

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ANTALYA İLİ KESME ÇİÇEK SERALARINDAN TOPLANAN
Tetranychus urticae KOCH (ACARİNA: TETRANYCHİDAE)
POPÜLASYONLARININ ABAMECTİNE DİRENÇ DÜZEYLERİ VE
G314D MUTASYONUN BELİRLENMESİ

Erdem SOLMAZ

Danışman
Prof. Dr. Recep AY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2019



© 2019 [Erdem SOLMAZ]

TEZ ONAYI

Erdem SOLMAZ tarafından hazırlanan " Antalya ili kesme çiçek seralarından toplanan *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) popülasyonlarının abamectine direnç düzeyleri ve G314D mutasyonun belirlenmesi " adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Prof. Dr. Recep AY

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ahmet Güray FERİZLİ

Ankara Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Sibel YORULMAZ SALMAN

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yusuf UÇAR



TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Erdem SOLMAZ



TEZ ONAYI

Erdem SOLMAZ tarafından hazırlanan " Antalya ili kesme çiçek seralarından toplanan *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) popülasyonlarının abamectine direnç düzeyleri ve G314D mutasyonun belirlenmesi " adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Bitki Koruma Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Prof. Dr. Recep AY**

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Ahmet Güray FERİZLİ**

Ankara Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Sibel YORULMAZ SALMAN**

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Enstitü Müdürü **Prof. Dr. Yusuf UÇAR**

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Erdem SOLMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	6
3. MATERYAL ve METOT.....	11
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. Kırmızıörümcek popülasyonları	11
3.1.1.1. Kırmızıörümcek popülasyonlarının toplanması.....	11
3.1.1.2. Kırmızıörümcek popülasyonlarının üretimi.....	12
3.1.2. Akarisit	13
3.2. Metot.....	14
3.2.1. Bioassay çalışmaları	14
3.2.1.1. İlaç konsantrasyonlarının hazırlanması	14
3.2.1.2. İlaçların uygulanması.....	15
3.2.2. Moleküler Çalışmalar	17
3.2.2.1. Genomik DNA ekstraksiyonu.....	17
3.2.2.2. Direnç mutasyonları TaqMan tanı yöntemleri.....	18
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	20
4.1. Bioassay sonuçları	20
4.2. Moleküler Çalışmaların Sonuçları.....	22
4.2.1. Genomik DNA ekstraksiyon sonuçları.....	22
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	24
KAYNAKLAR	28
ÖZGEÇMİŞ.....	33

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANTALYA İLİ KESME ÇİÇEK SERALARINDAN TOPLANAN *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) POPÜLASYONLARININ ABAMECTINE DİRENÇ DÜZEYLERİ VE G314D MUTASYONUN BELİRLENMESİ

Erdem SOLMAZ

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Recep AY

İki noktalı kırmızıörümcek *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) ülkemizde ve dünyada birçok üründe zararlı olan akar türlerinden birisidir. *T. urticae* birçok endüstri bitkisinde, süs bitkilerinde, açık ve örtüaltı sebzelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu çalışmada Antalya ili kesme çiçek üretim seralarından toplanan *T. urticae* popülasyonlarının abamectin için LC değerleri, direnç oranları ve G314D nokta mutasyonunun varlığı araştırılmıştır.

LC değerlerinin belirlenmesinde ilaçlama kulesi yaprak disk yöntemi kullanılmıştır. Tarla popülasyonlarının LC₅₀ değerleri hassas popülasyonun LC₅₀ değerlerine oranlanarak direnç düzeyleri belirlenmiştir. GSS, SV1, SV2, A01, A02, A03, A04, A05 ve A06 popülasyonlarının LC₅₀ değerleri sırasıyla 1,63; 381,55; 350,25; 1385,71; 1207,79; 2,62; 321,95; 414,29 ve 377,73 µl/100 ml su olmuştur. LC₅₀ değerlerine göre hassas popülasyonla karşılaştırılan tarla popülasyonlarının direnç oranları 1,61 - 850 kat arasında değişmiştir. Bu çalışmada dirençli akarlarda yaygın görülen G314D nokta mutasyonu mutasyonlara özel proplar kullanılarak real-time PCR ile incelenmiştir. Real-time PCR ile mutasyon taraması yapılan 8 tarla ve bir hassas popülasyonda G314D nokta mutasyonu belirlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: *Tetranychus urticae*, LC, real-time PCR, G314D, abamectin.

2019, 33 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINATION OF ABAMECTINE RESISTANCE LEVELS AND G314D MUTATION OF POPULATIONS OF *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) COLLECTED FROM GREENHOUSE FLORICULTURE GREENHOUSES IN ANTALYA

Erdem SOLMAZ

Isparta University of Applied Sciences
The Institute for Graduate Education
Department of Plant Production

Supervisor: Prof. Dr. Recep AY

Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) is a mite species that is the pest of many crops in our country and in the world. *T. urticae* causes significant economic losses in many industrial plants, ornamental plants, fields and greenhouse production areas. In this study, LC values, resistance rates and presence of G314D point mutation for abamectin of *T. urticae* populations were investigated collected from cut flower production greenhouses in Antalya.

Leaf disc-spray tower method was used in determination of LC values. The resistance levels were determined by the LC₅₀ values of the field populations were compared to the LC₅₀ values of the susceptible population. LC₅₀ values of the GSS, SV1, SV2, A01, A02, A03, A04, A05 and A06 populations has determined as 1,63; 381,55; 350,25; 1385,71; 1207,79; 2,62; 321,95; 414,29 and 377,73 µl/100 ml water, respectively. The resistance rates of field populations was found between 1.61 - 850 fold according to LC₅₀. Also, G314D point mutation which is common in resistant mites, was investigated with using specific probes to mutations by real-time PCR. G314D point mutation was not determined in 8 field and susceptible GSS populations.

Keywords: *Tetranychus urticae*, LC, real-time PCR, G314D, abamectin.

2019, 33 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan, yeri geldiğinde hocalıktan çok babalık yapan, değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Recep AY'a teşekkürlerimi sunarım.

Literatür araştırmalarımnda ve arazi çalışmalarında yardımcı olan değerli arkadaşım Ziraat Mühendisi Cenk KESKİN'e, Bana mesleği öğreten ve sevdiren Zir. Yük. Müh. Mehmet Ali İNANICI, Zir. Yük. Müh. Mustafa Hakan BALCI, Zir. Yük. Müh. Oğuzcan ÇALTILI'ya, Moleküler çalışmalarda yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Bayram ÇEVİK'e, Moleküler çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen ve öğreten Zir. Yük. Müh. Nadire SAKALLI'ya, tez çalışmalarımnda ve denemelerimnde yardımcı olan değerli arkadaşım Zir. Müh. Gülsüm KIVRAK'a teşekkür ederim.

Kesme çiçek seralarından toplanan akar örneklerini teşhis eden, değerli hocam Prof. Dr. Sultan ÇOBANOĞLU'na teşekkür ederim.

5079-YL1-17No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan, maddi manevi desteğini esirgemeyen Babam Halil SOLMAZ'a, Annem Emine SOLMAZ'a, Kardeşim Ömer SOLMAZ'a sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

ERDEM SOLMAZ
ISPARTA, 2019

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1 <i>Tetranychus urticae</i> (İki noktalı kırmızıörümcek).....	1
Şekil 1.2. Kesme çiçek seralarında ilaçlama yapımı.....	2
Şekil 1.3. 2016 Yılı TÜİK verilerine göre Türkiye’de illere göre örtüaltı kesme çiçek üretim alanları (TÜİK, 2018).....	3
Şekil 3.1. <i>Tetranychus urticae</i> örtüaltı kesme çiçek üretim alanları	12
Şekil 3.2. <i>Tetranychus urticae</i> popülasyonlarının üretimi	13
Şekil 3.3. Abamectin’in kimyasal yapısı	14
Şekil 3.4. İlaç konsantrasyonlarının hazırlanması	15
Şekil 3.5. <i>Tetranychus urticae</i> aktarımı	15
Şekil 3.6. İlaç uygulaması	17
Şekil 3.7. Eppendorf tüp, primerler, RT-PCR, TaqMan	19
Şekil 4.1. GSS ve diğer popülasyonların LC ₅₀ değeri.....	21
Şekil 4.2. <i>Tetranychus urticae</i> popülasyonlarının logaritmik doz - ölüm grafikleri	22
Şekil 4.3. Real-Time PCR G314D nokta mutasyonu görüntüsü	23

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. <i>Tetranychus urticae</i> popülasyonlarının toplanma tarihleri, konukçuları ve toplanan yerlerin koordinatları	12
Çizelge 4.1. GSS ve popülasyonların akarisit uygulaması sonucu gerçekleşen denemelere ilişkin Probit analizi.....	21
Çizelge 4.2. GSS ve popülasyonların DNA yoğunlukları.....	23



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ l	Mikrolitre
DNA	Deoksiribo Nükleikasit
GST	Glutathione-S-Transferase
LC ₅₀	Lethal Konsantrasyon 50
LC ₉₀	Lethal Konsantrasyon 90
P450	Cytochrome P450
rt-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



1. GİRİŞ

Tarımsal ürünlerin üretim, hasat ve tüketiciye sunulmasına kadar olan süreçte ekonomik kayıplara neden olan birçok organizma vardır. Bunların başında böcek ve akarlar gelmektedir. Bunlarla bilinçli bir savaşım yapılmadığında ekonomik kayıplar % 100'e kadar çıkabilmektedir. Çeşitli kültür bitkilerinde ekonomik kayıplara neden olan zararlılar arasında fitofag akar türleri bulunmaktadır. Bu akar türlerinin başında ise konukçu çeşitliliğinin çok olması ve kısa sürede üremesi nedeniyle *Tetranychus urticae* gelmektedir (Tsagkarakou vd., 1999; van Den Boom vd., 2004; van Leeuwen vd., 2005) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *Tetranychus urticae* (İki noktalı kırmızıörümcek)
(<https://www.flickr.com/photos/sanmartin/4883543313>)

Tetranychus urticae ülkemizde ve dünyada birçok üründe zararlı olan türlerden birisidir. Birçok endüstri bitkisinde, süs bitkilerinde ve seralarda önemli zarara neden olmaktadır. *Tetranychus urticae* 250'den fazla konukçu bitkinin parankima hücreleri ile beslenerek zararlı olan polifag bir akar türüdür (van

Den Boom vd., 2003). Ülkemizde ve dünyada tarımda zararlılarla savaşımında üreticiler açısından en etkili ve en çok tercih edilen yöntemlerin başında kimyasal savaşım gelmektedir. *Tetranychus urticae*'nin savaşımında uygulanması kolay olması kısa sürede etki göstermesi nedenleri ile kimyasal savaşım tercih edilmektedir (Ay vd., 2005) (Şekil 1.2).

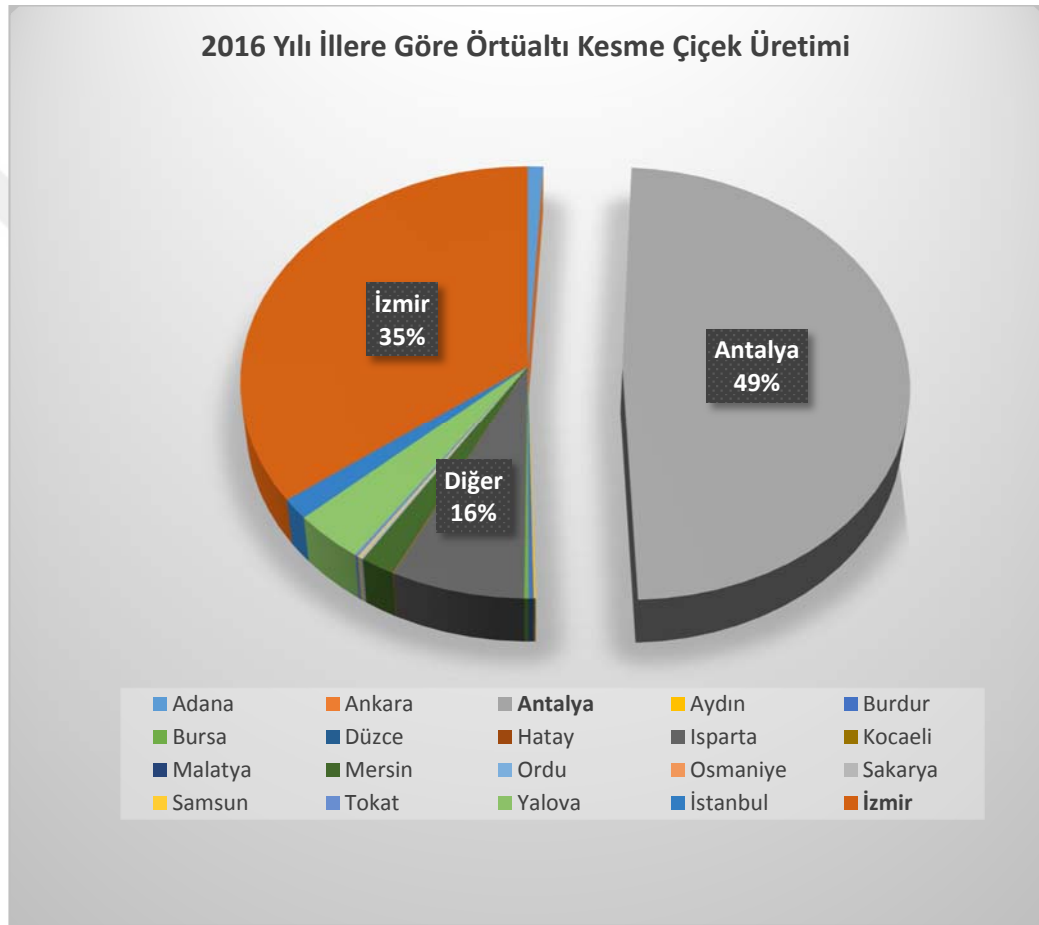


Şekil 1.2. Kesme çiçek seralarında ilaçlama yapımı

Günümüzde kimyasal mücadelede kullanılan pestisitlerin zararlılarda direnç gelişimi, doğal düşmanlar üzerinde yan etkileri, çevre ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. Kimyasal savaşımında kullanılan aynı etkili maddeye sahip pestisitlerin sürekli kullanımı nedeniyle zararlılar zaman içerisinde direnç geliştirmektedir. Bunun sonucunda üreticiler ilaçlamaların sayısını artırmakta veya doz artırma yoluna gitmektedir. *T. urticae* kısa sürede döl vermesi ve yüksek üreme gücü nedeniyle birçok akarısit'e karşı hızlı direnç geliştirebilmektedir (Tsagkarakou vd., 2002; Sato vd., 2004).

TÜİK 2016 yılı verilerine göre ülkemizde yaklaşık olarak 952989 dekar alanda örtüaltı kesme çiçek üretimi yapılmaktadır. Bunun yaklaşık olarak 463669 dekarı Antalya ilinde üretilmektedir (Şekil 1.3). *Tetranychus urticae* örtüaltı kesme çiçek üretiminde önemli zararlıların başında gelmektedir ve mücadele edilmediği takdirde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *Tetranychus urticae* konukçularına stiletlerini batırarak onlardan bitki özsuğunu emerek,

beslendikleri bitkilerde ağ oluşturarak zararlı olurlar. Beslenmiş oldukları konukçularda yaprakların, çiçeklerin, meyvenin sararmasına veya beyazlaşmasına neden olurlar. Yapmış oldukları zararlar ilerlediğinde nekrotik bölgeler meydana gelir. Örtüaltı alanlarda maliyetinin ucuz olması ve uygulamasının kolay olması nedeniyle genellikle kimyasal mücadele tercih edilmektedir. Bu yüzden de zararlı türler kullanılan pestisitlere karşı kolayca direnç geliştirebilmektedir.



Şekil 1.3. 2016 Yılı TÜİK verilerine göre Türkiye’de illere göre örtüaltı kesme çiçek üretim alanları (TÜİK, 2018).

Kırmızıörümceklerin kısa yaşam döngüleri ve hızlı üreme güçleri nedeniyle birkaç uygulamadan sonra pestisitlere karşı direnç geliştirmeleri bunların mücadelesini zorlaştırmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) direnci ‘normal bir popülasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin

belirli bir dozuna karşı, aynı türün diğer popülasyonundaki bireylerin tolerans kazanma yeteneğinin gelişmesi' şeklinde tanımlamaktadır. Normal bir popülasyonda direnç geni taşıyan bireylerin sayısı azdır. Aynı ilaç ve benzer etkiye sahip ilaçlar uygulandığında dirençli bireyler yaşamaya ve üremeye devam ederken hassas bireyler ölecektir. İlaçlama sıklığına bağlı olarak popülasyonun direnç oranı artacaktır. Böceklerde direnç mekanizmasını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Son 20 yılda kırmızıörümceklerde de böceklerde olduğu gibi Sitokrom P450 monooksijenaz, esteraz ve glutatyon S-transferaz gibi enzimlerin detoksifikasyon artışının direnç mekanizmalarında rol oynadığı düşünülmektedir (Yorulmaz vd., 2010). Ancak yapılan birçok çalışma bu mekanizmalara ilave mekanizmalarında olabileceğini ortaya koymaktadır. Moleküler biyolojideki gelişmeler bu alanda da yeni gelişmelere neden olmuştur. Bazı ilaçların hedef bölgesinde ya da detoksifikasyon enzimleri gen bölgesindeki mutasyonlarda insektisit direnç mekanizmalarında rol oynadığı ortaya konmuştur. Direncin moleküler mekanizması insektisit baskısı ile selekte edilen genetik değişikliğin tipine göre sınıflandırılmaktadır. Gen yapısındaki nokta mutasyonları, gen sayısı veya aktivitesindeki modifikasyonlar (detoksifikasyon enzimlerini kodlayan genlerin amplikasyonu) olarak tanımlanmaktadır (Feyereisen, 1995). *Tetranychus urticae* popülasyonlarında mücadele stratejilerinin geliştirilebilmesi için, dirence neden olan genlerin teşhis edilmesi ve mekanizmalarının anlaşılması gerekmektedir.

Abamectin etken maddeli akarisit kesme çiçek üretim alanlarında zararlı olan *T. urticae* ile mücadelede yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Abamectin grubu akarisitler Glutamat kapılı klorid kanallarının allosterik modülatörleri olarak etki etmektedirler. Yoğun bir şekilde kullanılmasının oluşturduğu en büyük olumsuzluk ise zararlıların bu akariste karşı hızlı bir şekilde direnç geliştirmesidir. G314D nokta mutasyonu Glutamat kapılı klorid kanallarında oluşmaktadır.

Bu çalışmada Antalya bölgesindeki örtüaltı kesme çiçek üretiminde önemli zararlıların başında gelen ve mücadele edilmediği takdirde büyük ekonomik kayıplara neden olan *Tetranychus urticae* de yaygın olarak kullanılan bir akarisit

olan, abamectine karşı direnç düzeyleri belirlenmiş ve G314D nokta mutasyonun var olup olmadığı moleküler yöntemler ile açıklanmaya çalışılmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

van Leeuwen vd. (2006), *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'nin hassas ırkının (LS-VL) bifenazate ile 36 kez seleksiyona maruz bırakılması sonucunda dirençli ırkı (BR-VL) elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Susurluk (2008), *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de sentetik piretroitli insektisitlere karşı oluşan direncin moleküler karakterizasyonunu incelemiştir. Hassas popülasyon ile 8 kez selekte olan popülasyon arasında lambda-cyhalothrin ve bifenthrin'e karşı 8.15 ila 18.24 kat, 74.23 ila 134.07 kat direnç belirlemiştir. Çalışmaların lambda-cyhalothrin ve bifenthrin direncinde esteraz ve sitokrom P450 monooksijenaz enzimlerinin önemli rol oynadığını, glutathion-S-transferaz enzimlerinin ise dirençte rol oynamadığını göstermiştir. Bifenthrin ile selekte edilen BEYDOM popülasyonunun sodyum kanal geninin IIS4-IIS6 bölgesinin sekans analizi hassas popülasyon ile karşılaştırıldığında herhangi bir aminoasit veya nükleotid yer değişimi saptayamamıştır.

Tsagkarakou vd. (2009), *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de piretroid direnci ile ilişkili para sodyum kanal mutasyonlarını araştırarak F1538I ve A1215D nokta mutasyonlarını tespit etmişlerdir.

Khajehali vd. (2010), *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) Avrupa popülasyonlarında organofosfat direncindeki Asetilkolinesteraz nokta mutasyonlarını araştırmışlardır. Dirençle ilişkili AChE1 mutasyonları PCR-RLFP yöntemiyle karakterize edilmiştir. F331W, T280A, G328A, A201S AChE mutasyonları tespit etmişlerdir. Bu mutasyonların içinde *T. urticae*'de en önemli mutasyonun F331W mutasyonu olduğunu rapor etmişlerdir.

Kwon vd. (2010), *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'nin abamectin direncinin moleküler mekanizmasını ve genetiğini araştırmışlardır. Çalışmada abamectin dirençli (AbaR) ve abamectine duyarlı (AbaS) olmak üzere iki adet izojenik popülasyon kullanılmıştır. Sonuçta γ -amino bütirik asit (GABA)-kapılı klorid kanal genlerinin tam uzunluktaki cDNA fragmentlerinin klonlanması ve

dizilenmesinin sonucunda iki ırk arasında hiçbir polimorfizm olmadığını ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte *T. urticae*'nin glutamat-kapılı klorid kanal genlerinin (TuGluCl), tam uzunluktaki cDNA fragmentlerinin dizilenmesiyle abamectin direncinin G323D nokta mutasyonu ile geçici bir ilişkiye sahip olduğunu saptamışlardır.

Carvalho vd. (2012), Domates kırmızıörümceği *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard (Acari: Tetranychidae)'de chlorpyrifos direncinin asetilkolinesteraz-1 geninde mutasyon ve amplifikasyon ilişkisini incelemişlerdir. Fransa ve Malavi'den toplanan dirençli ırklarda araştırma yapmışlardır. Daha önce yapılan bir çalışmada diğer bir böcek türünde ace-1 bölgesi OP (Organofosfat) direncinde etkili olduğu bilinmektedir. *T. evansi*'nin ace-1 geninin artan kopya sayısı ve kopya sayısındaki varyasyonlar Malavi ırkında tespit edilmiştir.

Kwon vd. (2014), *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de monocrotophos, fenprothrin ve abamectin dirençli popülasyonların alel sıklıklarına bakılarak direnç mekanizmalarında etkili nokta mutasyonu belirlemişlerdir (TuAChE de G228S ve F439W; TuVSSC da L1022V; TuGluCl da G323D). *T. urticae*'de bu moleküler yöntemlerin direnç izlenmesini kolaylaştıracak bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Riga vd. (2014), abamectin dirençli *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) popülasyonlarında sitokrom P450 artışı belirlemişlerdir. P450'nin CYP392A16 geninin abamectini metabolize ettiğini saptamışlardır.

Ding vd. (2015), Turunçgil kırmızıörümceği (*Panonychus citri* McGregor)'nde sodyum kanal genlerinin moleküler karakterizasyonunu tanımlamışlardır. Fenprothrin ile dirençli popülasyonlarda nokta mutasyonu belirlemişlerdir. F1538 nokta mutasyonu sodyum kanalının IIS6 bölgesinde olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmanın gelecek araştırmacılar için turunçgil kırmızıörümceğinin *P. citri* McGregor (Acari: Tetranychidae)'nin piretroid direnç mekanizmalarının belirlenmesinde öncülük edeceğini ön görmüşlerdir.

Piraneo vd. (2015), Amerika Birleşik Devletleri şerbetçiotu (*Humulus lupulus*) üretim alanlarından topladıkları *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) popülasyonlarının farklı akarisitlere karşı direnç düzeylerini ve çoklu direnç ile ilgili mutasyonlarını araştırmışlardır. Test edilen *T. urticae* popülasyonlarının %35'inin sitokrom B geni(G126S)'ndeki mutasyonun bifenazate direnciyle; %66.7'sindeki voltaj kapılı sodyum kanal geni(F1538I)'ndeki bir mutasyonun da bifenthrin direnciyle ilişkili olabileceğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca test edilen hiçbir popülasyonda glutamat-kapılı klorid kanal alt birimlerinde mutasyon tespit edilmemiştir; bu da hedef bölgedeki duyarsızlığının abamectin direncinde önemli olmadığı izlenimi vermektedir. Buna rağmen çalışmada abamectin direnci için varsayılan mekanizma olan P450 ile ilişkili detoksifikasyon gözlemlenmiştir.

Çağatay vd. (2016), cypermethrin ile 6 kez selekte edilen *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) popülasyonunda cypermethrine karşı direnç gelişimi, direncin biyokimyasal ve moleküler mekanizması araştırmışlardır. Elde edilen popülasyonun LC₅₀ değeri hassas popülasyonun LC₅₀ değerine oranladıklarında 54.24 kat direnç geliştirdiğini belirlemişlerdir. Elde edilen popülasyonun esteraz, glutathione S-transferaz ve sitokrom P450 detoksifikasyon enzimleri hassas popülasyonun detoksifikasyon enzim aktiviteleri ile karşılaştırıldığında sırasıyla 1.58, 1.16 ve 1.35 kat daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, *T. urticae*'de cypermethrin direncinde detoksifikasyon enzimleri rol oynayabileceğini belirtmişlerdir.

Bajda vd. (2017), *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'nin METI-1 akarisitlere direnç mekanizması olan mitokondriyal kompleks 1'i inhibe eden hedef bölgesini moleküler olarak araştırmışlardır. Çalışma sonucunda METI-1 akarisitlere dirençli ırklardaki kompleks 1'in PSST homologunda H92R değişimi tespit edilmiştir. Ayrıca genetik haritalama ve QTL analizi yapılarak PSST genini içeren pyridaben direncinin genomik bölgesini tanılamışlardır.

Ilias vd. (2017), abamectin ve piretroid direnç mutasyonları (glutamat kapılı klorür kanallarındaki G314D ve G326E ve voltaj kapılı sodyum kanalındaki

F15381), sera ve açık tarla ürünlerinin en önemli zararlılarından biri olan kırmızıörümcek *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de bulunduğunu bildirilmiştir.

Osakabe vd. (2017), *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de etoxazole direncinin mekanizmasında; real-time PCR kullanarak uyguladıkları RED- $\Delta\Delta$ Ct yöntemiyle ile bioassay sonuçlarının ilişkisini incelemişler ve bu iki yöntemin korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca *T. urticae*'de bulunan kitin sentaz 1 (CHS1; I1017F)'in doğrudan etoxazole direnci ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Shi vd. (2017), *T. cinnabarinus* Boisd. (Acari: Tetranychidae)'da fenprothrin direnci ile ilişkili olduğu bilinen P450 enzimini kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenleyen altı transkripsiyon faktörünü tanımlamış ve karakterize etmişlerdir. Ayrıca P450 genlerinin promoterleri üzerinde çalışmada CncC ve Maf'ın bu genlerin ekspresyonlarını etkileyerek *T. cinnabarinus*'da fenprothrin duyarlılığını etkilediğini ortaya koymuşlardır.

Çağatay vd. (2018), Antalya ve Muğla'dan topladıkları üç farklı *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) popülasyonunda hassas popülasyona kıyasla 223-404 kat arasında değişen abamektin direnci saptamışlardır. Tüm popülasyonların Esteraz, GST, P450 enzim aktivitelerine bakılmış olup, hassas popülasyona göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca G134D ve G326E nokta mutasyonu tespit edememişlerdir.

Çağatay vd. (2018), laboratuvar seleksiyonu ile cypermethrin direnci geliştirdikleri bir *T. urticae* popülasyonunda 54.24 kat direnç gelişimi sağlamışlardır. Dirençli popülasyonda yapılan sinerjistik denemelerinde piperonyl butoxide (PBO), esteraz, P450; S-benzyl-O, O-diisopropylphosphorothioate (IBP), esteraz; ve diethyl maleate (DEM), glutathione S-transferase (GST) için sırasıyla 1.41, 1.61 ve 2.27 kat sinerjistik direnci tespit edilmiştir. Ayrıca TaqMan diagnostik denemelerinde voltaj kapılı sodyum kanal mutasyonu olmadığını ortaya koymuşlardır.

Luo vd. (2018), *T. cinnabarinus* Boisd. (Acari: Tetranychidae)'a karşı mitokondriyal ATP sentaz hedef bölgesi akarisitlerin etki mekanizmasının moleküler düzeyde ortaya çıkarılmasını amaçlamışlardır. Çalışmada *T. cinnabarinus*'dan elde edilen ATP sentaz genlerinin on iki tanesinin cDNA'sı tam uzunlukta klonlanarak karakterize edilmiş ve ekspresyon seviyeleri propargit-dirençli ve hassas ırklar için ayrı ayrı belirlenmiştir. Ayrıca propargit maruziyetinin gen ekspresyonu üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Sonuçlarda dirençli ırktaki TcATPsynU-2, TcATPsynF0-2 ve TcATPsynF0-4'ün aşağı-yönlü regülasyona uğradığı; TcATPsynF0-2 ve TcATPsynF0-4'ün propargit maruziyetine güçlü tepkiler verdiği tespit edilmiştir.

Zhang vd. (2018), *T. cinnabarinus* Boisd. (Acari: Tetranychidae)'un cyflumetofen dirençli ırkı (CYR) ile hassas ırkında (SS) bir microRNA'sında miR-1 ailesine ait (tci-miR-1-3p) incelemiş ve aşağı yönlü-regülasyona uğradığını belirtmiştir. Elde ettiği sonuçlara göre *T. cinnabarinus*'da cyflumetofen direncinin miR-1 ile ilişkisi olduğunu işaret etmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini Antalya ilinde örtüaltı kesme çiçek üretim alanlarından toplanan *T. urticae* popülasyonları ve Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde 2001 yılından beri üretimi sağlanmakta olan, günümüze kadar herhangi bir pestisit uygulamasına maruz kalmayan hassas *Tetranychus urticae* (German Susceptible Strain; GSS); popülasyonların devamının sağlanması için gerekli olan konukçu bitki (*Phaseolus vulgaris*), abamectin etken maddeli akarisit oluşturmuştur.

Bioassay çalışmaları için ilaçlama kulesi (spray tower), plastik petriler, ince uçlu fırça, pamuk, farklı hacimlere sahip mikropipetler, binoküler gibi materyaller kullanılmıştır.

Moleküler çalışmalarda, Real-Time PCR (Biorad), nanodrop, farklı hacimlere sahip mikropipetler gibi malzemeler kullanılmıştır.

3.1.1. Kırmızıörümcek popülasyonları

3.1.1.1. Kırmızıörümcek popülasyonlarının toplanması

Tetranychus urticae popülasyonları Antalya ili kesme çiçek seralarından 2017 yılı kesme çiçek üretim sezonunda toplanmıştır (Tablo 3.1). Bu çalışmalar sırasında *Tetranychus urticae* bireyleri bulunduğu şüphelenilen yaprak örnekleri toplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Tetranychus urticae* toplanan örtüaltı kesme çiçek üretim alanları

Çizelge 3.1. *Tetranychus urticae* popülasyonlarının toplanma tarihleri, konukçuları ve toplanan yerlerin koordinatları.

Popülasyon Adı	Toplanma Tarihi	Konukçuları	Koordinatları
SV-1	07.09.2017	Karanfil	36°58'42.2"N 30°46'01.4"E
SV-2	07.09.2017	Karanfil	36°58'22.0"N 30°46'43.4"E
AO-1	20.09.2017	Gerbera	36°55'57.9"N 30°46'00.1"E
AO-2	20.09.2017	Gerbera	36°56'47.2"N 30°45'55.2"E
AO-3	20.09.2017	Karanfil	36°56'06.3"N 30°45'43.7"E
AO-4	20.09.2017	Karanfil	36°57'34.0"N 30°45'43.8"E
AO-5	20.09.2017	Karanfil	36°57'32.7"N 30°45'43.5"E
AO-6	20.09.2017	Karanfil	36°57'53.0"N 30°45'28.6"E

3.1.1.2. Kırmızıörümcek popülasyonlarının üretimi

Toplanan örnekler etiketlenerek poşet içerisinde, buz kutusuna koyularak Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Bitki Koruma bölümü Böcek toksikolojisi laboratuvarına getirilmiştir. Laboratuvara getirilen örnekler akarların kaçmasını ve karışmasını engellemek amacıyla içi su dolu küvetler

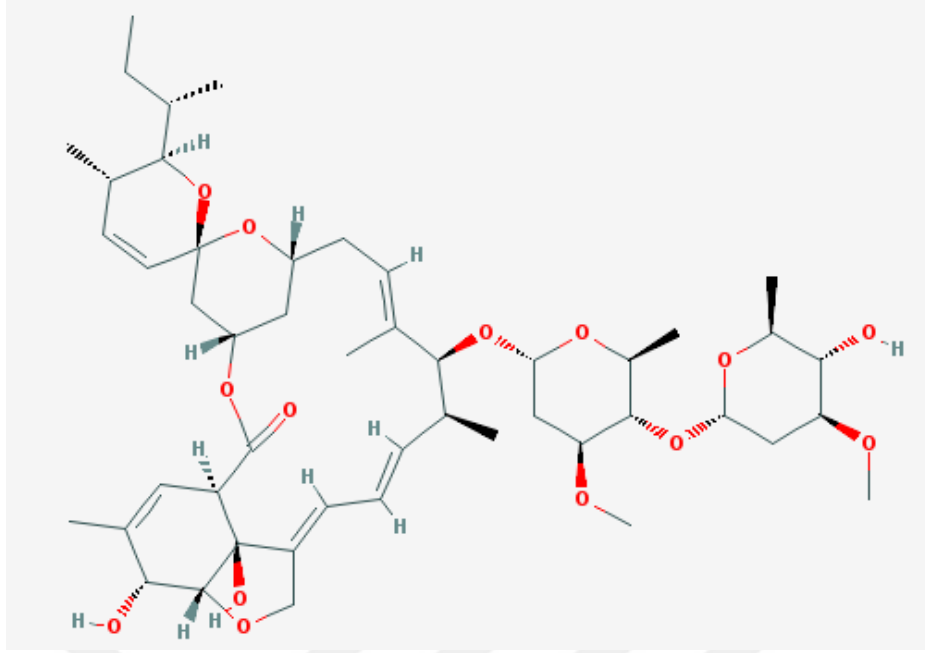
içerisine yerleştirilen barbunya bitkilerine aktarılmıştır. Daha sonra bu bitkiler üzerinde getirilen popülasyonların artması beklenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Tetranychus urticae* popülasyonlarının üretimi

3.1.2. Akarisit

Bu çalışmada Abamectin etkili maddesine sahip Agrimec EC (Syngenta AG) kullanılmıştır. Etkili madde miktarı litrede 18 gramdır (18g/L). Abamectin, toprak kökenli bir aktinomiset bakteri olan *Streptomyces avermitilis* (Burg) (Actinomycetales: Streptomycetaceae)'in fermantasyon ürünü olan bir biyopestisit (Stumpf & Nauen, 2002; İnak & Çobanoğlu, 2016). Kontakt ve mide etkili akarisit, insektisit ve nematisitdir. Abamectin translaminar etkiye sahiptir (Cloyd, 2010; İnak & Çobanoğlu, 2016). Bekleme süresi 7 gündür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Abamectin'in kimyasal yapısı

(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/avermectin_b1a)

3.2. Metot

3.2.1. Bioassay çalışmaları

Örtüaltı kesme çiçek üretim alanlarından toplanan ve laboratuvar şartlarında üretimi sağlanan *Tetranychus urticae* popülasyonlarının abamectin etken maddeli akarısitelerle karşı göstermiş olduğu LC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde yaprak disk metodu kullanılmıştır.

3.2.1.1. İlaç konsantrasyonlarının hazırlanması

T. urticae'nin abamectine karşı LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerini belirlemek için ön çalışmalarla yaklaşık % 90-99 ölüm veren doz saptanmıştır. Belirlenen bu doz her seferinde 1/2 oranında seyreltilerek en az 6 doz elde edilmiştir. LC değerlerinin belirlendiği çalışmalarda bu dozların popülasyonlarda % 10 ve % 95-99 ölüm veren dozlar arasında dağılım göstermesine önem gösterilmiştir.

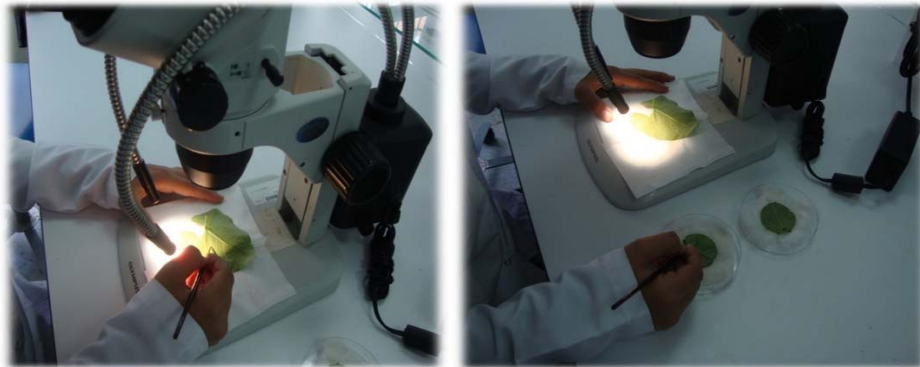
Denemeler her bir dozdan ve kontrol (saf su uygulanan)'de 3'er tekerrür olacak şekilde kurulmuştur. (Şekil 3.4)



Şekil 3.4. İlaç konsantrasyonlarının hazırlanması

3.2.1.2. İlaçların uygulanması

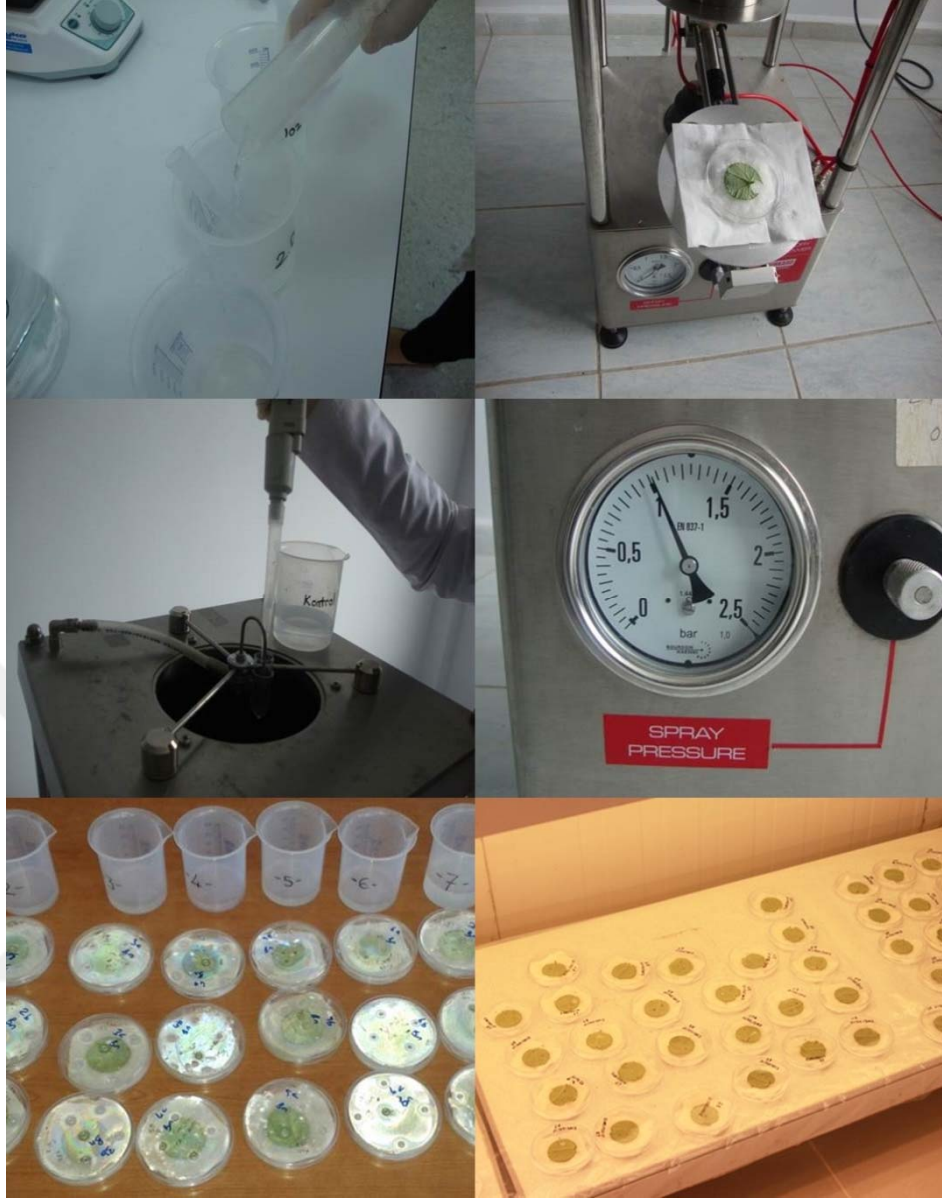
Tabanı ıslatılmış pamukla kaplı 9 cm çapındaki petrielerde pamuk üzerinde hazırlanan 3 cm çapındaki yaprak diskleri üzerine yaklaşık 25 adet *Tetranychus urticae* ergin dişiler binoküler altında bir fırça yardımı ile aktarılmıştır. (Şekil 3.5)



Şekil 3.5. *Tetranychus urticae* aktarımı

Petriler hazırlanan ilaç konsantrasyonları ile ilaçlama kulesi kullanılarak 1 bar basınçta ilaçlanmıştır. Her petriye 2 ml ilaçlı sıvı püskürtülmüştür. Kontrole sadece saf su uygulanmıştır. Petriler yaklaşık 30 dk. havalandırılarak, 26 ± 1 °C sıcaklık, %60-65 nem ve 16:8 fotoperiyodik koşullarına sahip iklim kabinlerine bırakılmıştır. Ölü-canlı değerlendirmesi 24 saat sonra yapılmıştır. Sayımlarda bireylere bir fırça yardımı ile dokunarak kendi vucüt uzunluğu kadar yürüyüp yürüyememesine bakılmıştır. Kendi vücut uzunluğu kadar yürüyemeyen bireyler ölü olarak kabul edilmiştir.

Tetranychus urticae popülasyonlarının 24 saat sonra belirlenen ölüm verilerinden yararlanılarak POLO bilgisayar paket programında (LeOra Software, 1994) LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri belirlenmiştir. Denemede kullanılan bütün popülasyonlar için LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerinin standart hassas popülasyona ait LC₅₀ ve LC₉₀ değerine oranlanması ile her ilaç için popülasyonların direnç oranları elde edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. İlaç uygulaması

3.2.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.2.1. Genomik DNA ekstraksiyonu

CTAB ekstraksiyon metodu kullanılarak Genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Toplanan popülasyonlardan ve hassas popülasyondan seçilen dişi *Tetranychus urticae* bireyleri 50'şer adet olarak 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve bir süre -80 °C'de saklanmıştır. İlk olarak içerisinde 50'şer adet dişi birey

bulunan 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpün içerisine sıvı azot koyularak pestil ile iyice ezilmiştir. Daha sonra 1 ml CTAB sıvısı eklenmiş olup tekrar pestil ile ezilmiştir. 2 µl 2-Merkaptoetanol eklenmiştir. 5-10 saniye vortekste karıştırıldıktan sonra -20 °C'ye 15 dakika bekletilmiştir. 15 dakika sonra 65 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilmeye bırakılmıştır. İnkübe işleminden sonra 10.000 RPM'de 5 dakika santrifüje koyulmuştur. Proteinlerin uzaklaştırılması için 24/1 oranında kloroform/isoamil alkol karışımı hazırlanmıştır. Örneklerin bulunduğu mikrosantrifüjden 650 µl ve kloroform/isoamil alkol karışımından 650 µl alınarak yeni bir mikrosantrifüje bırakılmıştır. 15.000 RPM'de 10 dakika santrifüje edilmiştir. Bu işlem sonrası yeni bir mikrosantrifüj içerisine 350 µl izopropil alkol koyulmuştur. İzopropil alkol koyulan yeni mikrosantrifüjün içerisine, santrifüje edilen mikrosantrifüjün çökelti üstünde kalan kısımdan 500 µl süpernatant alınıp eklenmiştir. Tekrardan 15.000 RPM'de 10 dakika santrifüje edilmiştir. Sonra içerisindeki sıvı dökülmüştür ve %70'lik etanol ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası 5-10 saniye vorteks ile karıştırılmıştır ve mikrosantrifüj tüpler kurumaya bırakılmıştır. Son olarak her bir mikrosantrifüje 50 µl nükleaz saf su eklenmiştir. Kullanılncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. Direnç mutasyonları TaqMan tanı yöntemleri

Her diagnostik deney için 2 primer ve 2 prob kullanılmıştır. G314D bölgesini kapsayan parçaları sentezlemek için G314D_F (5' CACGTCAAATATCAGGAATCAATGCAT 3') + G314D_R (5' GGCAAATTCAATGAGAGCACCAAAA 3') primerleri kullanılmıştır. Denemede Hassas(GSS) allel için FAM(PROB1-WT G314G FAM 5' FAM-TTGACATTTGGACAGGTTG-BHQ1 3') etiketli prob kullanılmış, mutant(dirençli) allel için ise VIC(PROB2-Mut G314D HEX 5' HEX-TGACATTTGGACAGATTG-BHQ1 3') etiketli prob kullanılmıştır. Her bir prob üzerinde 3' floresan söndürücü taşımıştır. Problar G314D_VIC + G314D_FAM, G314D bölgesinin analizleri için kullanılmıştır.

Yalnızca diploid dişi olan *Tetranychus urticae* bireyleri diagnostic denemelerde kullanılmıştır. Tüm PCR reaksiyon denemeleri için 15 µl, dişi bireylerin genomik DNA'sından 2 µl, 7,5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix, primerden 800nm ve prob için 200nm kullanılmıştır. Hazırlanmış olan PCR reaksiyonları Biorad, Real Time PCR tanılama cihazı ile yapılmıştır. Real Time PCR'da döngü kullanım sıcaklıkları, 95 °C'de 10 dakikayı takiben, 92°C'de 15 saniye, 60°C'de 1 dakika toplam 40 döngü olacak şekilde kullanılmıştır.

PCR reaksiyonlarında kullanılan bireyler dirençli ve hassas allelleri VIC ve FAM boya miktarlarının artması şeklinde Biorad'ın kullanılacağı Real Time PCR ile gözlenmiştir.

TaqMan analizlerini doğrulamak için ve *Tetranychus urticae* örtüaltı popülasyonlarının taramasında kullanılmadan önce, bilinen genotiplerin genomik DNA şablonları kullanılmıştır. Ayrıca, TaqMan sonuçlarını doğrulamak için aynı DNA şablonları daha da büyütülmüş ve her iki yönde dizilenmiştir.



Şekil 3.7. Eppendorf tüp, primerler, RT-PCR, TaqMan

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yapılmış olan bu çalışma 2016-2018 yılları arasında Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünde yapılmıştır. Antalya ili örtüaltı kesme çiçek üretim alanlarından toplanan, dirençli olduğundan şüphelenilen *T. urticae* popülasyonlarının, Glutamat kapılı klorür kanallarının allosterik modülatörleri olan abamectine karşı direnç düzeylerinin, Rothamstad Experimental Station (İngiltere)'den getirilen standart hassas popülasyonun (German Susceptible Strains, GSS) direnç düzeyi ile karşılaştırılarak popülasyonların direnç düzeyleri saptanmıştır. Moleküler çalışmalarda Glutamat kapılı klorür kanallarında bulunan G314D nokta mutasyonunun var olup olmadığı konusunda çalışılmıştır.

4.1. Bioassay sonuçları

Antalya ili örtüaltı kesme çiçek üretim alanlarından 2017 yılı üretim sezonunda toplanan popülasyonların LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri karşılaştırılarak, popülasyonların abamectin etken maddeli akarisit karşı göstermiş olduğu direnç oranları belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Popülasyonların LC₅₀ değerleri, GSS için 1.63, SV1 için 381.55, SV2 için 350.25, AO1 için 1385.71, AO2 için 1207.79, AO3 için 2.62, AO4 için 321.95, AO5 için 414.29, AO6 için 377.73 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1). LC₅₀ değerlerine göre direnç oranları, SV1 için 234.08 kat, SV2 için 214.88 kat, AO1 için 850.13 kat, AO2 için 740.98 kat, AO3 için 1.61 kat, AO4 için 197.52 kat, AO5 için 254.17 kat, AO6 için 231.74 kat olarak belirlenmiştir. Ayrıca popülasyonların LC₉₀ değerleri, GSS için 4.33, SV1 için 1461.51, SV2 için 2921.96, AO1 için 9780.7, AO2 için 6109.7, AO3 için 11.01, AO4 için 1339.46, AO5 için 1820.77, AO6 için 1677.74 olarak tespit edilmiştir. LC₉₀ değerlerine göre direnç oranları ise, SV1 için 337.68 kat, SV2 için 675.11 kat, AO1 için 2259.8 kat, AO2 için 1411.63 kat, AO3 için 2.54 kat, AO4 için 309.48 kat, AO5 için 420.68 kat, AO6 için 387.64 kat olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

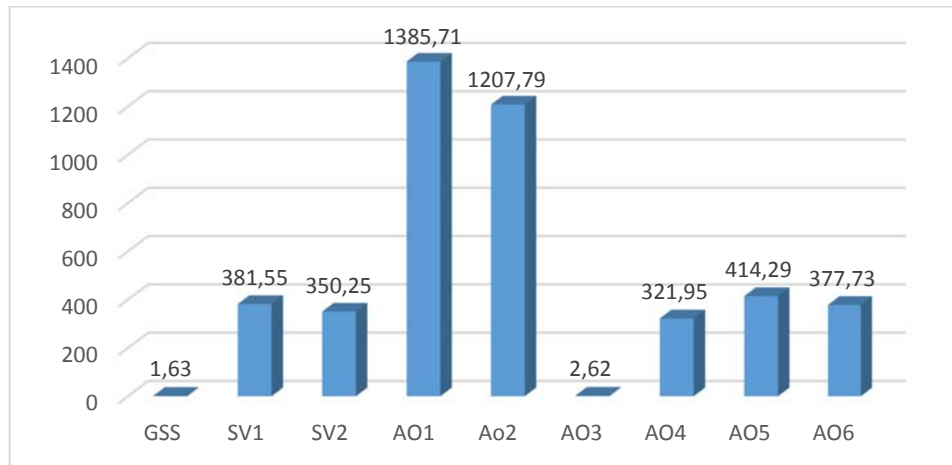
Çizelge 4.1. GSS ve popülasyonların akarisit uygulaması sonucu gerçekleşen denemelere ilişkin Probit analizi

Popülasyon	n*	Eğim±SE	LC ₅₀	LC ₉₀	RR** (LC ₅₀)	RR*** (LC ₉₀)
GSS	613	3.02±0.37	1.63 (1.19 - 2.06)	4.33 (3.26-7.26)	-	-
SV1	626	2.20±0.27	381.55 (264.19- 493.94)	1461.51 (1065.68- 2498.32)	234.08	337.68
SV2	644	1.39±0.13	350.25 (272.84- 441.33)	2921.96 (2044.14- 4744.41)	214.88	675.11
AO1	638	1.51±0.15	1385.71 (740.05- 2310.56)	9780.7 (5063.48- 38397.81)	850.13	2259.8
AO2	631	1.82±0.21	1207.79 (739.20- 1727.22)	6109.7 (3848.23- 14742.20)	740.98	1411.63
AO3	623	2.06±0.25	2.62 (1.60-3.62)	11.01 (7.33-24.73)	1.61	2.54
AO4	593	2.07±0.24	321.95 (227.27- 415.77)	1339.46 (978.72- 2214.15)	197.52	309.48
AO5	565	1.99±0.34	414.29 (163.72- 605.26)	1820.77 (1144.64- 7705.48)	254.17	420.68
AO6	602	1.98±0.22	377.73 (264.74- 495.59)	1677.74 (1183.69- 2966.25)	231.74	387.64

* denemede kullanılan ilaçlı birey sayısı

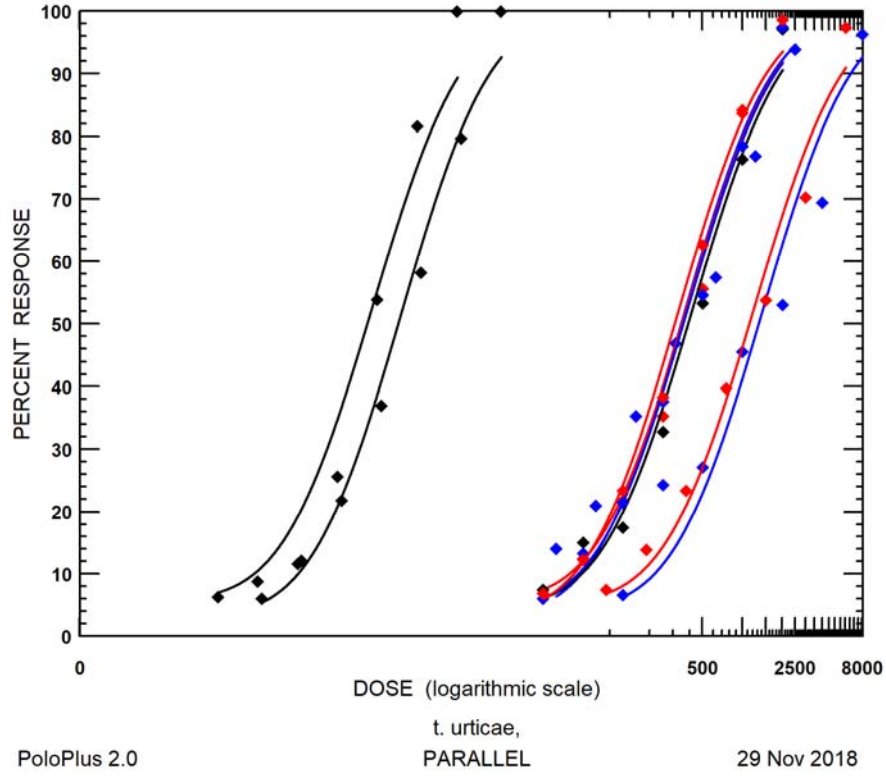
** LC₅₀'ye göre direnç düzeyi

*** LC₉₀'a göre direnç düzeyi



Şekil 4.1. GSS ve diğer popülasyonların LC₅₀ değeri

Popülasyonların logaritmik doz - ölüm grafikleri şekil 4.2'de verilmiştir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi popülasyonlar üç grup oluşturmuştur. Grafiğin en solunda hassas GSS ve AO3 popülasyonu yer alırken en sağda abamectin'e en çok direnç gösteren AO1 ve AO2 popülasyonları yer almıştır. Diğer popülasyonlar ise hemen en dirençli popülasyonların solunda yer almıştır.



Şekil 4.2. *Tetranychus urticae* popülasyonlarının logaritmik doz - ölüm grafikleri

4.2. Moleküler Çalışmaların Sonuçları

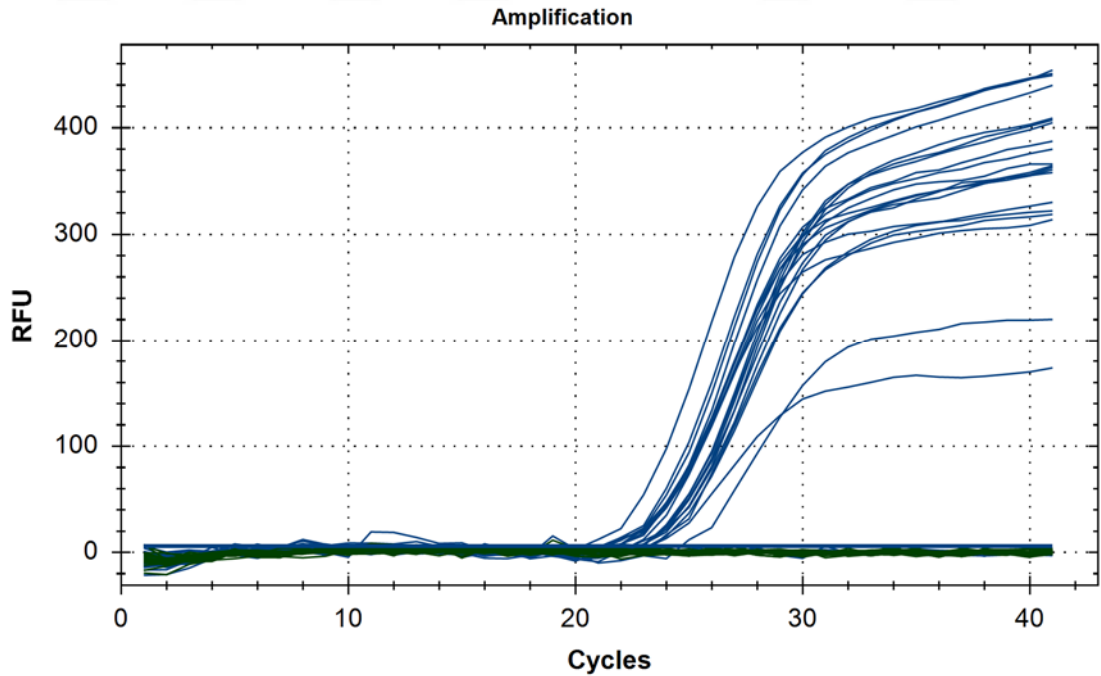
4.2.1. Genomik DNA ekstraksiyon sonuçları

Genomik DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen DNA'ların, nanodrop spektrofotometre kullanarak yoğunluklarına bakılmıştır. Her bir popülasyon örneği için 50 ng olacak şekilde 100 µl hacme uygun DNA miktarları saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. GSS ve popülasyonların DNA yoğunlukları

Popülasyon	Yoğunluk (ng/µl)	Saflık Dereceleri (A260/A280)
GSS	83.7	2.03
SV1	79.1	2.09
SV2	64.4	2.12
A01	61.6	2.13
A02	86.3	2.10
A03	112.2	2.12
A04	57.9	2.06
A05	69.9	2.12
A06	53.2	2.06

G314D nokta mutasyonu mutasyonlarına özel problar kullanılarak real-time PCR ile incelenmiştir. Hassas için FAM, dirençli için VIC isimli problar kullanılmıştır. Real-time PCR ile mutasyon taraması yapılan 8 tarla ve bir hassas popülasyonda G314D nokta mutasyonu belirlenememiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Real-Time PCR G314D nokta mutasyonu görüntüsü (Maviler HASSAS)

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

İki noktalı kırmızıörümcek ile kimyasal mücadelede karşılaşılan en büyük problemlerin başında, kullanılan kimyasallara karşı direnç geliştirmeleri gelmektedir. Ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalarda, iki noktalı kırmızıörümceğin birçok akarisit ve insektisite karşı direnç geliştirdiği saptanmıştır.

Kesme çiçekler yüzyıllardır estetik amaçla kullanılmalarına karşın son yıllarda önemli bir tarımsal ürün olarak karşımıza çıkmaktadır (Korkut vd., 1995). Ülkemiz koşulları düşünüldüğünde hedef pazarlara yakın olması, işgücü maliyetinin düşük olması en önemlisi de uygun iklim koşullarıyla kesme çiçek üretimi için değerli avantajlara sahiptir (Özkan ve Karagüzel, 1999). Türkiye’de 1940’lı yıllarda ticari olarak yapılmaya başlanan kesme çiçek üretimi ilk olarak İstanbul ve çevresinde başlamış ve 1985 yılından itibaren Antalya’da yapılmaya başlanmıştır (Kızıloğlu vd., 2012).

Çalışmada ilk olarak, Antalya ili içerisinde kesme çiçek üretiminin yapıldığı bölgeler araştırılmıştır. Yapılan incelemeler sonucu 8 farklı üretim alanından 8 popülasyon toplanıp laboratuvar koşullarında çoğalması sağlanmıştır. Her bir popülasyonun abamectin için LC değerleri bioassay testler ile saptanmıştır. Antalya ilinden kesme çiçek seralarından toplanan popülasyonlarda; LC₅₀ değerlerine göre 1.61 – 850 kat arası direnç belirlenmiştir, LC₉₀ değerlerine göre ise 2.54 – 2259 kat arası abamectin direnci saptanmıştır. Ayrıca Real-Time PCR metodu kullanılarak G314D nokta mutasyonunun var olup olmadığı araştırılmak için yapılan moleküler çalışmalarda herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Bu çalışmada sadece AO3 adlı popülasyonda abamectin direnci (1.61 kat) belirlenememiştir. Üreticiyle yapılan görüşmede bu serada kesme çiçek üretimine henüz birkaç yıldır devam edildiği ve kırmızıörümcek mücadelesinde başka etken maddeye sahip akarisitlerin kullanıldığı tespit edilmiştir. Ne var ki diğer sonuçlar göz önüne alındığında abamectin direncinin bu serada da yakın zamanda yüksek seviyelere ulaşacağı düşünülmektedir.

Salman ve Kocaman (2017), Isparta da karanfil seralarından topladıkları dört adet *T. urticae* *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) popülasyonunda abamectine karşı duyarlılık düzeylerini araştırmışlar ve 43.53 - 246.23 kat arasında değişen abamectin direncinin var olduğunu belirlemişlerdir.

Yalçın vd. (2018), çilek üretim alanlarından topladıkları *Tetranychus urticae* Koch (red form) (Acari: Tetranychidae) ile yaptıkları çalışmada etoxazole ve spiromesifen için larva denemeleri, abamectin ve tebufenpyrad için ise ergin denemeleri yürütmüşler, bioassay ve biyokimyasal yollarla direnç testleri ve kinetik esteraz ve glutathione S-transferase (GST) okumaları gerçekleştirmişlerdir. LC₅₀ değerlerine göre arazi popülasyonlarının direnç oranları abamectin, etoxazole, spiromesifen ve tebufenpyrad için sırayla 2.39–7.86, 6.80–15.39, 4.61–9.73 ve 5.51–12.47 arasında bulunmuştur. Ayrıca esteraz ve GST enzyme aktivitesi arazi popülasyonları için sırayla 7.72–10.69 mOD/min/mg protein ve 5.92–7.56 mOD/min/mg protein olarak bulunarak hassas popülasyonuna göre (3.83 ve 5.49 mOD/min/mg protein) daha yüksek bulunmuştur.

Kim vd. (2019), acequinocyl direnciyle ilgili yaptıkları çalışmada; Güney Kore’de araziden topladıkları bir *T. urticae* popülasyonunda 16 yıl boyunca yaptıkları seleksiyon sonucu LC₅₀ değerine göre 4,237 kat direnç gelişimi sağlamışlardır. Ayrıca bu popülasyonda mitokondriyal sitokrom *b*’de I256V ve N321S mutasyonu tespit edilmiştir.

Türkiye’de abamectin kırmızıörümcek mücadelesinde en fazla kullanılan ilaçtır. Çok fazla kullanıldığı için bu akarite karşı direnç gelişimini yukarıda da belirtildiği gibi bir çok üründen toplanan kırmızıörümcek popülasyonlarında abamectin direnci belirlenmiştir (Yorulmaz vd., 2009; Çağatay vd., 2018). Ayrıca yapılan çalışmalarda kırmızıörümceklerde abamectin direnç mekanizması incelenmiş ve direnç mekanizmasında esteraz, glutatyon s-

transferaz (GST), P450 enzim ve G314D, G326E nokta mutasyonları belirlenmiştir (Yorulmaz ve Ay, 2009; Ilias vd., 2017). Bu çalışmada G314D mutasyonu incelenmiş ancak belirlenememiştir. Bu popülasyonların detoksifikasyon enzimleride incelenmiş ve abamectin dirençli popülasyonlarda detoksifikasyon enzim aktiviteleri yüksek çıkmıştır (basılmamış bilgi). Bu sonuçlar daha önceki yapılmış çalışmalar ile uyumludur (Ay ve Yorulmaz, 2009; Çağatay vd., 2018).

Tarımsal üretimde sahip olduğu avantajlar nedeniyle kimyasal savaşımın vazgeçilmez olması ve en fazla kullanılan zararlı savaşım yöntemi olması; direnci bu savaşım yönteminin önünde önemli bir engel olarak ortaya koymaktadır. Pestisit direnciyle ilgili her geçen gün yeni çalışmalar yayınlanarak konunun önemi ortaya koyulmaktadır. Kimyasal ilaçlar tarımsal zararlılara karşı kullanılmaya devam edildikçe oluşan seleksiyon baskısı sonucu direnç gelişecek ve bu giderek artacaktır.

Sonuç olarak Antalya ili kesme çiçek üretim alanlarında iki noktalı kırmızıörümcek mücadelesinde farklı etken maddeye sahip akarisitlerin rotasyona sokulması önerilmektedir. Ayrıca direnç konusuyla ilgili üreticilerin daha fazla bilinçlendirilmesi gerektiği açıkça görülmektedir. Bu; hem kullanılan kimyasal giderlerini azaltarak üreticiye maddi bir fayda sağlayacak hem de insan ve çevre sağlığı göz önüne alındığında olumlu sonuçlar doğuracaktır.

Öneriler

- *T.urticae* ve diğer önemli hızlı direnç geliştiren zararlı organizmalar ile etkili mücadele yapılması için direnç ile ilgili çalışmalar yapılması gerekmektedir.
- Aynı etken maddeye sahip ilaçların sürekli olarak kullanımı yerine farklı etki mekanizmasına sahip farklı etken maddeli ilaçların kullanılması sağlanmalıdır.

- Özellikle avcı akarlaraya yan etkisi olmayan ilaçlar ile avcı akarlar birlikte kullanılmalıdır veya uygun stratejilerle kombine edilmelilerdir. Bu durumda pestisit kullanımını azalmış olacak, yoğun ilaç kullanımını problemi çözülmüş olacaktır.



6. KAYNAKLAR

- Ay, R., Gürkan, M. O., 2005. *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'nin Değişik Popülasyonlarının İki Selektif Akarisite Karşı Duyarlılıklar ve Duyarlılık Mekanizmaları Üzerinde Araştırmalar. Tarım Bilimleri Dergisi, 11(2), 217-223.
- Ay, R., Yorulmaz, S., 2009. Bifenthrin'e Dirençli *Tetranychus Urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'de Çoklu Direnç, Direnç Kalıtımı ve Sitokrom P450 Aktivitesinin Belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 49(2).
- Ay, R., Kara, F. E., 2011. Toxicity, Inheritance of Fenpyroximate Resistance, and Detoxification-Enzyme Levels in A Laboratory-Selected Fenpyroximate-Resistant Strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Crop Protection, 30(6), 605-610.
- Bajda, S., Dermauw, W., Panteleri, R., Sugimoto, N., Douris, V., Tirry, L., Osakabe, L., Vontas, J., van Leeuwen, T., 2017. A Mutation in The PSST Homologue of Complex I (NADH: Ubiquinone Oxidoreductase) From *Tetranychus urticae* is Associated With Resistance To METI Acaricides. Insect biochemistry and molecular biology, 80, 79-90.
- Carvalho, R., Yang, Y., Field, L. M., Gorman, K., Moores, G., Williamson, M. S., Bass, C., 2012. Chlorpyrifos Resistance is Associated With Mutation and Amplification of The Acetylcholinesterase-1 Gene in The Tomato Red Spider Mite, *Tetranychus evansi*. Pesticide Biochemistry And Physiology, 104(2), 143-149.
- Cloyd, R.A., 2010. Pest management, Broad mites. (Web sayfası: http://www.oardc.ohio-state.edu/floriculture/images/10-10_Mites.pdf), (Erişim tarihi: Haziran 2018).
- Çağatay, N. S., 2016. *Tetranychus urticae* Koch. (Acari: Tetranychidae)'de Cypermethrin Direncinin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Çağatay, N. S., Menault, P., Riga, M., Vontas, J., Ay, R., 2018. Identification and Characterization of Abamectin Resistance in *Tetranychus urticae* Koch Populations From Greenhouses in Turkey. Crop Protection, 112, 112-117.
- Çağatay, N. S., Riga, M., Vontas, J., Çevik, B., Ay, R., 2018. Biochemical and Molecular Characterizations of Cypermethrin Resistance in Laboratory-Selected Cypermethrin-Resistant Strains of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). International Journal of Acarology, 1-6.

- Ding, T. B., Zhong, R., Jiang, X. Z., Liao, C. Y., Xia, W. K., Liu, B., Dou, W., Wang, J. J., 2015. Molecular Characterisation of A Sodium Channel Gene and Identification of A Phe1538 to Ile Mutation in Citrus Red Mite, *Panonychus citri*. *Pest Management Science*, 71(2), 266-277.
- Feyereisen, R., 1995. Molecular Biology Of Insecticide Resistance. *Toxicology Letters*, 82/83, 83-90.
- Ilias, A., Vassilio, V. A., Vontas, J., Tsagkarakou, A., 2017. Molecular Diagnostics For Detecting Pyrethroid and Abamectin Resistance Mutations in *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry And Physiology*, 135, 9-14.
- İnak, E., Çobanoğlu, S., 2016. Akarisitler ve Etki Mekanizmaları. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 6 (4), 371-382. Retrieved from <http://dergipark.gov.tr/entoteb/issue/30024/324157>
- Khajehali, J., Van Leeuwen, T., Grispou, M., Morou, E., Alout, H., Weill, M., Tirry, L., Vontas, J., Tsagkarakou, A., 2010. Acetylcholinesterase Point Mutations in European Strains Of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) Resistant to Organophosphates. *Pest Management Science*, 66(2), 220-228.
- Kızıloğlu, R., Uzunöz, M., Topal, İ., 2012. Yalova İlinde Kesme Çiçek Yetiştiriciliğinin Üretim Maliyeti ve Karlılığı. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 43(1), 65-68.
- Kim, S. I., Koo, H. N., Choi, Y., Park, B., Kim, H. K., Kim, G. H., 2019. Acequinocyl Resistance Associated With I256V and N321S Mutations in The Two-Spotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*.
- Korkut, A., Yıldırım, T. Görür, G., Çakmak, S., 1995. "Türkiye'de Süs Bitkileri Tüketim Projeksiyonları ve Üretim Hedefleri", IV. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, Tarım Haftası'95 Kongre Kitabı, 2. Cilt, T.C. Ziraat Bankası Kültür Yayınları No:26, 697-714, Ankara.
- Kwon, D. H., Lee, S. W., Ahn, J. J., Lee, S. H., 2014. Determination of Acaricide Resistance Allele Frequencies in Field Populations of *Tetranychus urticae* Using Quantitative Sequencing. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17, 99-103.
- Kwon, D. H., Yoon, K. S., Clark, J. M., Lee, S. H., 2010. A Point Mutation in A Glutamate-Gated Chloride Channel Confers Abamectin Resistance in The Two-Spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Insect molecular biology*, 19(4), 583-591.
- Leora software, 1994. *Polo-pc: a User's Guide to Probit or Logit Analysis* Leora Software, 28 p., Berkeley, ca.

- Luo, Y., Ni, J., Zheng, K., Yang, Z., Xie, D., Da, A., Chai, J., Jiang, X., Li, S., 2018. Cloning and Different Expression of ATP Synthase Genes Between Propargite Resistant and Susceptible Strains of *Tetranychus cinnabarinus* (Acarina: Tetranychidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(1), 402-407.
- Osakabe, M., Imamura, T., Nakano, R., Kamikawa, S., Tadatsu, M., Kunimoto, Y., Doi, M., 2017. Combination of Restriction Endonuclease Digestion With the $\Delta\Delta\text{Ct}$ Method in Real-Time PCR to Monitor Etoxazole Resistance Allele Frequency in The Two-Spotted Spider Mite. *Pesticide biochemistry and physiology*, 139, 1-8.
- Özkan, B., Karagüzel, O., 1999. Türkiye'de Dışsatıma Yönelik Kesme Çiçek Üretimi ve Sorunları. *Hasat Dergisi*, 14(164):20-23 ss. Antalya.
- Piraneo, T. G., Bull, J., Morales, M. A., Lavine, L. C., Walsh, D. B., Zhu, F., 2015. Molecular Mechanisms of *Tetranychus urticae* Chemical Adaptation in Hop Fields. *Scientific reports*, 5, 17090.
- Riga, M., Tsakireli, D., Ilias, A., Morou, E., Myridakis, A., Stephanou, E. G., Nauen, R., Dermauw, W., van Leeuwen, T., Paine, M., Vontas, J., 2014. Abamectin is Metabolized By CYP392A16, A Cytochrome P450 Associated With High Levels of Acaricide Resistance in *Tetranychus urticae*. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, 46, 43-53
- Salman, S. Y., Kocaman, T., 2017 *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'nin Karanfil Popülasyonlarında Abamectin ve Spirodiclofen'e Karşı Duyarlılık Düzeyleri. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 7(2), 105-112.
- Sato, M. E., Miyata, T., Da Silva, M., Raga, A., De Souza Filho, M. F., 2004. Selections for Fenpyroximate Resistance and Susceptibility, and Inheritance, Cross-Resistance and Stability of Fenpyroximate Resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Applied Entomology and Zoology*, 39(2), 293-302.
- Sharma, R. K., Bhullar, M. B., Singh, S., Jindal, V., 2018. Molecular Analysis of Fenazaquin Selected Resistant Strain of Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae* Koch.
- Shi, L., Wang, M., Zhang, Y., Shen, G., Di, H., Wang, Y., He, L., 2017. The Expression of P450 Genes Mediating Fenprothrin Resistance is Regulated By Cncc and Maf in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 198, 28-36.

- Stumpf, N. R. Nauen, 2002. Biochemical Markers Linked to Abamectin Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72 (2): 111-121.
- Susurluk, H., 2008. İki Benekli Kırmızıörümcek *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae)'de Piretroid İnektisitlere Karşı Oluşan Direncin Moleküler Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- Tsagkarakou, A., Navajas, M., Rousset, F., Pasteur, N., 1999. Genetic Differentiation in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) From Greenhouses in France. In *Ecology and Evolution of the Acari*, 175-185.
- Tsagkarakou, A., Pasteur, N., Cuany, A., Chevillon, C., Navajas, M., 2002. Mechanisms of Resistance to Organophosphates in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) From Greece. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, 32(4), 417-424.
- Tsagkarakou, A., van Leeuwen, T., Khajehali, J., Ilias, A., Grispou, M., Williamson, M. S., Tirry, L., Vontas, J., 2009. Identification of Pyrethroid Resistance Associated Mutations in The Para Sodium Channel Of The Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Insect Molecular Biology*, 18(5), 583-593.
- TÜİK, (2016). Erişim Tarihi: Kasım 2018. Türkiye İstatistik Kurumu Web Sitesi: <http://www.tuik.gov.tr/> adresinden alınmıştır.
- van Den Boom, C. E., Beek, T. V., Dicke, M., 2003. Differences Among Plant Species in Acceptance By The Spider Mite *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Entomology*, 127(3), 177-183.
- van Den Boom, C. E., Van Beek, T. A., Posthumus, M. A., De Groot, A., Dicke, M., 2004. Qualitative and Quantitative Variation Among Volatile Profiles Induced By *Tetranychus urticae* Feeding On Plants From Various Families. *Journal Of Chemical Ecology*, 30(1), 69-89.
- van Leeuwen, T., Tirry, L., Nauen, R., 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(11), 869-877.
- van Leeuwen, T., Vam Pottelberge, S., Tirry, L., 2005. Comparative Acaricide Susceptibility and Detoxifying Enzyme Activities in Field-Collected Resistant and Susceptible Strains of *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science*, 61(5), 499-507.

- Yalçın, K., Döker, İ., Kazak, C., 2018. Acaricide Resistance in *Tetranychus urticae* Red Form (Acari: Tetranychidae) Collected From Strawberry in Southern Turkey: Bioassay and Biochemical Studies. *Systematic and Applied Acarology*, 23(12), 2279-2287.
- Yorulmaz, S., Ay, R., 2009. Multiple Resistance, Detoxifying Enzyme Activity, and Inheritance of Abamectin Resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33(4), 393-402.
- Yorulmaz, S., Ay, R., 2010. Akar ve Böceklerde Pestisitlerin Detoksifikasyonunda Rol Oynayan Enzimler. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24(2), 137-148.
- Zhang, Y., Feng, K., Hu, J., Shi, L., Wei, P., Xu, Z., Shen, G., Li, M., Xu, Q., He, L., 2018. A microRNA-1 Gene, Tci-Mir-1-3p, is Involved in Cyflumetofen Resistance By Targeting A Glutathione S-Transferase Gene, TCGSTM4, in *Tetranychus cinnabarinus*. *Insect molecular biology*, 27(3), 352-364.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Erdem SOLMAZ
Doğum Yeri ve Yılı : Ödemiş, 1994
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : erdemsolmaz35@hotmail.com

Taranmış
Fotoğraf
(3.5cm x 3cm)

Eğitim Durumu

İlköğretim : 50. Yıl İlköğretim okulu, 2001-2008
Lise : Kiraz Anadolu Lisesi, 2008-2012
Lisans : SDÜ, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma, 2012-2016

Yayımlar