6	9	59	3.16	>0.001
Canopy width (cm)	24.49 \pm 0.5	15	49	4.61	>0.001
First pod height (cm)	21.39 \pm 0.5	0	35	4.37	>0.001
Stems per plant (number)	1.30 \pm 0.1	1	3	4.04	>0.001
Pods per plant (number)	20.44 \pm 0.7	0	49	3.99	>0.001
Biological yield (g)	386.40 \pm 11.2	10	890	3.47	>0.001
Seed yield (g)	171.65 \pm 4.8	2	352	2.83	>0.001
100-seed weight (g)	35.93 \pm 0.8	12	57	24.30	>0.001

AWC 612-1M selected from AWC 612 (*C. reticulatum*) was free from leaf miner damage with a given score of 1.00. Some mutants (ACC 3204M, ACC 3405M and ACC3224M) and breeding lines (LMR 57, LMR 60, LMR 154, LMR 161, LMR 162, LMR 165, LMR 200, FLIP 20051C, FLIP 2005-7C) from ICARDA were found as resistant as the control line (ICC 6119). Expectedly, Sierra and ILC 3397 were found to be susceptible to leaf miner with scores of 7.50 and 9.00, respectively. The mutants, ACC 2208-1M, ACC 3305-1M and ACC 3305-2, were susceptible having the score of 8.00, 7.75 and 7.75, respectively (Fig. 1). AWC 612-1M had multipinnate leaf shape with dark pigmentation on plant (Fig. 2), whereas its parent AWC 612 had normal leaf shape with lighter pigmentation. AWC 612-1M was the most resistant chickpea among breeding lines, mutants and controls (Fig. 1).

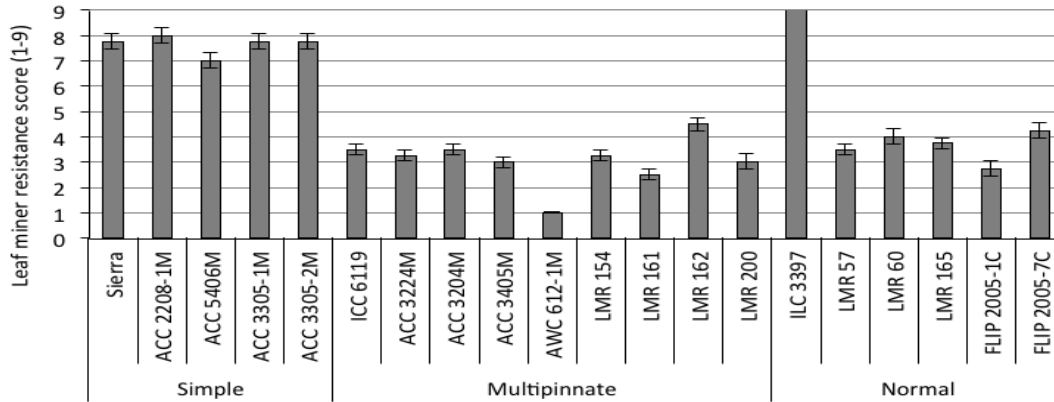


Figure 1. Leaf miner resistance scores in 20 *Cicer* genotypes. Bars show means \pm standard errors over two years.



Figure 2. ILC 3397 (leaf miner susceptible control), AWC 612-1M (leaf miner resistant mutant), Sierra (Leaf miner susceptible control) and AWC 612-1M, respectively (from left to right).

LMR score was statistically and significantly correlated with 100-seed weight ($r = 0.719^{**}$) indicating that the leaf miner resistant genotypes had mostly small seeds. Muelbauer & Singh (1987) reported that there was a positive relationship between large leaf and large seed size. Leaf miner resistance score was significantly and negatively related with leaf shape ($r = -0.682^{**}$) explaining that the resistant genotypes had generally multipinnate leaf (Fig. 2). There was also significant correlation between leaf miner resistance and days to flowering ($r = -0.481^{**}$) indicating that late flowering genotypes were less affected by leaf miner damages in Table 5.

Table 5. Correlation matrix between leaf miner resistance and agro-morphological characteristics in 20 *Cicer* genotypes

Traits	DFL	FLC	PLH	SPP	FPH	CAN	PPP	LES	BIY	SEY	HSW
FLC	0.251										
PLH	-0.560**	-0.270									
SPP	0.383**	0.146	-0.226								
FPH	-0.075	-0.200	0.281	0.925**							
CAN	0.221	0.182	-0.035	0.453**	0.004						
PPP	0.203	0.455**	-0.125	0.387**	0.002	0.471**					
LES	0.336*	0.152	-0.163	-0.035	0.220	-0.224	0.077				
BIY	-0.314*	-0.311*	0.465**	-0.007	0.209	0.189	0.136	-0.132			
SEY	-0.458**	-0.263	0.416**	-0.167	-0.060	0.095	0.075	-0.335*	0.756**		
HSW	-0.628**	-0.332*	0.469**	-0.378**	-0.147	-0.146	-0.454**	-0.612	0.293	0.511**	
LMR	-0.481**	-0.118	0.282	-0.299	-0.310*	-0.277	-0.370*	-0.682**	-0.042	0.258	0.719**

The values marked * and ** are statistically significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

The larger leaflet size is considered as an indicator of the more leaf miner per leaf (Toker et al., 2010). The findings on resistance to leaf miner in the present study are in agreement with the report of Toker et al. (2010). In the present study, leaf miner resistance was the highest among genotypes with multipinnate leaves followed by normal ones, while genotypes with simple leaves were found to be always susceptible (Figs. 1-2). In addition to genotypes having multipinnate leaf shapes, some breeding lines with normal leaf shape from ICARDA were resistant to leaf miner. Comparable results were given in the study of El-Bouhssini et al. (2008). In the present study, however, the resistance levels in normal leaf shaped-genotypes were not as high as multipinnate leaf shaped-genotype AWC 612-1M (Fig. 2). Sithanatham and Reed (1980) pointed out that leaf miner damage was higher in genotypes with larger leaflets than small leaflet ones. In current study, simple leaf shaped mutant lines (ACC 3305-1M and ACC3305-2M) derived from resistant multipinnate parent ICC 6119 were as susceptible as control lines (Fig. 1). This result further indicates that large leaflet supports more leaf miner than smaller ones.

Singh & Weigand (1994) screened over 7000 chickpea germplasm for resistance to leaf miner. However, the study did not report any highly resistant genotypes. Reed et al. (1987) identified 21 chickpeas as moderately resistant after screening of 9500 genotypes. Singh & Weigand (2006) improved three chickpea germplasm lines resistant to leaf miner having multipinnate leaf types. These genotypes were further validated by Toker et al. (2010). Seven chickpea breeding lines were reported as resistant to leaf miner (Malhotra et al., 2007). These resistant genotypes were used as parent in breeding programs in ICARDA. As for wild *Cicer* species, Singh & Weigand (1994) found leaf miner resistance in *C. cuneatum* Hochst. ex Rich., *C. judaicum* Boiss., *C. pinnatidum* Jaub. & Spach. and *C. reticulatum* Ladiz. after screening of 200 lines representing eight wild *Cicer* species. Similarly, Robertson et al. (1995) found leaf miner resistance in *C. bijugum* K.H. Rech., *C. echinospermum* P.H. Davis, *C. pinnatifidum* Jaub. & Spach., *C. judaicum* Boiss., *C. chorassanicum* (Bge) M. Pop., and *C. reticulatum* Ladiz. In the present study, AWC 612-1M was found as highly resistant to leaf miner (Figs. 1-2). Unlike the cultivated chickpeas, this mutant was free from leaf miner damage probably since it had very tinny leaflets (Fig. 2). This is the first report on *C. reticulatum* with multipinnate leaf since all accessions of *C. reticulatum* have normal leaves (Robertson et al., 1995).

The unique mutant AWC 612-1M is under use in breeding programs through conventional breeding methods since it can easily be crossed with the cultivated chickpea. In this sense, the present study is one of the useful examples to improve of resistance to leaf miner via mutation breeding.

Acknowledgements

We are thankful to Dr. F.J. Muehlbauer (Washington State University, Pullman, USA), Drs. R.S. Malhotra and A. Sarker (ICARDA, Aleppo, Syria), Drs. B.V. Rao and H.D. Upadhyaya (ICRISAT, Patancheru, Hyderabad, India), Dr. J. Gil (Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain) and Dr. A. Tan [Aegean Agricultural Research Institute (AARI), Menemen, Izmir, Turkey] for kindly supplying seeds. We are also grateful to TUBITAK and Akdeniz University Scientific Research Projects Coordination Unit.

References

- Cikman, E. & H. S. Civelek, 2006. Population densities of *Liriomyza cicerina* (Rondani, 1875) (Diptera: Agromyzidae) on *Cicer arietinum* L. (Leguminosae: Papilionoidea) in different irrigated conditions. Turkish Journal of Entomology, 30: 3-10.
- Cikman, E., A. Beyarslan & H. S. Civelek, 2006. Parasitoids of leaf miners (Diptera: Agromyzidae) from Southeast Turkey with 3 new records. Turkish Journal of Zoology, 30: 167-173.
- Donmez, A. A., 2011. *Cicer uludereensis* Dönmez: a new species of Cicer (Chickpea) (Fabaceae) from around the Fertile Crescent, SE Turkey. Turkish Journal of Botany 35: 71-76.
- El-Bouhssini, M., K. Mardini, R. S. Malhotra, A. Joubi & N. Kagka, 2008. Effects of planting date, varieties and insecticides on chickpea leaf miner (*Liriomyza cicerina* R.) infestation and the parasitoid *Opius monilicornis* F. Crop Protection, 27: 915-919.
- FAOSTAT, 2013. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567> (Date accessed: January, 2015).
- Giray, H., 1970. *Liriomyza cicerina* Rond. (Diptera: Agromyzidae)'nin Morfolojik Karakterleri, Kısa Biyolojisi ve Zarar Şekli Üzerinde Araştırmalar. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi, Bornova, İzmir, 34 s.
- Karman, M., E. Erakay & O. Kaya, 1970. Nohut yaprak sineği ve baklagil tohum böcekleri. Çiftçi Broşürü, 53: 1-7.
- Ladizinsky G., & A. Adler, 1976. The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. Euphytica, 25: 211-217.
- Malhotra, R. S., M. El-Bouhssini & A. Joubi, 2007. Registration of seven improved chickpea breeding lines resistant to leaf miner. Journal of Plant Registration, 1: 145-146.
- MINITAB, 2000. Minitab statistical software vers. 13.1.
- Muehlbauer, F. J. & K. B. Singh, 1987. "Genetics of Chickpea, 99-125". In: The Chickpea (Eds.: M. C. Saxena & K. B. Singh). CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 409 pp.
- Muehlbauer, F.J., W. J. Kaiser & C. J. Simon, 1994. Potential for wild species in cool-season food legume breeding. Euphytica, 73: 109-114.
- Reed, W., C. Cardona, S. Sithanatham & S. S. Lateef, 1987. Chickpea Insect Pest and Their Control, 283-318". In: The Chickpea (Eds: M. C. Saxena & K.B. Singh). CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 409 pp.
- Robertson, L. D., K. B. Singh & B. Ocampo, 2005. A Catalog of Annual *Cicer* Species. ICARDA, Aleppo, Syria, 171 pp.
- Singh, K. B. & S. Weigand, 1994. Identification of resistant sources in *Cicer* species to *Liriomyza cicerina*. Genetic Resources and Crop Evolution, 41: 75-79.
- Singh, K. B. & S. Weigand, 2006. Registration of three leaf miner-resistant chickpea germplasm lines: ILC 3800, ILC 5901, and ILC 7738. Crop Science, 36: 472-472.
- Sithanatham, S. & W. Reed, 1980. Preliminary observations on *Heliothis* and other insect pests on chickpea in Syria. International Chickpea Newsletter, 2: 15.

- Smykal, P., C.J. Coyne, M. J. Ambrose, N. Maxted, H. Schaefer, M.W. Blair, J. Berger, S. L. Greene, M. N. Nelson, N. Besharat, T. Vymyslicky, C. Toker, R. K. Saxena, M. Roorkiwal, M. K. Pandey, J. Hu, Y-h. Li, L-X. Wang, Y. Guo, L-J. Qiu, R. J. Redden & R. K. Varshney, 2015. Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Science* 34: 43-104.
- Toker, C., B. Uzun, H. Canci & F. O. Ceylan, 2005. Effects of gamma irradiation on the shoot length of *Cicer* seeds. *Radiation Physics and Chemistry*, 73: 365-367.
- Toker, C., 2009. A note on the evolution of kabuli chickpeas as shown by induced mutations in *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56: 7-12.
- Toker, C., F. Erler, H. Canci, & F. O. Ceylan, 2010. Severity of leaf miner (*Liriomyza cicerina* Rond.) damage in relation to leaf type in chickpea. *Turkish Journal of Entomology*, 34: 211-226.
- Toker, C., H. Canci, N. E. Inci & F. O. Ceylan, 2012a. Improvement in imidazolinone resistance in *Cicer* species by induced mutation. *Plant Breeding*, 131: 535-539.
- Toker, C., H. Canci, N. E. Inci, F. O. Ceylan, B. Uzun, S. Sönmez, S. Citak & C. Ikten, 2012b. Pyramiding of the resistance to Fe-deficiency chlorosis and leaf miner (*Liriomyza cicerina* Rond.) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) by mutation breeding. *Turkish Journal of Field Crops*, 17: 41-45.
- Toker C., C. Ikten, F.O. Ceylan, E. Bolucek & B. Uzun, 2013. Genetic relationship between transgressive segregations and genetic distance based on SSR markers in *Cicer* species. *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 38-39.
- Van der Maesen, L. J. G., 1972. *Cicer* L., A Monograph of the Genus with Special Reference to Chickpea (*Cicer arietinum* L.), Its Ecology and Cultivation. Ph. D. thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen (The Netherlands), 342 pp.
- Van der Maesen L. J. G., N. Maxted, F. Javadi, S. Coles & A. M. R. Davies, 2007. "Taxonomy of the Genus *Cicer* Revisited, 14–46". In: *Chickpea Breeding and Management*. (Eds.: S. S. Yadav, R. Redden, W. Chen & B. Sharma). CAB International, Wallingford, 638 pp.
- Weigand, S., 1990. "Insect Pests of Chickpea in the Mediterranean Area and Possibilities for Resistance, 73-76". In: *Present Status and Future Prospects of Chickpea Crop Production and Improvement in the Mediterranean Countries* (Eds: M.C. Saxena, J.I. Cubero & J. Wery). *Options Méditerranéennes-Série-Séminaires-no 9-CIHEAM*, Paris, France, 175 pp.
- Weigand, S. & M. P. Pimbert, 1993. "Screening and Selection for Insect Resistance in Cool-Season Food Legumes. 145-156". In: *Breeding for Stress Tolerance in Cool-Season Food Legumes* (Eds.: K.B. Singh & M.C. Saxena). ICARDA, A Wiley-Sayce Co-Publication, John Wiley and Sons, Baffins Lane, Chichester, UK, 474 pp.

Orijinal araştırma (Original article)

Türkiye için yeni bir zararlı *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae)¹

Ricania simulans (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae) a new pest for Turkey

Kibar AK^{2*}

Şaban GÜÇLÜ³

Cafer EKEN⁴

Reyhan SEKBAN⁵

Summary

This study was carried out to determine distribution, host plant and biology of *Ricania simulans* (Walker) (Hemiptera: Ricaniidae) in Eastern Black Sea Region of Turkey between 2009 and 2011. There is no important plant pest in the Eastern Black Sea Region of Turkey except this species. However, population of *R. simulans* being harmful in many wild and cultivated plant species in both nymphal and adult stages has been increased since 2009. As a result of this study, it was determined that *R. simulans* has been widespread on coastal areas of Eastern Black Sea Region of Turkey with an extensive host range including elderberry, bean, kiwifruit, wild blackberries, hydrangea, fig tree, alder, cherry laurel, tea tree and grapevine. Nymphs of the pest emerge in the middle of May and it has 5 nymphal stages, the adults emerge early July and started to lay their eggs in early August, overwinter as eggs and gives one generation in a year.

Keywords: *Ricania simulans*, Eastern Black Sea Region, distribution, host, biology

Özet

Bu çalışma, Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde zararlı olan *Ricania simulans* (Walker) (Hemiptera: Ricaniidae)'ın yayılışını, konukçularını ve biyolojisini belirlemek amacıyla 2009-2011 yılları arasında yürütülmüştür. Bu zararlı dışında Doğu Karadeniz Bölgesi'nde ürünlerde mücadeleyi gerektirecek önemli zararlılar mevcut değildir. Fakat nimf ve erginleri birçok yabani ve kültür bitkisinde zararlı olan *R. simulans*'in popülasyonu 2009 yılından beri artmaktadır. Bu çalışma sonucunda *R. simulans*'in Doğu Karadeniz Bölgesi sahil kesiminin tamamında yayıldığı tespit edilmiştir. Zararlıının en önemli konukçularının mürver, fasulye, kivi, yabani böğürtlen, ortanca, incir, kızılbaş, karayemiş, çay ve asma olduğu belirlenmiştir. Nimfler Mayıs ortasından itibaren çıkarak 5 nimf dönemi geçirmekte, erginler ise temmuz başında çıkarak yumurtalarını ağustos başından itibaren koymakta, kışı yumurta döneminde geçirerek yılda bir nesil vermektedir.

Anahtar sözcükler: *Ricania simulans*, Doğu Karadeniz, yayılış, konukçu, biyoloji

¹ Bu çalışma TAGEM tarafından desteklenen TAGEM-BS-09/04-08/01-11 nolu proje sonuçlarının bir bölümüdür.

² Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Samsun

³ Bozok Üniversitesi, Tarım ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Yozgat

⁴ Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta

⁵ Atatürk Çay ve Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, Rize

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: kibarak@yahoo.com

Alınış (Received): 14.10.2014 Kabul edilmiş (Accepted): 13.03.2015 Çevrimiçi Yayın Tarihi (Published Online): 31.03.2015

Giriş

Doğu Karadeniz Bölgesi çay, fındık ve kivi üretimi bakımından Türkiye'nin en önemli bölgesidir. Türkiye'deki fındık üretiminin % 10'u, 64.000 hektar üretim alanı bulunan Trabzon bölgesinde (Trabzon-Artvin) gerçekleştirilmektedir (Yavuz, 2007). Karadeniz Bölgesi kivi üretiminin de en önemli merkezi durumunda olup, 12.112 dekar üretim alanı ve 17.841 tonluk üretim ile Türkiye üretiminin % 61'ini karşılamaktadır (Kontaş, 2012). Çayda ise durum daha farklı olup Trabzon, Rize ve Artvin illerinde 74.396 hektar alanda yaklaşık 1 milyon 100 bin ton üretim ile Türkiye'nin toplam üretiminin % 97'sini karşılamaktadır (Paksoy et al., 2006).

Doğu Karadeniz Bölgesi'nin tarımsal yönden diğer bir özelliği de yetiştirilen ürünlerde kimyasal mücadeleyi gerektirecek yoğunlukta hastalık ve zararlıların bulunmamasıdır. Bu bağlamda özellikle çay plantasyonlarında zararlılar yönünden doğal denge oluşmuş ve herhangi bir kimyasal mücadele yapılmamaktadır. Buna benzer bir şekilde fındık alanlarında bazı yerlerde ilaçlama yapılmamakla birlikte bazı bahçelerde ilaçlama yapılmakta, ancak kivi bahçelerinde herhangi bir kimyasal mücadele yapılmamaktadır. Bunların dışında geleneksel olarak aile ihtiyaçlarına yönelik yetiştirilen diğer sebze, meyve ve tarla ürünlerinde de herhangi bir kimyasal uygulama yapılmamaktadır. Ancak, 6-7 yıl öncesine kadar Türkiye'de bulunmayan ve anavatanının Çin olduğu bilinen (Tsaur, 2005) *Ricania simulans* (Walker, 1851)'in ülkemizdeki yayılış alanı ve popülasyonu günden güne artmaktadır.

Ricaniidae, Fulgoroidea (Hemiptera) üst familyasında yer alan küçük familyalardan birisidir. Dünya genelinde 40 cins içerisinde yer alan yaklaşık 400 türü vardır (Chou et al., 1985). Türler daha çok Afrotropical, Australian ve Oriental bölgelerde, az sayıda tür ise Palaearktik bölgede bulunur. Imura (2003), *R. simulans*'ın nimf ve erginlerinin bir yabancı tür olan *Solanum carolinense* L. (Solanaceae) ve çeşitli familyalardan birçok bitki türü üzerinde bulunduğunu, bitkilerin sap kısmından bitki özsuyu emerek beslendiğini bildirmektedir. Avidzba & Bobokhidze (1982), zararlının 1956 yılında Abhazy'a'da (Rusya) tespit edildiğini, Karadeniz'in subtropik sahilleri boyunca yayılarak Kafkasya'ya ulaştığını; böğürtlen, çay, asma, turunçgiller, şeftali ve soya fasulyesi gibi bitkilerde beslendiğini, Dzhashi et al. (1982) ise zararlının, Gürcistan'ın güneyinde, kışı yumurta döneminde geçirerek yılda bir döl verdiğini bildirmektedir. Bunların dışında *R. simulans*'ın ekonomik zararı ile ilgili kayda rastlanılmamasına karşın, Avustralya ve Yeni Zelanda'da, aynı familyaya ait ve biyolojileri *R. simulans* ile benzer olan *Scolypopa australis* (Walker)'in önemli bir zararlı olduğunu, kivi ve diğer bazı kültür birkileri ile birçok yabancı ot türünde yaygın olarak bulunduğu, kivinin tehlikeli bir zararlısı olduğu ve kivi bahçelerinde bu zararlıya karşı geniş spektrumlu ilaçların kullanıldığı belirtilmektedir (Logan et al., 2002; Charles et al., 2004).

Uzak Doğu kökenli olan bu zararlının, Rusya ve Gürcistan'da 30 yıldan daha uzun bir süredir bulunduğu anlaşılmaktadır (Avidzba & Bobokhidze, 1982; Dzhashi et al., 1982). Gürcistan ile Türkiye arasındaki sınır hareketliliği nedeniyle buradan gelen bulaşık bitki materyalleri ile zararlının ülkemize bulaştığı düşünülmektedir.

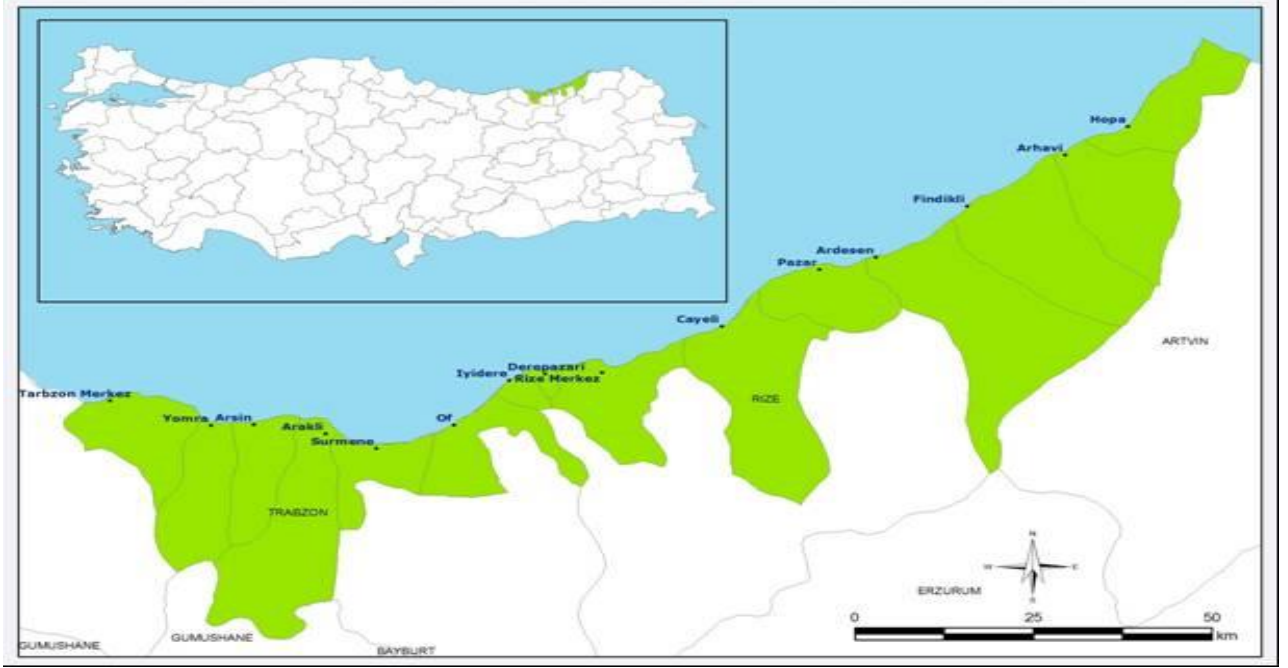
Türkiye'de *R. simulans*'a karşı ilk defa geniş kapsamlı olarak yapılan bu çalışma ile zararlının bölgede yayılışı, konukçuları ve biyolojisi ortaya konulmuştur.

Materyal ve Yöntem

Çalışmanın ana materyalini *Ricania simulans*'ın yumurta, nimf ve erginleri ile konukçuları oluşturmuştur.

Konukçuları, yayılışı ve yoğunluğu

Zararlının yayılış ve yoğunluğunun belirlenmesi ile ilgili çalışmalar Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Artvin ilinde, Hopa ve Arhavi ilçeleri; Rize ilinde, Fındıklı, Ardeşen, Pazar, Çayeli, Merkez, Derepazarı ve İyidere ilçeleri, Trabzon ilinde ise Of, Sürmene ve Araklı ilçelerinde (Şekil 1), bu ilçeleri temsil eden farklı yönlerdeki en az üç köydeki farklı bahçelerde yapılmıştır. Belirtilen yerlere nimflerin yoğun olduğu haziran ayının ortalarında birer hafta arayla gidilerek örnekleme yapılmıştır. Bitkilerin yaklaşık 20 cm'lik sürgünleri üzerinde bulunan nimfler sayılmış ve her bir konukçudan en az 10 bitkide sayım yapılarak farklı konukçular arasındaki tercih durumları da ortaya konulmuştur. Yoğunluk belirlenmede zararlının koloni oluşturduğu bitkiler dikkate alınmıştır. Arazide teşhisi yapılamayan bitkiler uygun şekilde kurutularak ilgili uzmanlara teşhis ettirilmiştir.



Şekil 1. Çalışmanın yapıldığı bölge.

Biyolojisi

Yumurta bırakma yerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma 2010-2011 yıllarında yürütülmüş olup bu amaçla 80x80x80 cm ölçülerinde 4 adet kafes kullanılmıştır. Kafeslerden her birine bölgede yaygın olarak görülen çay, asma, kivi, mandarin ve elma fidanlarından birer adet konulmuştur. Bu kafeslerin her birine temmuzun ikinci yarısından itibaren, erginler yumurta bırakmaya başlamadan önce 30 ergin erkek ve 20 ergin dişi salınmıştır. Kafesler korunaklı ve doğal şartları içeren Çaykur Genel Müdürlüğü'nün deneme alanına (Hayrat Fidanlığı) yerleştirilmiştir. 2010 yılında kafeslere erginler 02.08.2010, 2011 yılında ise 11.08.2011 tarihinde konularak, erginlerin tamamı ölünceye kadar tutulmuştur. Kafesler kaldırıldıktan sonra her bir konukçuda yumurta dizini ve yumurta sayıları sayılarak değerlendirilmiştir.

Doğada *R. simulans*'in biyolojisi ile ilgili çalışmalar 2009-2011 yıllarında, zararının yoğun olarak bulunduğu Rize ilinde yürütülmüştür. Mayıs'ın ikinci yarısından itibaren günlük periyotlarla nimf çıkışı, haziranın son haftasından itibaren ergin çıkışı, ağustos ayının başından itibaren de erginlerin yoğun olarak bulunduğu bitkilerin sürgünleri kontrol edilerek yumurta koyma tarihleri belirlenmiştir.

Ayrıca, 2009 ve 2010 yıllarında nimfler ilk görüldüğü tarihten itibaren, bütün bireyler ergin oluncaya kadar, her hafta nimf örnekleri alınarak alkol içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Bunlar laboratuvarında, dönemlerine göre ayrılarak sayılmış ve böylece her bir nimf döneminin görüldüğü dönemler belirlenmiştir.

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Konukçuları, yayılışı ve yoğunluğu

Çalışma sonucunda zararının, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Sarp sınırından (Hopa) başlayarak Trabzon'un Araklı ilçesine kadar olan sahil kesiminde yayılış gösterdiği belirlenmiştir.

Artvin ilinde çalışma yapılan alanlarda zararının en yoğun bulunduğu bölgenin Kemalpaşa olduğu (27 nimf/sürgün) tespit edilmiştir. Kemalpaşa, Gürcistan sınırına en yakın bölgedir. Sırasıyla bu ilçeyi Hopa (9 nimf/sürgün) ve Arhavi (7 nimf/sürgün) izlemiştir.

Rize’de zararının en yoğun bulunduğu ilçenin İyidere (25 nimf/sürgün) olduğu ve bunu Derepazarı (23 nimf/sürgün) ve Merkez ilçenin (8 nimf/sürgün) takip ettiği belirlenmiştir. Rize’nin doğu ilçelerinde (Fındıklı, Ardeşen, Pazar ve Çayeli) zararlıya daha düşük yoğunlukta (3-5 nimf/sürgün) rastlanmıştır. Bu ilçelerdeki üreticilerin zararının varlığından haberdar olmadıkları, zararının nimf ve erginlerinin dikkat çekmediği belirlenmiştir.

Trabzon ilinde ise popülasyonu en yoğun ilçenin Sürmene (10 nimf/sürgün) olduğu, Sürmene’yi Of (4 nimf/sürgün) ve Araklı’nın (3 nimf/sürgün) takip ettiği tespit edilmiştir. Sürmene haricinde diğer ilçelerdeki çiftçilerin zararının varlığından haberdar olmadıklarını belirtmişlerdir. Araklı’nın batısında kalan ilçelerde (Arsin ve Yomra) ve Trabzon (Merkez)’de zararlı tespit edilmemiştir.

Zararının nimflerine bölgede yaygın olan bitkilerden en çok mürver (*Sambucus* spp.), fasulye, kivi, yabancı böğürtlen, ortanca (*Hydrangea macrophylla* Thunb. (Hydrangeaceae), incir, kızılağaç, karayemiş (*Prunus laurocerasus* L. (Rosaceae), çay ve asmada rastlanmakta olup bu bitkilerdeki ortalama yoğunluğu sırasıyla 33,85; 27,60; 22,25; 19,75; 19,08; 16,50; 14,20; 12,42; 10,20 ve 8,92 nimf/sürgün olarak belirlenmiştir. Ayrıca zararlıya eğrelti otu, ısırgan, fındık, akasya, pelin (*Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) yeni dünya, lavanta, üç yaprak (*Poncirus trifoliata* (L.) (Rutaceae), ceviz, yabancı hurma, elma, mandalina, kestane, hıyar ve patlıcanda da yer yer yoğunluk oluşturmaktadır.

Nimfler ilk önce tarım alanlarının kenarında yer alan mürver, yabancı böğürtlen, ısırgan ve pelin gibi yabancı otlar, çit bitkileri ve asma gibi yumurtaların yoğun olarak bırakıldığı bitkilerde görülmekte ve daha sonra buralardan kültür bitkilerine geçmektedir. Fındık, kivi, kızılağaç, karayemiş ve incir gibi konukçuların daha çok dip sürgünleri ve taze uç sürgünlerinde beslenmektedir. Kültür bitkilerinden fasulyede özellikle çiçeklenme döneminde yoğun olarak zarar yaptığı, ayrıca hıyar ve patlıcan gibi sebzelerde de beslendiği tespit edilmiştir. Ancak bu sebzeler ticari amaçla yetiştirilen bitkiler olmayıp, küçük bahçelerde üreticilerin kendi ihtiyaçlarını karşılamak için yetiştirdiği yerel çeşitlerden oluşmaktadır.

Biyolojisi

Kafeslerde yapılan çalışmada, zararının yumurta bırakmak için daha çok asma ve çay bitkisini tercih ettiği belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Kafeslerde yumurta bırakılan sürgün ve her bir sürgündeki yumurta sayısı

Tüplü Fidanlar	Yıl	I. Kafes		II. Kafes		III. Kafes		IV. Kafes		Toplam		Ortalama	
		SS	YS	SS	YS	SS	YS	SS	YS	SS	YS	SS	YS
Asma	2010	1	20	1	35	2	17	2	150	6	222	1,50	37,00
	2011	1	56	2	44	6	153	2	71	11	324	2,75	29,46
Çay	2010	4	108	3	63	3	74	9	156	19	401	4,75	21,10
	2011	2	40	3	65	4	80	2	19	11	204	2,75	18,55
Kivi	2010	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0,00	0,00
	2011	-	-	-	-	-	-	1	35	1	35	0,25	35,00
Mandarin	2010	-	-	-	-	1	20	-	-	1	20	0,25	20,00
	2011	4	27	9	102	-	-	-	-	13	129	3,25	9,92
Elma	2010	-	-	-	-	-	-	1	20	1	20	0,20	20,00
	2011	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0,00	0,00

SS-Bulaşık sürgün sayısı, YS-Yumurta sayısı.

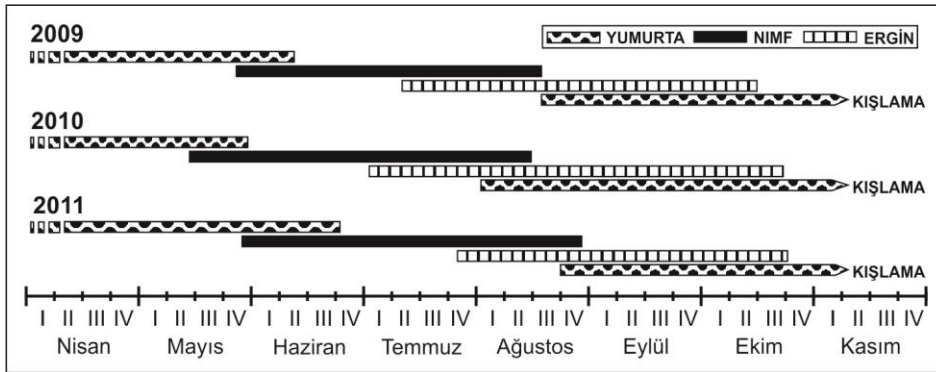
Yapılan gözlemlerde zararının yumurta bırakma tercihinde en önemli faktörün, bitki türünden çok, konukçuda yumurta koymaya elverişli sürgünlerin bulunup bulunmaması olduğu belirlenmiştir. Zararlı yumurta koymak için daha çok kuru ya da kurumaya yüz tutmuş sürgünleri tercih etmektedir. Çayın

periyodik olarak hasat edilmesi sonucu kesilen sürgünlerden geriye kalan 1-2 cm uzunluktaki kısımlar kurumakta ve kurumuş olan bu kısa sürgünlere çok yoğun olarak yumurta konulmaktadır. Ancak, doğal koşullarda özellikle eylül ayında yapılan üçüncü biçim esnasında yumurta konulan bu sürgünlerin çoğu kesilmektedir. Üzüm asmalarında ise bitkinin tutunmaya yarayan sürgünleri (sülük) erken dönemde kurumaya başlamakta ve zararlı yumurta koymak için buraları çok yoğun bir şekilde tercih etmektedir. Bunun yanında kafeslere konulan bitkilerden başka, zararlının bulunduğu alanlardaki diğer konukçuların çoğunlukla kurumak üzere olan dal ve sürgünlerine yumurta konularak bu dokuların tamamen kurummasına neden oldukları tespit edilmiştir.

Çalışmanın birinci yılı olan 2009 yılında ilk nimf çıkışı mayısın son haftası (24.05.2009), 2010 yılında mayısın ikinci haftası (12.05.2010), 2011 yılında ise mayısın son haftası (27.05.2011) olarak belirlenmiştir. Yumurtaların açılması 2009 yılında 10 Haziran, 2010 yılında 29 Mayıs, 2011 yılında ise 26 Haziran tarihine kadar sürmüştür. Nimflere 2009 yılında 17.08.2009, 2010 yılında 14.08.2010, 2011 yılında ise 28.08.2011 tarihine kadar rastlanmıştır. 2010 yılında ekimin dördüncü (27.09.2010) haftasından kasımın birinci haftasına kadar (05.11.2010) çok düşük yoğunlukta nimfe rastlanmasına karşın, bu durumun zararlının bulunduğu ortamın ekolojik şartlarına bağlı olarak geç açılan yumurtalardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Erginler 2009 yılında 10 Temmuz-14 Ekim, 2010 yılında 2 Temmuz-20 Ekim, 2011 yılında ise 25 Temmuz-21 Ekim tarihleri arasında doğada görülmüştür. Erginlerin yumurtalarını; 2009 yılında ağustosun üçüncü haftasından (17.08.2009), 2010 yılında ağustosun ilk haftasından (02.08.2010), 2011 yılında ise ağustosun üçüncü haftasından itibaren (24.08.2011) koydukları tespit edilmiştir (Şekil 2).

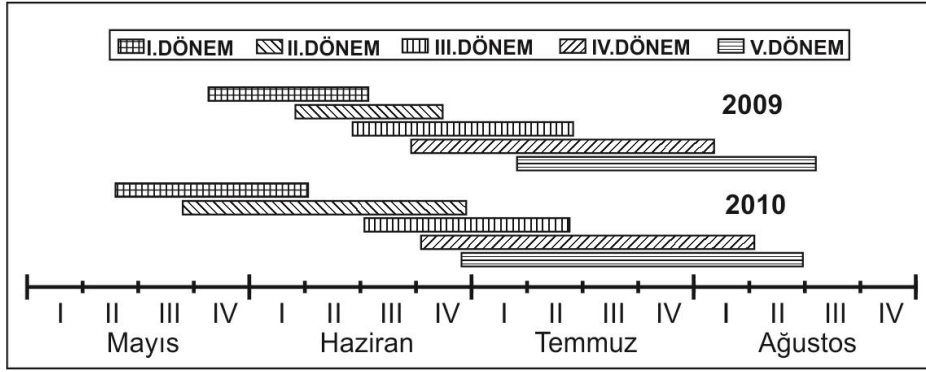
Yumurtalar, otsu ve odunsu bitkilerin dal ve sürgünlerinin kabukları altına bırakılmakta ve bu şekilde kışı geçiren zararlı yılda bir nesil vermektedir.

Nimf dönemlerini belirlemek amacıyla 2009 ve 2010 yıllarında sürdürülen çalışmada zararlının 5 nimf dönemi geçirdiği tespit edilmiştir (Şekil 3). 2009 yılında birinci nimf dönemi mayısın üçüncü haftası (24.05.2009) ile haziranın üçüncü haftası (16.06.2009), ikinci nimf dönemi haziranın birinci haftası (08.06.2009) ile haziran'ın dördüncü haftası (26.06.2009), üçüncü nimf dönemi haziranın ikinci haftası (13.06.2009) ile temmuzun üçüncü haftası (13.07.2009), dördüncü nimf dönemi haziranın dördüncü haftası (21.06.2009) ile ağustosun birinci haftası (03.08.2009), beşinci nimf dönemi ise temmuzun ilk haftası (05.07.2009) ile ağustosun üçüncü haftası (17.08.2009) arasında görülmüştür (Şekil 3).



Şekil 2. *Ricania simulans*'ın nimf, ergin ve yumurta dönemlerinin yıl içindeki zaman dilimleri.

2010 yılında birinci nimf dönemi mayısın ikinci haftası (12.05.2010) ile haziranın ikinci haftası (8.06.2010), ikinci nimf dönemi mayısın üçüncü haftası (18.05.2010) ile haziranın son haftası (29.06.2010), üçüncü nimf dönemi haziranın ikinci haftası (16.06.2010) ile temmuzun ikinci haftası (12.07.2010), dördüncü nimf dönemi haziranın üçüncü haftası (22.06.2010) ile ağustosun ikinci haftası (09.08.2010) arasında, beşinci nimf dönemi ise haziran sonu (28.06.2010) ile ağustos ortalarına (14.08.2010) kadar görülmüştür (Şekil 3).



Şekil 3. *Ricania simulans*'ın 2009 ve 2010 yıllarındaki nimf dönemleri.

Erginler (Şekil 4 a,b) bahçe kenarlarındaki çit bitkilerinde ve kültür bitkilerinin taze sürgünlerinde beslenmektedir. Nimfler (Şekil 4 c,d,e) ilk başta bahçe kenarlarındaki çit bitkilerinde görülmekte ve buradan kültür bitkilerine geçmektedir. Nimf ve erginler taze ve sulu bitki dokularında koloni oluşturarak beslenmekte ve buralarda fumajine neden olmaktadır. Bu durum özellikle kivide son derece dikkat çekmektedir (Şekil 4 f). Erginlerin doğada yoğun olarak temmuz sonu ağustos başında bulunduğu ve çiftleşen dişilerin ağustos başından itibaren yumurtalarını otsu bitkiler ve çok yıllık bitkilerin kurumakta olan ince sürgün ve dalcıklarına bırakmaktadır. Ergin dişiler, özellikle ucu kesilmiş ve geriye doğru kurumaya başlayan dal veya sürgünleri yumurta bırakma yeri olarak tercih etmektedir. Bunun yanında özellikle asmadaki tutunucu sürgünlerin kurumaya başladığı dönem ile dişilerin yumurta bırakmaya başlamasının aynı döneme denk geldiği ve bu organlara çok yoğun yumurta bıraktıkları tespit edilmiştir. Dişi yumurtalarını kabuk altına bitki dokusu içerisine tespih tanesi gibi düzgün bir hat boyunca dizer ve bir yumurta dizisinde yaklaşık olarak 5-35 adet yumurta bulunmaktadır. Bitki dokusunda yumurta bırakılan yerlerin bir hat şeklinde tırtıklı ve yumurta bırakılan dokuların kabarık oldukları belirlenmiştir. Yumurta konulan dokular ve açılan yaralar kolayca görülebilmektedir (Şekil 4 g,h). Otsu bitkilere yumurtaların uçtan itibaren konulmaya başlandığı ve genellikle sadece yumurta konulan kısmın kuruduğu tespit edilmiştir. Ancak bazı odunsu bitkilerde yumurta konulan yan dallar veya sürgünlerin de kurummasına neden olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışma *Ricania simulans*'ın Doğu Karadeniz Bölgesi'nde dikkat çekici yoğunlukta görülmeye başlamasından ve üreticilerden gelen şikâyetler ile birlikte 2009-2011 yıllarında yürütülmüştür. Ancak 2008 yılında zararının yoğun olduğu yerlerde ön çalışmalar yürütülerek zararının *R. simulans* olduğu belirlenmiştir.

Zararının, Doğu Karadeniz'de Sarp sınır kapısından Trabzon'un Araklı ilçesine kadar olan bölgede yayıldığı, Hopa (Kemalpaşa), İyidere, Derepazarı, Rize Merkez ve Sürmene (Yeniay)'nin zararının en yoğun bulunduğu yerler olduğu belirlenmiştir. Avidzba & Bobokhidze (1982), zararının ilk olarak 1956 yılında Abhazya'da (Rusya) tespit edildiğini, Karadeniz'in subtropik sahilleri boyunca yayılarak Kafkasya'ya ulaştığını bildirmiştir.

Dzhashi et al. (1982), zararının Gürcistan'ın güneyinde, çalışmada belirlenen sonuçlara paralel bir şekilde, kışı yumurta döneminde geçirerek yılda bir döl verdiğini bildirmektedir. Ancak nimf ve erginleri Türkiye'ye göre yaklaşık bir ay önce çıkmaktadır.

Konukçuları ve konukçu tercihi ile ilgili çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre ergin ve nimflerin kültür ve yabani bitkilerin taze sürgünleri üzerinde beslendikleri tespit edilmiştir. Özellikle ilk dönemde (mayıs-haziran) nimflerin yabani böğürtlen, mürver, kivi, kıvılağaç, mandarin, fasulye ve hıyar gibi bitkilerin taze sürgünleri üzerinde buldukları ve beslendikleri belirlenmiştir. Avidzba & Bobokhidze (1982), Abhazya'da (Rusya) böğürtlen, çay, üzüm, şeftali ve diğer ürünleri tercih ettiklerini ve geniş bir konukçuya sahip olduklarını bildirmişlerdir.



Şekil 4. *Ricania simulans*; ergin (a,b), nimf (c,d,e), kivi meyve sapında beslenen nimflerin oluşturduğu fumajin (f), yumurta bırakılmış sürgünün görünümü (g), kabuk altındaki yumurtalar (h).

Zararının biyolojisiyle ilgili elde edilen somut sonuçlardan kültürel mücadeleye yönelik çıkarımlar elde edilebilir. Çünkü *R. simulans*'a karşı mekaniksel mücadele dışında herhangi bir mücadele önerilmemekte, zararının kış dönemini konukçu bitkilerin kurumuş ve kurumak üzere olan dal veya sürgünlerinde yumurta döneminde geçirmeleri nedeniyle bir sonraki yıl nimfler çıkmadan önce bahçelerin temizlenmesi ve yumurta ile bulaşık bitkilerin veya dalların imhası popülasyonu büyük ölçüde düşürecektir. Ayrıca, biyolojik mücadelesine yönelik olarak Güçlü et al. (2010)'nın Rize (Merkez)'de *R. simulans*'a karşı *Lecanicillium muscarium*'un etkinliği ile ilgili laboratuvar ve arazi şartlarında yapmış oldukları çalışmada *L. muscarium*'un nimflere etkinliğinin erginlerden daha fazla olduğu, Lm4 izolatının, *R. simulans*'ın doğal koşullarda kontrolü amacıyla kullanılabilir potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir.

Ak et al. (2013), 2009-2011 yıllarında zararının nimflerine karşı Azadirachtin (400 ml/100 L) ve Spinosad (35 ml/100 L)'i denemiş; Azadirachtin'in %30, Spinosad'ın ise %71.2-78.7'lik bir etkinlik gösterdiğini bildirmiştir. Ancak Saruhan et al. (2006)'nın bildirdiği gibi, özellikle çay zararlılarının popülasyonlarının doğal düşman baskısı altında doğal dengede olması nedeniyle, bu bölgede yetiştirilen çay ile iç içe olması nedeniyle çay zararlılarının doğal düşmanları üzerine olumsuz etki yaparak çay zararlılarının doğal dengesinin bozulabileceği düşüncesiyle üreticilere önerilmemiştir. Bunun sadece nimflerin ilk çıktığı devrede yoğun olarak bulunduğu bahçe kenarlarındaki çit bitkileri veya yabancı otlar üzerinde uygulanması önerilebilir.

Teşekkür

Çalışmanın her aşamasını destekleyen Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğüne, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne, İşbirliği ve destekleri nedeniyle ÇAYKUR Genel Müdürlüğüne, Of, Rize ve Hopa Ziraat Odası Başkanlıklarına teşekkür ederiz.

Yararlanılan Kaynaklar

- Ak, K., Ş. Güçlü & R. Sekban, 2013. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yeni bir zararlı *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae)'a karşı azadirachtin ve spinosad etki maddeli biyopestisitlerin etkinliklerinin belirlenmesi. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 6 (1): 10-14.
- Avidzba, N.S. & Z. M. Bobokhidze, 1982. Biophenology of the Japanese leafhopper. Zashchita Rastenii, No:6, 36 pp.
- Charles, J.G. & D.J Allan, 2004. Passionvine hopper, *Scolypopa australis* (Walker) (Hemiptera: Ricaniidae), egg parasitism by Aphelinidae (Hymenoptera) in New Zealand. New Zealand Entomologist 27: 83-89.
- Dzhashi, V. S., A. A. Nikolaishvili & T. Y. Demetradze, 1982. The Japanese leafhopper - a pest of bay. Zashchita Rastenii, No: 2, 57 pp.
- Imura, O., 2003. Herbivorous arthropod community of an alien weed *Solanum carolinense* L. Appl. Entomol. Zool. 38 (3): 293-300.
- Güçlü, Ş., K. Ak, C. Eken, H. Akyol, R. Sekban, B. Beytut & R. Yıldırım, 2010. Pathogenicity of *Lecanicillium muscarium* against *Ricania simulans*. Bulletin of Insectology, 63 (2): 243-246.
- Kontaş, E., 2012. Türkiye ve dünyada kivi üretimi. Tarım Türk Dergisi, 38: 90-92.
- Logan, D.P., P.A. Allison & K. Stannard, 2002. Selection of wild hosts for feeding by Passion vine hopper, *Scolypopa australis* (Walker) (Hemiptera: Ricaniidae) in the Bay of PLENTY. New Zealand Plant Protection 55:368-373.
- Paksoy, S. & H. Memiş, 2006. "Rize'de tarım sektörü, tarıma dayalı sanayiler ve çay, 129-135". Rize Valiliği, I. Rize Sempozyumu (16-18 Kasım 2006). Rize, 718 s.
- Saruhan, İ., C. Tuncer & K. Ak, 2006. Çay zararlıları. Rize Valiliği, I. Rize Sempozyumu (16-18 Kasım 2006), Rize, 718 s.
- Tsaur, S. C., 2005. Some Fulgoroids (Insecta: Hemiptera) collected on Turtle Island, Taiwan. Zoological Studies 44 (1): 1-4.
- Yavuz, G.G., 2007. Fındık. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü-BAKIŞ. Sayı: 9, Nüsha: 8.

Orijinal araştırma (Original article)

Bademde yüksek konsantrasyonlarda ozon gazı uygulamasının *Plodia interpunctella* (Hübner) ve *Ephestia cautella* (Walker)' ya karşı etkinliği

Efficacy of gaseous ozone at high concentrations against *Plodia interpunctella* (Hübner) and *Ephestia cautella* (Walker) in Almond

Ali A. IŞIKBER^{1*} M. Serdar ÖZTEKİN² K. Sinan DAYISOYLU³
Ahmet D. DUMAN⁴ Selda EROĞLU¹

Summary

In this study efficacy of gaseous ozone at high concentrations and short exposure time against all life stages of *Plodia interpunctella* (Hübner) ve *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) in almond was investigated under laboratory conditions. All life stages of *E. cautella* and *P. interpunctella* placed at the top and bottom position of 1.3 kg almond in fumigation chamber were exposed to two different concentrations (8.35 and 33.33 mg/l) of ozone flush treatment at 30 minute intervals for 6 hour. The results of biological tests indicated that ozone treatment at 33.33 mg/l concentration resulted in % 100 or nearly % 100 mortalities of only adult and pupa stage of *E. cautella* and all life stages of *P. interpunctella* placed at top position of the almond. However, ozone treatments at lower concentration (8.35 mg/l) caused nearly % 100 mortalities of only adult and pupa stage of *P. interpunctella* at placed at top position of the almond. It was clear that ozone treatments at low concentration (8.35 mg/l) resulted in significantly lower mortalities of all life stages of *E. cautella* and *P. interpunctella* than those at high concentration (33.33 mg/l). Generally, in all ozone treatments the mortalities of tested insects placed at top position of the almond were higher than those placed at bottom position of the almond. Notably, it was hard to kill the larvae and eggs of *E. cautella* and *P. interpunctella* placed at bottom position of the almond. Moreover, it was found that *E. cautella* was more tolerant to ozone treatments than *P. interpunctella* except their egg stage. In conclusion, this study shows that ozone treatment at high concentrations and short exposure time could not be effective alternative to methyl bromide for the rapid disinfestations of the almonds since it did not cause the complete mortality of all life stages of *E. cautella* and *P. interpunctella* on almond.

Keywords: Gaseous ozone, almond, fumigant, *Ephestia cautella*, *Plodia interpunctella*

Özet

Bu çalışmada laboratuvar koşullarında bademde kısa uygulama süresinde ve yüksek konsantrasyonda ozon gazı uygulamasının *Ephestia cautella* (Walker) ve *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae)' nin tüm biyolojik dönemlerine karşı biyolojik etkinliği araştırılmıştır. Fümigasyon çemberi içerisinde 1.3 kg kabuklu bademin üst ve alt kısmına yerleştirilen *E. cautella* ve *P. interpunctella*'nin tüm biyolojik dönemleri 6 saat süresince yarım saat aralıkla iki farklı konsantrasyonda (8.35 and 33.33 mg/l) ozon gazı sirkülasyonuna maruz bırakılmıştır. Biyolojik testler sonucunda 33.33 mg/l konsantrasyonda ozon gazı uygulamasında ürünün üst kısmına yerleştirilen *E. cautella*' nin yalnızca ergin ve pupaların, *P. interpunctella*'nin ise tüm biyolojik dönemlerin 100 % ya da 100 % yakın ölümleri elde edilmiştir. Bunun yanında daha düşük konsantrasyonda (8.35 mg/l) ozon gazı uygulamasında ise yalnızca ürünün üst kısmına yerleştirilen *P. interpunctella*' nin ergin ve pupaların 100 % yakın ölümleri elde edilmiştir. Açık bir şekilde düşük konsantrasyonda (8.35 mg/l) ozon gazı uygulamasında *E. cautella* ve *P. interpunctella*'nin tüm biyolojik dönemlerine ait ölüm oranları yüksek konsantrasyonda (33.33 mg/l) ozon gazı uygulamasındakilerden istatistiki olarak önemli derecede daha düşük olduğu görülmüştür. Genel olarak tüm ozon gazı uygulamasında ürünün üst kısmına yerleştirilen böceklerin ölüm oranları alt kısma yerleştirilen böceklerinkinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Özellikle ürünlerin alt kısmına yerleştirilen *E. cautella* ve *P. interpunctella* larvalarını ve yumurtalarını tamamen öldürmenin çok güç olduğu görülmüştür. Ayrıca, bu çalışmada yumurta dönemi hariç *E. cautella*'nin genellikle *P. interpunctella*'ya göre ozon gazına daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak yüksek konsantrasyonda ozon gazı uygulamasının kısa uygulama süresinde bademde *E. cautella* ve *P. interpunctella*'nin tüm biyolojik dönemlerini tamamen kontrol edememesinden dolayı ozon gazının ürünlerin böcek bulaşmalarından hızlı bir şekilde arındırılmasında metil bromide potansiyel bir alternatif olamayacağı görülmektedir.

Anahtar sözcükler: Ozon gazı, badem, fümigant, *Ephestia cautella*, *Plodia interpunctella*

¹ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 46100 Kahramanmaraş, Türkiye

² Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Makineleri Bölümü, 01330 Adana, Türkiye

³ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 46100 Kahramanmaraş, Türkiye

⁴ Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Hatay, Türkiye

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: isikber@ksu.edu.tr

Alınış (Received): 20.02.2015 Kabul ediliş (Accepted): 20.03.2015 Çevrimiçi Yayın Tarihi (Published Online): 13.04.2015

Giriş

Badem yetiştiriciliğinin, dünya kabuklu meyve üretimi içerisinde önemli bir yeri vardır. Dünyadaki toplam badem alanı 2000 yılında 1.7 milyon hektar iken, 2009 yılında %7 artışla 1.8 milyon hektara yükselmiştir. İspanya, dünya badem üretiminde % 34' lük pay ile ilk sırada yer almaktadır (Yavuz, 2011). İspanya'yı sırasıyla Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Tunus ve İran izlemektedir. Türkiye, dünya kabuklu badem üretiminde 2012 yılı itibarıyla 75 bin ton üretimle % 3.87'lik bir paya sahiptir (Anonymous, 2012). Bademin depolanması esnasında depo zararlılarının bulaşması badem sektöründe önemli sorunlara neden olabilmektedir. Depolama sırasında saklama koşullarına bağlı olmakla birlikte nitelik ve nicelik kayıpları büyük oranda depo zararlıları sonucu ortaya çıkmaktadır. Sert kabuklu meyvelerin depolanması sırasında Kuru Meyve Güvesi (*Plodia interpunctella* (Hübner), Lepidoptera: Pyralidae), Kuru İncir Kurdu (*Ephestia cautella* (Walker), Lepidoptera: Pyralidae) ve İç Fındık Güvesi (*Paralipsa gularis* Zell.; Lepidoptera: Pyralidae) gibi böcek bulaşmaların ürün kalitesini düşürdüğü bilinmektedir (Yasan & Kiper, 1972; Ferizli & Emekci, 2010). Özellikle *P. interpunctella* ve *E. cautella* meyvede beslenerek meyve kalitesini düşürürler. Ayrıca ürünün üzerine ipeğimsi bir ağ örerek meyvelerin kirlenmesine neden olurlar (Damarlı et al., 1997). Buna bağlı olarak badem ihracatı esnasında böcek veya böcek kalıntılarından dolayı ürünlerin geri gönderildiği ve böylece hesaplanmayan kayıpların oluşabildiği görülmektedir.

Böcekleri hızlı şekilde öldürmesinden, geniş spektrumlu aktiviteye ve düşük maliyete sahip olmasından dolayı depolanmış ürün zararlıların kontrolünde yaygın olarak Metil bromit (MeBr) uygulanmakta (Fields & White, 2002) iken MeBr'in ozon tabakasını inceltici etkisi nedeni ile kullanımına yasaklanmıştır. Montreal Protokolü çerçevesinde MeBr kullanımı gelişmiş ülkelerde 2005, Türkiye'de 2007 yılından itibaren bazı karantina ve sevkiyat öncesi uygulamaları dışında yasaklanmış, gelişmekte olan ülkelerde ise 2015 yılından itibaren uygulamanın başlaması beklenmektedir (MBTOC, 1998; Bell, 2000; Schneider et al., 2003; Anonymous, 2004). Sonuç olarak MeBr kullanımının yasaklanması ve çevreye olan etkisi nedeni ile MeBr'ün yerini alacak alternatif yöntemlerin araştırılmasının gerekliliği giderek önem kazanmaya başlamıştır. Bu bağlamda kimyasal (fosfin, karbonil sülfid, sülfürlü florit, karbon disülfid, ozon, etil format, metil iyodit, vb.) ve kimyasal olmayan (değiştirilmiş atmosfer, yüksek basınç, sıcak/soğuk uygulamaları, radyo frekansı, uzun dalga enerjisi, radyasyon, vb.) birçok yöntem denenmiş veya denenmektedir (Johnson et al., 2000; Zettler & Arthur, 2000, Fields & White, 2002; Johnson et al., 2003; Schneider et al., 2003; Aksoy et al., 2003). MeBr'in yerini alacak kimyasal ve kimyasal olmayan önerilen birçok alternatiflerin olmasına rağmen her biri MeBr'in direk yerini almasını engelleyebilen etkinlik, maliyet, penetrasyon ve kalıntı bakımından kısıtlamalara sahiptir.

Ozon üç atoma sahip oksijen (O₃) molekülünün bir formudur. Doğada gök gürültüsünü takiben havada taze temiz kokuyla karakterize edilen mavimsi veya renksiz bir gaz olarak üretilir. Normal atmosfer sıcaklığı ve basıncında dengeli olmayan bir gaz olup, 35°C sıcaklıkların üstünde hızlıca oksijene dönüşür. Bu nedenle kullanım anında üretilmek zorunda olup, üretildikten sonra depolanması olanaksızdır. Ozon ticari olarak çoğunlukla bir korona akım jeneratörü tarafından saf oksijenden veya havadan üretilir (Kim et al., 2003). Ozon, çeşitli yararlı uygulamaları olan etkili bir oksidandır. Ozon, suyun dezenfeksiyonunda, koku, tat ve rengin giderilmesinde, sudaki pestisitlerin, inorganik ve organik bileşiklerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Ozonun tarımsal alandaki uygulamaları ise; sebze ve meyvelerin korunması ve depolanması, kolay bozulur ürünlerin yüzey dekontaminasyonu ve işleme ekipmanları, suyun ve paketlenme materyallerinin dezenfeksiyonu şeklinde özetlenebilir (Mendez et al., 2003). Gaz formundaki ozon güçlü bir sanitasyon ve fumigasyon maddesidir. Ozonun gıda

uygulamalarında kullanımına yönelik çalışmalardan bazıları; proses suyu sterilizasyonu ve geri dönüşümü (Xu, 1999), bakteriyel gelişimin önlenmesi (Kim & Yousef, 2000; Achen & Yousef, 2001; Sharma et al., 2002), küflerden kaynaklanan bozulmaların önlenmesi (Perez et al., 1999; Palou et al., 2002), meyve ve sebzelerin yıkanması ve depolanması (Escriche et al., 2001; Beltran et al., 2005), kuru incirlerde mikrobiyel yükün azaltılması (Öztekin et al., 2006), paslanmaz çelik yüzeylerdeki mikrobiyel popülasyonun azaltılması (Güzel-Seydim et al., 2004), depo zararlılarının kontrolü (Kells et al., 2001; Mendez et al., 2003; Isikber et al., 2007), pestisit ve kimyasal kalıntıların parçalanması (Ong et al., 1996; Hwang et al., 2001), kanatlı ve et ürünlerinde mikroorganizmaların kontrolüdür (Kim et al., 2003; Meunpol et al., 2003).

Ozon gazı genellikle bazı depolanmış tahıl zararlılarının mücadelesinde kullanılmıştır. Mendez et al. (2003) böcek bulaşık mısırı 3 gün süreyle 50 ppm ozon gazıyla fümige etmişlerdir. Bu uygulama sonunda Mısır biti (*Sitophilus zeamais* Motsch., Coleoptera: Curculionidae)'nin erginleri, Kuru Meyve Güvesi (*Plodia interpunctella* Hübn.)'nin larvaları ve Un Biti (*Tribolium castaneum* Herbst., Coleoptera: Tenebrionidae)'nin erginleri üzerinde % 92-% 100 arasında değişen ölüm oranlarına neden olduğunu tespit etmişlerdir. Erdman (1980) 45 ppm ozon konsantrasyonuna maruz bırakılan *Tribolium confusum* Jacquelin du Val ve *T. castaneum*'un erginlerinde yüksek ölümlerin gerçekleştiğini bildirmiştir. Leesch (2003) laboratuvar koşullarında tek başına yüksek konsantrasyonda (300 ppm) ve kısa uygulama süresinde (4 saat) ozon gazı uygulamasının *P. interpunctella*'nin pupalarında yüksek oranda ölüme neden olduğunu bildirmiştir. Isikber & Öztekin (2009) iki depolanmış ürün zararlısı *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) ve *T. confusum*'un ozon gazına karşı duyarlılıklarını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda *E. kuehniella* ve *T. confusum*'un gelişme dönemlerinin ozon gazına karşı duyarlılıklarında önemli farklılığın olduğunu ve genel olarak *T. confusum*'un *E. kuehniella*'ya göre ozon gazına daha dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir. Athanassiou et al. (2008) 2 saat süreyle yüksek ozon konsantrasyonuna (115 ppm) maruz bırakılan *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) ve *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) erginlerinin yaklaşık % 60'nın ve 4 saat süreyle aynı konsantrasyonda ozon uygulamasında ise % 100'nün öldüğünü bildirmişlerdir. Ozon ile yürütülen tüm bu çalışmalar sonucunda ozon gazının depolanmış ürün zararlılarının ölümüne neden olduğunu, ancak böceklere karşı etkinliğinin böcek türlerine, böcek dönemlerine, uygulama yapılan ürüne ve uygulama şekline göre farklılıklar gösterdiği görülmektedir.

Sert kabuklu meyve sanayisi, hasat sonrası böcek bulaşmasını önlemek için kimyasal fumigant olarak yalnızca fosfin kullanmaya devam etmektedir. Fosfin kullanımı, karsinojenik etkisinden (Garry et al., 1990; Alavanja et al., 1990), dayanıklılık sorunundan (Champ & Dyte, 1976; Zettler et al., 1989; Zettler & Cuperus, 1990) ve uzun maruz bırakma süresine (6 gün veya daha uzun süre) gereksinim duyulmasından dolayı tehdit altındadır. Ayrıca, bu uzun maruz bırakma süresi fosfinin karantina uygulamalarında kullanımını mümkün kılmamaktadır. Metil bromidin kaybedilmesi ile ürünlerden böcek bulaşmasını hızlı şekilde kontrol edebilecek mevcut alternatiflerin bulunmamasından dolayı kuru meyve ve sert kabuklu meyve sanayisi üzerine önemli derecede olumsuz etkiye sahip olmuştur. Bu yüzden hızlı böcek ölümlerinin gerekli olduğu (bir günden daha kısa maruz bırakma süresi) karantina uygulamaları için yeni fümigantların geliştirilmesi kritik öneme sahiptir. Mevcut çalışmada bademde metil bromide alternatif olarak kısa maruz bırakma süresinde yüksek konsantrasyonlarda ozon gazı uygulamasının *E. cautella* ve *P. interpunctella*'nin tüm biyolojik dönemlerine (yumurta, larva, pupa ve ergin) karşı biyolojik etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

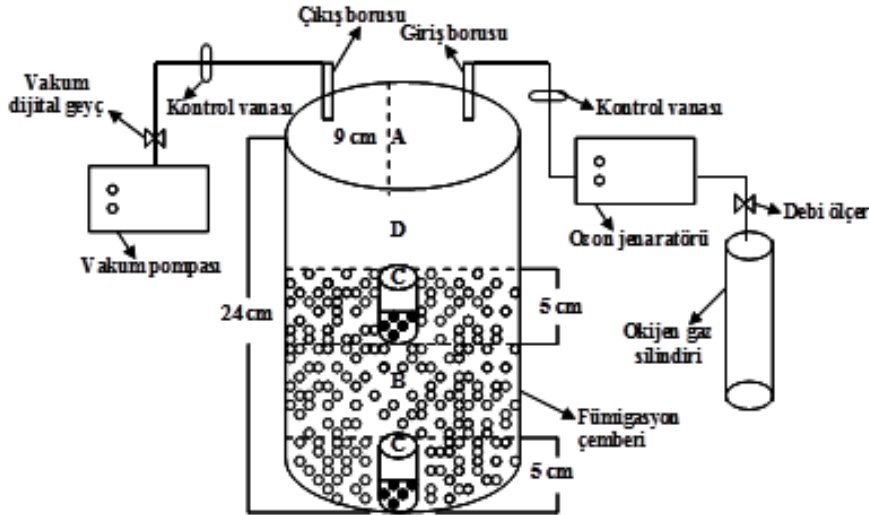
Materyal

Ozon üretim sistemi

Çalışmada ürünlü ortamda yüksek ozon konsantrasyon uygulaması için kullanılan ozon uygulama seti 5 üniteden oluşmaktadır (Şekil 1). Bunlar;

1. Saf oksijen kullanılması durumunda 10 g/h, kuru hava kullanılması durumunda 5 g/h ozon üretme kapasitesine sahip bir *ozon jeneratörü* (OZO 1VTTL – Ozomax, Kanada)
2. Oksijen gazı akış hızının ayarlanmasını sağlayan bir *elektronik debi ölçer (flowmetre)*,
3. Fumigasyon çemberi içerisindeki havayı çekmeye yarayan *vakum pompası*,
4. Ürün ve böceklerin yerleştirildiği ve ozon fümigasyonun yapıldığı *ozon fumigasyon çemberi*,
5. Oksijen tüpü

Ürünlü ortamda yüksek konsantrasyonda ozon uygulaması ile ilgili denemeler 9 cm çapındaki metal kapaklı 3 litrelik cam kavanoz içerisinde yürütülmüştür. Bu kavanozların metal kapakları üzerinde 3 cm uzunluğunda 0.5 cm çapında iki metal rekor ile dışarı açılan iki delik bulunmaktadır. Her metal rekor üzerinde 5 cm uzunluğunda silikon hortum yerleştirilmiştir. Bu deliklerin ilki ozon jeneratörüne bağlanmış ve ikincisinin ucu vakum pompasına bağlanmıştır (Şekil 1). Hortumun bir ucu ürünlü ortamdaki havanın alınması sağlanırken diğer delikten ozon gazının cam kavanoz içerisine verilmesi sağlanmıştır. Böylece ozon gazı istenilen aralıklarla cam kavanoz içerisinde sirküle edilmiştir. Ozon gaz konsantrasyonunun ayarlanması ise saf oksijen gazının akış hızına göre ayarlanmıştır. Oksijen tüpü ile ozon jeneratörü arasına bir debi ölçer (flow metre) yerleştirilmiştir ve oksijen gazının akış hızı elektronik debi ölçer tarafından yönetilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Ürünlü ortamda ozon gazı fümigasyon sistemi. A: 3'lük fümigasyon çemberi; B: Fümigasyon çemberi içerisinde 1.3 kg ürün; C: Böcekleri içeren ağzı tülle kaplı küçük cam şişeler; D: Fümigasyon çemberi içerisinde kalan boş hacim.

Biyolojik testlerde kullanılan ürün

Biyolojik testlerde % 10-12 ürün nemi içeren kabuklu Ferraduel badem çeşidi (*Prunus amygdalus* Batsch) kullanılmıştır.

Biyolojik testlerde kullanılan böcek türleri

Biyolojik testlerde *E. cautella* ve *P. interpunctella*'nın tüm biyolojik dönemleri kullanılmıştır. Biyolojik testlerde kullanılan *E. cautella* kültürünün ana materyali Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Laboratuvar'ından temin edilmiştir. Biyolojik testlerde kullanılan *P. interpunctella* kültürünün ana materyali Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Laboratuvar'ından temin edilmiştir.

Yöntem

Ephestia cautella ve *Plodia interpunctella*'nın yetiştirilmesi

Ephestia cautella laboratuvarında 10:1:2 oranında buğday kırmısı, kuru maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ve gliserin karışımından oluşan besin ortamında yetiştirilmiştir (Rahman et al., 2004). *Plodia interpunctella* ise 2: 1:0.25: 0.50: 0.25: 0.25 oranında kepek, mısır unu, kuru maya, bal, süt tozu ve gliserin karışımından oluşan besin ortamında yetiştirilmiştir (Ozkan, 2006). Çalışmada kullanılan buğday kırmısı, mısır unu ve kepek -17 °C sıcaklıktaki derin dondurucuda 4 gün süre ile tutularak olası zararlı bulaşıklılığı riski ortadan kaldırılmıştır. Hazırlanan besin 3 litrelik cam kavanozlara ilave edilmiş ve besin üzerine yaklaşık 300-350'şer adet yeni bırakılmış yumurta aktarılmıştır. Kavanozların kapaklarına hava girişini sağlamak ve başka zararlıların bulaşmasını önlemek amacıyla tül ile kapatılmıştır. *Ephestia cautella* ve *P. interpunctella* kültürü, 26±1°C sıcaklık ve % 65±5 orantılı nem içeren böcek yetiştirme odasında yapılmıştır.

Ürünlü ortamda yürütülen biyolojik testler

Altı saat süreyle 30 dakika arayla ürünlü ortamda test edilecek böcekler ozon gazı uygulaması için 1.3 kg badem kullanılmıştır. Fumigasyon çemberi içerisine 1.3 kg ürün dökme olarak yerleştirilmiştir. Biyolojik testler için *E. cautella* ve *P. interpunctella*'nın 50 adet yumurta, 20 adet larva, pupa ve ergin kullanılmıştır. Biyolojik testlerde *P. interpunctella* ve *E. cautella*'nın 1-2 günlük erginleri, pupaları ve yumurtaları ve son dönem larvaları (28-32 gün) kullanılmış olup tüm dönemlerde bireyler 50 ml' lik şişelere konulmuştur. Larvalar için şişelere hacimlerinin 1/3 kadar (50 ml'lik şişeler için 10 g) taze besin eklenmiştir. Ozon gazının tüplere girebilmesi ve şişelere konan böceklerin kaçmasının engellenmesi için ağızları tülle kapatıldıktan sonra 1.3 kg kabuklu bademin üst ve alt kısmına yerleştirildikten sonra fumigasyon çemberinin kapakları kapatılmıştır. Test edilecek böceklerin ve 1.3 kg ürünün bulunduğu fumigasyon çemberi içerisinde 10±2 mm Hg düşük basınç (vakum) sağlanana kadar ortamdaki hava vakum pompası (KNF, Almanya) yardımıyla tamamen çekilmiştir (Şekil 1). Fumigasyon çemberi içerisinde 10±2 mm Hg düşük basınç (vakum) sağlandıktan sonra iki farklı yüksek konsantrasyonda (8.35 mg/l (3895 ppm) ve 33.33 mg/l (15545 ppm) ozon gazı atmosferik basınç seviyesine (760 mm Hg) gelene kadar ürün içerisine sirküle edilmiştir. Bu ozonlama işlemi her 30 dakika aralayla toplam olarak 12 kez tekrar edilmiştir. Kesikli ozon uygulaması 26±1°C sıcaklık, 65±5% orantılı nem içeren iklim odalarında gerçekleştirilmiştir. Ozon gazı uygulamasından sonra ürün içerisine yerleştirilen böcekleri içeren şişeler çıkarılmış ve biyolojik testler kısmında belirtilen yöntemlere göre ölü-canlı sayımları yapılmıştır. Denemeler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş olup her bir deneme için 3 kontrol bırakılmıştır. Her uygulamadan sonra biyolojik testlerde kullanılan badem örnekleri değiştirilerek yeni ürün kullanılmıştır.

Verilerin değerlendirilmesi ve analizi

Ozon uygulanmış böcekler % 65±5 nem ve 26±1°C' de iklim odasında tutulmuştur. Ozon uygulamasından sonra yumurtalar cam şişeden çıkartıldıktan sonra fırça yardımıyla mikadan yapılmış küçük delikler içeren hücreler içerisine yerleştirilmiştir. Yumurtalar ve pupalar için bir hafta sonra, erginler için 1 gün sonra ve larvalar için ise pupa olduktan sonra ölü-canlı sayımı yapılmıştır. Ürünlü ortamda ozon gazının *E. cautella* ve *P. interpunctella* üzerindeki etkisini belirlemek için yürütülen biyolojik testler sonucunda elde edilen canlı ve ölü birey sayılarını kullanılarak her uygulama için ölüm oranları (%) hesaplanmıştır. Her uygulama için elde edilen ölüm oranları Arcsin transformasyonuna tabi tutulmuştur. Buradan elde edilen verilere çift yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve ortalamalar % 5 önem seviyesinde çoklu karşılaştırmalı LSD testine göre kıyaslanmıştır (SAS Ins., 1985).

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları ozon konsantrasyonunun *E. cautella*'nın tüm biyolojik dönemlerine ait ölüm oranları üzerine istatistiksel olarak önemli etkiye sahip olduğunu göstermiştir ($F_{2, 54} = 220.68$, $P < 0.0001$). Benzer olarak ürünün içerisine böceğin yerleştirildiği pozisyon (ürünün altı ve üstü) da *E. cautella*'nın tüm gelişme dönemlerine ait ölüm oranları üzerine istatistiksel olarak önemli etkiye sahip olmuştur ($F_{1, 54} = 27.94$, $P < 0.0001$). Ürünün üst kısmına yerleştirilen 8.35 mg/l konsantrasyonda ozon gaz uygulamasına ait *E. cautella*'nın tüm biyolojik dönemlerine (ergin, larva ve yumurta) ait ölüm oranları 33.33 mg/l konsantrasyonda ozon gaz uygulamasına ait ölüm oranlarından önemli derecede daha düşük olduğu görülmüştür. 33.33 mg/l konsantrasyonda ozon gaz uygulaması ürünün üst kısmına yerleştirilen larva ve yumurta dönemi hariç diğer dönemlerin (ergin ve pupa) %100 yakın ölümüne neden olmuştur. Bunun yanında 33.33 mg/l konsantrasyonda ozon gaz uygulaması kabuklu bademin hem üst hem de alt kısmına yerleştirilen larvaların düşük ölüm oranlarına (sırasıyla % 36.7 ve % 13.33) sahip olmuştur. Hem 8.35 mg/l hem de yüksek konsantrasyonda ozon gaz uygulaması özellikle kabuklu bademin alt kısmına yerleştirilen larvaların ölüm oranının çok düşük olduğu görülmüştür. Kabuklu bademin içerisinde böceğin yerleştirildiği pozisyon 8.35 mg/l ozon uygulamasında böceğin ergin ve pupaların ve 33.33 mg/l ozon uygulamasında ise ergin ve larvaların ölüm oranları üzerine istatistiki olarak önemli etkiye sahip olmuştur (Çizelge 1). Genel olarak tüm ozon uygulamalarında kabuklu bademin üst kısmına yerleştirilen böcekler için ölüm oranları alt kısma yerleştirilen böceklerinkinden daha yüksek olduğu görülmüştür.

Çizelge 1. Altı saat süresince yarım saat aralıklarla iki farklı konsantrasyonda ozon gazı sirkülasyonuna maruz bırakılan 1.3 kg kabuklu bademin iki farklı kısmına (üst ve alt kısma) yerleştirilen *Ephesia cautella*'nın tüm biyolojik dönemlerine ait ölüm oranları

Uygulama konsantrasyonu	Böcek pozisyonu	Ölüm oranı (%)±S.hata				F ve P değeri	LSD değeri
		Ergin	Larva	Pupa	Yumurta		
8.35 mg/l (3895 ppm)	Üst	78.3±3.3 Ba	13.33±3.3 Bc	75±5 Ba	46.7±2.4 Bb	$F_{3,8}=57.2$ $P<0.0001$	8.235
	Alt	11.7±1.7 Cc	10±2.9 Bc	81.7±1.7 ABa	44±2 Bb	$F_{3,8}=145.3$ $P<0.0001$	5.919
33.33 mg/l (15545 ppm)	Üst	98.3±1.7 Aa	36.7±4.4 Ac	95±2.89 Aa	64±2 Ab	$F_{3,8}=36.4$ $P<0.0001$	12.273
	Alt	20±5 Cc	13.33±3.3 Bc	91.7±4.4 Aa	58.7±1.3 ABb	$F_{3,8}=37.6$ $P<0.0001$	13.525
Kontrol	Üst	0±0 D	5±1.7 C	5±2.9 C	2.7±2.7 C	-	-
	Alt	0±0 D	5±1.7 C	5±2.9 C	2.7±2.7 C	-	-
F ve P Değeri	-	$F_{5,12}=188.3$ $P<0.0001$	$F_{5,12}=15.2$ $P<0.0001$	$F_{5,12}=46.5$ $P<0.0001$	$F_{5,12}=43.9$ $P<0.0001$		
F ve P Değeri	-	7.806	9.803	15.440	10.161		

Verilere iki yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmış olup, ortalamalar arasındaki farklılıklar %5 önem seviyesinde LSD testine göre ortaya konmuştur. Aynı sütunda bulunan farklı büyük harfler ve aynı satırda bulunan farklı küçük harfler istatistiki olarak birbirinden farklıdır.

Böceğin biyolojik dönemlerinin ozon gazı uygulamasına karşı hassasiyetleri arasında da istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu bulunmuştur ($F_{3, 54} = 45.99$, $P < 0.0001$). Hem 8.35 mg/l hem de 33.33 mg/l ozon gaz uygulamasında kabuklu bademin üst kısmına yerleştirilen *E. cautella*'nın pupaların ve erginlerin ölüm oranları diğer dönemlerinkinden istatistiki olarak önemli derecede daha yüksek bulunurken hem 8.35 mg/l hem de 33.33 mg/l ozon gaz uygulamasında kabuklu bademin alt kısmına yerleştirilen *E. cautella*'nın yalnızca pupaların ölüm oranları diğer dönemlerinkinden istatistiki olarak önemli derecede daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 1). Tüm ozon uygulamalarında larva dönemine ait ölüm oranları ise diğer dönemlerin ölüm oranlarından istatistiki olarak önemli derecede daha düşük bulunmuştur. Hem düşük hem de yüksek konsantrasyonda ozon gaz uygulamasında kabuklu bademin üst kısmına yerleştirilen *E. cautella*'nın ergin ölüm oranları yumurta ölüm oranlarından istatistiki daha

yüksek bulunurken kabuklu bademin üst kısmına yerleştirilen *E. cautella*'nın ergin ölüm oranları yumurta ölüm oranlarından istatistiki daha düşük bulunmuştur (Çizelge 1). Bu iki dönemin ölüm oranları larvalarinkinden yüksek ancak pupalarinkinden düşük bulunmuştur.

Ephestia cautella ile ilgili yürütülen çalışmada elde edilen sonuçlara benzer olarak ozon konsantrasyonunun *P. interpunctella*'nın tüm gelişme dönemlerine ait ölüm oranları üzerine istatistiksel olarak önemli etkiye sahip olduğu görülmüştür ($F_{2, 54} = 521.3$, $P < 0.0001$). Benzer olarak ürünün içerisine böceğin yerleştirildiği pozisyon (ürünün altı ve üstü) da *P. interpunctella*'nın tüm gelişme dönemlerine ait ölüm oranları üzerine istatistiksel olarak önemli etkiye sahip olmuştur ($F_{1, 54} = 45.78$, $P < 0.0001$). Açık bir şekilde ürünün üst kısmına yerleştirilen 8.35 mg/l ozon gaz uygulamasında *P. interpunctella*'nın yalnızca yumurtalarına ait ölüm oranları 33.33 mg/l ozon gaz uygulamasına ait ölüm oranlarından önemli derecede daha düşük olduğu görülürken *P. interpunctella*'nın diğer dönemlerin (ergin, larva ve pupa) ölüm oranları arasında önemli farklılıklar bulunmamıştır (Çizelge 2.). Bunun yanında 33.33 mg/l konsantrasyonda ozon gaz uygulaması ürünün üst kısmına yerleştirilen tüm biyolojik dönemlerin %100 ya da %100 yakın ölümüne neden olurken 8.35 mg/l konsantrasyonda ozon gaz uygulaması ise yalnızca ürünün üst kısmına yerleştirilen ergin ve pupaların %100 yakın ölümüne neden olmuştur. Hem 8.35 mg/l hem de 33.33 mg/l konsantrasyonda ozon gaz uygulaması kabuklu bademin alt kısmına yerleştirilen yumurtaların üzerine düşük etkiye sahip olduğu görülmüştür. Genel olarak kabuklu bademin üst kısmına yerleştirilen böceklerin ölüm oranları alt kısma yerleştirilen böceklerinkinden daha yüksek ölüm oranlarına sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 2. Altı saat süresince yarım saat aralıklarla iki farklı konsantrasyonda ozon gazı sirkülasyonuna maruz bırakılan 1.3 kg kabuklu bademin iki farklı kısmına (üst ve alt kısma) yerleştirilen *Plodia interpunctella*'nın tüm biyolojik dönemlerine ait ölüm oranları

Uygulama konsantrasyonu	Böcek pozisyonu	Ölüm oranı (%)±S.hata				F ve P değeri	LSD Değeri
		Ergin	Larva	Pupa	Yumurta		
8.35 mg/l (3895 ppm)	Üst	96.7±3.3 ABa	83.33±3.3 ABb	96.7±1.7 ABa	42.7±3.5 Bc	$F_{3,8} = 23.1$ $P = 0.0003$	13.434
	Alt	86.7±6.7 Ba	68.3±12 Bb	78±1.7 Ca	29.3±21.3 Cc	$F_{3,8} = 8.3$ $P = 0.0078$	12.016
33.33 mg/l (15545 ppm)	Üst	100±0 Aa	93.3±3.3 Ab	100±0 Aa	93.7±2.9 Ab	$F_{3,8} = 4.98$ $P = 0.0309$	11.598
	Alt	90±5 Ba	76.7±3.3 Bb	88.3±1.7 BCab	48.7±5.2 Bc	$F_{3,8} = 17.9$ $P = 0.0007$	9.877
Kontrol	Üst	0±0 Cb	15±5.8 Ca	5±2.9 Dab	7.3±1.8 Da	-	-
	Alt	0±0 Ca	15±5.8 Ca	5±2.9 Da	7.3±1.8 Da	-	-
F ve P değeri	-	$F_{5,12} = 76.2$ $P < 0.0001$	$F_{5,12} = 21.5$ $P < 0.0001$	$F_{5,12} = 90.6$ $P < 0.0001$	$F_{5,12} = 83.9$ $P < 0.0001$		
F ve P değeri	-	14.716	15.641	11.367	7.457		

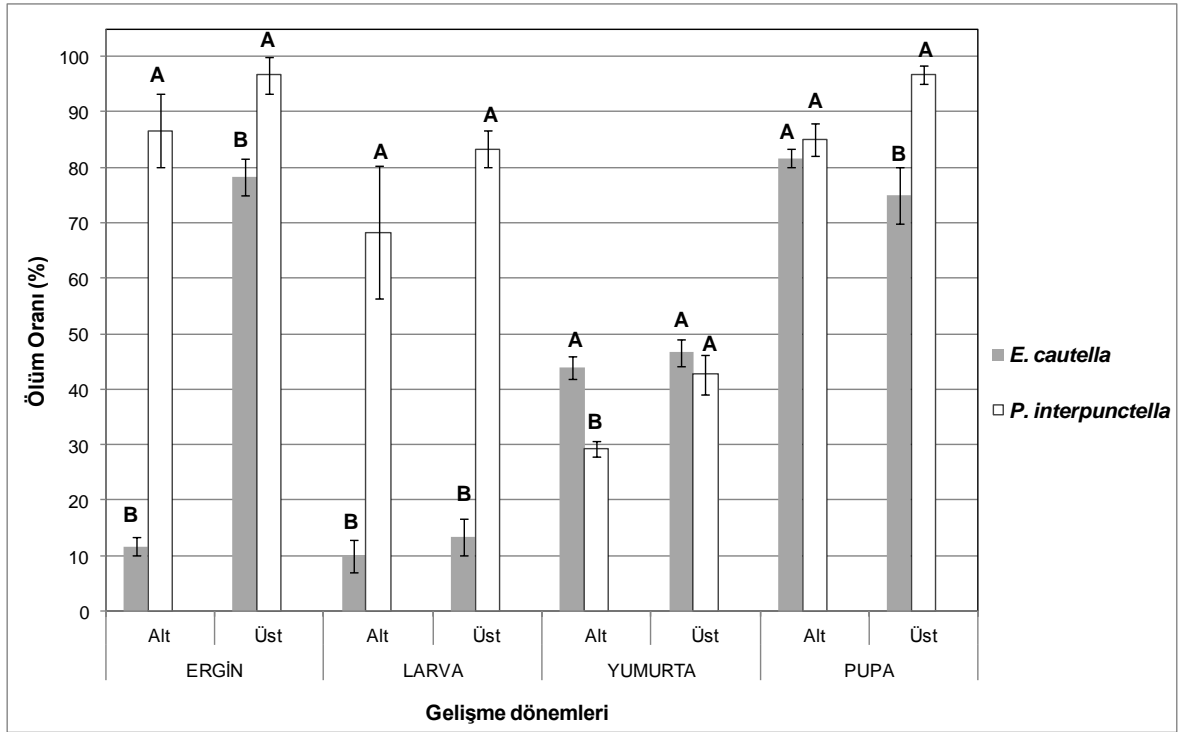
Verilere iki yönlü varyans analizi (ANAVO) uygulanmış olup, ortalamalar arasındaki farklılıklar %5 önem seviyesinde LSD testine göre ortaya konmuştur. Aynı sütunda bulunan farklı büyük harfler ve aynı satırda bulunan farklı küçük harfler istatistiki olarak birbirinden farklıdır.

Plodia interpunctella'nın biyolojik dönemlerinin ozon gazı uygulamasına karşı hassasiyetleri arasında da istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu bulunmuştur ($F_{3, 54} = 22.81$, $P < 0.0001$). Hem 8.35 mg/l hem de 33.33 mg/l ozon gaz uygulamasında kabuklu bademin hem üst hem de alt kısmına yerleştirilen *P. interpunctella*'nın pupaların ve erginlerin ölüm oranları diğer dönemlerinkinden istatistiki olarak önemli derecede daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 2). Tüm ozon uygulamalarında (ürünün üst kısmında 33.33 mg/l konsantrasyonda ozon gaz uygulaması hariç) yumurta dönemine ait ölüm oranları ise diğer dönemlerin ölüm oranlarından istatistiki olarak önemli derecede daha düşük bulunmuştur. Hem 8.35 mg/l hem de 33.33 mg/l ozon gaz uygulamasında kabuklu bademin üst kısmına yerleştirilen *P.*

interpunctella'nın erginlerin ve pupaların ölüm oranları yumurtaların ve larvaların ölüm oranlarından istatistiki olarak daha yüksek bulunurken kabuklu bademin alt kısmına yerleştirilen *P. interpunctella*'nın yumurtaların ölüm oranları ise larvaların ölüm oranlarından istatistiki olarak daha düşük bulunmuştur (Çizelge 2). Tüm bu sonuçlar farklı konsantrasyondaki ozon gazı uygulamalarının *P. interpunctella*'nın farklı biyolojik dönemleri üzerindeki biyolojik etkinliklerinde önemli farklılıkların olduğunu göstermektedir.

Ozon gazının farklı depolanmış ürün zararlıları karşı etkinliği ile ilgili daha önceden yürütülen çalışmalarda ozon gazı konsantrasyonun ve ozon uygulama süresinin ozon gazının depolanmış ürün zararlılarına karşı etkinliğinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Kells et al., 2001; Sousa et al., 2008; Isikber & Oztekin, 2009; McDonough et al., 2011). Mevcut çalışmada da açık bir şekilde daha düşük konsantrasyonda (8.33 mg/l) ozon gazı uygulamasında *E. cautella* ve *P. interpunctella*'nın tüm biyolojik dönemlerine ait ölüm oranları yüksek konsantrasyonda (33.33 mg/l) ozon gazı uygulamasındakilerden istatistiki olarak önemli derecede daha düşük olduğu görülmüştür. Genel olarak ürünlerin üst kısmına yerleştirilen böceklerin ölüm oranları alt kısma yerleştirilen böceklerinkinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Özellikle ürünlerin alt kısmına yerleştirilen *E. cautella* ve *P. interpunctella* larvalarını ve yumurtalarını tamamen öldürmenin çok güç olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ozon gazının böcekleri öldürmek için ürün içerisine yeterince penetre olmadığını göstermiştir. Ozonun ürün arasından ilk hareketine ortamın ozon talebi olarak tanımlanan bir olay tarafından engel olunduğu düşünülmektedir (Kim et al., 1999). Ozon gazı ile reaksiyona giren ürün yüzeyindeki kimyasal elementler tam olarak bilinmemektedir. Ancak, Kells et al. (2001) tahıl daneleri ozon gazına maruz bırakıldıklarında tahıl daneleri arasından ozon gazının hareketi çok az bir iç dirençle hızlı olduğunu bildirmişlerdir. Mason et al. (1997) ozon gazının kirli tahıl daneler temiz daneler üzerine yapılan iki farklı ozon uygulamasını test etmişlerdir. Bu araştırmacılar benzer şekilde ozon gazının temiz daneler üzerine yapılan uygulamada ozon gazının hızlı bir şekilde parçalanmadığını ve ürünle reaksiyona girmeksizin böcekleri öldürecek ozon konsantrasyonuna ulaşarak ürün içerisine hızlı bir şekilde hareket ettiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar *E. cautella* ve *P. interpunctella*'nın gelişme dönemlerinin ozon gazına duyarlılıkları arasında önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Mevcut çalışmada *E. cautella* ve *P. interpunctella*'nın yumurta ve larva dönemlerinin ozon uygulamalarına ergin ve pupa dönemlerine göre daha dayanıklı olduğu görülmüştür. Leesch (2003) 4 saat süreyle 300 ppm ozon gazına maruz bırakılan of *P. interpunctella*'nın tüm biyolojik dönemlerinin duyarlılıklarını laboratuvar koşullarında test etmiştir. Çalışma sonucunda ozon uygulamasına en hassas dönemin ergin olurken bunu larva ve pupanın takip ettiğini ve yumurtanın ise ozon gazından hiç etkilenmediğini bildirmiştir. Bu sonuçlar mevcut çalışmada elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Bu çalışmada ozon gazının bir fümigant olarak *E. cautella* ve *P. interpunctella*'ya karşı etkinliği ile ilgili elde edilen sonuçlar ozonun depolanmış tahıllarda zararlı böceklere karşı etkinliğini belirlemeye yönelik yapılan diğer çalışmalarla da kıyaslanabilir. Kells et al. (2001) tarafından elde edilen sonuçlar 3 gün süreyle 50 ppm konsantrasyonda ozon uygulaması *S. zeamais* ve *T. confusum*, erginlerin ve *P. interpunctella*'nın larvalarının yüksek ölümlerine neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ozon konsantrasyonu mevcut çalışmadaki ozon konsantrasyonundan oldukça düşük olmasına rağmen uygulama süresinin mevcut çalışmada test edilen sürelerden daha uzun olduğu görülmektedir. Bu yüzden test edilen böceklere karşı ozonun etkinliğindeki farklılıklar ozon konsantrasyonundaki, uygulama süresindeki veya ozon uygulama metodundaki farklılıktan kaynaklanabileceği ön görülmektedir.



Şekil 2. Altı saat süresince yarım saat aralıklarla 8.35 mg/l konsantrasyonda ozon gazı sirkülasyonuna maruz bırakılan 1.3 kg kabuklu bademin iki farklı kısmına (üst ve alt kısma) yerleştirilen *Ephestia cautella* ve *Plodia interpunctella*'nin tüm biyolojik dönemlerine ait ölüm oranları.

Test edilen böcek türlerinin ozon gazı karşı hassasiyetleri arasında da istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu görülmüştür (Şekil 2; $F_{1, 35}=75.34$, $P<0.0001$). Altı saat süresince yarım saat aralıklarla 8.35 mg/l konsantrasyonda ozon gazı sirkülasyonuna maruz bırakılan kabuklu bademin hem üst hem de alt kısmına yerleştirilen *P. interpunctella* ergin ve larvaların ölüm oranları *E. cautella* ergin ve larvaların ölüm oranlarından istatistiki olarak önemli derecede daha yüksek bulunmuştur (ergin üst kısım için $F_{1, 4} = 10.57$, $P=0.0314$; ergin alt kısım için $F_{1, 4} = 34.11$, $P=0.0043$; larva üst $F_{1, 4} = 137.86$, $P=0.0003$; larva alt $F_{1, 4}=23.14$, $P=0.0086$). Ozon gazına maruz bırakılan kabuklu bademin üst kısmına yerleştirilen *P. interpunctella* pupaların ölüm oranları *E. cautella*'nin ergin ve larvaların ölüm oranlarından istatistiki olarak önemli derecede daha yüksek bulunurken ($F_{1, 4}=15.47$, $P=0.0171$) alt kısmına yerleştirilen *E. cautella* ve *P. interpunctella* pupaların ölüm oranları istatistiki olarak benzer bulunmuştur ($F_{1, 4}=15.47$, $P=0.0171$). Yumurta döneminde ise kabuklu bademin alt kısmına yerleştirilen *E. cautella* yumurtalarının ölüm oranları *P. interpunctella* yumurtalarının ölüm oranlarından istatistiki olarak önemli derecede daha yüksek bulunurken ($F_{1, 4}=37.73$, $P=0.036$) üst kısmına yerleştirilen *E. cautella* ve *P. interpunctella* yumurtaların ölüm oranları istatistiki olarak benzer bulunmuştur ($F_{1, 4}=0.88$, $P=0.4012$). Tüm bu sonuçlar yumurta dönemi hariç *E. cautella*'nin genellikle *P. interpunctella*'ya göre ozon gazına daha dayanıklı olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde ozon gazı ile ilgili daha önceden yürütülen çalışmalardan elde edilen sonuçlar toksisite sonuçları depolanmış ürün zararlısı türlerin ozon gazına karşı duyarlılıklarında önemli farklılıkların olduğunu göstermektedir (Leesch, 2003; Işıkber & Oztekin, 2009; McDonough et al., 2011). Nitekim, Leesch (2003) *T. confusum* erginlerinin ozon gazına *P. interpunctella* erginlerine göre daha dayanıklı olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde McDonough et al. (2011) *T. castaneum* ve *P. interpunctella*'nin %100 ölümlerini elde etmek için gerekli olan konsantrasyon x uygulama süresi (C x t product) değerlerini hesaplamışlar ve *T. castaneum*'un *P. interpunctella*'ya göre daha yüksek ozon konsantrasyonuna veya daha uzun ozon uygulama süresine ihtiyaç duyduklarını (sırasıyla 256,500 ppm-dakika ve 183,000 ppm-dakika konsantrasyon x uygulama süresi (C x t product) değeri) bildirmişlerdir.

Sonuç olarak bu çalışmada yüksek konsantrasyonda ozon gazının kısa uygulama süresinde (6 saat) kabuklu bademde *E. cautella* ve *P. interpunctella*'nın tüm biyolojik dönemlerini tamamen kontrol edememesinden dolayı ozon gazının ürünlerin böcek bulaşmalarından hızlı bir şekilde arındırılmasında (karantina uygulamalarında) metil bromide potansiyel bir alternatif olamayacağı görülmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda yüksek konsantrasyonlarda ozon gazının daha uzun uygulama süresinde (24 saat) depolanmış ürün zararlılarına karşı biyolojik etkinliklerinin ve ozon gazının ürün kalitesitesine etkisinin araştırılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından 109O802 nolu proje ile desteklenmiştir. Bu desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

Yararlanılan Kaynaklar

- Achen, M. & A.E. Yousef, 2001. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. *Journal of Food Science*, 66: 1380-1384.
- Aksoy, U., K.B. Meyvacı, F. Şen & A. Altındışli, 2003. Impact of fumigants applied to control storage pests on fruit quality of dried figs. *IOBC/WPRS Bulletin*, 27: 203-209.
- Alavanja, J.C.R., A. Blair & M.N. Masters, 1990. Cancer mortality in the U.S. flour industry. *Journal of National Cancer Institute*, 82: 840-848.
- Anonymous, 2004. The regulation to amend the phase-out methyl bromide. *Official Gazette of Turkish Republic*, 25427.
- Anonymous, 2009. *FAO Agriculture Production Statistics*. (Web page: <http://faostat3.fao.org>) (Erişim tarihi: Ocak 2015).
- Athanassiou, C.G., D.N. Milonas, C.J. Sait, 2008. "Insecticidal effect of ozone against *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae), *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium confusum* Jacquelin Du Val (Coleoptera: Tenebrionidae): Influence of Commodity, 61-71". In: *Proceedings of the 8th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products* (Eds. G .Daolinc, S. Navarro, Y. Jian, T. Cheng, J. Zuxun, L. Yue, L. Yang & W. Haipeng). Chengdu, China, Sichuan Publishing House of Science & Technology, 738 p.
- Damarlı, E., H. Gün, G. Özey, S. Bülbül & P. Oechsle, 1997. An alternative method instead of methyl bromide for insect disinfestations on dried figs: Controlled atmosphere. *Acta Horticulture*, 480: 209-215.
- Bell, C.H., 2000. Fumigation in the 21st Century. *Crop Protection*, 19: 563-569.
- Beltran, D., M.V. Selma, A. Marin & M.I. Gil, 2005. Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 5654-5663.
- Champ, B.R. & C.E. Dyte, 1976. Report of the FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. *Food and Agriculture Organization Plant Protection Service. Series No. 5*, FAO Rome, 297p.
- Erdman, H.E., 1980. Ozone toxicity during ontogeny of two species of flour beetles, *Tribolium confusum* and *T. castaneum*. *Environmental Entomology*, 9: 16-17.
- Escriche, I., J.A. Serra, M. Gomez & M.J. Galotto, 2001. Effect of ozone treatment and storage temperature on physicochemical properties of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Food Science and Technology International*, 7: 251-258.
- Ferizli, A.G. & M. Emekci, 2010. "Depolanmış ürün zararlılarıyla savaşım, sorunlar ve çözüm yolları, 579-587". *TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 11-15 Ocak 2010, Ankara, Bildiriler Kitabı 2*, 1300 s.
- Fields, P.G. & N.D.G. White, 2002. Alternatives to methyl bromide treatments for stored-product and quarantine insects. *Annual Review of Entomology*, 47: 331-359.
- Garry, V.F., R.L. Nelson, J. Griffith & M. Haskins, 1990. Preparation of human study of pesticide applicators: sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to selected fumigants. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 10: 21-29.

- Güzel-Seydim, Z.B., A.K. Greene & A.C. Seydim, 2004. Use of ozone in food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft*, 37: 453-460.
- Hwang, E.S., J.N. Cash & M.J. Zabik, 2001. Postharvest treatments for the reduction of mancozeb in fresh apples. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49: 3127-3132.
- Isikber, A.A., S. Oztekin, R. Ulusoy, S. Ozsoy & A. Karcı, 2007. Effectiveness of gaseous ozone alone and in combination with low pressure or carbon dioxide against *Ephestia kuehniella* (Zell.) (Lepidoptera: Pyralidae) at short exposure time. *OIBC/SROP Bulletin*, 30: 205-213.
- Isikber, A.A. & S. Öztekin, 2009. Comparison of susceptibility of two stored-product insects, *Ephestia kuehniella* Zeller and *Tribolium confusum* du Val to gaseous ozone. *Journal of Stored Products Research*, 45: 159-164.
- Johnson, J.A., K.A. Valero, M.M. Hannel & R.F. Gill, 2000. Seasonal occurrence of postharvest dried fruit insects and their parasitoids in a culled fig warehouse. *Journal of Economic Entomology*, 93: 1380-1390.
- Johnson, J.A., S. Wang, & J. Tang, 2003. Thermal death kinetics of fifth-instar *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 96: 519-524.
- Kells, S.A., L.J. Mason, D.E. Maier & C.P. Woloshuk, 2001. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. *Journal of Stored Products Research*, 37: 371-382.
- Kim, J.G., A.E. Yousef & S. Dave, 1999. Application of ozone for enhancing the microbial safety and quality of foods. A review. *Journal of Food Protection*, 62: 1071-1087.
- Kim, J.G. & A.E. Yousef, 2000. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. *Journal of Food Science*, 65: 521-528.
- Kim, J.G., A.E. Yousef, & M.A. Khadre, 2003. Ozone and its current and future application in food industry. *Advances in Food and Nutrition Research*, 45: 167-218.
- Leesch, J.G., 2003. "The mortality of stored-product insects following exposure to gaseous ozone at high concentrations, 827-831". In: *Advances in Stored Product Protection, Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored-Product Protection* (Eds. P.F. Credland, D.M. Armitage, C.H. Bell, P.M. Cogan & E. Highley). York. CAB International, Oxon, UK., 1071 p.
- MBTOC., 1998. *Assessment of Alternatives to Methyl Bromide*. Nairobi, Kenya: UN Environment Commission, Ozone Secretariat, 374s.
- Mason, L.J., C.P. Woloshuk & D.E. Maier, 1997. "Efficacy of ozone to control insects, moulds and mycotoxins, 665-670". In: *Proceedings of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products* (Eds. E.J. Donahaye, S. Navarro & A. Vamava). Nicosia, Cyprus Printer Ltd., Nicosia, 700 p.
- McDonough, M., L. Mason & C. Woloshuk, 2011. Susceptibility of stored product insects to high concentrations of ozone at different concentration intervals. *Journal of Stored Products Research*, 47: 306-310.
- Mendez, F., D.E. Maier, L.J. Mason & C.P. Woloshuk, 2003. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. *Journal of Stored Products Research*, 39: 33-44.
- Meunpol, O., K. Lopinyosiri & P. Menasveta, 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 220: 43-48.
- Ong, K.C., J.N. Cash, M.J. Zabik, M. Siddiq & A.L. Jones, 1996. Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. *Food Chemistry*, 55: 153-160.
- Ozkan, C., 2006. Laboratory rearing of the solitary egg-larval parasitoid, *Chelonus oculator* Panzer (Hymenoptera: Braconidae) on a newly recorded factitious host *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Pest Science*, 79: 27-29.
- Öztekin, S., B. Zorlugenç & F. Kiroğlu Zorlugenç, 2006. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. *Journal of Food Engineering*, 75: 396-399.
- Rahman, M.M., H.L. Roberts, M. Sarjan, S. Asgari & O. Schmidt, 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 2696-2699.
- SAS Ins., 1989. *SAS / STAT^R User's Guide, Version 6, 4th Ed.* SAS Institute Inc., Cary, NC.

- Schneider, S.M., E.N. Roskopf, J.G. Leesch, D.O. Chellemi, C.T. Bull & M. Mazzola, 2003. Research on alternatives to methyl bromide: pre-plant and post-harvest. *Pest Management Science*, 59: 814-826.
- Sharma, R.R., A. Demirci, L.R. Beuchat & W.F. Fett, 2002. In activation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with ozonated water and heat treatment. *Journal of Food Protection*, 65: 447-451.
- Sousa, A.H., L.R. D' A. Faroni, A.de M. Pereira, F.da S. Cardoso, & E. Heberle, 2006. "Influence of grain mass temperature on ozone toxicity to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), 706-710". In: Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection (Eds. I. Lorini et al.). 15-18 October 2006, São Paulo, Brazil. Brazilian Post-harvest Association ABRAPOS, Passo Fundo, RS, Brazil, 1359 pp.
- Yasan, E. & G. Kiper, 1972. Doğu Karadeniz Bölgesi fındık depolarında ekonomik zararlara neden olan *Cadra cautella* Walk. ve *Plodia interpunctella* Hb.' nın biyolojileri, zarar nisbetleri ve mücadeleleri üzerinde araştırmalar. *Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı*, 71-73s.
- Yavuz, G.G., 2011. Badem. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, TEPGE Bakış. ISSN:1303-8346, Nüsha:6, Temmuz 2011, 8 s.
- Zettler, J.L., W.R. Halliday & F.H. Arthur, 1989. Phosphine resistance in insects infesting stored peanuts in the southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 82: 1508-1511.
- Zettler, J.L. & G.W. Cuperus, 1990. Pesticide resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in wheat. *Journal of Economic Entomology*, 83: 1677-1681.
- Zettler, J.L., & F.H. Arthur, Chemical control of stored product insects with fumigants and residual treatments, *Crop Protection*, 19: 577-582.
- Xu, L., 1999. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Food Technology*, 53: 58-63.

Orijinal araştırma (Original article)

Bozyazı ilçesi (Mersin) muz seralarında önemli bitki paraziti nematodların (*Helicotylenchus multincinctus*, *H. dihystra* ve *Meloidogyne* spp.) (Nemata) popülasyon değişimlerinin araştırılması¹

Investigation on population dynamics of important plant parasitic nematodes (*Helicotylenchus multincinctus*, *H. dihystra* and *Meloidogyne* spp. (Nemata) in banana greenhouses grown in Bozyazı (Mersin)

Ece B. KASAPOĞLU^{2*}

Gürkan YORAZ²

İbrahim Halil ELEKÇİOĞLU²

Summary

Banana is a plant which grown in tropical and subtropical areas, and has economic importance. Plant parasitic nematodes in banana production areas cause significant crop losses annually. Previous studies showed that spiral nematodes (*Helicotylenchus dihystra* (Cobb, 1893) (Tylenchida: Hoplolaimidae), *H. multincinctus* (Cobb, 1893) (Tylenchida: Hoplolaimidae)) and root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) (Tylenchida: Meloidogynidae)) and *M. javanica* (Treub, 1885) (Tylenchida: Meloidogynidae)) are widespread in banana production areas in Turkey. Plant parasitic nematodes are commonly found in banana field were identified and population fluctuations of spiral and root-knot nematodes were investigated monthly in Mersin. In this study, soil and root samples were collected monthly from a banana greenhouses in Bozyazı district of Mersin province between 2012 and 2014. *Helicotylenchus multincinctus*, *H. dihystra*, *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* were identified in different population densities in Banana growing area and among them *H. multincinctus* was found as most dominant nematode species. It was determined that population of *H. multincinctus* generally increased in April and decreased in November and February in both year.

Keywords: *Helicotylenchus multincinctus*, Spiral and Root-knot nematode, population dynamics, banana, greenhouse

Özet

Muz, tropik ve subtropik alanlarda yetişen, ekonomik öneme sahip bir bitkidir. Bitki paraziti nematodların, muz üretim alanlarında her yıl önemli oranda ürün kaybına neden olduğu bilinmektedir. Türkiye'nin muz üretim alanlarında bitki paraziti nematodlar daha önceki çalışmalarla belirlenmiş, spiral (*Helicotylenchus dihystra* (Cobb, 1893) (Tylenchida: Hoplolaimidae), *Helicotylenchus multincinctus* (Cobb, 1893) (Tylenchida: Hoplolaimidae)) ve kök-ur nematodlarının (*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) (Tylenchida: Meloidogynidae) ve *M. javanica* Treub 1885 (Tylenchida: Meloidogynidae)) yaygın olduğu belirtilmiştir. Mersin ilindeki muz alanlarında yaygın olarak bulunan bitki paraziti nematodlar belirlenmiş ve spiral ve kök-ur nematodların aylara göre popülasyon dalgalanmaları araştırılmıştır. Bu çalışmada Mersin ili Bozyazı ilçesindeki muz seralarında spiral ve kök-ur nematodlarının popülasyon dağılımlarını araştırmak amacıyla 2012-2014 yılları arasında her ay düzenli olarak toprak ve kök örnekleri alınmıştır. Muz serasında *H. multincinctus*, *H. dihystra*, *Meloidogyne javanica* ve *M. incognita* farklı popülasyon yoğunluklarında tespit edilmiş ve en yoğun nematod türü olarak *H. multincinctus* gözlenmiştir. *H. multincinctus*'ün popülasyon yoğunluğunun genel olarak Nisan ayında yükseldiği, Kasım-Şubat aylarında ise azaldığı belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Helicotylenchus multincinctus*, Spiral ve Kök-ur nematodu, popülasyon değişimi, muz, sera

¹ Bu çalışmanın bir bölümü 03-05 Şubat 2014 tarihlerinde Antalya'da düzenlenen V. Bitki Koruma Kongresinde sözlü olarak sunulmuş, özet olarak basılmıştır ve Çukurova Üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir.

² Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 01330, Sarıçam, Adana, Türkiye

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: ekasapoglu@cu.edu.tr

Alınış (Received): 15.12.2014 Kabul edilmiş (Accepted): 24.04.2015 Çevrimiçi Yayın Tarihi (Published Online): 08.06.2015

Giriş

Tropik ve subtropik alanlarda yetiştiriciliği yapılan muz bitkisinin, Dünya genelinde 102 milyon ton (FAO, 2010), Türkiye’de ise 207.727 ton (TUİK, 2012) üretimi gerçekleştirilmektedir. Ülkemizde muz yetiştiriciliği yalnızca Akdeniz Bölgesi’nde yapılmakta ve bölge üreticilerine önemli ekonomik gelir sağlamaktadır. Zararlı organizmalar içerisinde, bitki paraziti nematodların önemli zarar yaptığı ve Dünya genelinde yıllık %19,7 oranında verim kaybına neden oldukları bildirilmektedir (Sasser & Freckman, 1987).

Dünyada muz alanlarında, *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira 1940 (Tylenchida: Rotylenchulidae), *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949, (Tylenchida: Pratylenchidae), *Helicotylenchus multincinctus* Cobb, 1893 (Tylenchida: Hoplolaimidae), *H. dihystra* Cobb, 1893 (Tylenchida: Hoplolaimidae), *Meloidogyne* spp. ve *Pratylenchus* spp. gibi türlerin ürün kayıplarına neden oldukları bildirilmektedir (Costilla et al., 1979; Barekye et al., 2000; Araya et al., 2002; Sundararaju et al., 2003; Kamira et al., 2013). Muz yetiştiriciliği yapılan alanlarda spiral nematodlar (*Helicotylenchus* spp.) ve kök ur nematodları (*Meloidogyne* spp.) tüm dünyada ekonomik olarak zararlı durumdadırlar. Spiral nematodlar özellikle subtropik alanlarda muz kökleri üzerinde kahverengi leke şeklinde belirti oluşturmaları ve kökün özellikle korteks tabakasında beslenerek, gelişimini engellemeleriyle bilinmektedir (Barekye et al., 2000; Moens et al., 2006). Kökün korteks tabakasında yumurta döneminden itibaren ergin dişi dönemine kadar beslenmektedirler (Decker, 1989). Bu alanlarda, hem toprakta hem de bitki köklerinde en yoğun bulunan türün muz spiral nematodu, *H. multincinctus* olduğu belirtilmektedir (Kamira et al., 2013). Muz köklerinde oluşturdukları zararlar ise farklı türlerin yoğunlukları ve bitkinin vejetatif dönemine göre değişmektedir (Gowen et al., 2005). Türkiye’de muz yetiştirilen alanlarda yürütülen sörvey çalışmalarının sonucuna göre *Rotylenchulus reniformis* ve *Radopholus similis* bulunmamakta, buna karşın, *H. multincinctus*, *H. dihystra*, *Meloidogyne* spp. yaygın olarak bulunmaktadır (Gürdemir, 1979; Elekcioğlu, 1992; Elekcioğlu & Uygun, 1994; Mısırlıoğlu et al., 2008).

Muz alanlarında nematodlara karşı en uygun mücadele yöntemlerini belirlemek için zararlı nematodların popülasyon gelişmelerinin araştırılması büyük önem arz etmektedir (Chavez & Araya, 2010). Türkiye’de muz alanlarında yaygın bulunan türlerin tanımlanmaları ve zararı gibi konular araştırılmıştır (Gürdemir, 1979; Elekcioğlu, 1992; Elekcioğlu & Uygun, 1994; Mısırlıoğlu et al., 2008). Buna karşın türlerin popülasyon gelişmeleri ve dalgalanmaları üzerine çalışma yapılmamıştır. Bu amaçla Mersin İli Bozyazı İlçesi muz seralarında önemli bitki parazit nematod türlerinin 2 yıl boyunca aylık popülasyon değişimleri araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Doğa çalışmaları

Mersin İli, Bozyazı İlçesi’nde 5 da büyüklüğünde, yağmurlama sistemi ile sulanan muz serasında 2012-2014 yılları arasında “Anamur muzunu” olarak bilinen 8-14 yaş aralığındaki “Dwarf cavendish” ve “Grand nain” muz çeşidinin bulunduğu sera, deneme alanı olarak belirlenmiştir. Denemenin başlangıcında her ay düzenli olarak bir ön çalışma oluşturması için kök ve toprak örnekleri alınmıştır. Yapılan çalışma sonucunda deneme alanında kök ur nematodlarının çok düşük yoğunlukta oldukları belirlenmiştir. Wang & Hooks (2009 a) Hawaii’de muz bitkileri üzerinde yaptıkları sörvey çalışmasında, *H. multincinctus*’un toprak ve kökte bulunma oranlarının aynı olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan ön çalışmada benzer sonuçlar elde edildiğinden, yoğun iş gücünü azaltmak amacıyla çalışma süresince sadece toprak örnekleri alınmış ve değerlendirilmiştir.

İki üretim sezonu boyunca araştırmanın yürütüldüğü serada nematisit kullanılmamıştır. Denemeye alınan sera 4 parselde ayrılmış olup, her parseldeki muz bitkilerinden zikzak şekilde gidilerek, toprak sondası yardımıyla, 0–30 cm derinliğinden toprak örneği alınmıştır (Southey, 1986). Toprak örnekleri gerekli etiketlemeler yapıldıktan sonra Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Nematoloji Laboratuvarı (Adana, Türkiye’ne getirilip, 4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Laboratuvar çalışmaları

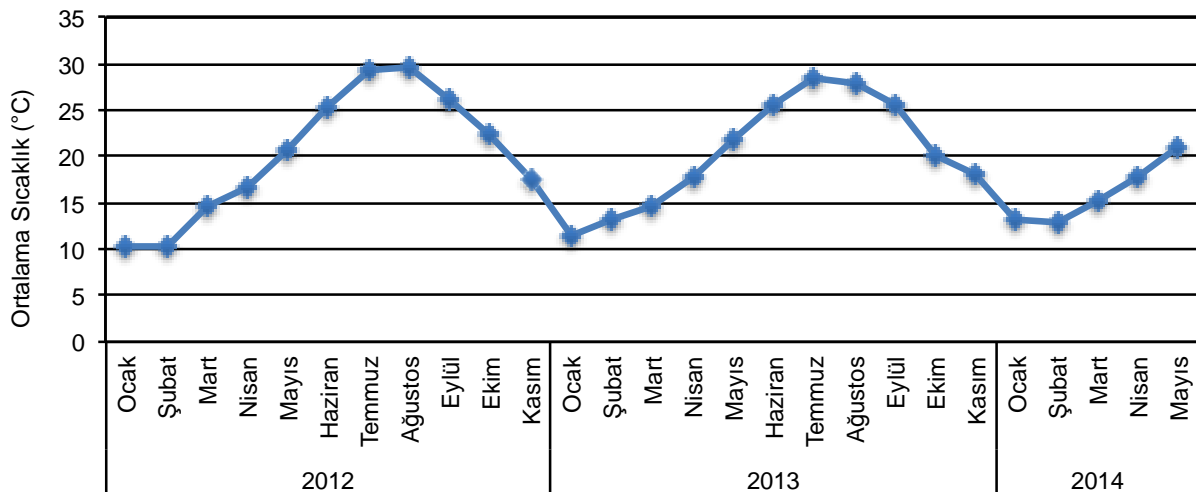
Toprakta serbest ve hareketli bulunan nematodların elde edilmesi amacıyla geliştirilmiş Baermann huni yöntemi'nin modifiye edilmiş biçimi olan Petri yöntemi kullanılmış ve 4 parselde bulunan hareketli ergin dişi ve larvalara ait bireyler elde edilmiştir. Bu amaçla 12 cm çapında, 2 cm yüksekliğinde plastik Petriler kullanılmış ve 50 cc (100 g) toprakta bulunan nematodlar elde edilmiştir (Barker, 1985; Southey, 1986). Toprakta elde edilen ve santrifüj tüpleri içerisinde çöktürülen nematodlar etüvde 60°C'de 5 dakika bekletilerek öldürülmüş ve TAF çözeltisi [7 ml formalin (% 40 formaldehit) + 2 ml triethanolamin + 91 ml saf su] içerisinde fikse edilmiştir (Hooper, 1986). Fikse edilen nematodlar Seinhorst (1959) yöntemine göre saf gliserin içerisinde alınmıştır. Saf gliserin içerisinde alınan nematodlar cinslerine göre ayrılarak, balmumu-yüzük (wax-ring) yöntemiyle önceden hazırlanmış olan lam üzerine alınmış daha sonra lamel ile ısıtıcı üzerinde sabitleştirilmiş ve tür teşhisleri yapılmıştır (Hooper, 1986).

Mersin ili Bozyazı ilçesi'nde, bir üretici serasında Ocak 2012-Nisan 2014 arasında her ay düzenli olarak alınan toprak örneklerinde bitki paraziti nematod ve saprofit gruplarının teşhisleri yapılmış, popülasyon yoğunlukları belirlenmiştir (Şekil 2, 3, 4). Spiral ve kök-ur nematodların, gerekli preparatları yapıldıktan sonra, dişi bireylerin morfolojik ve allometrik ölçüm değerlerine göre tür teşhisleri yapılmıştır.

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

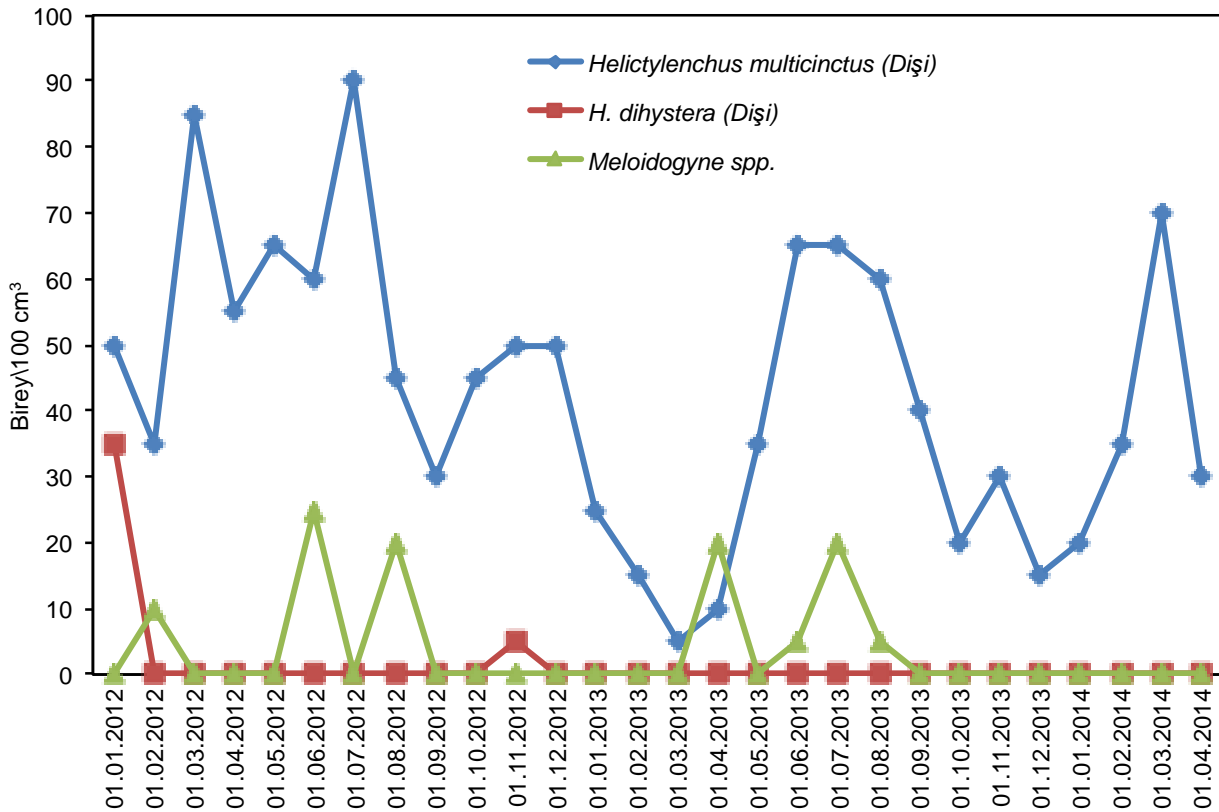
Bitki paraziti nematodlar içerisinde en yaygın ve yoğun olarak *H. multicinctus* bulunmuş, *H. dihystra*, *Meloidogyne javanica* ve *M. incognita* türlerine ise çok düşük popülasyon yoğunluklarında yalnızca birkaç örnekte rastlanmıştır. Ön çalışmada Kök ur nematodlarının sadece larvalarına rastlanmıştır. Köklerde ergin bireylere rastlanmadığı için kök ur nematodları "sp." düzeyinde verilmiştir.

Bu örneklerde tespit edilen bitki paraziti nematod türlerinin popülasyon yoğunluklarının ortalamasına göre aylık popülasyon gelişme seviyesi, erkek, dişi ve larva bireylerinin popülasyon düzeyleri belirlenmiştir. Bozyazı İlçesi'ne ait ortalama hava sıcaklığı verileri Meteoroloji Genel Müdürlüğü (MGM)'nden elde edilmiş ve Şekil 1'de verilmiştir. Aylık ortalama sıcaklık verileri dikkate alındığında (Şekil 1), en yüksek sıcaklığın her iki yılda da Temmuz aylarında, en düşük sıcaklığın ise Aralık ve Ocak aylarında kaydedildiği görülmektedir. Bitki rizosferindeki toprak sıcaklığının da bu doğrultuda seyrettiği literatür kayıtlarına dayanarak kabul edilmektedir.



Şekil 1. Bozyazı (Mersin) ilçesi için 2012, 2013 ve 2014 yıllarına ait ortalama sıcaklık değerleri (MGM).

Helicotylenchus multicinctus'un popülasyon yoğunluğunda, ilkbahar ve yaz aylarında sıcaklığa bağlı olarak genel bir yükselme olduğu görülmüştür (Şekil 2). *H. multicinctus*'un popülasyon yoğunluğunun 2012 ve 2013 yıllarında iki tepe noktası oluşturmuş, 2012 yılı Şubat ve Mart aylarında yükselmeye başlamış, daha sonra düşüş görülmüştür (Şekil 2). Zararının popülasyon yoğunluğu Temmuz ve Ağustos aylarında en yüksek düzeye ulaşmıştır. Bu yılların Ekim ve Kasım aylarında ise; daha önce en yüksek düzey olarak tespit edilen düzeylerden daha düşük olmakla birlikte zararının popülasyon yoğunluğunda yükselme görülmüştür. Her iki yılın Ekim ve Kasım aylarındaki bu düzeyler dikkate alındığında, *H. multicinctus*'un yıl içerisinde popülasyon yoğunluğunun üç tepe oluşturduğu söylenebilir. Popülasyonlardaki bu iniş ve çıkışların toprak sıcaklığının yanı sıra doğal düşman aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

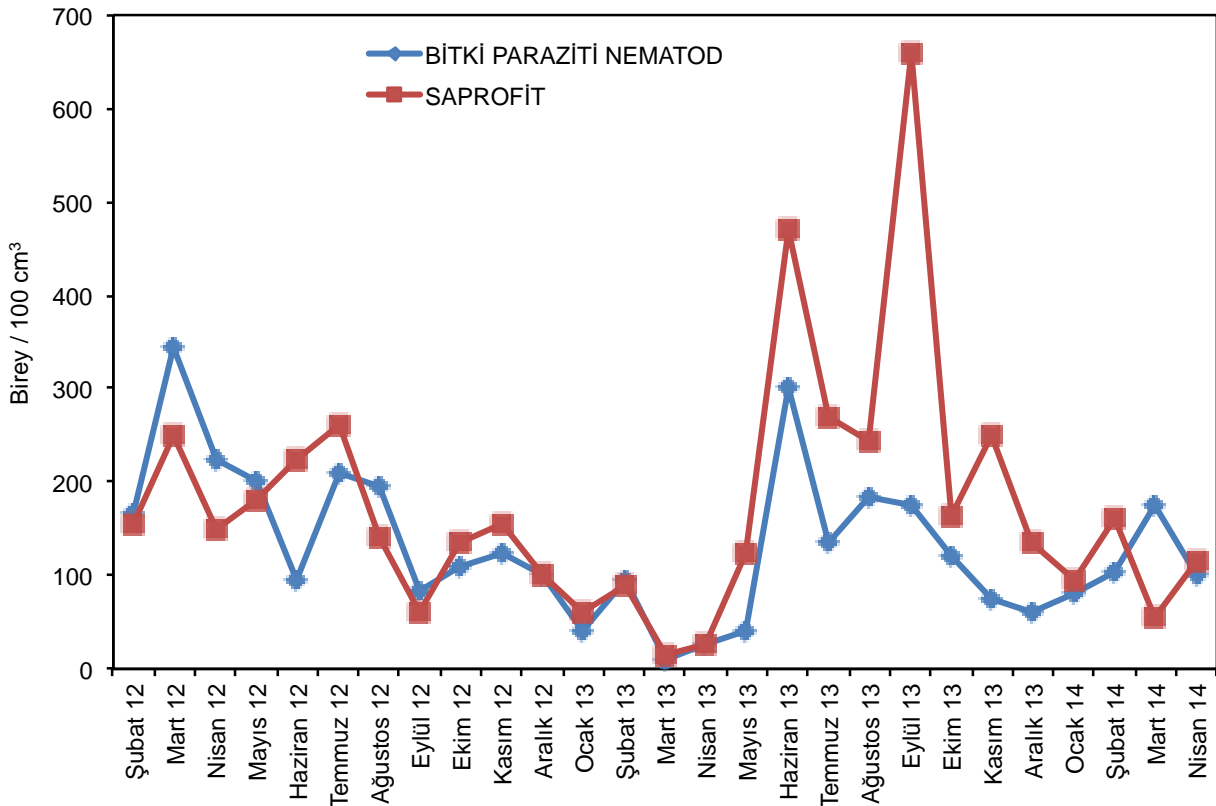


Şekil 2. Bozyazı (Mersin) ilçesi muz serasında 2012-2014 yılları arasındaki bitki paraziti nematod popülasyon dağılımı.

Muz alanlarında kök ur nematodları yaygın olarak bulunmakla beraber, spiral nematodlar ile birlikte kökür korteks tabakasından beslenmektedir. Bu nedenle kökür nematodu ve spiral nematodlar rekabet içerisindeyler. Elekcioğlu (1992) yaptığı çalışmada muz alanlarında *M. incognita* ve *M. javanica*'nın değişik yaygınlık oranında ve karışık popülasyonlar halinde yaygın olduklarını bildirmektedir. Vovlas et al., (1994) ile Wang & Hooks (2009b), *H. multicinctus*'un genellikle az bulunduğu bölgelerde kökür nematodlarının daha baskın olduğunu bildirmişler ve kökür nematodlarının yüzeyinde bakteriyel patojen olarak etkili olan *Pasteuria penetrans* (Thorne 1940) Sayre & Starr 1986 (Bacillales: Alicyclobacillaceae) tespit etmişlerdir. Buna göre topraktaki nematodlara karşı bakteriyel ve fungal parazitlerin, nematodların popülasyon yoğunluklarına etkisinin olduğu ve kökür nematodu popülasyonunun bundan dolayı düşük olduğu düşünülebilir. *H. multicinctus*'un en yüksek düzeyde bulunması, *H. dihystra* ve *Meloidogyne* spp.'nin ise düşük düzeylerde görülmesi türler arası rekabetten dolayı olabileceğinin göstergesidir. Diğer spiral nematod türü olan *H. dihystra* ve kökür nematodları (*Meloidogyne* spp.) çalışma süresince *H.*

multicinctus'a göre çok daha düşük popülasyon yoğunluğuna sahip oldukları ortaya konmuştur. Bu durumun tür içi ve türler arası rekabetten dolayı olduğu söylenebilir. Lashein & Youssef (2013), Mısır'da zeytin alanlarında 26-27°C'de *Helicotylenchus* sp.'nin popülasyonunun yükseldiğini, 14°C'de sıcaklığın düştüğü kış aylarında popülasyonda belirgin bir düşme olduğunu bildirmişlerdir. Brezilya'da 2002-2004 yılları arasında yapılan diğer bir çalışmada, genel olarak hava sıcaklığının ve yağışın en yüksek olduğu Aralık ayında *H. multicinctus*'un popülasyonunda yükselme görülmüş ve sıcaklık ve yağışın düşük olduğu aylarda ise popülasyonda düşmeler olduğu ortaya konulmuştur (Ribeiro et al., 2009).

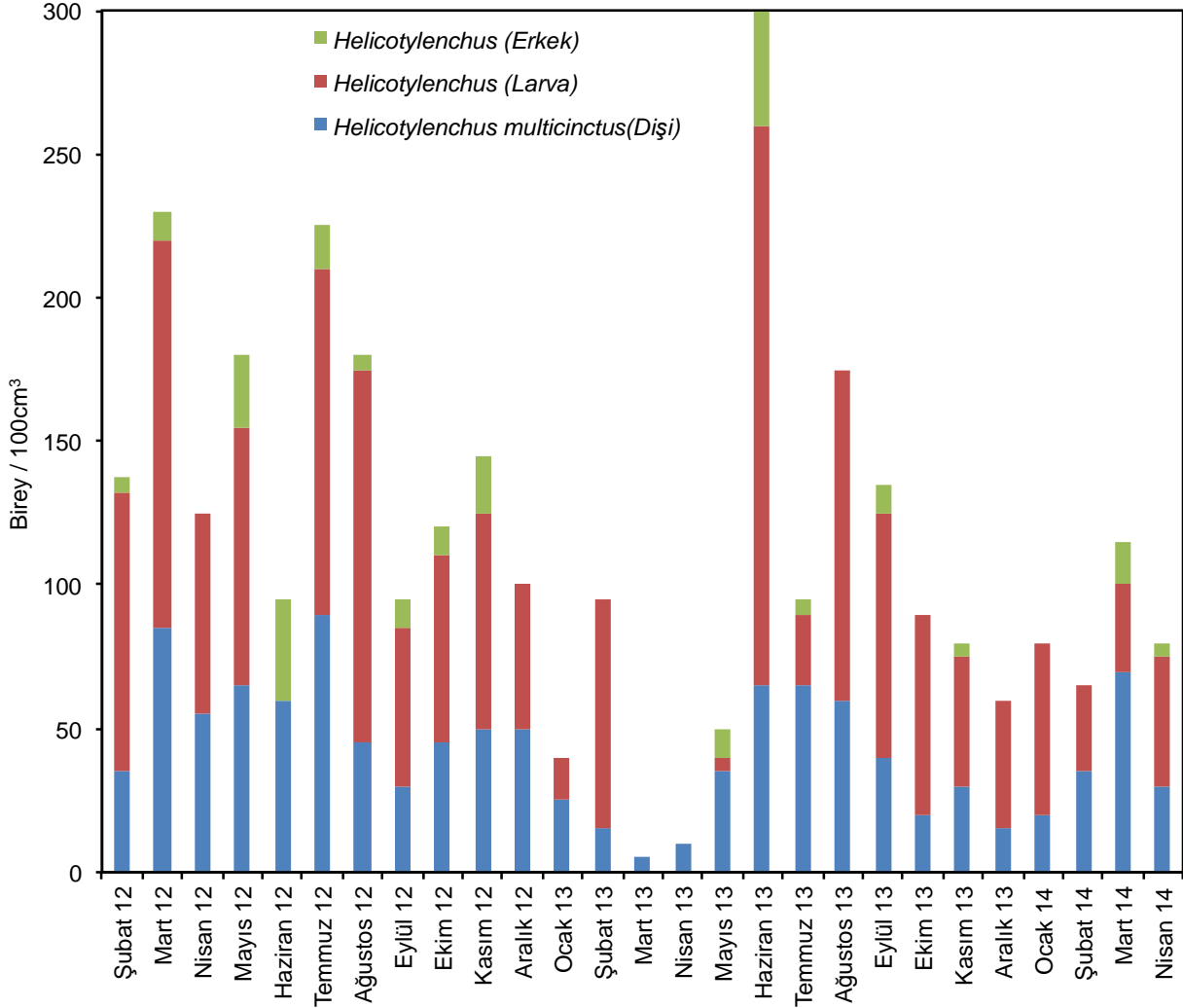
Denemenin yürütüldüğü serada 2012-2013 ile 2013-2014 üretim dönemlerinde toplam bitki paraziti ve saprofit nematodların popülasyon gelişmeleri Şekil 3'de verilmiştir. Genel olarak saprofit nematodların popülasyon yoğunluğunun 2013-2014 deneme döneminde bir önceki yıla göre daha yüksek düzeyde olduğu görülmektedir. 2012-2014 yılları arasındaki bitki paraziti nematod popülasyonuna bakıldığında popülasyon yoğunluklarının Şubat aylarında en düşük olduğu, Haziran ve Eylül aylarında ise en yüksek düzeye ulaştığı görülmektedir. Genel olarak ifade edilecek olursa, saprofit ve bitki paraziti nematodların popülasyon yoğunluklarındaki değişimlerin birbirine paralel seyrettiği söylenebilir. Popülasyon yoğunluklarında kış ve yaz aylarındaki düşüşler sıcaklık değişimlerine, sıcaklığın nematodların gelişmesi için optimum olduğu zamanlardaki değişimleri ise, biyolojilerine ve toprakta bulunan doğal düşmanların baskısına bağlanabilir. Nitekim Jatala (1986), fungus, avcı nematod, bakteri ve tardigrad'ların biyolojik savaşında rol oynadığını; Siddiqui & Mahmood (1996) ise özellikle toprakta bulunan nematod paraziti fungusların (entomopatojen funguslar), nematod popülasyonunu önemli derecede azalttığını belirtmiştir. Yine Wang & Hooks, (2009a) Hawaii'deki muz ekili alanlarda tuzak oluşturan funguslar, predatör nematodlar ve *Pasteuria penetrans* gibi doğal düşmanların yoğun olarak bulunduğunu ve bitki paraziti nematodları baskı altına alma potansiyellerinin yüksek olduğunu bildirmektedir.



Şekil 3. Bozyazı (Mersin) ilçesi muz serasında 2012-2014 yılları arasında bitki paraziti nematodlar ve saprofit nematodların dağılımı.

Queneherve (1989) Afrika'da tropikal bir iklime sahip Fildişi sahillerinde, Mayıs ayından Temmuz ayına kadar yıllık en fazla yağışın olduğu ve ortalama sıcaklığın 24-27°C olduğu dönemde, toprakta ve kökte *H. multincinctus*'un popülasyon yoğunluğunun arttığını bildirmiştir. McSorley & Parrado (1986) *R. similis*'in bulunmadığı muz alanlarında ve sıcaklığın minimum 15.6°C'den yüksek olduğu bölgelerde *H. multincinctus*'un daha fazla zarar meydana getirdiğini belirtmektedirler.

Bozyazı İlçesi muz serasında ana zararlı konumunda olan *H. multincinctus*'un örnekleme dönemlerinde larva, dişi ve erkek oranları Şekil 4'de gösterilmiştir. Genel olarak erkek bireylerin popülasyon yoğunluklarının düşük olduğu, buna karşın her örneklemede değişik yoğunlukta larva ve dişilere ait bireylerin bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4. 2012-2014 yılları arasında muz spiral nematodu (*Helicotylenchus multincinctus*)'nun popülasyon değişimine bağlı olarak biyolojik dönemleri.

Spiral nematodların muz bitkilerinde meydana getirdiği ekonomik zararlar göz önüne alındığında, *H. multincinctus*'un doğa koşullarında, erkek ve dişi bireylerinin oranlarının bilinmesi mücadeleye yönelik çalışmalara yardımcı olacaktır. Karakaş (2007) *H. multincinctus*'un yumurta dönemi ve 4. larva döneminden sonra erkek ve dişi bireylerin oluştuğunu belirtmektedir. Bu çalışmaya göre; larva dönemlerinin dişi ve erkek bireylere göre daha yüksek düzeylerde seyrettiği, dişi bireylerin popülasyon yoğunluğunun erkek bireylerden daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durumda *H. multincinctus*'un daha çok partenogenetik olarak çoğaldığı söylenebilir.

Muz üretilen bazı ülkelerde muzun çok önemli bir zararlısı olan *Radopholus similis* (Cobb 1893) (Tylenchida: Pratylenchidae) ve *H. multincinctus* birlikte bulunurken, ülkemizde şimdiye kadar *R. similis*'e rastlanmamıştır. Vilardebo & Guerout (1976) *R. similis*'in spiral nematodlara göre daha şiddetli zarar oluşturduğunu, Mc Sorley & Parrado (1986) ise *R. similis* 'in bulunmadığı alanlarda *H. multincinctus*'un zarar oranının arttığını bildirmektedirler. Türkiye'nin muz yetiştirilen alanlarında *R. similis*'in bulunmaması, *H. multincinctus*'un potansiyel olarak daha zararlı olmasını sağladığı yani türler arası rekabette avantajlı duruma getirdiği söylenebilir. Ayrıca, *R. similis*, *H. multincinctus*, kök lezyon (*Pratylenchus*) ve kök ur (*Meloidogyne*) nematodlarının genellikle karışık popülasyon olarak görüldüğünü ve *H. multincinctus* ve *Pratylenchus* sp.'nin yoğun bulunduğu yerlerde, *R. similis*'in yoğunluğunu azaltabileceği gözlenmiş ve bu durumun özellikle *Helicotylenchus* sp. ve *R. similis*'in muz bitkisinin kök korteksinde beslenmelerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Barekye et al., 2000; Chavez & Araya, 2010).

Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında *H. multincinctus*'un popülasyon yoğunluğunun Mersin İli Bozyazı İlçesi koşullarında Mart ayından itibaren artmaya başladığı göz önüne alındığında, mücadele yöntemleri ve özellikle kimyasal mücadelenin uygulanmasında bu zamanın en uygun olabileceği önerilebilir.

Bitki paraziti nematodlar ile mücadelede son zamanlarda ruhsat alan nematisitlerin içinde biyolojik mücadele etmenleri de bulunmaktadır. Kimyasal mücadelenin tercih edildiği durumlarda mücadele zamanının bu çalışmada ve diğer ülkede yürütülen çalışmalarda ortaya konulduğu gibi popülasyon yoğunluğunun artmaya başladığı zamana denk getirilmesi başarı için büyük önem arz etmektedir. Ayrıca dayanıklı hibrit çeşitlerle ilgili çalışmalarda (Krishnamoorthy et al., 2005) tespit edilen çeşitlerle ilgili olarak, bu çeşitlerin ülkemiz koşullarında performanslarının da araştırılması ve ona göre önerilmesi gerekmektedir. Toprakta bulunan yararlı organizmalar ve diğer organik ürünlerin bitki paraziti nematodları baskılayabileceği düşünüldüğünde, biyolojik preparatlara yönelim hem ekolojik sistemin korunması hem de insan sağlığı için uygun mücadele yöntemlerinden biri olmaktadır.

Yararlanılan Kaynaklar

- Araya, M., D. De Waele & R. Vargas, 2002. Occurrence and population densities of nematode parasites of banana (*Musa AAA*) roots in Costa Rica. *Nematropica*, 32 (1): 13-20.
- Barekye, By A., I. N. Kashaija, W. K. Tushemereirwe & E. Adipala, 2000. Comparison of damage levels caused by *Radopholus similis* and *Helicotylenchus multincinctus* on bananas in Uganda. *Annals of Applied Biology*, 137: 273-278.
- Barker, K. R., 1985. "Nematode Extraction and Bioassays. 19-39". In: *An Advanced Treatise on Meloidogyne*, 2 Methodology. (Eds. K.R. Barker, C.C. Carter & J.N. Sasser). North Carolina State University Grafics, Raleigh, North Carolina, 223 pp.
- Chavez, C. & M. Araya, 2010. Spatial-temporal distribution of plant-parasitic nematodes in banana (*Musa AAA*) plantations in Ecuador. *Journal of Applied Biosciences*, 33: 2057-2069.
- Cobb, N. A., 1893. Nematodes, Mostly Australian and Fijian. Macleay Memorial Volume Linnean Society New South Wales, 308 pp.
- Costilla, M. A., S. Gonzalez de Ojeda & T. H. Gomez, 1979. *Helicotylenchus multincinctus* in banana roots in northeastern Argentina. *Nematropica*, 9 (2): 138-139.
- Decker, H., 1989. "Ectoparasitic Root Nematodes, 299-304". In: *Plant Nematodes and Their Control (Phytonematology)* (Ed: N. M. Sveshnikova), E. J. Brill publishing, Leiden, The Netherlands, 540 pp.
- Elekcioğlu, İ. H., 1992. Untersuchungen Zum Auftreten And Zur Verbreitung Phytoparasitaerer Nematoden In Den Landwirtschaftlichen Hauptkulturen Des Ostmediterranen Gebietes Der Türkei. PLITS, Unpublished PhD thesis, Hannover, Germany, 120 pp.

- Elekcioğlu, İ. H. & N. Uygun, 1994. "Occurrence and distribution of plant parasitic nematodes in cash crop in Eastern Mediterranean Region of Turkey, 409-410". Proceedings of 9th Congress of The Mediterranean Phytopathological Union, 1994, Kuşadası Aydın, Turkey, 519 pp.
- FAO, 2010. http://www.fao.org/fileadmin/templates/banana/documents/SC_meeting_December_2012/Presentations_SC_2012/SC5-EST_presentation.pdf (Erişim Tarihi: Aralık, 2014).
- Gowen, S. R., P. Quénehervé & R. Fogain, 2005. "Nematode Parasites of Bananas and Plantains, 611-643". In: Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture (Eds. M. Luc, R. A. Sikora & J. Bridge). CABI publishing, UK, 896 pp.
- Gürdemir, E., 1979. Güney Anadolu Bölgesi'ndeki muzlarda zarar yapan nematodların tanımları, yayılışları ve zararları üzerine araştırmalar. Adana Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Araştırma Eserleri Serisi, No: 50, 74 s.
- Hooper, D. J., 1986. "Extraction of Free Living Stages from Soil, 5-30". In: Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes (Ed. J. F. Southey,). Her Majesty's Stationery Office, London, 202 pp.
- Jatala, P., 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology, 24: 453-489.
- Kamira, M., S. Hauser, P. Van Asten, D. Coyne & H. L. Talwana, 2013. Plant parasitic nematodes associated with banana and plantain in Eastern and Western Democratic Republic of Congo. Nematropica, 43 (2): 216-225.
- Karakaş, M., 2007. Life cycle and mating behavior of *Helicotylenchus multicinctus* (Nematoda: Hoplolaimidae) on excised *Musa cavendishii* roots. Biologia, Bratislava, Section Zoology, 62 (3): 320-322.
- Krishnamoorthy, V., N. Kumar, K. Poornima & K. Soorianathasundaram, 2005. Response of diploid banana hybrids and their parents to *Helicotylenchus multicinctus*. Nematologia Mediterranea 33: 35-40.
- Lashein, A. M. S. & M. M. A. Youssef, 2013. Seasonal dynamics of phytonematodes associated with olive cv. Toffahi affected by soil temperature and moisture. Pakistan Journal of Nematology, 31 (1): 85-88.
- McSorley R. & J. L. Parrado, 1986. *Helicotylenchus multicinctus* on bananas: an international problem. Nematropica, 16: 73-91.
- Mısırlioğlu, B., B. Beytut, T. Toktay, İ. Kepenekçi & Y. Ağı, 2008. "Bitki Paraziti Nematodlar. 11-65". In: Zirai Mücadele Teknik Talimatları (Ed. M. Aydemir). Başak Matbaacılık, Ankara, 65 s.
- Moens, T., M. Araya, R. Swennen & D. De Waele, 2006. Reproduction and pathogenicity of *Helicotylenchus multicinctus*, *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus coffeae*, and their interaction with *Radopholus similis* on *Musa*. The Journal of Nematology, 8 (1): 45-58.
- Ribeiro, R. C. F., F. R. P. Xavier, A. A. Xavier, V. F. Almeida, E. H. Mizobutsi, V. P. Campos, Ferraz & S. C. R. Dias-Arieira, 2009. Population dynamics and the effect of distance and depth on nematodes in banana in the north of the state of Minas Gerais, Brazil. Revista Brasileira de Fruticultura, 31 (1): 103-111.
- Sasser, J. N. & D. W. Freckman, 1987. "A World Perspective on Nematology: The Role of The Society. 7-14". In: Vistas On Nematology: A Commemoration Of The Twenty-Fifth Anniversary Of The Society Of Nematologists. (Eds. J. A. Veech and D. W. Dickson). Society of Nematologists, Hyattsville, Maryland, 509 pp.
- Sayre, R. M., & M. P. Starr. 1985. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 52: 149-165.
- Seinhorst, J. W., 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. Nematologica, 4: 67-69.
- Siddiqui, Z. A. & I. Mahmood, 1996. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. Bioresource Technology, 58 (3): 229-239.

- Southey, J. F., 1986. "Principles of Sampling for Nematodes. 1-4". In: Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. (Eds: J. F. Southey). Her Majesty's Stationery Office, London, 202 pp.
- Sundararaju, P., A. Shanthi & S. Sathiamoorthy, 2003. "Status Report On Musa Nematode Problems And Their Management in India, 21-25". In: Towards management of Musa nematodes in Asia and the Pasific (Eds. F. S. Dela Cruz, Jr., I. Van Den Bergh, D. De Waele, D. M. Hautea & A. B. Molina) University of the Philippines Los Banos, Laguna, Philippines, 93 pp.
- Thorne, G. 1940. *Duboscqia penetrans* n. sp. (Sporozoa, Microsporidia, Nosematidae), a parasite of the nematode *Pratylenchus pratensis* (de Man) Filipjev. Proceedings of the Helminthological Society of Washington. 7: 52-53.
- Thorne, G. 1949. On the classification of the Tylenchida, new order (Nematoda, Phasmidia). Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 16 (2): 37-73.
- TÜİK, 2012. www.tuik.gov.tr (Erişim Tarihi: Aralık, 2014).
- Vilardebo, A. & R. Guerout, 1976. Nematode species in West Africa, Madagascar and Reunion, with some comments on their biology. Nematropica, 6 (2): 53-54.
- Vovlas, N., Avgelis, A., D. Goumas & S. Frisullo, 1994. A survey of banana diseases in sucker propagated plantations in Grete. Nematologia Mediterranea, 22: 101-107.
- Wang, K., & C. R. R. Hooks, 2009a. Plant-parasitic nematodes and their associated natural enemies within banana (*Musa* spp.) plantings in Hawaii. Nematropica, 39 (1): 57-73.
- Wang, K., & C. R. R. Hooks, 2009b. Survey of nematodes on banana in Hawaii, and methods used for their control. Plant Disease, 69: 1-7.

Orijinal araştırma (Original article)

Biber hat ve çeşitlerinin *Meloidogyne incognita*'ya karşı dayanıklılığı

Resistance of pepper lines against *Meloidogyne incognita*

Adem ÖZARSLANDAN^{1*} Hasan PINAR² Atilla ATA² Davut KELEŞ²

Summary

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae)) are important pests of pepper causing important crop losses. The study was carried out in joint of Biological Control Research Station and Alata Horticultural Research Station from 2010 to 2014. Fifty-seven pepper lines were tested at $25 \pm 2.0^\circ\text{C}$ against *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, populations collected from the pepper fields in Mersin. Results of infection of nematodes were evaluated as gall index 60 days after inoculation. The 27 of the lines were considered resistant with 0-2 gall index and 30 were considered susceptible with 3-5 gall index. The homozygous pepper lines determined to be resistant were tested 3 times using different *M. incognita* populations. The pepper lines resistant for nematodes were crossed with susceptible lines having high yield and fruit quality characteristics. The nematode resistant hybrids 913XH9, 100XH8, N-269X1547 and N269X953-W showed the highest yield performance. These candidate hybrids could be used in root-knot nematode infected agricultural areas.

Keywords: Root knot nematode, *M. incognita*, pepper, resistance

Özet

Kök ur nematodları (*Meloidogyne* spp.) (Nematoda: Meloidogynidae) biberlerde önemli ürün kayıplarına neden olan bir zararlıdır. Bu çalışma 2010-2014 yıllarında Biyolojik Mücadele Araştırma İstasyonu Müdürlüğü ve Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu Müdürlüğünde yürütülmüştür. Elliyedi saf biber hattı Mersin ilindeki biber alanlarından alınan *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, popülasyonuna karşı $25 \pm 2.0^\circ\text{C}$ testlenmiştir. Nematod inokulasyonundan 60 gün sonra ur skalasına bakılarak değerlendirme yapılmıştır. Testlenen biber genotiplerinden 27 adeti 0-2, 30 adeti 3-5 ur skalası grubunda yer almıştır. Dayanıklı bulunan hatlar, farklı *M. incognita* popülasyonuna karşı üç kez tekrar test edilmiştir. Dayanıklı hatlar ile hassas olan yüksek verimli hatlar melezlenerek verim değerleri alınmıştır. Bunlardan 913XH9, 100XH8, N-269X1547 ve N269X953-W melez kombinasyonları en yüksek verim performansı göstermişlerdir. Yeni çeşit adayları kök-ur nematodunun ekonomik kayıplara neden olduğu tarım bölgelerinde ticari olarak kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Kök ur nematodu, *M. incognita*, dayanıklılık, biber

¹ Biyolojik Mücadele Araştırma İstasyonu Müdürlüğü Adana, Türkiye

² Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu Müdürlüğü Erdemli Mersin, Türkiye

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: ozarslandan2001@yahoo.com

Alınış (Received): 17.09.2014 Kabul ediliş (Accepted): 12.05.2015 Çevrimiçi Yayın Tarihi (Published Online): 11.06.2015

Giriş

Kök ur nematodları (*Meloidogyne* spp.) (Nematoda: Meloidogynidae) dünya genelinde çeşitli ürünlerin en önemli zararlılarından. Türkiye'de *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood ve *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood'nun sebze alanlarında en yaygın ve ekonomik önemli türler olduğu bildirilmiştir (Elekcioğlu et al., 1994; Söğüt & Elekcioğlu, 2000; Özarslan & Elekcioğlu, 2010). Biber yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda *M. incognita*'nın yaygın olduğu bilinmektedir. *M. incognita* biberde üreyip zarar verirken, *M. javanica* biberde üreyemez ve zarar veremez (Hartman & Sasser, 1985; Peixoto et al., 1997; Özarslan & Elekcioğlu, 2003). Sebze alanlarında kök-ur nematodları ile mücadelede genellikle fumigant etkili nematisitler kullanılmaktadır. Wesemael et al. (2011), bu kimyasalların insan sağlığına ve çevreye zararlı olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca, ürün rotasyonu ile konukçusu olmayan ürünlerin ve dayanıklı çeşitlerin kök ur nematodu enfeksiyonunu azaltmada etkili olduğunu, fakat bunun başarılı olması için birçok ürünün konukçuluk durumlarının bilinmesinin önemli olduğunu da bildirmişlerdir. Dayanıklı biber hatları *M. incognita*'nın üremesini sınırlayarak kontrol etmektedir. Bundan dolayı dayanıklı hat ve çeşitler, solarizasyon, ürün rotasyonu gibi diğer kontrol önlemleri ile beraber entegre mücadele programlarında kullanılmaktadır (Tzortzakakis et al., 2000).

Biberde allel olmayan farklı nematod dayanıklılık genleri vardır. İlk dayanıklılık geni N geni olarak isimlendirilmiştir. Biber N geninin, *M. arenaria*, *M. incognita* ve *M. javanica*'ya karşı dayanıklılık sağladığını, fakat bu dayanıklılığın etkinliğinin nematod izolatına ve inokulum düzeylerine bağlı olduğunu göstermişlerdir (Thies et al., 2008). N geni ilk defa Mississippi Nemaheart genotipinde tespit edilmiş ve geriye melezleme ile dayanıklılık hassas biber çeşitleri Carolina Wonder ve Charleston Bell'e aktarılmıştır (Thies & Fery, 2002). Bu dayanıklılığın 32°C de bile etkili olduğu ve kırılmadığı saptanmıştır (Thies & Fery, 2002).

Djian-Caporalino et al. (1999, 2001, 2007) yaptığı çalışmada, bağımsız Me dominant genlerini Me1 (PM217-PI 201234), Me3 (PM687-PI 322719) ve Me7 (PM702-Criollo de Morelos 334) olarak tespit etmişlerdir. Bu genler dominant genler olup *M. arenaria*, *M. incognita* ve *M. javanica*'ya karşı dayanıklılık sağlamaktadırlar. Bunlara ek olarak, Mech1 (PM702) ve Mech2 (PM217) genlerinin *M. chitwoodi*'ye karşı dayanıklılık sağladığını tespit edilmiş olup, biberde toplamda dokuz dayanıklılık geninin tespit edildiği (N, Me1, Me2, Me3, Me4, Me5, Me7, Mech1 and Mech2) bildirilmiştir (Hare, 1957; Blevé-Zacheo et al., 1998; Djian-Caporalino et al., 2001; 2007; Wang & Bosland, 2006; Wang et al., 2009).

Biberde nematod dayanıklılığını sağlayan farklı genlere karşı moleküler belirteçler geliştirilmiştir (Djian-Caporalino et al., 2001; 2007; Fazari et al., 2012; Gisbert et al., 2013). Fakat biber genotiplerine ve ilgili dayanıklılık genine göre kullanılan belirteçlerin güvenilirliği değişmekte ve klasik testleme kadar güvenli sonuç vermemektedir.

Bu sebeple, Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma İstasyonu Müdürlüğü biber ıslah çalışmalarından elde edilen saf hat ve çeşit adaylarının *M. incognita*'ya karşı dayanıklılık durumları klasik testleme ile belirlenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Bitki materyalleri, dünya sebze merkezinden (AVRDC, Taiwan) temin edilen ve farklı dayanıklılık genlerini taşıdığı bilinen biber hatları, Yolo Wonder B (H1), California Wonder 300 (TMR) (H2 ve H3), PM 687 (H5), PM 217 (H6), Criollo De morelos 331 ve Carolina Cayenne (H8, H9) ile yüksek verimli nematoda hassas yerli hatlardan oluşmaktadır.

Çalışmada kullanılan biber fideleri, 11 cm çapında ve 500 cm³ hacimlik plastik saksılara dikilmiştir. Bitkilerin yetiştirildiği toprak yapısı; %80 kum, %5 mil ve %15 toprak olacak şekilde hazırlanmış ve deneme öncesi 1 saat 121 °C sıcaklıkta otoklav edilerek dezenfekte edilmiştir. Testlemeler 25±1°C

sıcaklık ve %60±10 nem, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık koşullarının sağlandığı iklim odasında yürütülmüştür. Bitkilere nematod inokulasyonundan bir hafta önce ve bir hafta sonra gübreleme yapılmamıştır. Diğer dönemlerde rutin dengeli gübreleme yapılmıştır.

Denemelerde kullanılan Kök-ur nematodu (*M. incognita*) üretimi nematoda hassas olduğu bilinen "Poyraz F1" biber çeşidinde yapılmıştır. Kök-ur nematodunun üretildiği bitki köklerinden, stereo binoküler altında yumurta paketleri çıkartılarak geliştirilmiş Baermann-huni yöntemine göre 2. dönem infektif larvalar elde edilmiştir. Denemeler, biber fideleri 2-4 yapraklı dönemde, yaklaşık 15 cm boyuna ulaştıklarında tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekrarlı olarak kurulmuştur. Biber fidelerinin dört tarafına açılan 2 cm toprak derinliğine her bir saksıya ortalama 1000 adet 2. dönem larva inokulasyonu yapılmıştır.

Denemenin Değerlendirilmesi: Elliye adet biber hat veya çeşidi, kök ur nematodu inokulasyondan 60 gün sonra, kök urlanma oranı üzerinden değerlendirilmiştir. Bitkilerin dayanıklılık veya duyarlılık durumları, kök ur nematodlarının ur ve yumurta oluşturmaya bağlıdır. Kök ur nematodu bitki köklerinde ur oluşturabilir. Fakat iyi konukçusu olmadığı durumlarda yumurta üretmeyebilir. Bu nedenle, bitki kökleri Hartman & Sasser (1985) tarafından oluşturulan aşağıdaki "0-5 yumurta kesesi ve ur sayısı skalasına" göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucuna göre; köklerde 0-2 değerini alan biber bitkileri dayanıklı, 3-5 değerini alan bitkiler ise hassas olarak belirlenmiştir.

- 0: Kökte yumurta kesesi ve ur oluşumu yok
- 1: Kökte 1-2 yumurta kesesi ve ur oluşumu var
- 2: Kökte 3-10 yumurta kesesi ve ur oluşumu var
- 3: Kökte 11-30 yumurta kesesi ve ur oluşumu var
- 4: Kökte 31-100 yumurta kesesi ve ur oluşumu var
- 5: Kökte 100'den fazla yumurta kesesi ve ur oluşumu var

Bitki köklerinde oluşan urlanma değerleri sonuçlarına, SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanılarak varyans analizi yapılmış ve ortalamalar 0.05 önem seviyesinde Duncan testine göre karşılaştırılmıştır. Biber verim değerleri ise LSD testine göre karşılaştırılmıştır.

Dayanıklı biber hatları farklı *M. incognita* popülasyonlarına karşı testlemeleri yapılarak dayanıklılık durumları teyit edilmiştir. Bu çalışma sonuçlarının sağlıklı olması, virüsent bir popülasyonu kullanmamak için Mi geni içeren dayanıklı domates çeşitlerine nematod inokulasyonu yapılarak nematodun virüsent olup olmadığı kontrol edilmiştir. Dayanıklılık çalışmasında devamlı aynı kültürün kullanılmasından dolayı nematod tembelleşmekte ve hassas biber çeşidini dahi infekte etmemektedir. Bundan dolayı nematod kültürleri yıllık olarak yenilenmiş ve hassas biber çeşidinde üretimi yapılmıştır.

Nematod testlemesi sonucu dayanıklı olarak elde edilen biber hatları ile verimleri iyi olarak belirlenen hatların melezlenmesi sonucu elde edilen melez popülasyonların, 20 Şubat 2013 tarihinde 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 25 bitki olacak şekilde araziye dikimleri yapılarak, Haziran 2013 sonuna kadar verim değerleri alınmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada toplam 57 biber hat ve çeşidi testlenmiş olup, bunlardan 27'si dayanıklı 30'u ise hassas olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1). Dünya Sebze Merkezi'nden (AVRDC) alınan hatlardan PM 687, PM 217 ve Carolina cayenne, *M. incognita*'ya karşı dayanıklı iken, Yolo Wonder B, California Wonder 300, Criollo De morelos 331 hassas olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen saf hatlardan N269, N379, N1023, 398A, N59, N390, 216, N50, N171, 232, 233, 251 ve 205 *M. incognita*'ya dayanıklı olarak tespit edilmiştir. Dayanıklı bulunan saf hatlar ile yüksek verimli ümitvar hassas biber hatları ile melezleme çalışmaları yapılarak dayanıklılık aktarılmaya çalışılmıştır.

Çizelge 1. *Meloidogyne incognita*'ya karşı biber saf hat ve çeşitlerinin reaksiyonları

Kodu	Ur skala değeri	Kodu	Ur skala değeri	Kodu	Ur skala değeri
H1 (YOLO WONDER B)	4,5±0,29d	398A	0,0±0,00a	15AXH9	0,0±0,00
H2 (CALIFORNIA WONDER 300 (TMR))	5,0±0,00e	253XCM334	0,0±0,00a	253X398A	0,0±0,00
H3 (CALIFORNIA WONDER 300 (TMR))	5,0±0,00e	İNANXH8	0,0±0,00a	İNANXCM334	0,0±0,00a
H5 (PM 687)	0,0±0,00a	448XH8	0,0±0,00a	N50	0,5±0,29b
H6 (PM 217)	0,0±0,00a	448XH9	0,0±0,00a	1787XH8	0,0±0,00a
H8(CAROLINA CAYENNE)	0,0±0,00a	913XH8	0,0±0,00a	N171	0,0±0,00a
H9 (CAROLINA CAYENNE)	0,0±0,00a	913XH9	2,0±0,20c	232	0,0±0,00a
Criollo De morelos 331	5,0±0,00e	N59	0,0±0,00a	233	0,0±0,00a
N269	0,0±0,00a	N390	1,8±0,25c	251	0,0±0,00a
N379	0,0±0,00a	216	0,0±0,00a	205	0,0±0,00a
N1023	0,0±0,00a	913	5,0±0,00e	x-5-1	5,0±0,00e
N164	4,5±0,29d	253	5,0±0,00e	32	5,0±0,00e
448XH7	5,0±0,00e	15A	5,0±0,00e	765-4-2-B	5,0±0,00e
1787	5,0±0,00e	N 284	5,0±0,00e	N 284	5,0±0,00e
1121A	5,0±0,00e	İNAN	5,0±0,00e	KM7-1	5,0±0,00e
1530-W	5,0±0,00e	36	5,0±0,00e	475-A	5,0±0,00e
953-W	5,0±0,00e	1547	5,0±0,00e	X-5-1	5,0±0,00e
441	5,0±0,00e	İNAN 33-63	5,0±0,00e	761-4	5,0±0,00e
107	5,0±0,00e	284	5,0±0,00e	425	5,0±0,00e

* Aynı sütunda aynı harfleri içeren çeşit ve hatlar Duncan (P<0,05)'a göre birbirinden farklıdır.

Yolo Wonder B, *M. incognita*'ya karşı hassas olarak tespit edilmiştir. Bu elde edilen çalışma sonuçları Fery et al. (1998) ve Thies et al. (2008)'nin yapmış olduğu çalışma ile paralellik göstermektedir. California Wonder hassas olarak tespit edilmiş ve Fery & Dukes (1996)'in yaptıkları çalışma ile paralellik göstermektedir. Thies & Fery (2000) Yolo Wonder B ve California Wonder biber hatlarını *M. incognita*'ya karşı hassas olarak tespit etmişlerdir. PM 217, PM 687 ve Carolina Cayenne *M. incognita*'ya karşı dayanıklılık göstermiştir. Birçok çalışmada da PM 217 ve PM 687 hatlarının *M. incognita*'ya karşı dayanıklı olduğu belirtilmiştir (Bleve-Zacheo et al., 1998; Djian-Caporalino et al., 1999; 2001; 2007). Djian-Caporalino et al. (2001) PM 217, PM 687, CM334 ve Yolo Wonder biber hatlarının kök ur nematodlarına dayanıklı olduğu bildirmiştir. Bu çalışmada Carolina Cayenne genotipinin *M. incognita*'ya karşı dayanıklı olduğu (Fery et al., 1986; Fery & Dukes, 1996) ve Criollo de morelos 331 hattının hassas olduğu teyit edilmiştir. Fakat Criollo de morelos 334 (CM334) hattının bizim şartlarımızda *M. arenaria*, *M. javanica* ve *M. incognita*'ya karşı dayanıklı olduğu görülmüştür (Pegard et al. 2005). Kokalis-Burelle et al. (2009), yaptıkları çalışmada Carolina Cayenne, Carolina Wonder, Charleston Hot, Charleston Belle ve Mississippi Nemaheart hatlarının denemelerde *M. incognita*'ya karşı dayanıklı; Aristotle, PA-136 ve Caribbean Red Habanero ise hassas olarak tespit etmişlerdir. Carolina Cayenne'nin *M. incognita* ırk-1, 2, 3 ve 4'e (Zamora et al., 1994) ve *M. arenaria*'nın ırk 1 ve 2'sine (Noe, 1992) dayanıklı olduğunu bildirmiştir. Geliştirilen N269, N379, N1023, 398A, N59, N390, 216, N50, N171, 232, 251 ve 205 no'lu biber saf hatları yukarıda belirtilen dayanıklı biber hatları gibi *M. incognita*'ya karşı dayanıklılık göstermiştir.

Biber bitkisindeki Me ve N genleri, domates bitkisindeki Mi geninin aksine, yüksek sıcaklıkta da Kök ur nematodlarına karşı dayanıklılığın kırılmadığı; bu genlerin kullanımının tropik, sub-tropik ve sıcak ılıman bölgelerinde bir avantaj olduğu bildirilmiştir (Djian-Caporalino et al., 2007; Özarslan & Elekçioğlu, 2003; Thies et al., 2008). Bu nedenle geliştirilen saf hatların dayanıklılığının değişik sıcaklıklarda kırılmaması beklenmektedir.

Çizelge 2. Kök-ur nematodu dayanıklı biber hatları ile yüksek verimli saf hassas hatların melezlenmesi sonucu elde edilen hibritlere (F₁) ait verim değerleri

Genotip	Toplam verim (g/bitki)	Genotip	Toplam verim (g/bitki)	Genotip	Toplam verim (g/bitki)
253XN50	105,8±6,3jl	N-269X32-C	131,5±7,9fg	1787XH-8	83,7±5,0lm
253X398-A	140,6±8,4fh	N-269X36	175,2±10,5de	1787XH9	137,6±8,3fi
253XH-9	141,3±8,5fh	N-269X194	176,2±10,6de	N-269X1121-	140,3±8,4fh
1787XH-8	83,7±5,0lm	N-269X1547	217,8±13,1b	N-269X441	106,7±6,4jl
1787N269	137,6±8,3fi	N-269X407	160,0±9,6dg	N-269X953-W	207,8±12,5bc
İnanXH8	162,0±9,7df	N-269X1121-	139,4±8,4fh	N-269X1530-	149,4±9,0eh
100XH8	231,8±13,9b	N-269X1895	186,5±11,2cd	N-269X32--A	120,8±7,2hk
İnanXH9	72,2±4,3m	N-269X425	134,4±8,1fj	N-269X107	120,8±8,3hk
448XH-8	82,3±4,9lm	N-269X32-B	171,2±10,3de	N-269X475-A	138,1±8,3fi
448XH-9	94,6±5,7km	N-269X32-D	106,5±6,4jl	36XN-269	181,0±10,9cd
1787XN269	108,4±6,5il	N-269X414	149,5±9,0eh	913XH-8	121,0±6,6hk
1787XN50	171,2±10,3de	N-269X32-B	175,5±10,5de	913XH-9	265,6±15,9a
N-269X1780	150,8±9,0eg				

* Aynı sütunda aynı harfleri içeren çeşit ve hatlar LSD (P<0,05)'ye göre birbirinden farklıdır.

Çalışmada 37 adet melez bitkiye ait verim değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Bu çalışmada 913XH9 melezi, 265,6 g/bitki ile en yüksek değeri alırken, İnanXH9 melezi, 72,2 g/bitki ile en düşük değeri almıştır. Diğer 35 melez ise bu iki melezin verimi arasında dağılım göstermiştir (Çizelge 2). Çizelge 2'de verilen ilk bulgulara göre sırasıyla 913XH9, 100XH8, N-269X1547 ve N-269X953-W nolu hibritlerden en yüksek verim alınmıştır.



Şekil 1. Saf hat, melez ve çeşitlerdeki kök ur nematodu belirtileri; a ve b 'deki şekillerde, soldaki bitki kökleri nematoda hassas, sağdaki bitki kökleri dayanıklı.

Şekil 1'de görüldüğü gibi Kök ur nematodu dayanıklı saf hat, melez ve çeşitlerde ur oluşturamazken hassas çeşitlerde ur oluşturmuştur. Ancak bu ur oluşumu domatesteki kadar belirgin değildir.

Kök ur nematodları biberde ana zararlı konumunda olup ürün kaybına neden olmaktadır. Bundan dolayı kök ur nematodlar ile mücadele çalışmalarında dayanıklı çeşitlerin, entegre mücadele içerisinde diğer mücadele yöntemleri ile beraber kullanılmaları önerilmektedir. Sadece dayanıklı çeşitler ile mücadele edildiğinde, virüent popülasyonların gelişme olasılığından dolayı, diğer mücadele yöntemleri ile beraber uygulamak dayanıklı çeşidin kullanımını uzatmaktadır.

Teşekkür

"Türkiye F1 Hibrit Sebze Çeşit ve Nitelikli Hat Geliştirme Projesi ve 109G029 nolu KAMAG 1007 projesi kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Finansal destek nedeniyle TÜBİTAK'a, altyapı desteği sağladığı için Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na ve bilimsel danışmanlık katkılarından dolayı Doç. Dr. Nedim MUTLU, Prof. Dr. İ. Halil ELEKCİOĞLU ve Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA'ya teşekkür ederiz.

Yararlanılan Kaynaklar

- Bleve-Zacheo, T., M. Bongiovanni, M. T. Melillo & P. Castagnone-Sereno, 1998. The pepper resistance genes Me1 and Me3 induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultrastructural changes upon nematode infection. *Plant Science*, 133: 79-90.
- Djian-Caporalino, C., L. Pijarowski, A. Fazari, M. Samson, L. Gaveau, C. O'Byrne, V. Lefebvre, C. Caranta, A. Palloix & P. Abad, 2001. High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci Me3 and Me4 conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 592-600.
- Djian-Caporalino, C., A. Fazari, M. J. Arguel, T. Vernie, C. Vande Castele, I. Faure, G. Brunoud, L. Pijarowski, A. Palloix, V. Lefebvre & P. Abad, 2007. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) Me resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theoretical and Applied Genetics*, 114: 473-486.
- Djian-Caporalino C., L. Pijarowski, A. Januel, V. Lefebvre, A. Daubeze, A. Palloix, A. Dalmasso & P. Abad, 1999. Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 496-502.
- Elekcioglu, İ. H., B. Ohnesorge, G. Lung & N. Uygun, 1994. Plant parasitic nematodes in the Mediterranean region of Turkey. *Nematologia Mediterranea*, 22: 59-63.
- Fazari, A., A. Palloix, L. Wang, M. Yan Hua, A. Sage-Palloix, B. Zhang X & C. Djian-Caporalino, 2012. The root-knot nematode resistance N-gene co-localizes in the me-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. *Plant Breeding*, 131 (5): 665-673.
- Fery, R. L., P. D. Dukes & J. A. Thies, 1998. 'Carolina Wonder' and 'Charleston Belle': Southern root-knot nematode resistant bell peppers. *HortScience*, 33: 900-902.
- Fery, R. L. & P. D. Dukes, 1996. The inheritance of resistance to the southern root-knot nematode in 'Carolina Hot' cayenne pepper. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 121:1024-1027.
- Fery, R. L., P. D. Dukes & W. L. Ogle, 1986. 'Carolina Cayenne'pepper. *HortScience*, 21: 330.
- Gisbert, C., C. Trujillo-Moya, P. Sánchez-Torres, A. Sifres, E. Sánchez-Castro & F. Nuez, 2013. Resistance of pepper germplasm to *Meloidogyne incognita*. *Annals of Applied Biology*, 162 (1): 110-118.
- Hare, W. W., 1957. Inheritance of resistance to root-knot nematodes in pepper. *Phytopathology*, 47: 455-459.
- Hartman, K. M. & J. N. Sasser, 1985. "Identification of *Meloidogyne* Species on the Basis of Different Host Test and Perineal Pattern Morphology 69-77". In: *An Advanced Treatise on Meloidogyne*, Vol. 2 (Eds. K. R. Barker, C. C. Carter & J. N. Sasser). Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, 223 pp.

- Kokalis-Burelle, N., M. G. Bausher & E. N. Roskopf, 2009. Greenhouse evaluation of *Capsicum* rootstocks for management of *Meloidogyne incognita* on grafted bell pepper. *Nematropica*, 39: 121-132.
- Noe, J. P. 1992. Variability among populations of *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, 24: 404-414.
- Özarslandan, A. & İ. H. Elekciöđlu, 2003. Bazı hıyar, domates ve biber çeşitlerinin kök-ur nematodları (*Meloidogyne javanica* Chitwood, ırk-1 ve *M. incognita* Chitwood, 1949 ırk-2) (Nemata: Heteroderidae)'na karşı dayanıklılıklarının araştırılması. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 27 (4): 279-291.
- Özarslandan, A. & İ. H. Elekciöđlu, 2010. Türkiye'nin farklı alanlarından alınan Kök-Ur nematodu türlerinin (*Meloidogyne* spp.) (Nemata: Meloidogynidae) moleküler ve morfolojik tanıma ile belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 34 (3): 323-335.
- Pegard, A., G. Brizzard, A. Fazari, O. Soucaze, P. Abad & C. Djian- Caporalino, 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annum*. *Phytopathology*, 95: 158-165.
- Peixoto, J. R., W. R. Maluf & V. P. Campos, 1997. Resistencia de linhagens, híbridos F1 e cultivares de pimentão a *Meloidogyne incognita* (raças 1, 2, 3 e 4) e a *M. javanica*. *Horticultura Brasileira*, 15: 98-103.
- Söğüt, M. A. & İ. H. Elekciöđlu, 2000. Akdeniz Bölgesi'nde sebze alanlarında bulunan *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Nemata: Heteroderidae) türlerinin ırklarının belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 24 (1): 33-40.
- Thies, J. A. & R. L. Fery, 2000. Characterization of resistance conferred by the N gene to *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2, *M. hapla*, and *M. javanica*. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 125: 71-75.
- Thies, J. A. & R. L. Fery, 2002. Heat stability of resistance to southern root-knot nematode in bell pepper genotypes homozygous and heterozygous for the N gene. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 127: 371-375.
- Thies, J. A., D. W. Dickson & R. L. Fery, 2008. Stability of resistance to root-knot nematodes in "Charleston Belle" and "Carolina Wonder" bell peppers in a sub-tropical environment. *HortScience*, 43: 188-190.
- Tzortzakakis, E. A., M. S. Phillips & D. L. Trudgill, 2000. Rotation management of *Meloidogyne javanica* in a small scale greenhouse trial in Crete, Greece. *Nematropica*, 30: 167-175.
- Wang, D. & P. W. Bosland, 2006. The genes of *Capsicum*. *HortScience*, 41: 1169-1187.
- Wang, L. H., X. H. Gu, M. Y. Hua, S. L. Mao, Z. H. Zhang, D. L. Peng, X. F. Yun & B. X. Zhang, 2009. A SCAR marker linked to the N gene for resistance to root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in pepper (*Capsicum annum* L.). *Scientia Horticulturae*, 122: 318-322.
- Wesemael, W. M. L., N. Viaene & M. Moens, 2011. Rootknot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *Nematology*, 13: 3-16.
- Zamora, E., P. W. Bosland & S. Thomas, 1994. 'Carolina Cayenne' as a source of resistance to *Meloidogyne incognita* Races 1, 2, 3, and 4. *HortScience* 29: 1184-1185.

