

Orijinal araştırma (Original article)**Isparta ili merkez ilçesinde domates seralarından toplanan *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) popülasyonlarının bazı akarisitlere karşı direnç düzeyleri ve detoksifikasyon enzimleri¹**

Resistance levels and detoxification enzymes against some acaricides in populations of *Tetranychus urticae* Koch (Acari:Tetranychidae) collected from tomato greenhouses in central district of Isparta province

Sibel YORULMAZ SALMAN^{2*}**Bengi Kevser KAPLAN²****Summary**

In this study, the resistance levels of *Tetranychus urticae* Koch (Acari:Tetranychidae) populations collected from the greenhouses in the central district of the province of Isparta, Deregumu village, in 2014 against abamectin, spiromesifen and hexythiazox were determined by bioassay and biochemical methods. LC₅₀ values of *T. urticae* populations were found through leaf disk method by using spray tower. The resistance levels of *T. urticae* populations was determined as between 8.36-25.26 folds against abamectine, 8.16-22.82 folds against spiromesifen and 8.85-11.76 folds against hexythiazox. Enzymes of glutathione S-transferase (GST) and monooxygenase (P450) in the *T. urticae* popluations were determined by using the kinetic method; and the enzyme of esterase was determined by using the electrophoresis and kinetic methods. The levels of esterase, glutathione S-transferase (GST), and monooxygenases (P450) in the populations of *T. urticae* were 10.80-22.60, 2.56-2.78 and 0.0020-0.0040 mOD min⁻¹ mg⁻¹ protein, respectively. As a result, it was concluded that the esterase and P450 enzymes can be effective, but GST enzyme is not effective in the development of resistance against three acaricides in *Tetranychus urticae* populations collected from tomato greenhouses.

Key words: *Tetranychus urticae*, acaricides, resistance, detoxification enzymes

Özet

Bu çalışmada, Isparta ili Merkez ilçe Deregümü köyü domates seralarından 2014 yılında toplanan *T. urticae* popülasyonlarının abamectin, spiromesifen ve hexythiazox'a karşı direnç düzeyler bioassay ve biyokimyasal yöntemlerle belirlenmiştir. *T. urticae* popülasyonlarının LC₅₀ değeri ilaçlama kulesi kullanılarak yaprak disk metodu ile bulunmuştur. *T. urticae* popülasyonlarında abamectine'e karşı 8.36-25.26 kat; spiromesifen'e karşı 8.16-22.82 kat ve hexythiazox'a karşı 8.85- 11.76 kat arasında direnç düzeyleri belirlenmiştir. *T. urticae* popülasyonlarında dirençle bağlantılı detoksifikasyon enzimlerinden esteraz enzimi elektroforez ve kinetik yöntemlerle, GST ve P450 enzimleri ise kinetik yöntemle belirlenmiştir. *T. urticae* popülasyonlarının esteraz, GST ve P450 seviyeleri sırasıyla 10.80-22.60, 2.56-2.78 ve 0.0020-0.0040 mOD min⁻¹ mg⁻¹ protein arasında değişmiştir. Sonuç olarak domates seralarından toplanan *T. urticae* popülasyonlarında üç akarosite karşı gelişen dirençte esteraz ve P450 enzimlerinin etkili olabileceği, ancak GST enziminin ise direnç gelişiminde etkili olmadığı görüşüne varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Akarisit, detoksifikasyon enzimleri, direnç, *Tetranychus urticae*

¹ Bu çalışma TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı tarafından desteklenmiştir.

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta

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

Alınış (Received): 23.10.2014 Kabul edilmiş (Accepted): 01.12.2014

Giriş

İki noktalı kırmızıörümcek, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) dünyada birçok kültür bitkisi çeşidinde ekonomik kayıplara neden olan önemli bir zararlıdır (Helle & Sabelis, 1985). *T. urticae*'nin dünyada 150'den fazlası ekonomik öneme sahip, yaklaşık 1200 bitkide zarar yaptığı belirlenmiştir (Zhang, 2003). İki noktalı kırmızıörümcek bitki özsuğunu sokup emme suretiyle yapraklarda sararma, kuruma ve dökülmeyle doğrudan zarar yaparken, fotosentezin azalması ve virüs hastalıklarının nakliyle de dolaylı zarar meydana getirmektedir (Jeppson et al., 1975). *T. urticae*'nin savaşımında, uygulamasının kolay olması ve kısa sürede etki göstermesi nedeniyle kimyasal mücadele ilk sırada tercih edilmektedir (Van Leeuwen et al., 2005). Ancak *T. urticae*'nin fitofag yapısı, üreme potansiyelinin yüksek ve yaşam döngüsünün kısa olması gibi faktörler birkaç uygulamadan sonra akarisitlere direnç geliştirmesini kolaylaştırmaktadır (Stumpf & Nauen, 2001; Van Leeuwen et al., 2006). *T. urticae*'nin dünyada 60 ülkede 80'den fazla akarosite karşı direnç geliştirdiği belirlenmiştir (Miresmailli et al., 2006).

Son yıllarda Isparta İli Merkez İlçe Deregümü köyünde seracılık faaliyetleri oldukça yoğun bir şekilde yapılmaktadır. Antalya ilinde özellikle yaz aylarını içinde bulunduran dönemin sıcaklık ve nem değerlerinin aşırı yükselmesi nedeniyle örtüaltı üretim için alternatif bölgeler aranmıştır. Son beş yıllık süreç içerisinde Akdeniz Bölgesi'nde yer almasına rağmen, karasal iklim özelliği gösteren ve batı geçit kuşağında yer alan Isparta ili domates ve kesme çiçek örtüaltı üretiminde önemli bir yere gelmiştir. Isparta İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü 2012 yıl verilerine göre Merkez İlçe Deregümü Köyü'nde 480 dekarlık alan üzerinde örtüaltı domates üretimi yapılmış ve 4451 ton domates ürünü elde edilmiştir (Anonymous, 2012). Deregümü köyü domates üretimi seraları içerisinde en fazla ürün kaybına domates güvesi (*Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) ve iki noktalı kırmızıörümcek (*T. urticae* yol açmaktadır. Bu bölgedeki üreticiler hastalık ve zararlılarla üretim sezonu boyunca özellikle kimyasal mücadele yapmaktadırlar. Domates seraları içerisinde yoğun uygulanan ilaçlama programı sonucunda zararlıların, özellikle de kırmızıörümceklerin kullanılan akarisitlere karşı direnç geliştirmelerinin olası bir durum olduğu düşünülmektedir.

Abamectin (avermectin B1) toprak aktinomiseti *Streptomyces avermitilis*'den elde edilmiş ve insektisidal, nematisidal ve akarisidal etki gösteren bir pestisitir (Putter et al., 1981; Wang & Wu, 2007). Abamectin Türkiye'de 1981 yılında ruhsat almış ve birçok kültür bitkisinde zarar yapan *T. urticae*'nin kontrolünde kullanılmaktadır (Ay et al., 2005). Spiromesifen zararlı kırmızıörümcek mücadelesinde kullanılan büyüme düzenleyici bir akarisittir (Nauen et al., 2000; Bretschneider et al., 2007). Tetronik asit türevi grubu içerisinde yer alan spiromesifen zararlılarda lipid sentezini engelleyerek etki göstermekte ve yumurta, larva ve nimf gibi ergin öncesi dönemlerde kullanılmaktadır (Dekeyser, 2005). Hexythiazox Thiazolidine grubu içerisinde yer alan kontakt etkili ve sistemik olmayan bir akarisittir. Hexythiazox kırmızıörümceklerde ergin öncesi dönemlerde kullanılmaktadır (Sanatgar et al., 2011). Bu akarisit Entegre Mücadele programları içerisinde kırmızıörümcek mücadelesinde kullanılabilir (Yamamoto et al., 1996).

Bu çalışmada domates seralarından toplanan *T. urticae* popülasyonlarının abamectin, hexythiazox ve spiromesifen akarisitlerine karşı duyarlılık düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca *T. urticae* popülasyonlarında direnç ile bağlantılı olan estera, glutation S-transferaz (GST) ve P450 sitokrom monoksigenaz detoksifikasyon enzim düzeyleri de araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Tetranychus urticae popülasyonlarının orijini ve yetiştirilmesi

Çalışmada ana materyal olarak kullanılan *T. urticae* popülasyonları Isparta İli Merkez İlçe Deregümü Köyü'nde bulunan domates seralarından toplanmıştır. Domates seralarına 2014 yılı Haziran-Temmuz-Ağustos aylarında survey çalışmaları yapılmış ve 6 adet popülasyon toplanmıştır. Buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilen yaprak örnekleri *T. urticae* popülasyonlarının artmasını sağlamak amacıyla temiz barbunya bitkilerine aktarılmıştır. Örnek popülasyonların toplanma yerleri ve toplanma tarihleri çizelge 1'de verilmiştir. Karşılaştırma popülasyonu olarak kullanılan *T. urticae*'nin hassas popülasyonu German Susceptible Strain (GSS) 2001 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümündeki böcek yetiştirme kabinlerine Rothamsted Araştırma İstasyonundan (İngiltere) getirilmiştir. *T. urticae*'nin hassas popülasyonuna herhangi bir pestisit uygulaması yapılmadan yetiştirilmiştir. Popülasyonlar 26±1 °C sıcaklıkta, % 50-60 oranlı nem ve florasan lambalar ile 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullarda kültüre alınmıştır.

Çizelge 1. Denemede kullanılan *Tetranychus urticae* popülasyonlarının toplanma yerleri ve tarihleri

| Popülasyon adı | Toplandığı yer | Toplandığı tarih |
|-------------------------|----------------|------------------|
| ID1 | Domates serası | 15-06-2014 |
| ID2 | Domates serası | 15-06-2014 |
| ID3 | Domates serası | 21-07-2014 |
| ID4 | Domates serası | 21-07-2014 |
| ID5 | Domates serası | 17-08-2014 |
| ID6 | Domates serası | 17-08-2014 |
| Hassas popülasyon (GSS) | - | 21-04-2001 |

Akarisitler

Çalışmada kullanılan akarisitler Isparta İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü ile yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiş olup Isparta İli Merkez İlçe Deregümü Köyü domates seralarında kırmızıörümcek mücadelesinde yaygın olarak kullanılan üç akarisit çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Toksisite çalışmalarında abamectin (Agrimec EC, Syngenta, Japonya), spiromesifen (Oberon SC 240, Bayer Crop Science, Almanya) ve hexythiazox (Twister 5 EC, Hektaş, Türkiye) etkili maddeye sahip akarisitler kullanılmıştır.

Toksisite Testi

Abamectin, spiromesifen ve hexythiazox'un kırmızıörümceklerin ergin öncesi döneminde kullanılması sebebiyle bioassay çalışmaların tamamında 0-24 saatlik *T. urticae* larvaları kullanılmıştır. Aynı dönem kırmızıörümcek larvalarını elde etmek amacıyla, tabanı ıslatılmış pamukla kaplı 9 cm çapındaki Petri kapları üzerinde hazırlanan barbunya yaprak diskleri üzerine 15 adet ergin *T. urticae* dişi aktarılmış ve yumurta bırakmaları sağlanmıştır. Yumurtalar açıldıktan sonra aynı dönemdeki akar larvaları denemelerde kullanılmıştır. Bu yöntemde seçilen akarisitler saf su içinde çözdürülerek uygun dozlar hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan akaristlerin ilk dozu olarak tarla uygulama dozlarının iki katı uygulanmıştır. Akarisitlerin tarla uygulama dozlarının iki katlarının kullanılmasının sebebi ise *T. urticae* popülasyonlarının sera koşullarında yoğun pestisit uygulamalarından dolayı bir miktar direnç kazanmış olabileceklerinin düşünülmesinden kaynaklanmaktadır. Hazırlanan ilk dozdan itibaren akarisit konsantrasyonları %50 seyreltilerek denemeler 1 kontrol+7 doz, 3 tekrür olacak şekilde kurulmuştur. Nem sağlamak amacıyla tabanı ıslatılmış pamukla kaplı 9 cm çapındaki Petrilere 3 cm'lik yaprak diskleri hazırlanmıştır. Yaprak diskleri üzerine 25 adet 0-24 saatlik akar larvaları binoküler altında yumuşak uçlu fırça yardımıyla aktarılmıştır. Hazırlanan ilaç konsantrasyonları Petrilere ilaçlama kulesinde 1 atm basınç altında yaprak üzerine 2 ml olacak şekilde püskürtülmüştür. Kontrol grubuna sadece saf su uygulanmıştır. Kırmızıörümceklerde ölü-canlı sayımları 7. günde yapılmıştır. Elde edilen verilerden yararlanarak farklı akar popülasyonlarının LC₅₀ değerleri POLO bilgisayar paket programında (LeOra Software, 1994) hesaplanmıştır. Direnç katları, araziden alınan *T. urticae* popülasyonlarının LC₅₀ değerlerinin hassas popülasyonun LC₅₀ değerine bölünmesi ile hesaplanmıştır.

Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) ile esteraz enziminin incelenmesi

Elektroforez çalışmalarında Goka & Takafuji (1992), Ay & Gürkan (2005)'in yöntemleri uyarlanarak kullanılmıştır. Elektroforez işlemi mini kasetli sistemde (Bio-Rad) %7.5'lük ayırıcı ve %3.5'lük yükleyici jel içeren kesikli doğal elektroforez metodu kullanılmıştır. Beş adet ergin dişi birey 50 µl homojenizasyon tamponu (%0.1 Triton X-100 içeren %32'lik sukroz) içerisinde plastik ezici ile homojenize edilmiştir. Polimerizasyondan sonra her bir jel hücreğine 10 µl homojenat yüklenmiştir. Elektroforezde koşuturma işlemi 150 V'da yaklaşık 1.5 saat'de yapılmıştır. 0.2 M fosfat buffer (pH 6.5 ve %1 aseton içeriyor) ile %0.02 lik α -naphthyl asetat substrat solüsyonu hazırlanmıştır. Jel bu çözeltide esteraz enzimi inkübasyonu için 30 dk bekletilmiştir. %0.02'lik α -naphthyl asetat solüsyonu ile %0.4 oranında fast blue BB salt boya solüsyonu hazırlanmış ve jel bu çözeltide 1 saat boyanmıştır. Boyama işlemi bittikten sonra jel %7'lik asetik asit çözeltisi içerisine alınarak 24 saat sonra görüntüleme cihazında fotoğrafı çekilmiştir.

***Tetranychus urticae* populasyonlarının esteraz, glutathion S-transferaz (GST) ve monooksijenaz (P450) enzimlerinin kinetik olarak belirlenmesi**

Esteraz aktivitesinin kinetik olarak belirlenmesinde substrat olarak α -naphthyl acetate ve Stumpf & Nauen (2002)'in geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. 20 adet ergin dişi 100 µl sodyum fosfat buffer (0.1M, pH 7.5) (%0.1 Triton X-100 içeren) içinde homojenize edilmiştir. Bu homojenat 10000 g, +4 °C'de ve 5 dk santrifüj edildikten sonra enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzim kaynağı olarak kullanılan supernatant 10 kat seyreltilmiştir. Mikroplakanın hücrelerine 25 µl supernatant + 25 µl fosfat buffer (0.2 M, pH:6) konulmuştur. Çalışma hücrelere 200 µl substrat solüsyonunun eklenmesiyle başlatılmıştır. Substrat solüsyonu 30 mg fast blue RR tuzunun 50 ml 0.2 M sodyum fosfat buffer'da çözülmesi ve bu karışıma 500 µl 100 Mm α -naphthyl acetate'in eklenmesiyle elde edilmiştir. Enzim aktivitesi 23 °C, 450 nm'de 10 dk süreyle okunmuştur.

GST enziminin kinetik olarak belirlenmesinde Stumpf & Nauen (2002)'in geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. 30 ergin dişi 300 µl Tris HCL buffer (0.05M, pH:7.5) içinde homojenize edilmiştir. Supernatant 10000g, +4 °C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. 100 µl supernatant, 100 µl 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ve 100 µl reduced glutathione (GSH)'dan oluşan toplam hacim mikroplaka hücrelerine konulmuştur. CDNB %0.1 ethanolde hazırlanmış ve final konsantrasyonda hücrelerde 0.4 mM CDNB bulunmuştur. Absorbanstaki değişim 340 nm, 25 °C'de ve 5 dk'da okunmuştur.

Sitokrom P450 monooksijenaz enziminin belirlenmesinde substrat olarak *p*-nitroanisol (PNOD) ve Rose et al. (1995) yöntemi uyarlanarak kullanılmıştır. 50 adet dişi birey 100 µl homojenizasyon tampon çözeltisinde (0.05 M Tris-HCl + %1.15 KCl + 1mM EDTA pH (7.7)) plastik ezici ile ezilerek +4 °C 10000 g'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Mikroplaka hücrelerine 45 µL homojenizasyon buffer + 45 µL supernatant+100 µL 2mM PNOD eklenerek karışım 30 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon mikroplaka hücrelerine 10 µL 9.6 mM NADPH eklenerek başlatılmıştır. P450 enzim aktivitesi Versamax kinetik mikroplaka okuyucuda 405 nm, 30 °C'de 15 dk süreyle ölçülmüştür.

Biyokimyasal çalışmalarda, kontrol hücreleri ise homojenatsız olarak okunmuştur. Enzim okumaları dört tekerrürlü olarak yapılmıştır. Tüm enzim aktiviteleri Softmax PRO software programında analiz edilerek sonuçlar mOD min⁻¹ mg⁻¹ protein olarak verilmiştir. Örneklerin toplam protein miktarlarının belirlenmesinde Bradford (1976)'un total protein tayin yöntemi kullanılmış ve Bovine Serum Albumine (BSA) standart olarak alınmıştır. Enzim sonuçlarından elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi tekniği ile (One-Way ANOVA) analiz edilmiş ve popülasyonlar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Tukey testi kullanılmıştır (Winer et al., 1991).

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Toksisite sonuçları

Domates seralarından toplanan *T. urticae* popülasyonları ve hassas popülasyonda abamectin'e karşı belirlenen LC₅₀ değerleri ve direnç oranları Çizelge 2'de verilmiştir. *T. urticae* popülasyonlarında abamectin'e karşı belirlenen direnç oranları 8.21-25.26 kat arasında değişmektedir. Abamectin'e karşı en yüksek direnç oranı ID4 (25.26 kat) popülasyonunda belirlenirken en düşük direnç oranı ise ID6 (8.21 kat) popülasyonunda belirlenmiştir. Sato et al. (2005) *T. urticae* popülasyonunda beş seleksiyon sonucunda 342 kat abamectin direnci geliştiğini bildirmişlerdir. Yorulmaz & Ay (2009), laboratuvar koşullarında 15 kez selekte ettikleri *T. urticae* popülasyonunda 35.05 kat abamectin direnci belirlemişlerdir.

Çizelge 2. *Tetranychus urticae* popülasyonlarının abamectin'e karşı belirlenen LC₅₀ değerleri ve direnç oranları

| Popülasyon | n | Eğim±se | LC ₅₀ (mg a.i.l ⁻¹) (95% CL) | R** |
|-------------------|-----|-----------|--|-------|
| ID1 | 603 | 1.70±0.14 | 1.59 (1.27-1.93) | 8.36 |
| ID2 | 600 | 1.55±0.12 | 3.50 (2.66-4.65) | 18.42 |
| ID3 | 605 | 1.58±0.12 | 2.54 (2.06-3.08) | 13.36 |
| ID4 | 607 | 1.52±0.13 | 4.80 (2.67-6.31) | 25.26 |
| ID5 | 602 | 1.66±0.13 | 1.81 (0.81-3.09) | 9.52 |
| ID6 | 605 | 1.40±0.14 | 1.56 (0.94-2.23) | 8.21 |
| Hassas popülasyon | 608 | 1.58±0.27 | 0.19 (0.01-0.54) | - |

*: denemede kullanılan birey sayısı

** : hassas popülasyona göre direnç oranı

Domates seralarından toplanan *T. urticae* popülasyonları ve hassas popülasyonda spiromesifen'e karşı belirlenen LC₅₀ değerleri ve direnç oranları Çizelge 3'de verilmiştir. *T. urticae* popülasyonlarında spiromesifen'e karşı belirlenen direnç oranları abamectin'e benzer şekilde yüksek bulunmuştur. Abamectin ve spiromesifen'e karşı direnç oranlarının yüksek bulunmasının sebebinin özellikle domates üretim seralarında üretim sezonu boyunca yoğun akarisit uygulamalarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Çünkü domates seralarından toplanan *T. urticae*'nin tarla popülasyonları sürekli pestisit uygulamasına maruz kalmakta ve direnç geliştirebilmektedir. Spiromesifen'e karşı en yüksek direnç oranı 22.82 kat ile ID4 popülasyonunda belirlenirken en düşük direnç oranı ise 8.16 kat ile ID2 popülasyonunda belirlenmiştir. Pottelberge et al. (2009), 274 kat spirodiclofen dirençli *T. urticae* popülasyonunda P450 monoksinaz ve esteraz enzimlerinin direnç gelişiminde rol oynadığını belirlemişlerdir. Demaeght et al. (2013) 680 kat spirodiclofen dirençli *T. urticae* popülasyonunun aynı grupta yer alan spiromesifen ve spirotetramat akarisitlerine karşı da çapraz direnç geliştirebileceğini bildirmişlerdir. Hu et al. (2010) 90.8 kat spirodiclofen dirençli *Panonychus ulmi* (Acarı:Tetranychidae) popülasyonunda spirotetramat'a karşı çapraz direnç belirlemişlerdir. Spirodiclofen ve spiromesifen etken maddeleri tetronik asit türevi grubu altında yer alan ve etki mekanizmaları benzer akarisitlerdir. Literatürde spirodiclofen'e karşı kırmızıörümceklerde direnç gelişimi ile ilgili fazla sayıda çalışma bulunmasına karşı, spiromesifen ile çalışma sayısı sınırlıdır. Ancak spirodiclofen ve spiromesifen'in etki mekanizmalarının aynı olduğu düşünülürse, kırmızıörümceklerde spiromesifen'e karşı direnç gelişimi de olası bir durumdur. Çalışmamızda da domates seralarından toplanan *T. urticae*'nin tarla popülasyonlarında spiromesifen kullanımına bağlı olarak orta düzeyde direnç geliştiği görülmektedir.

Domates seralarından toplanan *T. urticae* popülasyonları ve hassas popülasyonda hexythiazox'a karşı belirlenen LC₅₀ değerleri ve direnç oranları Çizelge 4'de verilmiştir. *T. urticae* popülasyonlarında hexythiazox'a karşı belirlenen direnç oranları abamectin ve spiromesifen'e göre daha düşük bulunmuştur. *T. urticae* popülasyonlarında hexythiazox'a karşı belirlenen direnç oranları 8.54-11.76 kat arasında

değişmektedir. Hexythiazox'a karşı en yüksek direnç oranı ID4 (11.76 kat) popülasyonunda belirlenirken en düşük direnç oranı ise ID5 (8.54 kat) popülasyonunda bulunmuştur. Reissig & Hull (1991) elma bahçelerinden topladıkları *P. ulmi*'nin tarla popülasyonlarında hexythiazox direnci belirlemiştir. Pree et al. (2002) hexythiazox dirençli *P. ulmi* popülasyonunda 2000 kat clofentezine direnci belirlemiştir. Yorulmaz et al (2010), Isparta elma bahçelerinden topladıkları 13 adet *T. urticae* popülasyonunda cyhexatin'e karşı 1.24-3.36 kat, propargite karşı ise 1.23-3.18 kat arsında değişen direnç tespit etmişlerdir.

Çizelge 3. *Tetranychus urticae* popülasyonlarının spiromesifen'e karşı belirlenen LC₅₀ değerleri ve direnç oranları

| Popülasyon | n* | Eğim±se | LC ₅₀ (mg a.i l ⁻¹) (95% CL) | R** |
|-------------------|-----|-----------|--|-------|
| ID1 | 600 | 1.37±0.11 | 35.16 (28.17-43.15) | 11.75 |
| ID2 | 602 | 1.28±0.11 | 24.40(16.36-33.64) | 8.16 |
| ID3 | 603 | 1.57±0.12 | 38.90 (28.00-52.70) | 13.01 |
| ID4 | 608 | 1.49±0.13 | 68.25(45.72-103.48) | 22.82 |
| ID5 | 603 | 1.56±0.12 | 28.94 (15.64-43.68) | 9.67 |
| ID6 | 600 | 1.90±0.16 | 51.26(31.99-76.75) | 17.14 |
| Hassas popülasyon | 603 | 1.21±0.47 | 2.99 (1.51-6.14) | - |

*: denemede kullanılan birey sayısı

** hassas popülasyona göre direnç oranı

Çizelge 4. *Tetranychus urticae* popülasyonlarının hexythiazox'a karşı belirlenen LC₅₀ değerleri ve direnç oranları

| Popülasyon | n* | Eğim±se | LC ₅₀ (mg a.i l ⁻¹) (95% CL) | R** |
|-------------------|-----|-----------|--|-------|
| ID1 | 602 | 1.61±0.13 | 14.53 (6.67-18.76) | 8.85 |
| ID2 | 602 | 1.43±0.12 | 16.40 (9.55-22.62) | 10.00 |
| ID3 | 607 | 1.36±0.12 | 16.07 (13.55-20.30) | 9.79 |
| ID4 | 610 | 1.33±0.11 | 19.29 (15.22-24.45) | 11.76 |
| ID5 | 605 | 1.40±0.12 | 14.01 (11.28-20.02) | 8.54 |
| ID6 | 606 | 1.12±0.21 | 15.26 (13.40-19.50) | 9.30 |
| Hassas popülasyon | 602 | 1.53±0.16 | 1.64 (0.94-2.42) | - |

*: denemede kullanılan birey sayısı

** hassas popülasyona göre direnç oranı

Esteraz, Glutathion S-transferaz (GST) ve Sitokrom P450 Monoksijenaz Enzim Aktivitesi Sonuçları

Tetranychus urticae'nin hassas ve domates seralarından toplanan tarla popülasyonlarının esteraz, GST ve P450 enzim aktivitesi sonuçları Çizelge 5'de verilmiştir. *T. urticae* popülasyonlarında en yüksek esteraz enzim aktivitesi 22.60 mOD min⁻¹ mg⁻¹ protein değeriyle ID4 popülasyonunda belirlenmiştir. Esteraz enzim aktivitesi bakımından ID4, ID2 ve ID6 popülasyonları istatistiki olarak aynı grup içerisinde yer almıştır (P<0.05). ID2, ID3 ve ID5 popülasyonlarının esteraz enzim seviyeleri hassas popülasyona göre yüksek bulunmuş ve farklı bir istatistik gruba ifade edilmiştir. Domates seralarından toplanan *T. urticae* popülasyonlarının GST enzim aktiviteleri hassas popülasyonla benzer bulunmuş ve aynı istatistik grup içerisinde yer almışlardır (P<0.05). Domates seralarından toplanan *T. urticae* popülasyonlarında en yüksek P450 monoksijenaz enzim aktivitesi 0.0042 mOD min⁻¹ mg⁻¹ protein değeri ile ID4 popülasyonunda, en düşük enzim seviyesi ise 0.0026 mOD min⁻¹ mg⁻¹ protein değeri ile ID1 popülasyonunda belirlenmiştir. P450 enzim aktivitesi bakımından ID2, ID4, ID5 ve ID6 popülasyonları istatistiki olarak aynı grupta yer alırken, ID1 ve ID3 popülasyonları ise farklı bir grubu oluşturmuştur (P<0.05).

Çizelge 5. Hassas ve domates seralarından toplanan *Tetranychus urticae* popülasyonlarının esteraz enzim aktiviteleri

| Popülasyon | n* | Spesifik aktivite mOD min ⁻¹ mg ⁻¹ protein | R/S** |
|-------------------|----|---|-------|
| Esteraz | | | |
| Hassas popülasyon | 4 | 10.80 c*** | |
| ID1 | 4 | 15.25 b | 1.41 |
| ID2 | 4 | 20.38 a | 1.88 |
| ID3 | 4 | 17.31 b | 1.60 |
| ID4 | 4 | 22.60 a | 2.09 |
| ID5 | 4 | 15.36 b | 1.42 |
| ID6 | 4 | 19.42 a | 1.79 |
| GST | | | |
| Hassas popülasyon | 4 | 2.78 a*** | <1 |
| ID1 | 4 | 2.67 a | <1 |
| ID2 | 4 | 2.59 a | <1 |
| ID3 | 4 | 2.56 a | <1 |
| ID4 | 4 | 2.75 a | <1 |
| ID5 | 4 | 2.70 a | <1 |
| ID6 | 4 | 2.61 a | <1 |
| P450 | | | |
| Hassas popülasyon | 4 | 0.0020 c*** | |
| ID1 | 4 | 0.0026 b | 1.30 |
| ID2 | 4 | 0.0040 a | 2.00 |
| ID3 | 4 | 0.0031 b | 1.55 |
| ID4 | 4 | 0.0042 a | 2.10 |
| ID5 | 4 | 0.0035 a | 1.75 |
| ID6 | 4 | 0.0038 a | 1.90 |

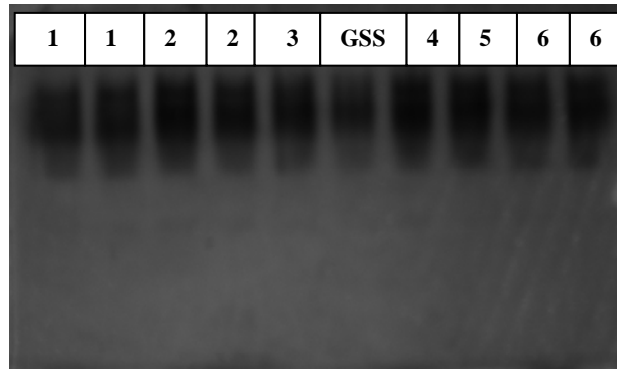
* Tekerrür sayısı

** Denenen popülasyonun enzim aktivitesi/ hassas popülasyonun enzim aktivitesi

*** Aynı harfler istatistiki olarak aynı grubu göstermektedir (P<0.05)

Poliakrilamid jel elektroforez sonuçları

Tetranychus urticae popülasyonlarının esteraz enzim bantları poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle belirlenmiş ve bantlar şekil 1'de verilmiştir. Ayrıca popülasyonların esteraz bantlarının kantitatif yoğunlukları densimetrede belirlenerek sonuçlar Çizelge 6'da gösterilmiştir.

Şekil 1. *Tetranychus urticae* popülasyonlarının esteraz bantları (1: ID1, 2: ID2, 3: ID3, GSS: hassas popülasyon, 4: ID4, 5: ID5, 6: ID6)

Tetranychus urticae popülasyonlarının esteraz bantları incelendiğinde, domates seralarından toplanan tarla popülasyonlarına ait esteraz bantlarının hassas popülasyona ait esteraz bandına göre daha koyu çıktığı belirlenmiştir. Ayrıca Çizelge 6 incelendiğinde domates seralarından toplanan *T. urticae* popülasyonlarının esteraz bantlarından belirlenen kantitatif yoğunluklarının hassas popülasyona göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar *T. urticae*'nin tarla popülasyonlarının esteraz enzimlerinin kinetik olarak belirlenmesi sonucu elde edilen sonuçlar ile uyumaktadır. Çünkü tarla popülasyonlarının

tamamında esteraz enzim aktivitesi hassas popülasyona göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca tarla popülasyonlarında abamectin, spiromesifen ve hexythiazox'a karşı belirlenen direnç sonuçları ile de uyum göstermektedir.

Çizelge 6. *Tetranychus urticae* popülasyonlarının esteraz bantlarının kantitatif yoğunlukları ($P < 0.05$)^a

| Popülasyon | Toplam yoğunluk±SE | Oran ^b |
|-------------------|--------------------|-------------------|
| Hassas popülasyon | 2420.01±1.19 B | - |
| ID1 | 2945.00±1.25 A | 1.21 |
| ID2 | 3456.05±1.35 A | 1.42 |
| ID3 | 3019.04±1.28 A | 1.24 |
| ID4 | 4325.08±1.21 A | 1.78 |
| ID5 | 3489.03±1.38 A | 1.44 |
| ID6 | 3845.02±1.99 A | 1.58 |

^aAynı harfler istatistiki olarak aynı grubu göstermektedir ($P < 0.05$)

^b*Tetranychus urticae* popülasyonlarının enzim aktivitesi/hassas popülasyon enzim aktivitesi

Esteraz, GST ve sitokrom P450 enzimleri birçok insektisit ve akarisit detoksifikasyonunda rol oynamaktadır (Konanz & Nauen 2004). Literatürde *T. urticae*'de birçok akarisite karşı gelişen dirençte detoksifikasyon enzimlerinin rol oynadığı görülmektedir. Yang et al. (2002), bifenthrin ile selekte edilen *T. urticae* popülasyonunda esteraz seviyesinde artış belirlerken, GST aktivitesinin azaldığını bulmuştur. Stumpf & Nauen (2002) *T. urticae*'nin abamectin dirençli tarla popülasyonunda hassas popülasyonla karşılaştırıldığında, 1.6 kat esteraz ve 12.7 kat P450 enzim aktivitesi belirlemişlerdir. Bu çalışmada da benzer şekilde *T. urticae*'nin tarla popülasyonlarında abamectin direnci belirlenmiş ve esteraz ve P450 enzim seviyeleri yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda özellikle kırmızıörümcek popülasyonlarında en yüksek direnç abamectin'e karşı belirlenmiştir. Rauch & Nauen (2003), 13 kat spirodiclofen dirençli *T. urticae*'de 1.2 kat esteraz enzim aktivitesi belirlemişlerdir. Çalışmamızda *T. urticae*'nin tarla popülasyonlarında spirodiclofen ile aynı etki mekanizmasına sahip olan spiromesifen'e karşı 8.21-25.26 kat direnç oranı ve esteraz enzim aktivitesi yüksek bulunmuştur. Van Leeuwen & Tirry (2007), *T. urticae*'nin tarla popülasyonunda yüksek oranda bifenthrin direnci ve esteraz aktivitesi bulmuşlardır. Van Leeuwen & Tirry (2007), pamuk bitkisinden toplanan *T. urticae*'nin tarla popülasyonunda yüksek oranda bifenthrin direnci ve esteraz aktivitesi bulmuşlardır. Khajehali et al. (2011) gül üzerinden toplanan ve birçok akarisite karşı duyarlı olan faklı *T. urticae* popülasyonlarında GST enzim aktivitelerinde önemli bir farklılık belirlememişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde *T. urticae*'nin tarla popülasyonlarının GST enzim aktiviteleri ile hassas popülasyonun GST enzim aktivitesi arasında fark bulunmamıştır. Lin et al. (2009), börülce üzerinden topladıkları ve seleksiyon sonucu 8.7 kat abamectin dirençli *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari:Tetranychidae) popülasyonunda 2.7 kat esteraz ve 3.4 kat GST enzim aktivitesi belirlemişlerdir. Ay & Kara (2011), fasulye bitkisi üzerinde yetiştirilen 105.27 kat clofentezine dirençli *T. urticae* popülasyonunun esteraz bant yoğunluğunun fazla olduğunu belirlemişlerdir. Moghadam et al. (2012), gül bitkisi üzerinden toplanan fenazaquin dirençli *T. urticae* popülasyonlarında hassas popülasyona göre esteraz enziminin arttığını belirlemişlerdir. Literatür bilgileri kırmızıörümceklerde akarisitlere karşı gelişen dirençte detoksifikasyon enzimlerinin etkili olduğunu belirtmektedir. Bu çalışmada *T. urticae*'nin domates seralarından toplanan tarla popülasyonlarında üç farklı akarisite karşı gelişen dirençte özellikle esteraz ve P450 enzimlerinin rol oynadığını akla getirmektedir. Özellikle her üç akarisite karşı en yüksek oranda direnç belirlenen ID4 popülasyonunda esteraz ve P450 enzim aktivitelerinin diğer popülasyonlara göre en yüksek bulunması da bu görüşü desteklemektedir. Buna karşılık GST enziminin kinetik olarak ölçülmesinde tarla popülasyonları ve hassas popülasyon arasında farklılık belirlenmemiştir. Ancak bu tür çalışmalarda daha detaylı araştırmalar mutlaka yapılmalı ve özellikle pestisitlerin etki mekanizmalarını artıran ve detoksifikasyon enzim inhibitörü olarak görev yapan sinerjist çalışmalarında yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak domates seralarından toplanan *T. urticae* popülasyonlarında abamectin, spiromesifen ve hexythiazox akarisitlerine karşı orta düzeyde direnç belirlenmiştir. Bunun yanı sıra *T. urticae*'nin tarla popülasyonlarında bu üç akarisite karşı gelişen dirençte özellikle esteraz ve P450 enzimlerinin rol oynayabileceği buna karşılık GST enziminin ise etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. Dünyada ve ülkemizde iki noktalı kırmızıörümceğin akarisitlere karşı direnç gelişimi ve mekanizmasının belirlendiği çalışma sayısı oldukça fazladır. Ancak Isparta ili Merkez ilçe Deregümü domates seraları üretim açısından yeni bir bölge olması ve yoğun pestisit uygulamalarının yapılmasından dolayı bu alanda *T. urticae* popülasyonlarının direnç gelişimi bakımından incelenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu çalışma sonucunda Isparta ilindeki Merkez ilçe Dergümü köyü domates seralarında kırmızıörümceklere karşı yaygın olarak kullanılan üç akarisit *T. urticae* popülasyonlarında önemli bir duyarlılık kaybına neden olduğu bulunmuştur. Bu akarisitleri sık aralıklarla ve arka arkaya kullanmak yerine, farklı etki mekanizmasına sahip akarisitlerin rotasyonla kullanımlarının yararlı olacağı düşünülmektedir. Zararlılarla etkili bir kimyasal mücadele için duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi önemlidir. Bu nedenle zararlıların duyarlılık düzeylerinin sık aralıklar kontrol edilerek direncin önlenmesi veya geciktirilmesi için gerekli önlemlerin alınması gerektiği düşünülmektedir.

Teşekkür

Çalışmayı maddi yönden destekleyen TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı'na teşekkür ederiz.

Yararlanılan Kaynaklar

- Anonymous, 2012. T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu Başkanlığı, Ankara. (Web sayfası: <http://www.tuik.gov.tr>.) (Erişim tarihi: Haziran, 2014).
- Ay, R & M. O. Gürkan, 2005. Resistance to bifenthrin and resistance mechanisms of different strains of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) from Turkey. *Phytoparasitica*, 33: 237-244.
- Ay, R & F. E. Kara, 2011. Toxicity, inheritance and biochemistry of clofentezine resistance in *Tetranychus urticae*. *Insect Science*, 18(5): 503-511.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein – dye inding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bretschneider, T., R. Fisher & R. Nauen, 2007. "Inhibitors of lipid synthesis (acetyl-CoA- carboxylase inhibitors), 909–925". In: *Modern Crop Protection Compounds* (Ed: W. Kramer & U. Schirmer). Wiley, Weinheim, 1025p.
- Dekeyser, M. A., 2005. Acaricide mode of action. *Pest Management Science*, 61: 103–110.
- Demaeght, P., W. Dermauw, T. Tsakireli, J. Khajehali, R. Nauen, L. Tirry, J. Vontas, P. Lümme, & T. Van Leeuwen, 2013. Molecular analysis resistance to acaricidal spirocyclic tetranic acids in *Tetranychus urticae*: CYP392E10 metabolizes spirodiclofen, but not its corresponding enol. *Insect Biochemical Molecular Biology*, 43: 544-554.
- Goka, K & A. Takafuji, 1992. Enzyme variations among Japanese populations of the two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch. *Applied Entomology Zoology*, 27: 141–150.
- Helle, W. & M.W. Sabelis. 1985. *Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control*. Elsevier, Amsterdam, 545p.
- Hu, J., C. Wang, J. Wang, Y. You & F. Chen, 2010. Monitoring of resistance to spirodiclofen and five other acaricides in *Panonychus citri* collected from Chinese citrus orchards. *Pest Management Science*, 66: 1025–1030.
- Jeppson, L. R., H. H. Keifer & E. W. Baker, 1975. *Mites Injurious to Economic Plants*. University of California Press, Berkeley, 614 p.
- Khajehali, J., P. Nieuwenhuys, P. Demaeht, L. Tirry & T. Van Leeuwen, 2011. Acaricide resistance and resistance mechanisms in *Tetranychus urticae* populations from rose greenhouses in the Netherlands. *Pest Management Science*, 67: 1424–1433.
- Konanz, S. & R. Nauen, 2004. Purification and partial characetrization of a glutathione s-transferase from the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 79(2): 49-57.

- Leeuwen, T. & L. Tirry, 2007. Esterase-mediated bifenthrin resistance in a multiresistant strain of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science*, 63:150-156.
- LeOra Software, 1994. Polo-pc: a User' s Guide to Probit or Logit Analysis Leora Software, Berkeley, 28p.
- Lin, H., X. Chuan-hua, W. Jin-jun, L. Ming, L. Wen-cai & Z. Zhi-mo, 2009. Resistance selection and biochemical mechanism of resistance to two acaricides in *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93: 47-52.
- Miresmaili, S. & M. B. Isman, 2006. Efficacy and persistence of rosemary oil as an acaricide against two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) on greenhouse tomato. *Journal of Economic Entomology*, 99: 2015–2023.
- Moghadama, M. M., M. Ghadamyaria & K. Talebi, 2012. Resistance mechanisms to fenazaquin in Iranian populations of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*, 38(2): 138-145.
- Nauen, R., N. Stumpf & A. Elbert, 2000. "Efficacy of BAJ 2740, a new acaricidal tetrionic acid derivative, against tetranychid spider mite species resistant to conventional acaricides". *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference*. (14-18 November 1990, UK), 829 p.
- Pottelberge, S. V., T. V. Leeuwen, J. Khajeali & L. Tirry, 2009. Genetic and biochemical analysis of a laboratory-selected spirodiclofen-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari:Tetranychidae). *Pest Management Science*, 65: 358–366.
- Pree, D. J., L. A. Bittner & K. J. Whitty, 2002. Characterization of resistance to clofentezine in populations of european red mite from orchards in Ontario. *Experimental and Applied Acarology*, 27: 181-193.
- Putter, I., J. G. MacConnell, F. A. Presier, A. A. Haidri, S. S. Ristich & R. A. Dybas, 1981. Avermectins: novel insecticides, acaricides and nematocides from a soil microorganism. *Cellular Molecular Life Science*, 37: 963-964.
- Rauch, N. & R. Nauen, 2003. Spirodiclofen resistance risk assessment in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): a biochemical approach. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 74: 91-101.
- Reissig, W. H. & L. A. Hull, 1991. Hexythiazox resistance in a field population of european red mite (Acari: Tetranychidae) on apples. *Journal of Economic Entomology*, 84(3): 727-735.
- Rose, R. L., R. Barbhaya, G. Rock & E. Hodgson, 1995. Cytochrome P-450-associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in *Heliothis virescens*. *Pesticide Biochemical Physiology*, 51: 178–191.
- Sanatgar, E., R. V. Shoushtari, A. A. Zamani, M. Arbabi & E.S. Nejadian, 2011. Effect of frequent application of hexythiazox on predatory mite *Phytoseiulus persimilis* Athias - Henriot (Acari: Phytoseiidae). *Acade Journal of Entomology*, 4: 94-101.
- Sato, M. E., M. Z. Silva, A. Raga & M. F. S. Filho, 2005. Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance. *Neotropic Entomology*, 34: 991-998.
- Stumpf, N. & R. Nauen, 2001. Cross-resistance, inheritance and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 94(6): 1577-1583.
- Stumpf, N. & R. Nauen, 2002. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemical and Physiology*, 72: 111-121.
- Van Leeuwen, T., S. V. Pottelberge & L. Tirry, 2005. Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science* 61: 499-507.
- Van Leeuwen, T. V., L. Tirry, & R. Nauen, 2006. Complete maternal inheritance of bifenazate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and its implications in mode of action considerations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 869-877.
- Van Leeuwen, T & L. Tirry, 2007. Esterase-mediated bifenthrin resistance in a multiresistant strain of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science*, 63:150-156.
- Wang, L & Y. Wu, 2007. Cross-resistance and biochemical mechanisms of abamectin resistance in the B-type *Bemisia tabaci*. *Journal of Applied Entomology*, 131: 98-103.

- Winer, B. J., D. R. Brown & K. M. Michels, 1991. Statistical Principles in Experimental Design, ISBN 0-07-070982-3, New York, 552p.
- Yamamoto, A., H. Yoneda, R. Hatano & M. Asada, 1996. Realized heritability estimates of hexythiazox resistance in the citrus red mite *Panonychus citri* (McGregor). Journal of Pesticide Science, 21: 43-47.
- Yang, X., L. L., Buschman, K. Y. Zhu & D.C. Margolies, 2002. Susceptibility and detoxifying enzyme activity in two spider mite species (Acari: Tetranychidae) after selection with three insecticides. Journal of Economic Entomology, 95(2): 399-406.
- Yorulmaz, S. & R. Ay, 2009. Multiple resistance, detoxifying enzyme activity, and inheritance of abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 33: 393-402.
- Yorulmaz, S., P. Kaplan, D. Boztürk, S. Çobanoğlu & R. Ay, 2010. Isparta ili elma bahçelerinden toplanan *Tetranychus urticae* Koch. (Acarina: Tetranychidae) popülasyonlarının cyhexatin ve propargite karşı duyarlılıklarının belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 5 (1): 17-23.
- Zhang, Z., 2003. Mites of Greenhouses: Identification, Biology and Control. CABI Publishing, Wallingford, 828 p.