ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

İKİ BENEKLİ KIRMIZIÖRÜMCEK *Tetranychus urticae* KOCH (ACARINA: TETRANYCHIDAE)'DE PİRETROİT İNSEKTİSİTLERE KARŞI OLUŞAN DİRENCİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Hilal SUSURLUK

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ANKARA
2008

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

İKİ BENEKLİ KIRMIZIÖRÜMCEK *Tetranychus urticae* KOCH (ACARINA: TETRANYCHIDAE)'DE PİRETROİT İNSEKTİSİTLERE KARŞI OLUŞAN DİRENCİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Hilal SUSURLUK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. Oktay GÜRKAN

Bu çalışma, Antalya-Gazipaşa, Beyobası (BEYDOM) domates serasından toplanan *Tetranychus urticae* (Koch) popülasyonunda, sentetik piretroitlerden lambda cyhalothrin ve bifenthrin'e karşı oluşan direncin biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu ve kalıtımının belirlenmesi amacı ile yapılmıştır.

T. urticae'nin BEYDOM popülasyonu İngiltere'den getirilen standart hassas (GSS) popülasyonun % 90'ını öldüren doz ile petri kabı yöntemi kullanılarak selekte edilmiş ve birbirini izleyen seleksiyonlarda lambda cyhalothrin ve bifenthrin'in LC_{50} ve LC_{90} değerleri belirlenmiştir. 8 seleksiyon sonunda elde edilen direnç oranları hassas popülasyona oranla LC_{50} ve LC_{90}'a göre sırasıyla lambda cyhalothrin ve bifenthrin için 18.24 ve 8.15 kat ve 74. 23 ve 134.07 kat olarak saptanmıştır. Dirençli ve hassas popülasyonlar arasında yapılan resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F1 dölünde lambda cyhalothrin direncinin kalıtımının eşeye bağlı ve baskın karakterde olduğu, bifenthrin direncinin kalıtımının ise otozomal ve eksik çekinik karakterde olduğu belirlenmiştir. F2 dölünden elde edilen ölüm oranlarına göre ise lambda cyhalothrin direncinin düşük dozlarda birden fazla genin, yüksek dozlarda ise tek gen kontrolünde ve bifenthrin direncinin ise tek gen kontrolünde olduğu bulunmuştur. Sırasıyla esteraz, monooksijenaz ve glutation S-transferaz enzim inhibitörleri olan *S,S,S*-tributylphosphorotrithioate (DEF), piperonylbutoxide (PBO) ve diethylmaleate (DEM) ile yapılan sinerjizm çalışmaları lambda cyhalothrin ve bifenthrin direncinde esteraz ve monooksijenaz enzimlerinin önemli rol oynadığını, glutation 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 saptanmamıştır.

Temmuz 2008, 153 sayfa

Anahtar Kelimeler :Biyoassay, piretroit direnci, lambda cyhalothrin, bifenthrin, seleksiyon, kalıtım, *Tetranychus urticae*, voltaj kapılı sodyum kanalı, *kdr*

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RESISTANCE TO PYRETHROID INSECTICIDES IN THE TWO SPOTTED SPIDERMITE *Tetranychus urticae* KOCH (ACARINA: TETRANYCHIDAE)

Hilal SUSURLUK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. M. Oktay GÜRKAN

The study was performed in order to determine the biochemical and molecular characteristics and inheritance of the resistance which was developed against synthetic pyrethroids, lambda cyhalothrin and bifenthrin by *Tetranychus urticae* (Koch) population, which was collected from tomato greenhouse in Antalya-Gazipasa, Beyobasi (BEYDOM).

Population of *T. urticae* BEYDOM was selected using the dose of LC_{90} of standart susceptiple population (GSS) with Petri Dish method, and LC_{50} and LC_{90} of lambda cyhalothrin and bifenthrin were detected in the following selections. Resistance rates at the end of the 8^{th} selection according to LC_{50} and LC_{90} for lambda cyhalothrin and bifenthrin were found 18.24 and 8.15-fold, and 74.23 and 134.07-fold, respectively. Resistance to lambda cyhalothrin in F1 progeny which was obtained from reciprocal crosses between resistant and susceptiple populations was showed sex linked and dominant inheritance while resistance to bifenthrin was inherited autosomaly and incompletely recessive factor. Mortality in F2 progeny indicated that the resistance to lambda cyhalothrin was under the control of more than one gene in lower doses however the mortality in higher doses and resistance to bifenthrin were under the control of only one gene. Synergist experiments with S,S,S-tributylphosphorotrithioate (DEF), piperonylbutoxide (PBO) and diethylmaleate (DEM), which are inhibitors of esterases, monooxygenases and glutathion-S-transferases respectively suggested a major role of esterases and monooxygenases in the resistance to lambda cyhalothrin and bifenthrin, whereas glutathion-S-transferases do not play a key role in the resistance.

Analysis of the sequence of the IIS4–IIS6 region of the sodium channel gene of BEYDOM population selected with bifenthrin did not reveal any amino acid or nucleotide replacements compared to that of the GSS strain.

July 2008, 153 pages

Key Words :Bioassay, pyrethroid resistance, lambda cyhalothrin, bifenthrin, selection, inheritance, *Tetranychus urticae*, voltage-gated sodium channel, *kdr*

TEŞEKKÜR

Antalya ilinin Gazipaşa ilçesi Beyobası köyü domates serasından toplanan *T. urticae* popülasyonunun sentetik piretroitlere gösterdiği direncin kalıtımının, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonunun hassas popülasyon ile karşılaştırılarak yapıldığı bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından 2003-2006 yıllarında desteklenen "Kırmızı örümceklerde sentetik piretroitlere direncin moleküler mekanizmaları üzerinde araştırmalar" konulu proje tarafından desteklenmiştir.

Bu konuda bana çalışma fırsatı veren, anlayış ve yol gösteren, ihtiyaç duyduğum her konuda içtenlikle yardımcı olan danışman hocam, Sayın Prof. Dr. M. Oktay GÜRKAN (A.Ü.Z.F. Bitki Koruma Bölümü)'a, Tez İzleme Komitesinde olmayı kabul ettikleri için Sayın Prof. Dr. Sultan ÇOBANOĞLU (A.Ü.Z.F) ve Prof. Dr. Mahinur S. AKKAYA (ODTÜ, Kimya Bölümü)'ya teşekkürlerimi sunarım. Denemelerim süresince bana yardımcı olan A.Ü.Z.F. Bitki Koruma Bölümü elemanlarına, çalışmamın her aşamasında destek ve yardımlarını gördüğüm sevgili arkadaşlarım Tuğba ERDOĞAN, Arzu ÇELİK, Selcan ALPTEKİN ve Necva HADİM'e, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde bana çalışma olanağı sağlayan Sayın Prof. Dr. Bahattin KOVANCI'ya ve her zaman katkı ve yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşım Öğr. Gör. Dr. N. Alper KUMRAL (U.Ü.Z.F)'a, biyokimyasal ve moleküler çalışmalarımızın sonuçlarını yorumlamada bizlere yardımcı olan Dr. Martin Williamson ve Dr. Graham Moores (Rothamsted Experimental Station, İngiltere)'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bu altı yıllık süreçte bana büyük bir sabır ve anlayış gösteren, beni her koşulda destekleyerek daima yanımda olan aileme ve sevgili eşim Dr. İ. Alper SUSURLUK'a sonsuz teşekkür ediyorum.

Hilal SUSURLUK
Ankara, Temmuz 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER DİZİNİ vi
KISALTMALAR vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 9
3. MATERYAL VE YÖNTEM 35
3.1 Materyal 35
3.1.1 İki noktalı kırmızıörümcek (*Tetranychus urticae* Koch) populasyonları 36
3.1.2 Kullanılan ilaçlar 38
3.2 Yöntem 40
3.2.1 Biyoassay ve seleksiyon çalışmaları 40
3.2.1.1 İnsektisit dozlarının hazırlanması 42
3.2.1.2 İstatistiksel değerlendirme 42
3.2.2 Biyokimyasal çalışmalar 42
3.2.2.1 Toplam protein miktarının ölçümü 43
3.2.2.2 Toplam karboksilesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi 43
3.2.2.3 Poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) ile karboksilesteraz enzimi izozimlerinin incelenmesi 44
3.2.2.4 Glutation S-transferaz enzim aktivitesinin belirlenmesi 45
3.2.2.5 Sitokrom P-450 monooksijenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi 46
3.2.3 Sinerjistik çalışmalar 47
3.2.4 Resiprokal çaprazlamalar 47
3.2.5 Moleküler çalışmalar 49
3.2.5.1 Sodyum kanalları dejenere primerlerinin elde edilmesi 50
3.2.5.2 Total rna izolasyonu 51
3.2.5.3 RNA'nın saflaştırılması 52
3.2.5.4 cDNA sentezi 52
3.2.5.4.1 cDNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması 53
3.2.5.4.2 2. PCR 54
3.2.5.4.3 PCR ürünlerinin agaroz jelden ekstraksiyonu 55
3.2.5.4.4 pGEM-T vektör içerisine bağlanma 55
3.2.5.4.5 Vektörün transformasyonu 56
3.2.5.4.6 Plazmit izolasyonu 58
3.2.5.4.7 Etanol presipitasyonu 58
3.2.5.4.8 Sekans reaksiyonu 59
3.2.5.5 Genomik DNA ekstraksiyonu 60
3.2.5.5.1 DNAZOL ile genomik DNA izolasyonu 60
3.2.5.5.2 CTAB buffer kullanılarak yapılan genomik DNA izolasyon protokolü 61
3.2.5.5.2.1 Genomik DNA'nın PCR ile çoğaltılması 61
3.2.5.6 Nükleotid sekansı 63

4. BULGULAR VE TARTIŞMA 64

4.1 Biyoassay ve Seleksiyon Çalışmalarının Sonuçları ve Tartışma 64
4.2 Biyokimyasal Sonuçlar ve Tartışma..... 72
4.2.1 Karboksilesteraz enzim aktivitesinin ölçümü..... 72
4.2.2 Poliakrilamit jel elektroforezi ile spesifik olmayan karboksilesteraz izozimlerinin incelenmesi..... 75
4.2.3 Glutation S-transferaz enzim aktivitesinin ölçümü 77
4.2.4 Sitokrom P450 monooksijenaz (MO) enzim aktivitesinin ölçülmesi..... 80
4.3 Sinerjistik Çalışmaların Sonuçları ve Tartışma..... 83
4.4 Resiprokal Çaprazlama Sonuçları ve Tartışma 87
4.5 Moleküler Çalışmaların Sonuçları ve Tartışma..... 99
4.5.1 *T. urticae* sodyum kanalının 2. domain'inin dejenere primerleri.....101
4.5.2 Total RNA izolasyonu.....101
4.5.3 cDNA sentezi ve PCR ile çoğaltılması 103
4.5.4 Klonlama ve transformasyon.....104
4.5.5 Dizi analizi 105
4.5.6 Genomik DNA ekstraksiyonu 108
4.5.7 Genomik DNA'nın PCR ile çoğaltılması.....109
4.5.8 Sekans analizi 110
5. SONUÇ..... 118
KAYNAKLAR 121
EKLER..... 137
EK 1 Karboksilesteraz Enzim Aktivitesinin Ölçümü İçin Gerekli Olan Malzemelerin Hazırlanışı 138
EK 2 Polikarilamit Jel Elektroforez Yapılışı İçin Gerekli Olan Malzemelerin Hazırlanışı 139
EK 3 Glutation S-Transferaz Aktivitesinin Ölçümü İçin Gerekli Olan Malzemelerin Hazırlanması 140
EK 4 Sitokrom P 450 Monooksijenaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü İçin Gerekli Olan Malzemelerin Hazırlanması 141
EK 5 *Blattella, Pediculus, Musca, Heliothis, Boophilus* ve *Varroa*'nın NCBI Web Sayfasında Kayıtlı Sodyum Kanalı Sekanslarından EBI Cluster W Programı ile Yapılan Alignment 142
EK 6 Qiaquick Jel Ektraksiyon Kiti Kullanılarak Poliakrilamit Jelden DNA Fragmentlerinin Ekstraksiyonu..... 147
EK 7 Microspin™ S-400 HR Kolonları ile PCR Ürünlerinin Temizlenmesi Kolonun Hazırlanması 149
EK 8 Sekans Sonuçları 150
ÖZGEÇMİŞ..... 152

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
A	Absorbans
APS	Amonyum Persülfat
Bp	bazçifti
BSA	Bovin Serum Albumin
cDNA	Komplementer DNA
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromide
DEF	*S*,*S*,*S*-tributyl phosphorotrithioate
DEM	Diethyl Maleate
DNA	Deoksiribo Nükleikasit
dNTP	Deoksi-nükleotidtrifosfat
ECOD	7-ethoxycoumarin
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
EtBr	Ethidium Bromide
GSH	Glutathione
g	Relative Centrifugation Force=rcf
Kb	Kilobaz
KCL	Potasyum Klorür
kdr	Knockdown Resistance
LC_{50}	Letal Konsantrasyon-50
LC_{90}	Letal Konsantrasyon-90
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
ng	nanogram
NH_4O	Ammonium acetate
PAGE	poliakrilamit jel elektroforez
PBO	piperonyl butoxide
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PNOD	p-nitroanisole
Ppm	Milyonda Bir Kısım
RNA	Ribo Nükleikasit
RT-PCR	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TAE	Tris-Acetate-EDTA
Taq	*Thermus aquaticus*
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
Tris	Tris (hydroxymethyl) Aminomethane
UV	Ultraviyole

KISALTMALAR

TuNa	*Tetranychus urticae* Sodyum Kanalı
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
EBI	European Bioinformatics Institute
GST	Glutathione-S-Transferase
P450	Cytochtome P450
MO	Monooksijenaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Sodyum kanalının şematik yapısı 5
Şekil 1.2 Sodyum kanalının hücre içinden görüntüsü ve inaktivasyonu 5
Şekil 3.1 *Tetranychus urticae* popülasyonlarının üzerinde yetiştirildiği fasulye bitkileri 37
Şekil 3.2 *Tetranychus urticae* popülasyonlarının yetiştirildiği kafes sistemleri 37
Şekil 3.3 Kafes sistemlerinin iklim odası içerisindeki görüntüsü 38
Şekil 3.4 Petri kabı yönteminde kullanılan ilaçlama kulesi 41
Şekil 3.5 Poliakrilamit jel elektroforezinde kullanılan tank ve güç kaynağı 45
Şekil 3.6 Böcek sodyum kanalları 51
Şekil 4.1 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının lambda cyhalothrin'e karşı gösterdiği logaritmik doz- probit doğruları 69
Şekil 4.2 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının bifenthrin'e karşı gösterdiği logaritmik doz-probit doğruları 69
Şekil 4.3 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının lambda cyhalothrin'e karşı gösterdiği karboksilesteraz enzim aktivitesi 73
Şekil 4.4 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının bifenthrin'e karşı gösterdiği karboksilesteraz enzim aktivitesi 73
Şekil 4.5 Lambda cyhalothrinle selekte edilmiş seleksiyon popülasyonlarının (Seleksiyon (0-8)) karboksilesteraz aktivitesi 76
Şekil 4.6 Bifenthrinle selekte edilmiş seleksiyon popülasyonlarının (Seleksiyon (0-8)) karboksilesteraz aktivitesi 76
Şekil 4.7 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının lambda cyhalothrin'e karşı gösterdiği glutation S- transferaz enzim aktivitesi 79
Şekil 4.8 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının bifenthrin'e karşı gösterdiği glutation S-transferaz enzim aktivitesi 79
Şekil 4.9 *Tetranychus urticae*'nin R ve S populasyonlarında ve iki populasyon arasındaki resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F1 dişilerinde lambda cyhalothrin için gözlenen doza bağlı ölüm oranı eğrileri 90
Şekil 4.10 *Tetranychus urticae*'nin R ve S populasyonlarında ve iki populasyon arasındaki çaprazlamalardan elde edilen F1 ve F2 dişilerinde lambda cyhalothrin için gözlenen doza bağlı ölüm oranı eğrileri 91
Şekil 4.11 *Tetranychus urticae*'nin R ve S populasyonlarında ve iki populasyon arasındaki resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F1 dişilerinde bifenthrin için gözlenen doza bağlı ölüm oranı eğrileri 93
Şekil 4.12 *Tetranychus urticae*'nin R ve S populasyonlarında ve iki populasyon arasındaki resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F1 ve F2 dişilerinde bifenthrin için gözlenen doza bağlı ölüm oranı eğrileri 94
Şekil 4.13 Tez kapsamında yapılan moleküler çalışmaların genel şeması 100
Şekil 4.14 Agaroz jelde (%1) izole edilen total RNA örneklerinin görünümü 102
Şekil 4.15 Temizlenmiş saf RNA 102
Şekil 4.16 cDNA'nın PCR ile çoğaltılması 103
Şekil 4.17 İkinci PCR reaksiyonunda kullanılan (2/3) primer kombinasyonlarından elde edilen bantlar 104
Şekil 4.18 Rekombinant kolonilerin bulunduğu LB ortamı 105

Şekil 4.19 Plazmid cDNA izolasyonu 105
Şekil 4.20 *Tetranychus urticae*'nin hassas ırkı (GSS)'nın
sodyum kanallarının II. domain'ine
ait 444 bp'lik bölümün cDNA ve amino asit sekansları
ve buna göre hazırlanan spesifik primerler 106
Şekil 4.21 *Tetranychus urticae*'nin sodyum kanal geninin II. domain'inin
S4, S5, S6 transmembran segmentlerinin cDNA sekansının gen
bankasında bulunan homolog sekanslarla karşılaştırılması
ve daha önce rapor edilen mutasyonların pozisyonları 107
Şekil 4.22 PCR ile genomik DNA'nın spesifik primerlerle çoğaltılması 109
Şekil 4.23 PCR sonucu elde edilen 444 bp'lik bantlar..... 110
Şekil 4.24 Hassas ve dirençli (BIF) popülasyonun sekansından elde edilen aminoasit
diziliminin karşılaştırılması 113
Şekil 4.25 Hassas, 11 ve 12 numaralı sekans sonuçlarının nükleotid diziliminin
karşılaştırılması 114

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 *Kdr* ile ilişkili olarak sodyum kanalını oluşturan aminoasit dizilim polimorfizmi 7
Çizelge 3.1 Resiprokal çaprazlamalar 49
Çizelge 3.2 PCR döngüsü 54
Çizelge 4.1 Lambda cyhalothrin için hassas (GSS) ve BEYDOM (Seleksiyon (0)) popülasyonlarının probit-ölüm verileri 65
Çizelge 4.2 Bifenthrin için hassas (GSS) ve BEYDOM (Seleksiyon (0)) popülasyonlarının probit-ölüm verileri 65
Çizelge 4.3 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının lambda cyhalothrin'e karşı gösterdiği probit-ölüm verileri ve direnç oranları 67
Çizelge 4.4 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının bifenthrin'e karşı gösterdiği probit-ölüm verileri ve direnç oranları 68
Çizelge 4.5 Lambda cyhalothrin ve bifenthrin ile selekte edilen 8. seleksiyon ve GSS popülasyonlarında PNOD'a göre sitokrom P450-MO enzim aktivitesi 81
Çizelge 4.6 Lambda cyhalothrin ve bifenthrin ile selekte edilen 8. seleksiyon ve GSS popülasyonlarında ECOD'a göre sitokrom P 450-MO enzim aktivitesi 81
Çizelge 4.7 *Tetranychus urticae*'nin 8. seleksiyon popülasyonları üzerinde esteraz, glutation S-transferaz ve sitokrom P450-MO enzim inhibitörlerinin sinerjistik etkisi 85
Çizelge 4.8 Resiprokal F1 ve F2 dişilerinin lambda cyhalothrin'e karşı gösterdiği probit-ölüm verileri ve direnç oranları 88
Çizelge 4.9 *Tetranychus urticae*'nin lambda cyhalothrin'e dirençli 8. seleksiyon popülasyonu ile yapılan RSR çaprazlamasında gözlenen ve beklenen ölüm oranları, kikare ve tek gen hipotezini belirlemek için kullanılan *P* değerleri 89
Çizelge 4.10 Resiprokal F1 ve F2 dişilerinin bifenthrin'e karşı gösterdiği probit-ölüm verileri ve direnç oranları 92
Çizelge 4.11 *Tetranychus urticae*'nin bifenthrin'e dirençli 8. seleksiyon popülasyonu ile yapılan RSR çaprazlamasında gözlenen ve beklenen ölüm oranları, kikare ve tek gen hipotezini belirlemek için kullanılan *P* değerleri 92
Çizelge 4.12 Dejenere primerlerin nükleotid dizi yapısı 101
Çizelge 4.13 *Tetranychus urticae*'ye spesifik primerlerin adı, nükleotid uzunlukları, dizileri ve Tm dereceleri 108
Çizelge 4.14 Hassas popülasyon (GSS) ve bifenthrin'in 8.seleksiyon popülasyonuna ait DNA yoğunlukları, saflık dereceleri 108

1. GİRİŞ

Tarım alanlarında görülen hastalık, zararlı ve yabancı otlar tarımsal üretimin en önemli hedeflerinden biri olan birim alandan en yüksek geliri elde etmeye engel teşkil etmektedirler. Bu etmenler gerekli önlemler alınmadığı takdirde elde edilen ürün miktarında önemli oranda kayıplara neden olmaktadır. Polifag bir zararlı olan İki noktalı kırmızıörümcek (*Tetranychus urticae* Koch) (Acari: Tetranychidae) pek çok tarımsal ürün, meyve ve süs bitkisinin en önemli zararlılarından birisidir (Leeuwen *et al.* 2006b). Acariformes olarak bilinen gruba ait olup, Prostigmata alt takımı ve Tetranychidae familyasında yer almaktadır (Borror *et al.* 1989). Yaklaşık 0,5 mm uzunluğunda, oval bir vücut şekline sahip olup yeşilimsi-sarımsı, şeffaf, kahverengi veya kırmızı-turuncu renklerdedir (Fasulo and Denmark 2000). İlk kez Koch tarafından 1836 yılında bulunmuştur (Pritchard and Baker 1955). Orijinin sıcak iklim bölgeleri olduğu düşünülmektedir (Fasulo and Denmark 2000).

Bu zararlıda döllemli ve döllemsiz üreme görülmektedir. Dişi bireyler diploid, erkek bireyler ise haploiddir. Döllemsiz üreme sonucu popülasyonda sadece erkek bireyler meydana gelirken (Brandenburg and Kennedy 1987), döllemli yumurtalardan sadece dişi bireyler meydana gelmektedir. Zararlının bitki üzerinde beslenmesi bitkiye direkt ve indirekt zarar vermektedir. Yaprak dökülmesi, yaprak yanıklığı ve sonuçta bitkinin ölmesi direkt zararı iken, fotosentezin azalması ve bazı bitki virus hastalıklarının nakledilmesi indirekt zararları arasına girmektedir. Konukçu bitki üzerindeki bu etkilerin birleşimi, önemli ölçüde ürün ve verim kaybına sebep olmaktadır (Huffaker and McMurty 1969).

Zararlı uygun konukçu bitki ve iklim koşullarında popülasyon yoğunluğunu hızla artırabilmektedir. Böyle bir durumda bu zararlı ile mücadele oldukça zor olmaktadır. Üreticiler mücadele için sık aralıklarla akarisit veya insektisit-akarisit uygulamaları yapmaktadır. Fakat bu uygulamalar çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Beslenmeye başladıkları andan itibaren bitki üzerinde yoğun ağ ördükleri için yumurta ve diğer hareketli dönemleri yapılan uygulamalardan etkilenmemektedir. Püskürtme şeklinde

yapılan ilaç uygulamaları da zararlının tüm dönemlerini öldürmek için oldukça yetersiz kalmaktadır. İlaçlama sonrası bitki üzerinde kalan dişi bireyler de döllemsiz üremeye devam ederek nesli devam ettirmekte ve popülasyonda tekrar bir artış ortaya çıkmaktadır.

Pestisitlere karşı oluşan direnç pek çok zararlıda görülen önemli bir problemdir. Aynı etki mekanizmasına sahip ilaç veya ilaçların tekrarlı bir şekilde uygulanması zararlı popülasyon için kullanılan kimyasallara karşı direnç oluşma riskini artırmaktadır (Helle and Sabelis 1985). Akarisit direnci *T. urticae* ile savaşımda karşımıza çıkan en önemli problemlerden biridir (Jeppson *et al.* 1975). Bu zararlı ile kimyasal savaşta ilk direnç problemi Avrupa ve Amerika'da seralarda, 1950'li yılların başında organik fosforlu insektisitlere karşı görülmüştür (Cranham and Helle 1985). Son yıllarda ise *T. urticae*'nin doğal tarla popülasyonları, savaşımında kullanılan kimyasalların çoğuna direnç geliştirmiş durumdadır (Leeuwen and Tirry 2007).

Pestisit direncine sebep olduğu bilinen ve pestisit detoksifikasyonunda rol oynayan 3 enzim sistemi bulunmaktadır. Bunlar karboksilesteraz, sitokrom P450 monooksijenaz (MO) ve glutation S-transferaz enzimleridir. Piretroit direncinin mekanizmaları arasında en yaygın görülenleri P450 monooksijenaz ve karboksilesteraz enzimleridir (Soderlund 1998, Scott 1999, Jamroz *et al.* 2000). Fakat yapılan bazı araştırmalarda *T. urticae*'de piretroit direncinde glutation S-transferaz enzimlerinin de rol oynadığı belirlenmiştir (Yang *et al.* 2001, Stumpf and Nauen 2002, Konanz and Nauen 2004).

Karboksilesteraz enzimleri tarafından pestisitlerin hidrolizinin artırılması veya bloke edilmeleri organik fosforlu, karbamatlı ve piretroitli bileşiklere karşı oluşan direnç de önemli bir rol oynamaktadır. Bu tip bir detoksifikasyon ilk kez böceklerde biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Böceklerde total esteraz aktivitesinin artması ya da bir veya daha fazla spesifik esteraz enziminin aktivitesinin artması bir direnç mekanizması olarak kabul edilmektedir. Bu mekanizma afitlerde çok iyi bir şekilde açıklanmıştır. Enzim saflaştırma çalışmaları, E4 olarak adlandırılan tek bir esteraz isoziminin Şeftali Yaprak Biti *Myzus persicae* (Hom: Aphididae)'nin organik fosforlulara dirençli

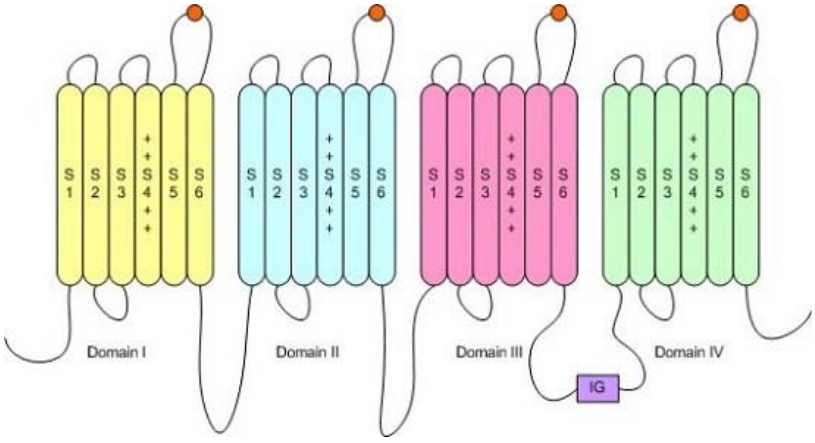
ırklarında oldukça yüksek düzeyde bulunduğunu göstermiştir (Devonshire 1977). Esteraz geninin amplifikasyonu organik fosforlulara dirençli *Culex* (Dip: Culicidae) ırklarında da çok iyi bir şekilde çalışılmıştır (Mullin and Scott 1992).

Sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri tüm organizmalarda bulunan önemli metabolik sistemlerden biridir. Olası pek çok reaksiyonda katalizör görevi gördüğünden vücuda giren yabancı maddelerin metabolizmasında, böcek hormonlarının, feromonlarının, yağ asitlerinin sentezi ve parçalanmasında, pek çok konukçu bitkinin kimyasallarına karşı böceklerin adaptasyonunda ve insektisit direncinde rol oynamaktadırlar (Terriere 1984, Hodgson *et al.* 1993). Bir insektisit uygulaması yapıldığında bu enzimler ilaçları ve diğer yabancı bileşikleri çözünebilir şekillerine dönüştürerek kolaylıkla vücuttan atılabilir hale getirip detoksifiye edilmelerinde görev alırlar. Böceklerdeki miktarlarının düşük olması ve stabil olmamalarından dolayı keşfedildikten 20 yıl sonra çalışılmaya başlanmıştır. Saflaştırılmaları çok zor olmakla birlikte fizikokimyasal özellikleri ve enzimatik karakteristikleri üzerine yapılmış çalışmalar çok sınırlıdır. Son yıllarda 20'den fazla böcek türünde sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri çalışılmış ve 60'dan fazla P450 geni sadece *Drosophila melanogaster* Meigen (Dip: Drosophilidae)'den izole edilmiştir (Shen *et al.* 2003).

Glutation S-transferaz (GST)'lar doğada bakteriler, maya, küf, yumuşakçalar, kabuklular, solucanlar, kurbağalar, böcekler, bitkiler, balıklar, kuşlar ve memelilerde bulunmaktadır. GST'ler vücuda alınan yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunda önemli bir role sahip olan enzimlerdir. İnsektisit metabolizmasında GST'lerin önemi ilk kez organik fosforlu bileşiklerin detoksifikasyonunda belirtilmiştir (Soderlund 1997). GST'ler daha sonra organik klorlu ve siklodien insektisitlere karşı böceklerde çalışılmıştır. GST'ler organik fosforlu bileşiklerin faz I metabolizmasında çok önemli olup böceklerde organik fosforlulara dirençte çok önemli bir role sahiptirler. Ayrıca sitokrom P450 izoenzimleri tarafından şekillendirilen metabolitlerin de faz II metabolizmasında çok önemli fonksiyonları bulunmaktadır (Soderlund 1997).

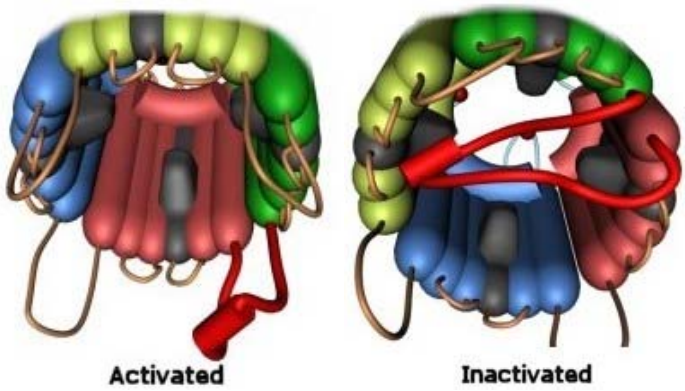
DDT ve piretroit insektisitlerin başlıca hedef yeri voltaj kapılı sodyum kanallarıdır (Narahashi 1986). Sodyum kanallarını kodlayan genlerin yapısında meydana gelen mutasyonlar piretroit direncinin en önemli sebepleri arasında yer almaktadır. Bu mekanizma hedef yeri duyarsızlığı olarak bilinmektedir (Miyazaki *et al.* 1996, Soderlund 1998). Piretroitler sinir membranlarındaki sodyum kanallarının fonksiyonunu değiştirerek insektisit etkilerini göstermektedirler ve sinir sisteminde voltaj kapılı sodyum kanallarında birtakım değişikliklere sebep olmaktadırlar. Böceklerde voltaj kapılı sodyum kanalı *para* geni tarafından kodlanmaktadır (Loughney *et al.* 1989). Voltaj kapılı sodyum kanalı kompleks bir membran proteini olup 260 kD'dan daha büyüktür. Tek bir polipeptit (α altünite) tarafından şekillenen kanalın ana yapısında 24 transmembran segmenti ile birbirini tekrar eden 4 domain (S1-S6) bulunmaktadır (Şekil 1.1). Her bir segment birbirine hidrofilik segmentlerle bağlıdır ve her domain'in 4. segmentinde voltaj sensörü olduğundan pozitif yükle yüklüdür. İnaktivasyon kapısı (IG), domain III ve IV arasında bulunmaktadır (Şekil 1.1) (Anonymous 2002a).

Bu kanallar, uyarıları alan zarlarda hareket potansiyellerinin artması için oldukça önemlidir. Hücre içerisine sodyum iyonlarının akışına izin vererek depolarize hücre zarına sebep olur. 7000 adet sodyum iyonu kanalların açıldığı yaklaşık 1 milisaniye gibi kısa bir süre içerisinde her kanal boyunca geçmektedir. Voltaj kapılı sodyum kanalları seçicilik ve voltaj kapısından sorumlu α-altünitelerinden oluşmaktadır. Bazı sodyum kanalları ise β-1 ve β-2 olarak adlandırılan 1 veya 2 daha küçük altünitelere sahiptir.



Şekil 1.1 Sodyum kanalının şematik yapısı (Anonymous 2002a)

Proteinden oluşan iyonik kanalın içe doğru açılan ve dıştan içe girişte seçiciliğe sahip olan bir kapısı bulunmaktadır. İyon kanalının ağız kısmı bazen 1.2 nm bazen de 0.3-0.5 nm'ye kadar daralan bir yapıdadır. Kanalın bu dar olan kısmı asparticacid, glycine, lysine ve alanine'den oluşan seçici filtresinde en üst seviyeye ulaşmaktadır. Bir sinir uyarısı geldiğinde hücre 3 ayrı fazdan geçmektedir. Öncelikle hücre sodyum kanallarının birden açılması ile depolarize edilir. Hücreyi tekrar toplamak için sodyum kanalları sodyuma geçirimsiz olmalıdır. Bu durum inaktivasyon evresi ile başarılır. Domain III ve IV arasındaki bu sitoplazmik bağ (IG) bu inaktivasyondan sorumludur. Bu inaktivasyonun resmedilmiş hali Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2 Sodyum kanalının hücre içinden görüntüsü ve inaktivasyonu (Anonymous 2002a)

Piretroit direncinin en önemli mekanizması knockdown direnç (*kdr*) olarak bilinen hedef yeri duyarlılığın azalmasıdır. *Kdr* olgusu ilk kez DDT'ye dirençli karasineklerde belirlenmiştir. Daha sonra Alman Hamam Böceği gibi diğer önemli zararlılarda da görülmüştür. *Kdr* görülen böceklerde voltaj kapılı sodyum kanallarında meydana gelen olası bir değişiklikle piretroit direnci arasındaki ilişki ilk kez elektrofizyolojik çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (Osborne and Hart 1979, Salgado et *al.* 1983). Diğer bir mekanizma ise *süper-kdr* direnci olup sinir sisteminde duyarsızlığa sebep olmakta ve DDT ve piretroitlerde *kdr* direncine göre daha yüksek düzeyde bir dirence sebep olmaktadır.

Kdr özelliği kromozom 3 üzerinde bulunmaktadır ve sinir sistemindeki elemetlerin duyarlılığını azaltmaktadır. *Kdr* özelliği bilinen tüm piretroidlerin öldürücü dozlarında dirence sebep olmaktadır. *Süper kdr* özelliği de yine kromozom 3 üzerinde bulunan, genetik olarak izole edilen ve böceklerde DDT ve bazı piretroitlere karşı görülen ve *kdr*'a göre böceklerde daha yüksek oranda dirence sebep olan bir direnç tipidir. *Kdr*'a benzeyen direnç mekanizmaları pek çok tarımsal zararlıda ve hastalık vektörlerinde belirlenmiştir. Piretroitlere duyarlılığın azalması *Heliothis virescens* Fabricius, *Spodoptera littoralis* Boisd., *Culex quinquefasciatus* Say, *Anopheles stephensi* (Liston) (Dip: Culicidae), *Blattella germanica* (Linnaeus) ve *Plutella xylostella* Linnaeus (Lep: Plutellidae) türlerinde belirlenmiştir. *Kdr* çok uzun yıllardan beri araştırıcıların ilgisini çekmektedir, fakat son yıllarda *kdr* direncinin genetik ve moleküler düzeyde belirlenmesi ile çok önemli gelişmeler kaydedilmiştir (Soderlund and Knipple 2003). *Kdr* ve *süper-kdr* mutasyonlarının büyük bir kısmı sodyum kanalının I. II. ve III. domainlerinin 6. transmembran segmentlerinde, II. domainin 4. ve 5. segmentlerini bağlayan zincirde ve I. ve II. domainleri bağlayan zincirde görülmüştür (Soderlund 2005).

Çizelge 1.1 *Kdr* ile ilişkili olarak sodyum kanalını oluşturan aminoasit dizilim polimorfizmi (Soderlund and Knipple 2003)

Türler	**Belirlenen Mutasyonlar**	**Referanslar**
Anopheles gambiae	L1014F	Martinez-Torres *et al*. (1998)
	L1014S	Ranson *et al*. (2000)
Bemisia tabaci	M918V; L925I	Morin *et al*. (2002)
Blattella germanica	L1014F	Miyazaki *et al*. (1996), Dong (1997)
	L1014F+E435K+C785R	Liu *et al*. (2000)
	L1014F+D59G+E435K+C785R+P1999L	Liu *et al*. (2000)
Boophilus microplus	F1538I	He *et al*. (1999)
Ctenocephalides felis	L1014F	Bass *et al*. (2004)
Culex pipiens	L1014F; L1014S	Martinez-Torres *et al*. 1999a
Culex quinquefasciatus	L1014F	Xu *et al*. (2005)
Cydia pomonella	L1014F	Brun-Barale *et al*. (2005)
Dropsophila melanogaster	I253N; A1410V; A1494V; M1524I	Pittendrigh *et al*. (1997)
Heliothis armigera	D1549V+E1533G	Head *et al*. (1998)
Heliothis virescens	L1014H	Park and Taylor (1997)
	V410M	Park *et al*. (1997)
	D1549V+E1533G	Head *et al*. (1998)
Hematobia irritans	L1014F+M918T	Guerreo *et al*. (1997)
Leptinotarsa decemlineata	L1014F	Lee *et al*. (1999)
Musca domestica	L1014F; L1014F+M918T	Ingles *et al*. (1996), Miyazaki *et al*. (1996), Williamson *et al*. (1996)

Çizelge 1.1 *Kdr* ile ilişkili olarak sodyum kanalını oluşturan aminoasit dizilim polimorfizmi (devam)

Myzus persicae	L1014F	Martinez-Torres *et al*. (1999b)
Pediculus capitis	T929I+L932F	Lee *et al*. (2000)
Plutella xylostella	L1014F+T929I	Schuler *et al*. (1998)

Bu çalışmalar sadece *kdr*'ın neden olduğu voltaj kapılı sodyum kanallarındaki nokta mutasyonları belirlemekle kalmayıp aynı zamanda piretroitlere dirençli sodyum kanallarının duyarlılığının azalmasının altında yatan moleküler mekanizmaları da açıklamaktadır.

Dünyada özellikle son 30 yıldır insektisitlere direnç konusunda gerek biyokimyasal gerekse moleküler biyoloji alanında oldukça detaylı araştırmalar yapılmaktadır. Ülkemizde ise bu konuyla ilgili yapılan araştırmalar sınırlıdır. Yapılan bu çalışma ülkemizin önemli tarımsal zararlılarından biri olan *T. urticae*'de sentetik piretroitli insektisit-akarisitlerden lambda cyhalothrin ve bifenthrine karşı oluşan direncin ana mekanizmalarını ortaya koymayı amaçlamaktadır. *T. urticae*'de piretroit direncini ve mekanizmalarını ortaya koymak amacı ile LC_{50} ve LC_{90} değerlerinin belirlendiği biyoassay çalışmaları, piretroit direncinde metabolik detoksifikasyondan sorumlu olabilecek enzimleri belirlemek amacı ile bazı biyokimyasal ve sinerjistik çalışmalar, direncin kalıtımını ortaya koymak amacı ile yapılan resiprokal çaprazlamalar ve son olarak piretroit direncine sebep olabilen sodyum kanallarındaki mutasyonlar moleküler düzeyde incelenerek direncin mekanizmaları ortaya konmaya çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Dünya'da *T. urticae*'nin insektisit veya akarisitlere direnci ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmış olup, bu tez çalışması ile doğrudan ilgili yayınlar kronolojik sıraya göre aşağıda verilmiştir.

Smissaert (1965), *T. urticae'*nin hassas ve dirençli popülasyonlarına ait dişi bireylerin homojenatları ile naftil asetat hidroliz oranları arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğunu bulmuştur. Benzer sonuçları diyapozdaki hassas ve dirençli popülasyonların dişi ve erkeklerinden de elde etmiştir.

Georghiou (1980), 1975 yılına kadar toplam 364 olan dirençli böcek ve akar türü sayısının 1978 yılında 414' e çıktığını belirtmiştir.

Kuhawara (1982), *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae)'nin organik fosforlu ve karbamatlı ilaçlara dirençli ırklarında, direnç ve asetil kolinesteraz (AChE) enzimi arasındaki ilişkiyi incelemiş ve direnç ile AChE arasında bir ilişki olduğunu rapor etmiştir.

Kuhawara *et al.* (1982), *T. kanzawai* Kishida'de organik fosforlu ilaçlara karşı oluşan direnci α ve β-naftil asetat, tribütrin, fenil asetat ve metil-n-bütirata karşı ester hidrolizi ile belirlemişlerdir. Naftil asetat ile ölçülen esteraz aktivitesi ve direnç arasında iyi bir korrelasyon bulmuşlardır.

Dennehy *et al.* (1983), San Joaquin vadisinde pamukta zararlı olan *T. urticae* popülasyonlarında dicofol direncini incelemek için tarla ve laboratuar çalışmaları yapmışlardır. Laboratuarda *T. urticae* popülasyonlarının hassas ve dirençli olanlarını tanımlamışlardır. Rezidüel bioassay ile 544 kat direnç saptamışlardır.

Croft *et al.* (1984), Oregon (ABD)'un armut bahçelerinden topladıkları *T. urticae* popülasyonlarını hassas laboratuar ırklarıyla karşılaştırdıklarında formetanate ve cyhexatin'e LC_{50} düzeyinde sırasıyla 117 ve 17 kat, LC_{95} düzeyinde ise 117 ve 171 kat direnç geliştiğini bildirmişlerdir.

Forgash (1984), insektisitlere karşı böceklerde direnç oluşumu ve bunun doğurduğu sonuçlar ile ilgili yaptığı çalışmasında, 1900'lü yılların başlarından itibaren 14 takıma bağlı 83 familyadan toplam 428 tür böcek ve akarın değişik gruptan kimyasal bileşiklere karşı direnç kazandığını açıklamıştır.

Hoyt *et al.* (1985), cyhexatin'in 1972'den 1980'e kadar armut bahçelerinde *T. urticae* savaşımında temel akarisit olarak kullanıldığını, bir bahçede 1978 yılında akarlarda direnç (4.1 kat) düşük düzeyde iken cyhexatin'in kullanımının devamı ile 1980'de direncin (24.9 kat) daha yüksek bir dereceye çıktığını ve daha sonra cyhexatin'in tek ve yoğun kullanımı 1983'e kadar azaltılınca direnç düzeylerinin de (9.9 kat) azaldığını, ancak cyhexatin kullanmaya devam eden iki komşu bahçede 1983'de direncin çok yüksek (31.3 ve 107.8 kat) olarak belirlendiğini kaydetmektedirler.

Croft *et al.* (1987), Kuzey Amerika'da kırmızı örümceklerle biyolojik savaşıma dayandırılan entegre akar savaşımında, selektif akarisitlerin ve diğer böceklere etkili ilaçların kullanıldığını bildirmektedirler. Araştırmacılar, akarlarda yapılan direnç kontrolünde selektif akarisitlere karşı direnç olduğunu ve sadece yeni ruhsatlandırılan clofentezine, hexythiazox ve abamectin'e karşı akarların hassas olduğunu, ancak bu aktif maddeler de doğru kullanılmazsa bunlara karşı da kısa sürede direnç gelişeceğini ve bu yüzden daha akılcı savaşım yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiğini vurgulamaktadırlar.

Dennehy *et al.* (1987), Kaliforniya' da pamuk üretim alanlarında dicofol'a dirençli *Tetranychus* türlerinde direnci belirlemek için kolay bir uygulama yöntemi olan petri kabı uygulama yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntem ile belirledikleri ayırıcı doz olan

56,2 ppm ile dicofol'a dirençli ve hassas bireyleri kolayca ayırt edebildiklerini belirtmişlerdir.

Pree (1987), *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae)'nin dicofol ile selekte edilen F_1(RxS) popülasyonlarının dicofol ile muamele edilmeden yetiştirildiği takdirde, bu direncin 8. döl sonunda bile değişmediğini ve dicofol direncinin uzun süre popülasyonda kalıcı olduğunu belirtmektedir.

Dennehy *et al.* (1988), New York'ta elma bahçelerinden topladıkları 10 *T. urticae* popülasyonunun 7 tanesinde dicofol'e direnç olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca iki izole bahçeden topladıkları *T. urticae* popülasyonunlarının hassas olmalarına rağmen devamlı dicofol kullanımı sonucu bir yıl içerisinde dicofol rezidüsüne 1000 kattan daha fazla direnç gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

Rizzieri *et al.* (1988), iki *T. urticae* popülasyonunda dicofol direncinin genetiği üzerine yaptıkları çalışmada her iki popülasyonda da dicofol direncinin çekinik özellikte olduğunu bildirmişlerdir.

Keena and Granett (1990), *T. urticae*'de propargit'e karşı oluşan direncin birden fazla gen tarafından kontrol edildiğini bildirmişlerdir.

Ferguson-Kolmes *et al.* (1991), dicofol'a dirençli *T. urticae* popülasyonunun 21 pestisite olan çapraz direncini değerlendirdiklerini, sonuçta bu ırkların aynı zamanda amitraz, bromopropylate ve chlorobenzilate'a karşı da güçlü bir pozitif çapraz dirence sahip olduğunu ve bu akarisitlerin dicofol'ün bir alternatifi olarak kullanılamayacağını kaydetmektedirler. Ayrıca yaptıkları biyokimyasal araştırmalarda dicofol'e dirençli *T. urticae* bireylerinde dirence P450-monooksijenaz enzimlerinin neden olduğunu bildirmişlerdir.

Kasamatsu (1992), Japonya'da *T. urticae* savaşımında sürekli akarisit kullanıldığını ve bunun sonucu olarak birçok akarisite (dicofol, tetradifon ve benzomate) ve birçok organik fosforlu insektisite karşı bu türün direnç geliştirdiğini bildirmektedirler.

Tian *et al.* (1992), Kaliforniya'da armut bahçelerinden topladıkları *T. urticae* popülasyonlarında LC_{50} düzeyinde cyhexatin'e 38 kat, fenbutatin-oxide'e ise 478 kat direnç olduğunu bildirmişlerdir.

Dennehy *et al.* (1993), akarisitlerin akarlara karşı kontakt etkisini ölçmek için mikroimmersion (MI) adlı yeni ve kullanışlı bir yöntem tanımlamışlardır. Mikroimmersiyon biyoassay'i 25' lik gruplar halindeki akarları vakum altında küçük pipet başlıklarına koymayı ve 30 sn boyunca 35 µl test solüsyonunda bekletmeyi ve bireyleri bölünmüş hücrelerdeki temiz yaprak yüzeyine koymayı içermektedir. MI hassas *T. urticae* bireylerine karşı amitraz, bifenthrin, chlorpyrifos ve dicofol'ün uygulanmasında formüle edilmiş ve konvensiyonel rezidüel biyoassaylerde olduğu gibi LC_{50} değeri hesaplanabilmiştir. MI'nın diğer biyoassay metotlarına göre en büyük farklılığının elde edilen probit doğrusu eğiminin büyüklüğü olduğunu ifade etmişlerdir.

Herron and Rophail (1993), *T. urticae*'de hexythiazox direncinin tek bir gen ile kontrol edildiğini bildirmişlerdir.

Kolmes *et al.* (1994), *T. urticae*'nin dicofol ve bifenthrin'e dirençli ırklarında davranışsal tepkinin farklı olduğunu, bu ırkların bifenthrin uygulanmış alanda daha uzun süre kaldıklarını bildirmişlerdir.

Campos *et al.* (1995), 10 farklı süs bitkisinden topladıkları *T. urticae* popülasyonlarında abamectin'e duyarlılığı rezidüel metot ile test etmişlerdir. LC_{95} değerleri 1-658 ppm arasında değişiklik göstermiştir. Laboratuarda abamectin ile selekte edilen *T. urticae* popülasyonunda hassas popülasyona göre 13-1592 kat direnç bulunmuştur.

Campos *et al.* (1996), Kaliforniya, Florida, Kanada adaları ve Hollanda'dan topladıkları *T. urticae* popülasyonlarında abamectin'e duyarlılığı yaprak rezidü yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Direncin yıllık uygulama sayısı ile doğru orantılı olarak arttığını ve LC_{95} değerlerine göre direnç oranının 0.5'den 175'e kadar değiştiğini bulmuşlardır. Araştırıcılar ayrıca *T. urticae* popülasyonlarında direnç gelişiminde farklı mekanizmalar olabileceğini de vurgulamışlardır.

Tsagkarakou *et al.* (1996), Yunanistan kökenli *T. urticae*'nin methyl-parathion (44 kat) ve methomyl (8 kat)'e karşı direnç mekanizmalarını, sinerjistlerin etkilerini ve çeşitli enzimlerin kinetik özelliklerinin hassas referans ırklar ve dayanıklı ırklar üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında sinerjist olarak esteraz ve GST'yi inhibe etmek için DEF, sitokrom P450 monooksijenaz enzimlerini inhibe etmek için PBO kullanmışlardır. Akarlar tek tek incelendiğinde esteraz allozimlerinin iso-elektrik noktalarının farklı olmadığı ve her iki ırkta da GST aktivitesinin aynı olduğu bulunmuştur. 2 sitokrom P450 monooksijenaz grubunun aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Dayanıklı ve hassas ırkların ikisinde de monooksijenaz enzim aktivitesinde çok fazla fark gözlenmemiştir.

Campos *et al.* (1997), *T. urticae* popülasyonlarında abamectin'e hassasiyeti belirlemek için abamectin'e dirençli ve hassas popülasyonlarda petri kabı yöntemi ile yaprak rezidü yöntemini karşılaştırmışlardır. Petri kabı yönteminin yaprak rezidü yöntemine göre daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Curkovic *et al.* (1997), fenazaquin, fenpyroximate and pyridaben gibi akarisitlerin elma ve armut ağaçlarında zararlı *P. ulmi* ve avcı *Neoseiulus californicus* McGregor (Acarina: Phytoseiidae)'a etkilerini bahçe ve laboratuar koşullarında incelediklerini kaydetmektedirler.

Kabir and Chapman (1997), kontakt akarisitlerin etkinliğini petri kabı-ilaçlama kulesi yöntemi ile belirlemişlerdir. Bu yöntemle *T. urticae* ve *P. ulmi*'de propargit'e karşı hassasiyeti belirlemişlerdir.

Goka (1998), *T. kanzawai* Kishida'nin hassas (S) ve dirençli (R) ırkı arasında çaprazlama yaparak tebufenpyrad, fenpyroximate ve pyridaben'e direncin genetiğini çalışmıştır. R ve S ırklarının LC_{50} değerlerinden hesapladığı direnç oranlarını sırasıyla tebufenpyrad, fenpyroximate ve pyridaben için 97, 1265 ve 134 olarak bulmuştur. R ve S ırkı arasında yaptığı resiprokal çaprazlamalarda F1 dişilerinde direncin kalıtımını yine tebufenpyrad, fenpyroximate ve pyridaben için orta, eksik baskın ve tam çekinik olarak bulurken, F2 dişilerinin gösterdiği tepkilerden bu 3 akarisite de direncin tek bir genin kontrolü altında olduğunu bulmuştur.

Guo *et al.* (1998), *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae)'un Çin'de en az 25 pestisite direnç geliştirdiğini bildirmişlerdir. *T. cinnabarinus*'ta omethoate ve monocrotophos direncinin eksik baskın gen tarafından kontrol edildiğini bulmuşlardır.

Herron and Rophail (1998), tebufenpyrad ile tarlada yapılan savaşımlarda başarısızlığa uğrayınca batı Avustralya'da elma ağaçlarından topladıkları *T. urticae*'nin bir ırkına (WA) 4 sezonun üzerinde beş kez tebufenpyrad uygulamışlardır. WA ırkında tebufenpyrad direnci ilk kez ortaya çıkmış olup 63.29 kat olarak bulunmuştur. *T. urticae*'de tebufenpyrad'a direnç gösteren bu ırkın, pryidaben'e 210 kat, fenpyroximate'e 24.60 kat ve chlorfenapyr'e de 2.20 kat çapraz direnç gösterdiğini bulmuşlardır.

Devine *et al.* (2001), İngiltere'de tebufenpyrad etken maddeli pestisite direnç gösteren *T. urticae* (TUK4) ırkı ile Japonya'dan getirilen METI-akarisitlere dirençli referans ırkta yaptıkları çalışmada 4 METI-akarisite (tebufenpyrad, pyridaben fenpyroximate, fenazaquin) direnci incelemişlerdir. Mikroimmersiyon denemesindeki bu bileşiklerin TUK4 için direnç oranlarını sırasıyla 46, 346, 168 ve 77 olarak belirlemişlerdir. Sonuçların Japon METI-akarisitlere dirençli referans ırk ile benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

Herron *et al.* (2001) 1993–94 sezonunun başlangıcında Avustralya'da pamukta *Helicoverpa* spp. (Lep: Noctuidae) ve *T. urticae* ile mücadele için ruhsat alan bifenthrin'i ruhsat alındığı andan itibaren izlemeye başlamışlardır. Sadece dört sezon kullanıldıktan sonra 1996/97 yıllarında direnç ortaya çıkmıştır. Takip eden üç mevsimde de *T. urticae*'de direnç, LC_{50}'de 1.2 kattan 109 kata artmış ve pamuk verimi de %90'dan %20'ye gerilemiştir. Direncin gelişimi *T. urticae* ile savaşımda bifenthrin'in güvenilirliğini azaltmıştır.

Nauen *et al.* (2001), *T. urticae* ve *P. ulmi* larvalarının Almanya, Avustralya, Japonya, Fransa, İtalya, Amerika (Kaliforniya ve Florida) ve Brezilya ırklarının hexythiazox, clofentezine, azocyclotin, deltamethrin, chlorpyrifos, pyridaben, fenpyroximate ve abamectin gibi bazı akarisit ve insektisitlere karşı duyarlılık derecelerini vermektedirler.

Stumpf and Nauen (2001), *T. urticae*'nin mitokondri elektron taşıma engelleyici (METI) etki mekanizmasına sahip akarisitlere olan direncinin artan bir problem olduğunu, METI mekanizmalı akarisitlerin ticari bahçelerde yüksek düzeyde çapraz direnç oluşturduğunu, bir Japon ve bir İngiliz ırkının larvalarında sırasıyla pyridaben'e 1100 ve 480 kat fenpyroximat'e 870 ve 45 kat, tebufenpyrad'a 33 ve 44 kat direnç kazandığını bildirmektedirler. Ayrıca araştırmacılar, bu popülasyonlar daha fazla seleksiyona uğratılmaksızın laboratuarda yetiştirildiğinde direnç düzeylerinin sabit kaldığını ve buna ek olarak Japon ırkının dicofol'a da çapraz direnç gösterdiğini eklemektedirler.

Yang *et al.* (2001), *Oligonychus pratensis* (Acari: Tetranychidae) ve *T. urticae*'de organik fosforlu insektisit dimethoate ve piretroit insektisitlerden bifenthrin ve lambda cyhalothrin'e direnci ve muhtemel detoksifikasyon mekanizmalarını sinerjistlerle değerlendirmişlerdir. *O. pratensis, T. urticae'*ye göre dimethoate'a 112 kat ve her iki piretroit insektisite de 24 kat daha hassas bulunmuştur. *O. pratensis* için bütün sinerjistlerin (Trifenil fosfat (TPP), dietil maleat (DEM) ve piperonil bütoksit (PBO)) iki piretroit insektisitin toksisitesini büyük ölçüde arttırdığını fakat dimethoat'a sinerjistik etkinin görülmediğini belirtmişlerdir. *T. urticae* için üç sinerjistin de

bifenthrin'in toksisitesini arttırdığını, lambda cyhalothrin'in toksisitesinin ise TPP ve PBO ile arttığı, dimethoate toksisitesinin ise sadece TPP ile yükseldiğini bildirmişlerdir.

Bynum and Archer (2001), Teksas'ta üç mısır tarlasında *O. pratensis* (Banks)'in bifenthrin'e direncini izlemişlerdir. Laboratuar biyoassaylerinde hassas laboratuar ırkına göre tarla ırklarının bifenthrin'e 3 ila 23 kat daha dirençli olduklarını bulmuşlardır. 1985 yılından 1995 yılına kadar olan süreçte LC_{50} değerleri karşılaştırıldığında bifenthrin'e hassasiyette önemli bir farklılık gözlenmezken 1995 yılında elde ettikleri yüksek LC_{50} değerleri bifenthrin'e direncin geliştiğini göstermiştir.

Herron and Rophail (2002), *T. urticae*'nin tebufenpyrad'a dirençli bir popülasyonunu seleksiyona maruz kalmaksızın 55 ay sonra test etmişler ve direnç oranının LC_{50} düzeyinde 63.29 kattan 2.41 kata gerilediğini bulmuşlardır. Fakat popülasyonun LC_{99} düzeyinde hala heterojen olduğunu ve direnç oranının 38.03 kata gerilediğini bildirmişlerdir.

Stumpf and Nauen (2002), *T. urticae*'nin Hollanda'dan NL-00, Kolombiya'dan COL-00 ve Brezilya'dan BR3-00 ırklarında abamectin direncinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu ırklarda abamectin'e karşı oluşan direncin P450-MO enzimlerinin önemli düzeyde artışı ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Abamectine dirençli NL-00 ve COL-00 ırklarında hassas ırk GSS'e göre MO aktivitesi birkaç kat daha yüksek bulunmuştur. Glutation *S*-transferaz (GST) aktivitesi, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ve monochlorobimane (glutationla konjugasyona girerek florosan bir ürün oluşturan yeni bir substrat) substratları ile ölçülmüştür. COL-00 ve NL-00 ırklarında CDNB substratı kullanılarak ölçülen GST aktivitesinde sırası ile 1.6- ve 2.0-katlık bir artış gözlenmiştir. NL-00 ırkına zıt olarak, Brezilya ırkında abamectin direncinin laboratuarda 6 ayın üzerinde stabil kalamadığını ve direncin zamanla azalmasının da GST ve MO aktivitesinde bir azalmaya sebep olduğunu belirtmişlerdir. *T. urticae*'de abamectin direncinde GST ve MO'nun yerini, MO inhibitörü PBO ve GST inhibitörü DEM ile yapılan sinerjizm çalışmaları ile de doğrulamışlardır.

Uesugi *et al.* (2002), *T. urticae*'de farklı kimyasal yapıya ve etki mekanizmasına sahip 2 yeni akarisit chlorfenapyr ve etoxazole'a direncin genetiğini çalışmışlardır. Direnç chlorfenapyr için hassasa göre 483 kat iken etoxazole için 100000 kattan fazla bulunmuştur. Her iki ırk arasında yaptıkları resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F_1 dölünde chlorfenapyr ve etoxazole'a direncin kalıtım şeklinin sırasıyla tam baskın ve tam çekinik olduklarını bulmuşlardır. F_2 dölünden elde edilen LC_{50} değerlerine göre de her iki akarisite direncin tek bir gen tarafından kontrol edildiğini bulmuşlardır.

Yang *et al.* (2002), *O. pratensis* ve *T. urticae'*de insektisitlere karşı hassasiyette gözlenen farklılıkları ve detoksifikasyon enzim aktivitesindeki değişiklikleri laboratuar ortamında incelemişlerdir. Her iki akar türüne ait 3 ırk, piretroit insektisitlerden bifenthrin ve lambda cyhalothrin ve bir organik fosforlu insektisitle (dimethoate) 10 kez seleksiyona tabii tutulmuştur. 10 seleksiyon sonra bifenthrin, lambda cyhalothrin ve dimethoate'e karşı hassasiyetin *O. pratensis*'te sırasıyla 4.5, 5.9 ve 289.2 kat azaldığı, *T. urticae*'de ise 14.8, 5.7 ve 104.7 kat azaldığı belirlenmiştir. Bifenthrin, lambda cyhalothrin ve dimethoate'e maruz kalmış *O. pratensis'*teki hassasiyet azalması, genel esteraz aktivitesinde sırasıyla 4.7, 3.0 ve 3.6 katlık artışla ilişkilendirilmiştir. *T. urticae* ırklarındaki hassasiyet azalması ise genel esteraz enzim aktivitesinde sırasıyla 1.3 ve 1.1 katlık artışla ilişkilendirilmiştir. Kullanılan insektisitlere karşı duyarlılıktaki azalma glutation S-transferaz enzim aktivitesi ile ilişkili bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar bu akarlarda esterazların, piretroitlere karşı direncin oluşmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Hardman *et al.* (2003), Nova Scotia ve Quebec (Kanada)'in elma bahçelerinden elde ettikleri bulgulara göre, *P. ulmi*'nin en baskın ve zararlı akar türü olduğunu ve bu alanlarda dicofol ve propargit'e direnç gösterdiğini bildirmişlerdir.

Herron *et al.* (2003) yeni bir akarisit ürününün *T. urticae* üzerindeki etkinliğini, standart bioassay metotları ile hassas ve dirençli referans ırklar kullanarak belirlemişlerdir. Deneysel ürün NN1 850.0 EW (Fenpyroximate ve propargite 3:10) her iki kimyasalın ayrı ayrı kullanımına göre *T. urticae*'ye önemli ölçüde daha toksik bulunmuştur.

Gelecekte *T. urticae* ile mücadelede deneysel ürün NN1 850.0 EW'nin ümit var olduğunu belirtmişlerdir.

Lin *et al.* (2003), methrin, abamectin, pyridaben, pyridaben ile abamectin karışımı (7.4:0.1) ve methrin ve abamectin karışımı (8.9:0.1) ile *T. cinnabarinus*'u devamlı olarak selekte etmişlerdir. 16 generasyon sonra direncin sırasıyla methrin, abamectin, pyridaben, pyridaben+abamectin ve methrin+abamectin'e 25.8, 3.7, 1.3, 4.0 ve 2.5 kat arttığını bildirmişlerdir.

Rauch and Nauen (2003), Kolombiya'da güllerden topladıkları *T. urticae* ırklarının hassasiyetini spirodiclofen'in 4mg litre^{-1} diagnostik konsantrasyonuyla izlemişlerdir. Italya'dan aldıkları *T. urticae*'nin bir tarla ırkını ise laboratuarda yapay olarak spirodiclofenle 21 ay boyunca 37 kez selekte etmiş fakat direnci çok yavaş düzeyde artırabilmişlerdir. Selekte edilen ırk sadece 13 katlık bir direnç göstermiştir. In vitroda detoksifikasyon enzimleri ile yaptıkları çalışmalar selekte edilen popülasyonda metabolik enzimlerin faaliyetinde bir artış olduğunu göstermiştir. Selekte ettikleri ırkta, selekte edilmeden kalan ilk hali ile karşılaştırıldığında karboksilesteraz aktivitesinde 1.2 katlık bir artış gözlemişlerdir. Substrat olarak CDNB kullanılarak ölçülen glutation S-transferaz enzim aktivitesinde ise 1.2 katlık bir artış gözlenmiş olup, 7-ethoxycoumarin ile ölçülen monooksijenaz aktivitesinde ise 2.1 katlık bir artış olduğunu belirlemişlerdir. İn vivoda *T. urticae* ile yapılan sinerjizm ve metabolizma çalışmaları da biyokimyasal çalışmaların sonuçlarını desteklemiştir. Parçalanma spirodiclofenle selekte edilmiş ırkta önemli düzeyde artmıştır.

Tapia-Perez *et al.* (2003), *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae)'un bir Meksika ırkı üzerinde yaptıkları çalışmada flumethrin direncininin birden fazla gen tarafından kontrol edildiğini ve uygulanan flumethrin konstrasyonuna bağlı olarak direncin çekinik veya baskın karakterde olduğunu ve ayrıca otozomal olduğunu bildirmişlerdir.

Gotoh *et al.* (2004), Japonya'da *Osmanthus* bitkisi ve turunçgillerden topladıkları iki *Panonychus* türü *P. osmanthi* ve *P. citri*'de 8 akarisite olan hassasiyet kayıplarını

incelediklerini, fenpyroximate'in *P. citri*'ye etkinliğinin Merkez ve Kuzeybatı Japonya'da Kuzey bölgelere nazaran çok düştüğünü, ayrıca diğer 7 preparatın da etkinliğinin azaldığını, ancak *P. osmanthi* için böyle bir bölgesel varyasyonun bulunmadığını bildirmektedirler.

Herron *et al.* (2004), Avustralya'da pamuk alanlarında chlorfenapyr'e *T. urticae*'nin tepkilerini 1997-1998 sezonunda izlemişlerdir. Direncin ilk kez 2001-2002 sezonunda ortaya çıktığını, direnç düzeyi ve dirençli ırkların oranının da kısa sürede arttığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak pamukta direnç yönetim stratejilerinde chlorfenapyr kullanımını değiştirerek her sezon yapılan 2 kez ilaçlamayı 1'e düşürmüşlerdir.

Kim *et al.* (2004), fenpyroximate'e direnç gösteren *T. urticae* popülasyonunun abamectin, acrinathrin, azocyclotin, benzoximate, bromopropylate, chlorfenapyr, dicofol, fenazaquin, fenbutatin oxide, fenpropathrin, milbemectin, propargite, pyridaben, tebufenpyrad ve bifenthrin gibi aktif maddelere çapraz direnç kazanımı ve direncin biyokimyasal mekanizmaları konusunda araştırma sonuçlarını vermektedirler.

Leeuwen *et al.* (2004), laboratuar koşullarında chlorfenapyr ile seleksiyona uğratılmış *T. urticae* popülasyonlarında çapraz dirençten kaynaklanan abamectin, amitraz, azocyclotin, bifenthrin, bifenazate, bromopropylate, clofentezine, dicofol, dimethoate, fenbutation oxide, flucycloxuron, hexythiazox, oxamyl, pyridaben ve spirodiclofen aktif maddelerine karşı hassasiyet kayıpları ve bu akarisit direncinin genetik mekanizması hakkında analiz sonuçlarını bildirmektedirler. Hassas ve selekte edilen iki ırk arasında yapılan resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F_1 dölünde chlorfenapyr'in sebep olduğu direncin kalıtım şeklinin eksik çekinik olduğu, F_2 dölünden elde edilen LC_{50} değerlerine göre de direncin birden fazla gen tarafından kontrol edildiğini bulmuşlardır. Esteraz, monooksijenaz ve glutation S-transferaz enzimlerinin inhibitörleri DEF, PBO ve DEM ile yapılan sinerjizm çalışmalarında da chlorfenapyr'e karşı oluşan dirençte esteraz enzimlerinin büyük bir role sahip olduğunu göstermişlerdir.

Sato *et al.* (2004), Sao Paulo (Brezilya)'nun çilek alanlarından toplanan *T. urticae*

popülasyonlarının fenpyroximate ile yapay laboratuar seleksiyonuna uğratıldığını, sonuçta LC_{50} ve LC_{95} oranlarının sırasıyla 2910 ve 2280 ppm'e ulaştığını bildirmektedirler. Ayrıca çapraz dirençle ilgili çalışmalarında da 8 farklı akarisit kullandıklarını ve fenpyroximate, pyridaben ve dimethoate arasında pozitif bir çapraz direncin varlığını saptadıklarını kaydetmektedirler. Son olarak, araştırmacılar, propargite, abamectin, milbemectin, fenpropathrin ve cyhexatin'e herhangi bir direncin görülmediğini ve fenpyroximate direncinin baskın bir genetik faktöre dayandığını, seleksiyon baskısının kaldırılmasına rağmen bir çok döl sonra bile direnç oranının azalmadığını eklemektedirler.

Young *et al.* (2004), *T. urticae*'nin gül seralarından topladıkları bir popülasyonunda etoxazole'e 3700 kat direnç bulmuşlardır. Bu popülasyonu 3 yıl etoxazole ile selekte ederek direnç oranını hassas ırka göre 5000000 kata çıkarmışlardır. Etoxazole direnci hiçbir akarisit uygulaması yapılmadan 16 ay bekletilerek stabilize edilmiştir. Etoxazole'e dirençli ırkın bazı akarisitlere kalıtımını ve çapraz direncini araştırmışlardır. Hassas (S) ve dirençli (R) ırklar arasında yaptıkları resiprokal çaprazlamalardan (R dişi x S erkek, S dişi x R erkek) elde edilen F_1 ve F_2 dölleri arasında konsantrasyon-ölüm oranı ilişkilerinde farklılıklar görmüşlerdir. Baskınlık derecesi F_1 döllerinde R dişi x S erkek olduğunda (RS) 0.98 olarak bulunurken, S dişi x R erkek olduğunda (SR) -0.97 olarak bulunmuştur. RS tipi çaprazlamada kalıtım tam baskın, SR tipi çaprazlamada ise direnç eksik çekinik olarak bulunmuştur.

Auger *et al.* (2005), *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae)'nin mancozeb'e dirençli bir tarla popülasyonunu laboratuarda mancozeb ile selekte etmişlerdir. 10 seleksiyon sonra LC_{50} düzeyinde direnç oranı standart hassas ırkla karşılaştırıldığında 73 kat daha yüksek bulunmuştur. Resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F_1 dölünde direncin oluşmasında dişi bireylerin herhangi bir katkısının olmadığını ve baskınlık derecesinin -0.1 olduğunu bulmuşlardır.

Humeres and Morse (2005), Kaliforniya ve San Diego'da avokado yetiştirilen alanlarda Persea akarı *Oligonychus perseae* Tuttle (Acari: Tetranychidae)'nın abamectin ve

milbemectin'e hassasiyet düzeylerini değerlendirmişlerdir. Milbemectin'e 5 akar ırkının hassasiyet oranlarının sırasıyla LC_{50} ve LC_{90} düzeyinde 2.1 ila 2.8 kat arasında olduğunu belirlemişlerdir. Abamectin'e yedi tarla ırkının hassasiyet oranları ise 2.1 ila 3.5 kat arasında değişiklik göstermiştir.

Leeuwen *et al.* (2005), *T. urticae*'nin tarladan topladıkları bir ırkını (MR-VL), hassas laboratuar ırkı (LS-VL) ile karşılaştırdıklarında bu ırkın bifenthrin, dicofol ve fenbutatin oxit'e yüksek derecede direnç gösterdiğini bulmuşlardır. MR-VL ırkının aynı zamanda günümüzde kullanılan pek çok akarisite de çapraz direnç gösterdiğini gözlemişlerdir. Bu ırk clofentezin'e 2631, dimethoate'a 250, chlorfenapyr'e 154, bromopropylate'e 25, amitraz'a 17, flucycloxuron'a 15 ve azocyclotin'e 7 kat çapraz direnç göstermiştir. MO ve esteraz aktivitesindeki artışın kısmen gözlenen direnç ve çapraz dirençten sorumlu olduğunu ifade etmişlerdir. 7-ethoxycoumarin (7-EC)'le MO aktivitesinin ölçümünü optimize ederek, yeni bir MO substratı olan 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin (7-EFC)'in 7-EC'ye çok iyi bir alternatif olduğunu ilk kez bu çalışmada belirlemişlerdir. MR-VL ırkında 7-EFC ve 7-EC substratları kullanıldığında MO aktivitesinde sırasıyla 3 ve 4 katlık bir artış gözlemişlerdir. Substrat olarak 4-nitrofenil asetat ve 1-naftil asetat kullanarak gerçekleştirdikleri kinetik esteraz aktivitesi ölçümleri MR-VL ırkında daha çok esteraz aktivitesi olduğunu göstermiştir. Bu çalışma *T. urticae*'de mevcut esterazların sınıflandırıldığı ilk çalışmadır. Native PAGE ile esteraz bantları ayırt edildikten sonra inhibitörlerin kullanımı ile asetil-, aril- ve karboksil-esterazlar bulunmuştur. Glutation *S*-transferaz enzimlerinin de dirençte herhangi bir role sahip olmadıklarını gözlemişlerdir.

Li *et al.* (2005), *B. microplus* (Acari: Ixodidae)'un Santa Luiza ırkında amitraz direncinin eksik çekinik olduğunu ve direnç özelliğinin de birden fazla gen tarafından kontrol edildiğini bildirmişlerdir.

Pree *et al.* (2005), *P. ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae)'nin hassas laboratuar ırkının yumurta ve ergin dişilerinde dört yeni akarisit, bifenazate, acequinocyl, spirodiclofen ve etoxazole'in hassasiyetini belirlemişlerdir. Ayrıca organik klorlu, organotin veya IGR

tipi akarisitlere dirençli popülasyonlarda, her akarisitin diagnostik konsantrasyonlarını test etmişlerdir. IGR tipi akarisitlerden clofentezine ve hexythiazox'a direnç kazanmış popülasyonlarda etoxazole'e 4 kat direnç gözlemişlerdir.

Kim *et al.* (2006), *T. urticae*'nin pyridaben'e dirençli bir tarla popülasyonunu pyridabenle 20 generasyon selekte etmişler ve selekte edilen bu dirençli ırka PR-20 adını vermişlerdir. 15 akarisite karşı PR-20 ırkının direncini ve çoklu direnç düzeylerini belirlemişlerdir. PR-20 ırkının pyridaben'e direnç oranı 240 olarak bulunmuştur. Bu ırk fenpyroximate'e 373 kat, acrinathrin'e 329 kat ve benzoximate'e 84 kat direnç göstermiştir. Abamectin, fenazaquin, fenbutatin oxide, fenpropathrin ve tebufenpyrad'a ise 10–40 kat arasında direnç göstermiştir. Buna karşı, azocyclotin, bromopropylate, chlorfenapyr, dicofol, milbemectin ve propargite'e ise göstermiş olduğu direnç oranları 10 kattan daha düşük bulunmuştur. Farklı metabolik inhibitörlerle yaptıkları sinerjizm çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında; kullanılan sitokrom P450 enzim inhibitörü PBO'nun pyridaben direncinde önemli rol oynadığı ve PBO kullanımının PR-20 ırkında pyridaben direncini önemli ölçüde düşürdüğünü belirlemişlerdir. Bu sonuçlar PBO kullanımının tarlada pyridaben direncinin yönetiminde faydalı olabileceğini göstermektedir.

Landeros *et al.* (2006), Meksika'da gül seralarından topladıkları bir *T. urticae* popülasyonunda avermectin, bifenthrin, dicofol, ve fenbutatin oxit'e karşı oluşan direnci ve direnç mekanizmalarını çalışmışlardır. Yaptıkları biyokimyasal çalışmalarda *T. urticae*'nin tarla ve laboratuar popülasyonlarında α- ve β- esteraz, oksidaz, glutation S-transferaz ve asetilkolinesteraz aktivitesini belirlemişlerdir. Bifenthrin, dicofol ve fenbutatin oxit'e karşı oluşan dirençte α- ve β- esteraz ve oksidaz enzimlerinin önemli rol oynadığını bulmuşlardır.

Leeuwen *et al.* (2006a), Avustralya ve Japonya'da chlorfenapyr'e direnç geliştiren *T. urticae*'de direncin biyokimyasal mekanizmalarını belirlemeye çalışmışlardır. Chlorfenapyr'e direnci esteraz aktivitesi ve P450 monooksijenaz aktivitesinin artışı ile ilişkili olarak bulmuşlardır. Bu enzimlerin aktivitelerini her iki ırkta resiprokal ve geri

çaprazlamalar yaparak da belirlemişlerdir. Her iki ırkın ve çaprazlarının esteraz izozimleri de isoelectric focusing (IEF) ile ayırt edilmiştir. Chlorfenapyr'e dirençli ırkta artan esteraz aktivitesinde 2 ayrı bant bulunmuştur (EST 11, pI = 4.88 ve EST 16, pI = 4.71). EST 11 bir karboksilesteraz olarak inhibitörlerle belirlenmiştir. Bu esteraz bantlarının varlığı ve yoğunluğunun farklı çaprazlamalarda değişiklik gösterdiğini ve chlorfenapyr'e direnci gösteren bir markör olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Glutation *S*-transferaz ve gluko-6-fosfat dehidrogenaz aktivitelerinin her iki ırk arasında önemli düzeyde farklılık göstermediğini belirtmişlerdir.

Leeuwen *et al.* (2006b), akarisitlere hassas bir *T. urticae* ırkı (LS-VL)'nı direncin oluşması için yapay olarak 36 generasyon bifenazate ile selekte etmişlerdir ve direnç oranını 4164 kata çıkarmışlardır. Metabolik direnç mekanizmalarını test etmek için in-vitro enzim çalışmaları ile birlikte sinerjistler kullanarak detoksifikasyon enzimlerini çalışmışlardır. Dirençli ırkta herhangi bir sinerjizm veya artan bir detoksifikasyon aktivitesi bulmamışlardır. Hassas LS-VL ırkı ile bifenazate'e dirençli BR-VL ırklarının haploid erkekleri ile diploid dişileri arasında yaptıkları resiprokal çaprazlamalarda bifenazate direncinin tamamen dişiden geldiğini ve direncin hassas erkekler dirençli dişilerle çaprazlandığında tam baskın olduğunu fakat dirençli erkekler hassas dişilerle çaprazlandığında ise tam çekinik olduğunu göstermişlerdir. Böyle bir kalıtım şekli daha önce yapılan hiçbir çalışmada gözlenmemiştir. Bu gözlem bifenazate için mitokondrial genom tarafından kodlanan başka bir hedef yerini akla getirmektedir.

Pottelberge *et al.* (2006), tarlada 3 METI akarisite maruz kalmış *T. urticae*'nin bir Belçika ırkını laboratuarda tebufenpyrad ile selekte etmişlerdir. Bu popülasyon seleksiyon sonrası tebufenpyrad, pyridaben, fenproximate ve fenazaquin'e hassas popülasyona göre oldukça yüksek direnç göstermiştir. Resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F_1 dölünde pyridaben direncinin eksik baskın olduğunu belirlemişlerdir. DEF, PBO ve DEM ile yaptıkları sinerjistik çalışmalarda pyridaben direncinde monooksijenaz enzimlerinin büyük öneme sahip olduğunu buna rağmen esteraz ve glutation S-transferaz enzimlerinin ise dirençte herhangi bir role sahip olmadığını bulmuşlardır.

Sato *et al.* (2006), Avcı akar *Amblyseius womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae)'nin methidathion'a dirençli ve hassas ırklarında sitokrom P450-MO aktivitesini incelemişlerdir. *A. womersleyi* (Kanaya ırkı)'nin organik fosforlulara dirençli bir ırkı kullanılarak methidathion'a hassasiyetini ölçmüşler ve direnç için laboratuar seleksiyonları yapmışlardır. MO enzim aktivitesi Kanaya ırkının selekte edilmiş dirençli ırkında (Kanaya R), selekte edilmemiş ırkına (Kanaya S) ve hassas ırka (Ishigaki S) oranla sırasıyla 3.60- ve 5.42- kat daha yüksek bulunmuştur. *A. womersleyi*'nin çalışmada kullanılan 16 popülasyonundan elde edilen LC_{50} (mg/l) değerleri ve monooksijenaz enzim aktivitesi arasında önemli düzeyde korrelasyon bulmuşlardır. Enzim aktivitesi *A. womersleyi*'nin farklı biyolojik dönemlerinde de değerlendirilmiştir (yumurta, larva, protonimf, deutonimf ve ergin). En düşük enzim aktivitesini methidathion'a en hassas dönem olan larva döneminde bulurlarken, protonimf, deutonimf ve ergin dönemlerinde en yüksek enzim aktivitesi bulmuşlardır.

Takeyama *et al.* (2006), her akar türünün citrus bitkileri üzerinde gelişemediğini fakat Turuçgil kırmızıörümceği *Panonychus citri (*Acarina: Tetranychidae*)*'nin Japon armutu gibi toksik olmayan konukçularında ve citrus türleri üzerinde gelişebilme yeteneğine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmadaki hipotez, citrus yapraklarında bulunan allelokimyasal maddelere karşı akarın bir detoksifikasyon sistemi geliştirerek citrus bitkilerine adapte olmasını içermektedir. Sitokrom P450'lerin iyi bilinen bir inhibitörü piperonil bütoksit (PBO)'i kullanarak citrus bitkileri üzerinde *P. citri*'nin hayatta kalması ile detoksifikasyon sistemi arasındaki ilişkileri incelemişlerdir. PBO'nun kritik konsantrasyonları tarafından detoksifikasyon enzimlerinin inhibisyonunun Japon armudunun yapraklarında beslenen *P. citri* performansını hiç etkilemediğini, turunçgil yapraklarında beslenen *P. citri*'nin ergin gelişmesini ise azalttığını belirlemişlerdir. Bu durum citrus bitkilerine adapte olmuş *P. citri*'nin, detoksifikasyon sistemlerinde sitokrom P450 enzimlerinin veya diğer detoksifikasyon enzimlerinin büyük role sahip olduğunu göstermektedir.

Leeuwen and Tirry (2007), *T. urticae*'nin tarladan topladıkları dirençli bir ırkının hassas laboratuar ırkı ile karşılaştırıldığında bifenthrin'e yüksek düzeyde direnç gösterdiğini belirlemişlerdir. Esteraz inhibitörü *S*,*S*,*S* tributyl- phosphorotrithioate (DEF)'in dirençli

ırkta bifenthrin toksisitesini oldukça önemli düzeyde sinerjize ettiğini bildirmişlerdir. Bifenthrin'in hassas ve dirençli ırklarda hidrolize olma aktivitesini in vitro inceleyerek gaz kromatografisi ile nicel olarak ölçmüşlerdir.

Piretroit direncinden sorumlu mekanizmalar olarak voltaj kapılı sodyum kanallarının yapısında meydana gelen bazı değişikliklerle ilgili az sayıda araştırma yapılmış olup bu araştırmalar arasında *T. urticae* henüz yer almamaktadır. Bu yüzden bu araştırma dünya ve Türkiye için de bir ilk olması sebebi ile oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalar daha çok böcekler üzerinde olup bu tez çalışması ile doğrudan ilgili yayınlar kronolojik sıraya göre aşağıda verilmiştir.

Doyle and Knipple (1991), sodyum kanallarında olası değişiklikleri inceleyebilmek için 4 takımdan 7 böcek türü ve bir Arachnid'den sodyum kanal genlerini izole ederek DNA sekans analizini yapmışlardır. Yapılan bu çalışmalarda *D. melanogaster* (Diptera: Drosophilidae)'in para-sodyum kanal geninin IS5-6 bölgesinden elde edilen amino asit dizilimi ile bu çalışmadan elde edilen aminoasit dizilimi karşılaştırılmış ve sadece serine ve threonine aminoasitlerinin yer değiştirdiği belirlenmiştir. Bu metodun, diğer böcek türlerinde de pek çok sodyum kanalı genlerinin karakterizasyonuna ışık tutacağını bildirmişlerdir.

Knipple *et al.* (1994), voltaj kapılı sodyum kanal geninde *kdr* mutasyonunu test etmek için *D. melanogaster*'in sodyum kanal genine homolog, ev sineğinin bir segmentine genomik DNA klonlamışlardır. Moleküler markerlar ile gerçekleştirilen genetik ilişki analizi, *kdr* özelliğinin DNA sekansında polimorfizme sebep olan voltaj kapılı sodyum kanal gen parçası ile çok sıkı ilişkide olduğunu göstermiştir. Çalışma sonuçları, *kdr* direncinin ana sebebi olarak voltaj kapılı sodyum kanal genini veya bu gendeki bir mutasyonu göstermektedir.

Jamroz *et al.* (1998), böceklerin sodyum kanallarında bulunan *kdr* ve *süper-kdr* mutasyonlarının piretroitlere karşı oluşan direncin temel sebebi olduğunu

belirtmişlerdir. Boynuz sineği *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae)'ta bu mutasyonları belirlemek için allele spesifik PCR yapılarak pek çok yabani ve laboratuar popülasyonlarında *kdr* ve *süper-kdr* mutasyonlarının allel sıklığını belirlemişlerdir. Benzer allel sıklığına sahip olan yabani popülasyonların direnç düzeyleri hassas popülasyona göre 3 ila 18 kat arasında değişirken, 17 kat dirence sahip bir laboratuar popülasyonunda *kdr* allel sıklığı, hemen hemen 18 kat dirence sahip yabani popülasyonun iki katı bulunmuştur. İki dirençli laboratuar popülasyonunda *süper-kdr* allel sıklığı yüksek oranda bulunmasına rağmen, *süper-kdr* allel sıklığının eş dirence sahip yabani popülasyonlarda daha az bulunduğunu belirtmişlerdir.

Liu *et al.* (2000), piretroit insektisitlere karşı *kdr* tipi direnç gösteren 5 *B. germanica* (Orthoptera: Blattidae) ırkında 2 yeni mutasyon belirlemişlerdir. Bu mutasyonlar; glutamic acid yerine lysine aminoasidinin gelmesiyle oluşan E434 mutasyonu ve cysteine yerine arginine aminoasidinin gelmesiyle oluşan C764 mutasyonlarıdır. Bu mutasyonları sodyum kanallarında I. ve II. domainleri birbirine bağlayan ilk hücrelerarası zincirde bulmuşlardır. Dirençli ırkların birinde de 2 ilave mutasyon daha belirlemişlerdir. Bu mutasyonlar sadece piretroit insektisitlere dirençli ırklarda bulunmuştur ve *B. germanica*'da piretroit insektisitlere karşı görülen *kdr* direncinin sebebini açıklamaktadır.

Liu *et al.* (2002), *kdr* veya *kdr*-tip direnç olarak bilinen piretroit direncinin para sodyum kanal genlerindeki nokta mutasyonlarla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Alman hamam böceğinin sodyum kanallarında bulunan 2 mutasyonun (E434K ve C764R) piretroit insektisit olan deltamehtrin'e sodyum kanal hassasiyetini azaltan L993F mutasyonunun etkisini artırdığını bildirmişlerdir. Fakat E434K ve C764R mutasyonlarının sodyum kanal hassasiyetini değiştirmediğini ortaya koymuşlardır. E434K ve C764R mutasyonlarının diğer böceklerde tanımlanan sodyum kanalları ile ilişkili mutasyonların etkisini artırıp artırmadığını belirlemek için, *H. virescens* (Lep: Noctuidae) sodyum kanal proteinindeki V421M mutasyonuna benzer pozisyonda hamam böceği sodyum kanal proteininde V409M mutasyonunu bulmuşlardır. Bu mutasyon deltamethrin'e kanal hassasiyetini 10 kat azaltmıştır. V409M mutasyonunun E434K veya C764K mutasyonu ile birlikte bulunduğunda deltamethrin'e kanal hassasiyetinde azalma

meydana getirmediğini fakat üç mutasyon (V409M, E434K ve C764R) bir arada bulunduğunda kanal hassasiyetinin 100 kat azaldığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar E434K ve C764R mutasyonlarının piretroit insektisitlere sodyum kanal hassasiyetini azaltan önemli mutasyonlar olduğunu göstermektedir.

Morin *et al.* (2002), *Bemisia tabac*i (Hom: Aleyrodidae)'de piretroitlere karşı oluşan *süper-kdr* direncinin sodyum kanalı proteininin II. molekülünün 4. ve 5. membran segmentleri arasındaki bağlayıcı fragmentte meydana gelen nokta mutasyonlardan dolayı oluştuğunu bildirmişlerdir. Sodyum kanalı geninde birbirinden bağımsız 2 mutasyon belirlemişlerdir. Bunlar; 918. pozisyonda methionin aminoasidinin yerine valine aminoasidinin gelmesi ile oluşan M918V mutasyonu ve 925. pozisyonda leucine aminoasidinin yerine izoleucine aminoasidinin gelmesi ile oluşan L925I mutasyonlarıdır. Dirençli *B. tabac*i ırklarında hassas ırklar ile karşılaştırıldığında 100 kat dirence sebep olan bu mutasyonlar *B. tabac*i total RNA'sının RT-PCR yapılarak çoğaltılması sonucu belirlenmiştir.

Tan *et al.* (2002), Alman hamam böceği'nin piretroitlere dirençli popülasyonlarında 3 adet sodyum kanal mutasyonu (E434K, C764R, L993F) tanımlamışlardır. Yaptıkları çalışmada, L993F mutasyonunun piretroitlerden deltamehtrin'e karşı sodyum kanal hassasiyetini azalttığını belirlemişlerdir. Buna rağmen, E434K ve C764R mutasyonları tek başına olduğunda deltamethrin'e kanal hassasiyetini azaltmadığını fakat E434K veya C764R mutasyonu L993F mutasyonu ile birleştiğinde deltamethrin hassasiyetinin 100 kat azaldığını, 3 mutasyon bir arada bulunduğunda ise deltamehtrin'e hassasiyetin 500 kat azaldığını bildirmişlerdir. Bunun yanında mutasyonların hiçbirinin kanal fonksiyonunu önemli ölçüde değiştirmediği de belirlenmiştir.

Wang *et al.* (2002), *Varroa destructor* (Acari: Varroidae)'da piretroit insektisit Apistan'a (tau-fluvalineate) karşı oluşan direncin moleküler mekanizmalarını araştırmak için hassas ve dirençli popülasyonlardan bir para-homolog sodyum kanal geni (VmNa)'ni 2. domainin 3. segmentinden (IIS3) 4. domainin 6. segmentine (IVS6) kadar klonlayarak sekansını yapmışlardır. Sekans analiz sonuçları Florida ve Michigan

popülasyonlarında fluvalineate direnci ile ilişkili olarak 4 amino asit değişikliği olduğunu ortaya koymuştur. Bu mutasyonlar, IIIS6'da F758L mutasyonu, domain 3 ve 4'ü birbirine bağlayan fragmentte görülen L826P mutasyonu, IVS5'de görülen 1982V mutasyonu ve IVS6'da görülen M10551 mutasyonlarıdır. Fakat ilginç olarak böceklerde daha önce tanımlanan *kdr* veya *süper-kdr* mutasyonları dirençli akarlarda gözlenmemiştir.

Soderlund and Knipple (2003), piretroitlere dirençli *H. virescens* popülasyonlarında leucine aminoasidinin yerine histidine aminoasidinin geçmesi ile 1014. pozisyonda görülen L1014H mutasyonuna ek olarak piretroit direnci ile ilişkili 3 mutasyon daha bulmuşlardır. Bunlar V410M, D1549V ve E1553G mutasyonlarıdır.

Tomita *et al.* (2003), Baş biti *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Phthiraptera) (De Geer)'te piretroit insektisitlere direncin temel mekanizmasının duyarsız sodyum kanalları olduğunu belirleyebilmek için insektisitlere hassas vücut biti *P. humanus humanus* (L.),'un bir ırkından para ortolog sodyum kanal geninin kısmi gen sekansını yapmışlardır.

Tsukahara *et al.* (2003), para-sodyum kanal geninin IIS4–IIS6 bölgesinin pek çok böcekte piretroit direncinde sinir duyarsızlığında önemli bir yere sahip olduğunu belirtmişlerdir. Lahana yaprak güvesi *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lep: Plutellidae)'da piretroitlere direnci belirlemek için bu bölgedeki amino asit dizilimini piretroitlere dirençli (R) ve hassas (NS) ırklarda karşılaştırmışlardır. R ırkında sırasıyla IIS5 ve IIS6 bölgelerinde isoleucine yerine threonine ve phenylalanine yerine leucine aminoasitlerinin gelmesi ile oluşmuş 2 mutasyon belirlemişlerdir. Araştırıcılar, IIS4–IIS6 domaininde görülen bu 2 mutasyonun Lahana yaprak güvesi'nde görülen piretroit direnci ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Bass *et al.* (2004), piretroit insektisitlere karşı oluşan *kdr* direncinin, piretroitlerin esas hedef yeri olan sinir membranlarındaki para tipi sodyum kanalında meydana gelen

mutasyonlar olduğunu ifade etmişlerdir. Bu mutasyonların da çoğunlukla sodyum kanal proteininin II. domaininde (S4-S6) olduğunu belirtmişlerdir. Kedi piresi *Ctenocephalides felis* (Bouche) (Siphonaptera: Pulicidae)'te bu mekanizmanın varlığını araştırmak için 7 laboratuvar ırkından para sodyum kanal geninin IIS4–IIS6 bölgesini klonlayarak sekansını yapmışlardır. Sekanstan elde ettikleri sonuçlar piretroit direncinde daha önce de görülen 2 amino asitte görülen yer değiştirme şeklindedir. Biri genel *kdr* mutasyonu olup daha önce de pek çok böcekte belirtildiği gibi leucine amino asidinin yerine phenylalanine amino asidinin gelmesi ile oluşan ve ev sineklerinde 1014. pozisyonda görülen L1014F mutasyonuna eş değer mutasyondur. Diğerinin ise threonine amino asidinin yerine valine amino asidinin gelmesi ile oluşan ve ilk kez Lahana Yaprak Güvesinde T929I olarak tanımlanan mutasyonun yeni bir varyantı olan T929V mutasyonu olduğunu belirtmişlerdir.

Anstead *et al.* (2005), Şeftali yaprak biti *M. persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae)'nin *kdr* olarak adlandırılan sinir sistemindeki duyarlılığı azaltan bir mekanizma ile piretroit insektisitlere direnç geliştirdiğini bildirmişlerdir. Duyarlılıktaki bu azalmaya para tip sodyum kanalında görülen 2 mutasyonun (L1014F (*kdr*) ve M918T (*süper-kdr*) sebep olduğunu bulmuşlardır.

Alon *et al.* (2006), *B. tabaci*'nin en fazla zarar meydana getiren B ve Q biyotiplerinde piretroitlere yüksek düzeyde direnç bulmuşlardır. B biyotipinde bu direnç para tipi sodyum kanalında L925I mutasyonu ile ilişkili olarak bulunmuştur. Yaptıkları çalışmada Q biyotipinin para tipi sodyum kanalında piretroitlere dirençle ilişkili 2 mutasyon bulunmuştur. Bunlar B biyotipinde bulunan L925I mutasyonu ile 929. pozisyonda meydana gelen T929V mutasyonudur.

Liu *et al.* (2006), Bal arısı akarı *V. destructor*'un sodyum kanal geninde piretroit insektisit, fluvalineate'e dirençle ilişkili 4 mutasyon belirlemişlerdir. Bu mutasyonlardan birinin sodyum kanalının 3. ve 4. domainlerini birbirine bağlayan fragmentte 1770. pozisyonda proline (P) amino asiti yerine leucine (L) amino asitinin gelmesi ile ortaya çıkan bir mutasyon olduğunu belirlemişlerdir.

Roditakis *et al.* (2006), Girit'ten izole ettikleri olan *B. tabaci* (GRMAL-RP)'nin oldukça dirençli bir Q biyotipinde α-cypermethrin'e karşı görülen direnci araştırmak için GRMAL-RP ırkının para sodyum kanal geninin IIS4–IIS6 bölgesinin sekansını yapmışlar ve bunu hassas SUD-S ırkı ile karşılaştırdıklarında 2 aminoasitin yer değiştirdiğini bulmuşlardır. Biri 925. pozisyonda (L925I) izoleucine yerine gelen leucine aminoasiti (daha önce *B. tabaci*'de piretroit direncinde belirtilmiştir) diğeri de, *B. tabaci*'de bulunan yeni bir *kdr* direncidir. Bu mutasyon valine yerine threonine aminoasidinin gelmesi ile 929. pozisyonda oluşan T929V mutasyonudur.

Davies *et al.* (2007), ergin *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) sivrisineklerinin voltaj kapılı sodyum kanalı (VGSC) α-alt ünitesinden cDNA'nın tamamının sekansını yapmışlardır.

Ülkemizde tarımsal zararlılara karşı oluşan direnç ve direncin mekanizmaları ile ilgili çalışma sayısı son derece sınırlı olup daha çok insektisitlere karşı hassasiyet kayıplarının belirlenmesine yönelik çalışmalardır.

Türkiye'de insektisit ve akarisitlere direnç ile ilgili çalışmalar 1960'lı yıllarda başlamıştır. Direnç üzerine ilk yayınlar yurtdışındaki durumları rapor eden derlemeler şeklinde olmuştur (Düzgüneş 1953, Alkan 1960). Öden vd. (1971)'nin Bambul *(Anisoplia austriaca* Hbst.)'un insektisitlere direnci konusunda yaptıkları çalışmayı Temizer (1972)'in Süne (*Eurygaster integriceps* Put.), Öden vd. (1972)'nin Kımıl (*Aelia rostrata* Boh.), Öden vd. (1975)'nin Fındık kurdu (*Curculio nucum* L.), Atak ve Atak (1977)'ın Patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say), Ural vd. (1986)'nin, *C. nucum,* Dörtbudak vd. (1987)'nin *Sitophilus granarius* (L), Dindar ve Yılmaz (1989) *C. nucum*, Dindar ve Yılmaz (1990)'ın *L. decemlineata,* Dindar ve Kılınçer (1992)'in ülkemizde ilk defa biyoassay yöntemlerinin yanında biyokimyasal yöntemleri de çalıştığı *Ceratitis capitata*'da malathion'a direnç çalışması, Ünal vd. (1994)'nin Kımıl (*Aelia rostrata*), Erdoğan ve Gürkan (1997) ve Ünal ve Uğurlu (1998)'nun *L. decemlineata*, Velioğlu (1999)'nun *Myzus persicae*, Uğurlu and Gürkan (2007)'ın *Helicoverpa armigera* ve Erdoğan *et al.* (2008)'un *B. tabaci*'de duyarlılık azalışı

üzerine yaptığı çalışmalar takip etmiştir.

Tarımsal zararlı kırmızı örümceklerin akarisitlere direnci konusunda ülkemizde çok az çalışma yapılmış olup, birçoğu son yıllarda gerçekleştirilmiştir. Bunlar aşağıda kronolojik sıraya göre verilmiştir:

Ecevit (1977), iki zararlı akar *T. urticae, P. ulmi* ve iki predatör akar *Neoseiulus fallacis* ve *A. fleschneri* üzerine yapmış olduğu direnç çalışmasında probit analizinin değiştirilmiş şeklini uyguladığını bildirmektedir.

Önçağ (1981), Ege bölgesinde çeşitli kültür bitkilerinde zararlı *T. urticae*'nin savaşımında çokça kullanılan ilaçlara karşı popülasyondaki direnç seviyelerini belirlediğini kaydetmektedir.

Erkam ve Gürkan (1983)'ın Yalova ve çevresinde meyve ağaçlarında bulunan *P. ulmi*'nin dicofol ve chlorobenzilate gibi akarisitlere olan direnç düzeylerini saptadıklarını bildirmektedirler. Araştırmacıların daldırma metoduna göre buldukları sonuçlara göre bu iki preparata hiçbir *P. ulmi* popülasyonda hassasiyet kaybı olmadığını belirtmektedirler.

Dağlı and Tunç (2001), Antalya'dan toplanan *T. cinnabarinus* popülasyonlarının dicofol'a yüksek direnç gösterdiğini, özellikle seralardan toplanan popülasyonların pamuktan toplananlara göre daha dirençli olduğunu kaydetmektedirler. Araştırmacılar, 16 döl boyunca dicofol ile seleksiyona uğratılan *T. cinnabarinus* popülasyonlarının dirençlerinin LC_{50}'ye göre 19.7 ve 100.7 kez arttığını eklemektedirler.

Kasap (2001), son yıllarda turunçgil üretim alanlarında sorun olmaya başlayan *P. citri*'nin iki farklı ırkının ergin dişileri üzerine, turunçgil alanlarında zararlılara karşı üreticilerce yoğun olarak kullanılan bazı tarımsal savaş ilaçlarının etkisini daldırma yöntemi ile belirlemiştir. İlaç uygulamasından 1, 24, 48 ve 72 saat sonra yaptığı

gözlemlerde tebufenpyrad, hexaflumoron, fluvalineate, methidathion, chlorpyrifos-ethyl, carbosulfan, bromopropylate, dicofol ve fenbutatin-oxit etkili maddeli ilaçların, Turunçgil kırmızıörümceğinin iki farklı ırkı üzerinde etkisinin birbirinden farklı olduğunu belirterek, bromopropylate ve dicofol etkili maddeli ilaçlara karşı, Turunçgil kırmızıörümceğinin ilaç kullanılmayan alanlardan toplanan I. ırkının, sürekli ilaçlama yapılan alanlardan toplanan II. ırkına göre daha hassas olduğunu kaydetmektedir.

Akgünlü (2005), Adana, Isparta, Diyarbakır, Mardin ve Urfa'dan farklı kültür bitkileri üzerinden topladığı 11 farklı *T. urticae* popülasyonlarının sentetik piretroitlerden bifenthrin, fenpropathrin ve lambda cyhalothrin'e karşı meydana getirdiği direnci incelemiştir. Standart hassas (GSS) popülasyon ile karşılaştırıldığında direnç oranlarının dağılımını LC_{50} değerlerine göre sırasıyla bifenthrin, fenpropathrin ve lambda cyhalothrin için 1.396-7.957, 1.055-8.698 ve 2.293-48.952 kat aralıklarında bulmuştur.

Ay (2005), Antalya ve Isparta illeri sebze seralarından toplanan *T. urticae* popülasyonlarının chlorpyrifos'a karşı hassasiyet düzeylerini petri-kabı bioassay metodu ile belirlemiştir. *T. urticae*'nin sera popülasyonlarının direnç oranları hassas popülasyon GSS'e göre 8'den 1774 kata kadar farklılık göstermiştir. Antalya bölgesinden topladığı tüm *T. urticae* popülasyonlarında chlorpyrifos'a oldukça yüksek direnç bulmuştur.

Ay *et al.* (2005a), *T. urticae*'nin propargite (Omite) 570 g l^{-1}, amitraz (Kortraz) 200 g l^{-1} ve abamectin (Agrimec) 18 g l^{-1}'e karşı hassasiyetlerini yaprak daldırma yöntemi ile test etmişlerdir. Isparta'da sebze seralarından beş farklı *T. urticae* popülasyonu toplanmış ve bu akarisitlere tepkileri hassas referans ırk ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Direnç oranları LC_{50} değerlerine göre propargite için <1.00'den 2.5'a, amitraz için 1.2'den 2.1'e, abamectin için de <1.0'den 2.9 kata kadar farklılık göstermiştir. Çalışma sonucunda, kullanılan popülasyonların bu ilaçlara karşı önemli düzeyde bir hassasiyet kaybı göstermediklerini belirtmişlerdir.

Ay *et al.* (2005b) Antalya ve Isparta illerinden 10 farklı *T. urticae* popülasyonunun esteraz enzimlerindeki genetik varyasyonları poliakrilamit jel elektroforezi kullanarak belirlemişlerdir. Tüm popülasyonlar heterojen esteraz bant dizilişleri göstermiştir. Antalya ve civarından toplanan popülasyonlarda hem popülasyonlar arası hatta aynı popülasyon içinde esteraz bantlarının dizilişi bakımından farklılık görüldüğünü belirtmişlerdir.

Ay and Gürkan (2005), *T. urticae*'nin Adana, Antalya, Izmir, Manisa ve Urfa'dan topladıkları dokuz farklı ırkının bifenthrine karşı hassasiyetini bioassay ve biyokimyasal yöntemlerle belirlemişlerdir. Irkların direnç oranları LC_{50}'de < 1'den 669 kata kadar çeşitlilik göstermiştir. Çalışılan tarla ırklarının sadece üç tanesi (Adana'dan iki ve Urfa'dan biri), bifenthrin'e dirençli bulunmuştur. Bu ırklarda esteraz enzim aktivitesi ve bifenthrin direnci arasında poliakrilamit jel elektroforezi ve kinetik enzim aktivitesi ölçümlerine göre bir korrelasyon bulmuşlardır.

Ay (2006), *T. urticae*'nin propargite (Omite) 570 g/l, abamectin (Agrimec) 18 g/l ve amitraz (Kortraz) 200 g/l'a karşı duyarlılıklarını belirlemiştir. Antalya'da farklı sebze üretim seralarından toplanan *T. urticae* popülasyonlarının bu akarisitlere karşı duyarlılıklarını ilaçlama kulesi-petri kabı yöntemi ile saptamıştır ve standart hassas popülasyon (GSS) ile karşılaştırmıştır. Standart hassas popülasyon (GSS) ile karşılaştırarak bulduğu direnç oranlarının dağılımı LC_{50}'ye göre propargite, abamectin ve amitraz için sırasıyla <1.0 - 2.55, 1.07 - 1.82 ve 1.15 - 34.09 kat düzeylerinde olmuştur.

Kumral and Kovancı (2007), Bursa bölgesi elma bahçelerinde Avrupa kırmızı örümceği *P. ulmi*' nin ergin dişilerinin akarisitlerden dicofol, bromopropylate ve fenpyroximate'e ve akarisit-insektisitlerden amitraza hassasiyet düzeylerini petri yaprak disk-ilaçlama kulesi metodu ile belirlemişlerdir. Hassas popülasyonla karşılaştırıldığında direnç oranları amitraz, dicofol, bromopropylate ve fenpyroximate için sırasıyla LC_{50} değerlerine göre 2.2'den 11.9'a, 0.8'den 3.6'ya, 1.0'dan 22.5'a ve 0.9'dan 7.9 kata

kadar değişiklik göstermiştir. Test edilen bileşiklere *P. ulmi* hassasiyeti bölgeden bölgeye geniş ölçüde farklı bulunmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmanın ana materyalini Antalya'nın Gazipaşa ilçesi Beyobası köyü domates serasından toplanmış İki noktalı kırmızıörümcek popülasyonu (BEYDOM) ile standart hassas popülasyon olan German Susceptible Strain (GSS) ve tarım ilaçlarından sentetik piretroitli akarisit-insektisit olan bifenthrin ve lambda-cyhalothrin oluşturmuştur.

Biyoassay çalışmalarında ilaçlama kulesi (spray tower) (Burkards Co. Ltd.), stereomikroskop, 9 cm çaplı plastik petriler, parafilm, ince (0 numara) uçlu fırça, 1, 5, 10 ml' lik pipetler, 50 ve 100 ml'lik cam şişeler, 50 ve 100 ml'lik ölçü silindirleri, ilaç konsantrasyonlarını hazırlamak için saf su ve her deneme sonrası ilaçlama kulesini temizlemek için kimyasal olarak da aseton (Merck) kullanılmıştır.

Biyokimyasal çalışmalarda ise, ependorfa uyan ezici çubuklar, tek ve çok kanallı mikropipetler, soğutmalı santrifüj, whatman 1 nolu kağıt, manyetik karıştırıcı, 96 kuyulu ve düz tabanlı mikroplate'ler, UV spektrofotometre, soğutmalı vertikal elektroforez sistemi (Biorad), vortex, -20 ve -80 $^{\circ}$C'lik derin dondurucu, Biorad marka elektroforez seti (Pharmasia GE–2/4), hassas terazi (Sartorius), dijital fotoğraf makinesi kullanılmıştır. Kimyasal malzeme olarak α-naphtil acetate, fast blue RR, tris HCL, GSH, CDNB, KCL, EDTA, PNOD, ECOD, sükroz, temed, akrilamit, N, N'-metilen bis akrilamit, amonyumpersülfat, bromocresolpurple, tris base, triton X-100, glycine, riboflavin, n-butanol ve asetik asit kullanılmıştır.

Moleküler çalışmalarda DNA ekstraksiyonu ve elde edilen DNA'nın görüntülenmesi için; steril ependorf tüpler, sıcak tabla, soğutmalı santrifüj, mikrodalga fırın ve yatay elektroforez sistemi (Biorad) kullanılmıştır. Bu çalışmalarda kimyasal malzeme olarak: CTAB buffer (pH:8), 2- mercaptoethanol, 24:1 oranında chloroform-isoamilalcohol, soğuk isopropanol, % 70'lik ethanol, steril saf su, agarose, 50 x TAE buffer, DNA loading buffer, DNA ladder ve EtBr kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu için;

Bio-Rad marka Thermocyclier, PCR tüpleri, steril distile su, DNA, primerler, dNTP, 10X Buffer ve Taq Polimeraz kullanılmıştır.

3.1.1 İki noktalı kırmızıörümcek *(Tetranychus urticae* Koch) popülasyonları

Denemelerde seleksiyona tabii tutulan *T. urticae* popülasyonu (BEYDOM) 2003 yılında, ülkemizde yoğun ilaçlama yapılan Antalya ilinin Gazipaşa ilçesi Beyobası köyü domates serasından toplanmıştır. Kontrol amaçlı kullanılmak üzere İngiltere'den standart hassas *T. urticae* popülasyonu (GSS) getirtilmiştir. Bu popülasyon 1965 yılından itibaren Rothamsted Experimental Station laboratuvarında yetiştirilmektedir.

Domates serasından *T. urticae* ile bulaşık olan yapraklar toplanarak kese kâğıtlarına konmuş, buz kutularında A.Ü. Ziraat Fakültesi'ne getirilmiş ve iklim odasında temiz fasulye bitkileri üzerinde kültüre alınmıştır (Şekil 3.1). *T. urticae*'nin ilaçlarla selekte edilmiş popülasyonlarının birbirine bulaşmasını önlemek amacıyla her bir döl için ayrı kafesler kullanılmıştır (Şekil 3.2). Bu kafeslerin içerisine fasulye saksıları konulmuş ve üzerlerine *T. urticae* popülasyonları bulaştırılmıştır (Şekil 3.2). Kültürler 26±2 ^{o}C sıcaklık, %50–60 orantılı nem ve 16 saat aydınlık-8 saat karanlık koşullarının sağlandığı iklim odalarında yetiştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.1 *Tetranychus urticae* popülasyonlarının üzerinde yetiştirildiği fasulye bitkileri



Şekil 3.2 *Tetranychus urticae* popülasyonlarının yetiştirildiği kafes sistemleri

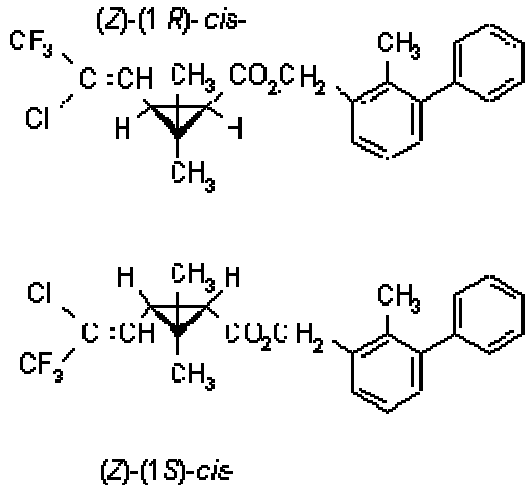


Şekil 3.3 Kafes sistemlerinin iklim odası içerisindeki görüntüsü

3.1.2 Kullanılan ilaçlar

Denemelerde sentetik piretroitli insektisit-akarisitlerden lambda cyhalothrin ve bifenthrin tercih edilmiştir. Seçilen piretroitlere ilişkin özellikler aşağıda verilmiştir.

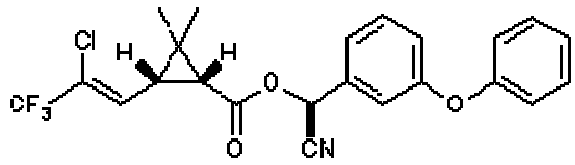
Bifenthrin



(Z)-(1 S)-cis-

Kimyasal ismi, (2-methyl-1, 1-biphenyl-3-y1)-methyl-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoro-1-propenyl)-2,2-dimethyl cyclopropanecarboxylate olan bifenthrin, geniş spektrumlu bir insektisit-akarisittir. Kapalı formülü $C_{23}H_{22}ClF_3O_2$ olup, renksiz ve katı haldedir. Böceklerde sinir sistemi veya kaslar üzerinde etkili olup bu hücrelerde potasyum ve sodyum hareketini bloke ederek etkisini göstermektedir (O'brien 1971). Ülkemizde 1988 yılında tütün beyaz sineği (*B. tabaci* (Gennadius)), pamukta kırmızı örümcekler (*T. cinnabarinus* Boisd., *T. urticae* Koch), yaprak piresi (*Empoasca decipiens* (Paoli)) ve pamukta yeşil kurt (*H. armigera* Hubner)'a ruhsat almıştır. Talstar EC 100 ticari ismiyle ülkemizde satışa sunulmaktadır (Anonim 2002a).

Lambda-cyhalothrin



Kimyasal ismi, [1α (S),α (Z)]-(±)- cyano (3- phenoxyphenyl) methyl 3-(2-chloro-3,3,3-trifluoro-1- propenyl)-2,2-dimethyl cyclopropanecarboxylate olan lambda cyhalothrin, geniş spektrumlu bir insektisit-akarisittir. Kapalı formülü $C_{23}H_{19}ClF_3NO$ olup, renksiz ve katı haldedir. Kontakt ve mide etkili, sistemik olmayan bir insektisittir. Repellent etkiye sahiptir (Anonymous 2000). Bu etkili madde *T. urticae'* ye karşı ruhsatlı değildir. Fakat yaprak bitleri, thrips, Lepidoptera ve Coleoptera larvalarına karşı çok yaygın kullanılan bir insektisittir (Toros vd. 2001). Ülkemizde 1988 yılında ruhsat almıştır. Ülkemizde ruhsatlı olan sıvı formülasyonları: Karate5 EC, Karate 2.5 EC, Kung-Fu 5 EC, Tekvando 5 EC, Gradal 5 EC, Tactic 5 EC, Maestro 5 EC, Tomcat, Sumosa 5 EC, Tornado 5 EC, suda dağılabilen granül formülasyonları: Ecco 5 WG, Karate max, mikrokapsül süspansiyon formülasyonu: Karate zeon'dur (Anonim 2002a). Denemelerde Maestro 5 EC kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

Denemeler, LC_{50} ve LC_{90} değerlerinin belirlendiği biyoassay ve seleksiyon çalışmaları, metabolik dirençle ilişkili üç detoksifikasyon enzim grubuna ait biyokimyasal ve sinerjistik çalışmalar, direncin kalıtım şeklini belirlemek için yapılan resiprokal çaprazlamalar ve sodyum kanallarıyla ilişkili moleküler çalışmalar olmak üzere 4 ayrı bölümde yürütülmüştür.

3.2.1 Biyoassay ve seleksiyon çalışmaları

Biyoassay çalışmaları öncelikle hassas *T. urticae* popülasyonu üzerine Campos *et al.* (1997), Kabir and Chapman (1997) ve Ay (2005)'dan alınan petri kabı yöntemi kullanılarak lambda cyhalothrin ve bifenthrin'in uygulanması şeklinde başlamıştır. Denemelerde en az 1 kontrol 6 farklı ilaç konsantrasyonu kullanılmıştır. Denemeler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. İlaç konsantrasyonları hazırlandıktan sonra ilaçlama kulesinde 9 cm çapındaki plastik petrilerin alt ve üst kapağına 2 ml olmak üzere toplam 4 ml ilaçlı sıvı püskürtülmüştür (Şekil 3.4). Uygulama yapılan petriler yaklaşık 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Petrilerin her birine bir fırça yardımıyla 25 ila 30 adet ergin dişi birey bırakılmış ve kapağı kapatıldıktan sonra etrafı parafilmle sıkıca sarılmış ve koşulları daha önce anlatılan iklim odasına konulmuştur. Hassas popülasyonun LC_{50} ve LC_{90} değerleri ve bu değerlerin güven aralıkları probit analizi ile bulunmuştur. BEYDOM popülasyonu üzerine seleksiyon baskısı oluşturabilmek için hassas popülasyonun % 90'ını öldüren doz seleksiyon baskısı oluşturmak için seçilmiştir.



Şekil 3.4 Petri kabı yönteminde kullanılan ilaçlama kulesi

Seleksiyon çalışmalarında Antalya'nın Gazipaşa ilçesinin Beyobası köyü domates serasından toplanan BEYDOM popülasyonu kullanılmıştır. Öncelikle BEYDOM popülasyonu, 20 erkek ve 20 dişi birey alınarak çoğaltılmıştır. Bu popülasyon üzerinde seleksiyon baskısının oluşması için lambda cyhalothrin ve bifenthrin ayrı ayrı uygulanarak popülasyonun LC_{50} ve LC_{90} değerleri elde edilmiştir. Hassas popülasyonun % 90'ını öldüren doz bu popülasyona uygulanarak 24 saat sonra ölmeyen bireyler toplanıp temiz fasulye bitkileri üzerine bulaştırılmıştır. Bu popülasyon çoğaldıktan sonra, ilaçlama kulesinde en az 6 farklı dozda ilaç konsantrasyonu uygulanarak LC_{50} ve LC_{90} değerleri elde edilmiştir. Selekte edilen her popülasyona hassas popülasyonun % 90'ını öldüren doz bu şekilde uygulanarak canlı kalan bireyler tekrar çoğaltılmış ve 8 kez seleksiyon yapılmıştır. Denemeler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş, her bir doz için yaklaşık 90 birey kullanılmıştır. Deneme sonuçları 24 saat sonra alınarak, bireylerin ölüm oranları değerlendirilmiş ve selekte edilen her popülasyona ait LC_{50} ve LC_{90} değerleri belirlenmiştir (Leeuwen *et al.* 2004).

3.2.1.1 İnsektisit dozlarının hazırlanması

İlaç formülasyonları saf su ile seyreltilerek 1000 ppm'lik stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Bu şekilde her deneme öncesi taze olarak hazırlanan stok solüsyondan yapılan tüm seyreltmelerde ve kontrolde de saf su kullanılmıştır. Hazırlanan dozlar ilaçlara ve popülasyonların duyarlılık düzeylerine göre değişmiştir.

3.2.1.2 İstatistiksel değerlendirme

Denemelerden 24 saat sonra elde edilen ölü-canlı sayımları kullanılarak POLO-PLUS paket programı ile probit analizi yapılmış (LeOra Software 1987) ve Letal Konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Daha sonra dozların logaritmaları alınarak % ölüm değerleri ile birlikte Windows Excel bilgisayar programı ile regresyon doğruları çizilmiştir. Selekte edilen her bir popülasyon için belirlenen LC_{50} ve LC_{90} değerlerinin, hassas popülasyon için belirlenen LC_{50} ve LC_{90} değerlerine oranlanması ile her seleksiyon popülasyonu için direnç oranları belirlenmiştir.

3.2.2 Biyokimyasal çalışmalar

Biyokimyasal çalışmalarda *T. urticae*'de insektisitlere karşı direnç oluşumunda önemli rolleri olan detoksifikasyon enzimlerinden toplam karboksilesteraz, glutation S-transferaz ve sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri incelenmiştir. Ayrıca toplam karboksilesteraz enzimindeki farklı izozimlerin aktiviteleri elektroforetik yöntemlerle de incelenmiştir.

3.2.2.1 Toplam protein miktarının ölçümü

Örneklerin toplam protein miktarlarının belirlenmesinde Bradford (1976)'un total protein tayin yöntemi kullanılmış ve Bovine Serum Albumine (BSA) standart olarak alınmıştır. 1 mg/mL oranında BSA'lı buffer hazırlanarak 2'şer µl aralıklarla 0-14 µl arasındaki konsantrasyonlar elisa plate'e yüklenmiştir. Örneklere ait homojenattan 5 µl plate'e yükleme yapılarak BSA'lı buffer'dan hazırlanan konsantrasyonlar üzerine ve örnekler üzerine 250'şer µl bradford solüsyonu ilave edilmiş ve plate 20 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklerdeki protein miktarı spektrofotometrik olarak 620 nm'de ölçülmüştür. Protein miktarı, ölçüm sonucu elde edilen standart eğriye göre değerlendirilerek mg olarak hesaplanmıştır.

3.2.2.2 Toplam karboksilesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Toplam karboksilesteraz enzim aktivitesi, Ay and Gürkan (2005) tarafından önerilen metot üzerinde yapılan bazı değişikliklerle ve substrat olarak α-naphtil acetate kullanımı ile belirlenmiştir. Bunun için 20 ergin dişi *T. urticae* steril ependorf tüpler içerisinde % 0.1 Triton X-100 içeren 100 µl (0.1 M, pH 7.6) sodyum fosfat buffer ile tüpe tamamen uyan bir ezici yardımıyla iyice ezilmiştir. Elde edilen homojenat 12000*g*'de +4 °C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı (süpernatant) enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Boya solüsyonu 50 ml sodyum fosfat buffer (0.2 M, pH 6.0) üzerine 30 mg Fast Blue RR tuzu ilave edilerek hazırlanmıştır. Bu solüsyon Whatman 1 nolu kâğıttan süzülerek küçük partiküllerinden arındırılmıştır. Daha sonra bu solüsyon içerisine substrat olarak saf asetonda çözünmüş 100 mM α-naphtil acetate'dan 100 µl eklenmiştir. Bu karışım hazırlandıktan sonra 96 hücrelik mikroplakaların her bir hücresine 20 µl süpernatant konulmuştur. Süpernatant üzerine 200 µl boya+substrat solüsyonu konularak 450 nm dalga boyunda toplam karboksilesteraz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Enzim aktivitesi VERSAmax Kinetik Mikroplaka Okuyucu (Molecular Devices)'da 23 °C'de toplam 20 dk'da 10 saniyelik aralıklarla 121 okuma sonucu elde edilmiştir. Kinetik okuma sonucu elde edilen optik yoğunluk (O. D.) değerleri, hassas ve selekte edilmiş popülasyonlarda protein miktarına oranla belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin birimi mOD /min /µg protein olarak ölçülmüş ve elde edilen veriler

ANOVA, LSD test ($P<0.05$)'e göre değerlendirilmiştir. Enzim aktivitesinin ölçümü için gerekli olan bufferlerin hazırlanışı EK 1'de verilmiştir.

3.2.2.3 Poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) ile karboksilesteraz enzimi izozimlerinin incelenmesi

Karboksilesteraz enzimi izozimlerinin incelenmesinde poliakrilamit jel elektroforez (PAGE) yöntemi kullanılmıştır. Lambda cyhalothrin ve bifenthrin ile selekte edilen her seleksiyon popülasyonunda karboksilesteraz bantları Ornstein and Davis (1964) yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla mini-dikey jel sistemi kullanılmıştır. Poliakrilamit jel elektroforezinde kullanılan solüsyonların hazırlanışı EK 2'de verilmiştir Cam plakalar jel dökme standına yerleştirildikten sonra üst kısımda yaklaşık 2 cm boşluk bırakılarak, % 7.5'luk küçük porlu jel dökülmüştür. Bu jelin üzerine hava ile temasını kesip, daha iyi polimerize olabilmesi için çok az miktarda n-butanol ilave edilmiştir. Yaklaşık 60 dk süren polimerizasyonu takiben n-buthanol ortamdan uzaklaştırılarak jelin üst kısmı saf su ile yıkanmıştır. Hazırlanan % 3.5'luk büyük porlu jel, küçük porlu jelin üzerine pastör pipeti yardımı ile ilave edilmiş ve taraklar yerleştirilmiştir. Jelin bu şekilde soğuk ışık kaynağının altında yaklaşık 1 gün süre ile iyice donması sağlanmıştır.

Örneklerin hazırlanmasında homojenizasyon sıvısı olarak 0.1 g sükroz, 1 ml Triton X 100 (% 1.6'lık çözelti) ve % 0.05 bromocresol purple karışımı kullanılmıştır. Homojenizasyon çözeltisi içerisine katılan bromocresol purple izleme boyası olarak kullanılmıştır. 5'er adet ergin dişi kırmızı örümcek ependorf tüplerine aktarılarak her birinin üzerine 20 µl homojenizasyon çözeltisi ilave edilmiştir. Örnekler ependorfa uyan bir ezici ile iyice homojenize edilmiştir. Homojenatlardan 10 µl alınarak jele yüklenmiş ve glycine buffer ortamında koşturulmuştur. Örnekler aynı anda 2 jel koşturabilen, jel elektroforez tankında (Bio-Rad) +4 ^{o}C'de, 1.5 saat süre ile 250 voltta koşturulmuştur (Şekil 3.5). Bu sürenin sonuna doğru boya hazırlanmış (0.1 g Fast Blue RR; 50 ml fosfat buffer pH 6.0; 1 ml 100 mM α-naphtyl acetate) ve cam plakalar arasından çıkarılan jel bu boyanın içerisine aktarılmıştır. Jel oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda yaklaşık 15 dk boyandıktan sonra fiksasyon için 1 gün süre ile % 7'lik asetik asit

içerisine alınmıştır. Ertesi gün jel üzerinde oluşan bantların fotoğrafları çekilerek bilgisayar ortamına aktarılmıştır.



Şekil 3.5 Poliakrilamit jel elektroforezinde kullanılan tank ve güç kaynağı

3.2.2.4 Glutation S-transferaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Glutation S-Transferaz enzim aktivitesi Stumpf (2001)'dan alınan yöntem üzerinde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Enzim aktivitesi substratlar olarak 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ve reduced glutathion (GSH) kullanılarak belirlenmiştir. 30 adet ergin dişi *T. urticae* 60 µl Tris-HCL Buffer (0.1 M, pH 7.5)'da ezilmiştir. 15 dk beklendikten sonra bu homojenat 12000*g*'de +4 °C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant'dan 96 hücrelik mikroplakanın her bir hücresine 30 µl konmuştur. Son hacimleri sırasıyla 0.4 mM ve 4 mM olan CDNB ve GSH solüsyonlarının her birinden süpernatant üzerine 100'er µl konularak 340 nm dalga boyunda elisa reader'da enzim aktivitesi belirlenmiştir. Glutation S-transferaz enzim aktivitesi VERSAmax Kinetik Mikroplaka Okuyucu (Molecular Devices)'da 23 °C'de toplam 20 dk'da 10 saniyelik aralıklarla 121 okuma sonucu elde edilmiştir. Kinetik okuma sonucu elde edilen optik yoğunluk (O. D.) değerleri, hassas ve seleksiyon baskısına uğramış popülasyonlarda protein miktarına oranla belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin birimi mOD /min /µg protein olarak ölçülmüş ve elde edilen veriler

ANOVA, LSD test (P<0.05)'e göre değerlendirilmiştir. Enzim aktivitesinin ölçümü için gerekli olan bufferlerin hazırlanışı EK 3'de verilmiştir.

3.2.2.5 Sitokrom P-450 monooksijenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Sitokrom P-450 monooksijenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için substrat olarak PNOD ve ECOD kullanılmıştır. Bunun için 100 adet ergin dişi *T. urticae* bir ependorf tüpe konulmuştur. Tüp içerisine 200 µl homojenizasyon buffer (0.05 M Tris-HCl + %1.15 KCl + 1mM EDTA pH (7.7)) ilave edilerek ependorfa uyan bir ezici çubuk yardımıyla iyice ezilmeleri sağlanmıştır. Homojenat +4 °C'de 100000*g*'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. PNOD denemesi için mikroplate'in her kuyucuğuna 90 µL enzim kaynağı + 100 µL 2mM *p*-nitroanisole eklenerek karışım 30 °C'de 3 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon 10 µL 9.6 mM NADPH eklenerek başlatılmıştır. Enzim aktivitesi 405 nm'de 30 °C'de 15 dk 34 sn aralıklarla okunmuştur (Rose *et al.* 1995). PNOD aktivitesi mOD /min /µg protein olarak ölçülmüştür.

Diğer substrat ECOD ile yapılan çalışmada kuyucuklara 50 µL enzim kaynağı + 80 µL 0.5 mM ECOD konularak 30 °C'de 3 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon 10 µL 9.6 mM NADPH eklenerek başlatılmıştır. Enzim aktivitesi Molecular Devices Floresans Mikroplaka Okuyucu Gemini EM'de 380 nm ve 460 nm çift dalgaboyunda unit/ml/µg protein olarak ölçülmüştür (Ullrich and Weber 1972). Hassas ve 8. seleksiyon popülasyonlarında protein miktarına oranla sitokrom P-450 monooksijenaz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen veriler ANOVA, LSD test (P<0.05)'e göre değerlendirilmiştir. Enzim aktivitesinin ölçümü için gerekli olan bufferlerin hazırlanışı EK 4'de verilmiştir.

3.2.3 Sinerjistik çalışmalar

Olası metabolik direnç mekanizmalarını *in vivo* olarak değerlendirebilmek için 3 sinerjist kullanılmıştır. Lambda cyhalothrin ve bifenthrin'in pek çok konsantrasyonu her iki ilaçla selekte edilen 8. seleksiyon popülasyonlarına uygulanmış ve LC_{50} ve LC_{90} değerleri elde edilmiştir. Daha sonra aynı popülasyona ilaç+sinerjist uygulanarak LC_{50} ve LC_{90} değerleri tekrar elde edilmiştir. Bu sinerjistler; karboksilesteraz enzim inhibitörlerinden biri olan S,S,S, tributyl phosphotrithioate (DEF) (2000 mg/L) (Leeuwen and Tirry 2007) glutation S-transferaz enzim inhibitörlerinden diethylmaleate (DEM) (100 µg/mL) (Leeuwen *et al.* 2004) ve sitokrom P450 monooksijenaz enzim inhibitörlerinden biri olan piperonylbutoxide (PBO) (1000 µg/mL) (Leeuwen *et al.* 2004)'tir.

Uygulamalarda asetonda çözülmüş sinerjistlerle öncelikle petri kapları ilaçlanmıştır. Petri kaplarının alt ve üst kapağına 2'şer ml sinerjist uygulanmıştır. Daha sonra yaklaşık 30 ergin dişi akar 1 petri kabına konduktan sonra 4 saat sinerjiste maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda akarlar piretroitlerle ilaçlanmış petri kaplarına alınmış ve 24 saat sonra canlı-ölü sayımları yapılarak sinerjizm oranları belirlenmiştir.

3.2.4 Resiprokal çaprazlamalar

Hassas ve dirençli bireyler arasında yapılan resiprokal çaprazlamalar, direnç genlerinin baskın veya çekinik, eşeye bağlı veya eşeye bağlı olmaması (otozomal) konusunda bize bilgi vermektedir.

Bu çalışmada *T. urticae*'de lambda cyhalothrin ve bifenthrin direncinin F1 dişileri üzerinde baskın veya çekinik karakterde olup olmadığını belirlemek için, lambda cyhalothrin ile selekte edilerek elde edilen 8. seleksiyon popülasyonu ile hassas (GSS) popülasyon arasında ve bifenthrin ile selekte edilerek elde edilen 8. seleksiyon popülasyonu ile yine hassas (GSS) popülasyon arasında resiprokal çaprazlamalar yapılmıştır (Çizelge 3.1). Çaprazlamalar, hassas popülasyonun 10 dişi deutonimfi ile

dirençli popülasyonun 30 ergin erkeğinin iklim odasında kafes sistem içerisinde bulunan temiz fasulye bitkilerinin yapraklarından birinin üzerine bırakılması ile yapılmıştır. Aynı çaprazlama yukarıda belirtilen sayılardaki bireyler arasında hassas popülasyonun ergin erkekleri ile dirençli popülasyonun dişi bireyleri arasında da yapılmıştır. Üç gün sonra döllenmiş dişiler ince uçlu fırça yardımı ile toplanarak iklim odasında bulunan diğer bir kafes sistemindeki taze fasulye bitkisi yapraklarının üzerine konulmuş ve 14 gün boyunca yumurta bırakmaları sağlanmıştır. Bu süre içerisinde her gün yumurta bırakan dişi bireyler toplanıp temiz fasulye bitkilerinin üzerine bırakılmıştır. Bırakılan yumurtalar açıldıktan 10 gün sonra F1 dişileri toplanarak denemeler için kullanılmıştır (Leeuwen *et al.* 2004).

*T. urticae'*de erkek bireyler haploid olup sadece annelerinin genlerini taşıdıkları için çaprazlamalardan elde edilen F2 dölü de genetik olarak geri çaprazlama dölüne eşittir (Goka 1998, Leeuwen *et al.* 2004). Bu nedenle; F2 dişilerini elde etmek için; F1 dişileri ile hassas veya dirençli popülasyonların erkekleri yukarıda bahsedildiği gibi çiftleşmeye bırakılmıştır (Çizelge 3.1). F2 dişileri ile de yukarıdaki anlatılan şekilde denemeler kurulmuştur. Her iki çaprazlamadan sonra F1 dişilerinde direncin baskınlığı aşağıda belirtilen formülle hesaplanmıştır (Stone 1968).

$\boldsymbol{D}= (2X_2-X_1-X_3)/ (X_1-X_3)$

X_1= Dirençli ırkın LC_{50} değerinin $\log_{10}$'u

X_2= F1 dişilerinin LC_{50} değerinin $\log_{10}$'u

X_3= Hassas ırkın LC_{50} değerinin $\log_{10}$'u

$\boldsymbol{D}= \mathbf{0}$ ise; hassas popülasyon ile tarla popülasyonunun hassasiyeti aynı ve heterozigot.

$\boldsymbol{D}= \mathbf{1}$ ise; tam baskın

$\boldsymbol{D}= \mathbf{-1}$ ise; tam çekinik

$\mathbf{0}<\boldsymbol{D}<\mathbf{1}$ ise; eksik (tam olmayan) baskın

$\mathbf{-1}<\boldsymbol{D}<\mathbf{0}$ ise; eksik (tam olmayan) çekinik olarak değerlendirilmiştir.

Direncin kalıtım şeklinin monogenik olduğu hipotezini test etmek için F1 dölü geriye çaprazlanarak gözlenen ve beklenen ölüm oranları elde edilmiştir. F2 dişileri için teorik olarak beklenen ölüm oranları aşağıda belirtilen formülle hesaplanmıştır (Georghiou 1969).

c= (0.5) W (F1 dişileri)+ (0.5) W (R ırkı)

c= Uygulanan bir konsantrasyonda teorik olarak beklenen ölüm oranı

W= Uygulanan bir konsantrasyonda dişi bireyde gözlenen ölüm oranı

Bu genetik hipotez, 1 serbestlik derecesi ve χ^2 tablosundan elde edilen değerlerle denemelerden elde edilen χ^2 değerlerinin karşılaştırılması sonucu değerlendirilmiştir. Gözlenen ve beklenen ölüm oranları arasındaki fark önemli ise monogenik kalıtım hipotezi ret edilmiş, fark önemsiz ise monogenik hipotez kabul edilmiştir.

Çizelge 3.1 Resiprokal çaprazlamalar

Popülasyon	Çaprazlamalar	
	Dişi	Erkek
Dirençli (RR)	R	R
Hassas (SS)	S	S
F1 SR	S	R
F1 RS	R	S
F2 RS×R	RS	R
F2 SR×S	SR	S

3.2.5 Moleküler çalışmalar

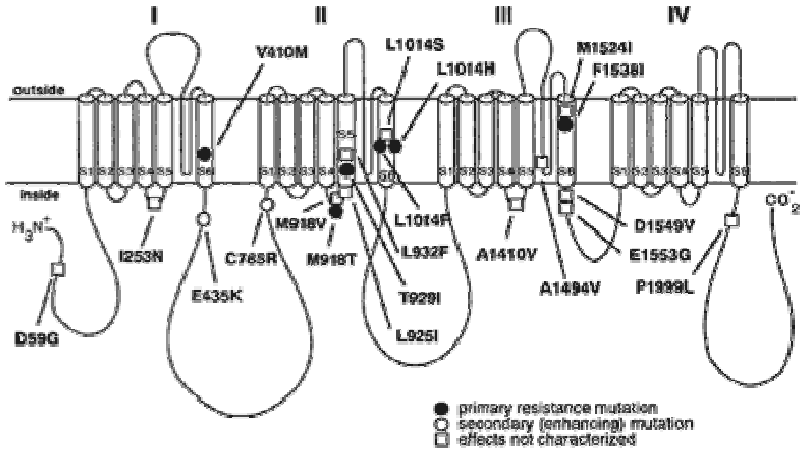
Piretroit insektisitler insan ve çevre sağlığına diğer gruplara oranla daha az risk taşıyan büyük bir insektisit grubu olup tarımsal ve tıbbi alanda pek çok arthropod zararlı ile savaşımda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Liu *et al.* 2006). Fakat bu yaygın kullanım son 20 yıldır pek çok böcek popülasyonunda piretroit direncinin gelişmesini sağlamıştır. Tarımsal zararlı kırmızıörümceklerin kontrolünde de piretroit insektisitlerin yaygın kullanımı bu zararlılarda da piretroit direncinin gelişmesine sebep olmuştur.

Piretroitlerden bifenthrin *T. urticae*'ye ruhsatlı olup yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Lambda cyhalothrin ise ruhsatlı olmamakla birlikte özellikle Çukurova bölgesinde diğer tarımsal zararlılara karşı yaygın bir şekilde kullanıldığından bu bölgede *T. urticae* gibi sekonder zararlılar ana zararlı gibi ortaya çıkmakta ve bu ilaca yoğun bir şekilde maruz kaldığı için zararlıda direnç gelişmektedir. *T. urticae*'de bifenthrin ve lambda

cyhalothrin'e karşı oluşan piretroit direncinin moleküler düzeyde araştırılabilmesi için olası sodyum kanalı mutasyonlarının ortaya çıkarılması gerekmektedir. Bu amaçla sodyum kanallarında *kdr* ve *süper kdr* mutasyonlarının en fazla görüldüğü II. domain'in sekans analizi yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu domain'in nükleotid dizinini ortaya koyabilmek amacıyla *Blattella germanica, Pediculus capitis, Boophilus microplus, Varroa destructor, Musca domestica* ve *Heliothis armigera* türlerinin sodyum kanallarının II. domain'leri, NCBI web sayfasında kayıtlı sodyum kanalı sekanslarından EBI ClusterW programı ile align edilerek 6 adet dejenere primer dizayn edilmiştir. Dejenere primer dizaynı evrim sürecinde en çok korunan bölgelerin belirlenmesi ile yapılmıştır. Bu primerler kullanılarak bu bölgeler total RNA izolasyonu ve cDNA eldesinden sonra 1. ve 2. PCR reaksiyonları ile çoğaltılmıştır. İstenen DNA fragmentlerinin pGEM T vektör içerisine klonlanması ve Stratagene XL-1 blue supercompenent hücre kiti kullanılarak transformasyonundan sonra elde edilen plazmit'ten yapılan DNA dizi analizi sonucu *T. urticae*'nin sodyum kanallarına spesifik sekans ortaya çıkmıştır. Bu sekansa göre *T. urticae*'nin sodyum kanallarına spesifik primerler dizayn edilmiştir. DNA ekstraksiyonu ve PCR işlemlerinden sonra *T. urticae*'nin sodyum kanalının IIS4-S6 transmembran segmentlerinin dizi analizi ortaya çıkarılmış ve mutasyonlar değerlendirilmiştir. Özetle bahsedilen bu çalışmalar aşağıda ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

3.2.5.1 Sodyum kanalları dejenere primerlerinin elde edilmesi

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda arthropodlarda sentetik piretroitlere direnç nedeniyle sodyum kanallarında görülen *kdr* ve *süper-kdr* mutasyonları en fazla II. domain'de görüldüğünden öncelikle bu bölgenin nükleotid sekansının çıkarılması amaçlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda sodyum kanallarının II. domain'inde saptanan *kdr* (10–30 kat direnç) ve *süper-kdr* (500 kattan fazla) mutasyonları Şekil 3.6'da görülmektedir. Bu aşamada aynı şekil üzerinde siyah noktalarla gösterilen sodyum kanallarının II. domain'inde daha önce mutasyon görülen *Blattella, Pediculus, Boophilus, Varroa, Musca* ve *Heliothis*'in gen bankasına kayıtlı sodyum kanalı sekanslarından yararlanılarak 6 adet dejenere primer dizayn edilmiştir (Çizelge 4.12).



Şekil 3.6 Böcek sodyum kanalları (Soderlund and Knipple 2003)

3.2.5.2 Total rna izolasyonu

Sodyum kanallarının II. domaininde olması muhtemel olan mutasyonları belirlemek için Promega SV Total RNA izolasyon kiti ve bu kitle birlikte tanımlanan protokol uygulanarak RNA elde edilmiştir. Bu protokole göre yaklaşık 40 mg olacak şekilde kırmızıörümcekler bir ependorfta tartılarak üzerine sıvı azot ilave edilmiş ve ependorfa uyan steril ezici çubuklarla ezilmiştir. Üzerine 175 µL lysis buffer ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine 350 µL dilution buffer konularak 70 °C sıcaklıkta 3 dk inkube edilmiştir. İnkubasyondan sonra +4 °C'de 10 dk 12000 veya 14000*g*'de santrifüj edilmiştir. Üstteki faz temiz bir tüpe alınarak üzerine % 95'lik 200 µL etilalkol ilave edilerek birkaç kez pipetle tüpün içerisinde iyice karıştırılmıştır. Karışım kit içerisinde hazır bulunan filtreli tüplere alınarak 1 dk 14000*g*'de santrifüj edilmiştir. Filtreli tüpün altında toplanan sıvı atılarak üzerine 600 µL RNA yıkama solüsyonu ilave edilerek 1 dk santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı tekrar atılmıştır. Tüpe 50 µL DNase inkubasyon solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dk inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrası üzerine 200 µL SV DNase stop solüsyonu eklenerek 1 dk 14000*g*'de santrifüj edilmiştir. 600 µL SV RNA yıkama solüsyonu ilave edilerek 1 dk 14000*g*'de santrifüj edilerek altta toplanan sıvı atılmıştır. 250 µL SV RNA yıkama solüsyonu eklenerek 2 dk daha santrifüj edilmiştir. Filtreli tüp üzerine yeni bir filtre takılarak üzerine 100 µL nükleaz içermeyen su konmuştur ve 1 dk 14000*g* de santrifüj edilmiştir. Altta toplanan RNA -20 °C veya -70 °C'de saklanmıştır. 2 µL RNA, 5 µL

boya ve 3 µL su karıştırılarak +80 °C'de 3 dk inkubasyondan sonra buzda soğutulmuş ve %1 lik agarose jele yüklenerek 50 voltta 1 saat koşturulmuştur. 20 dk EtBr içinde tutulduktan sonra 10 dk yıkanmıştır ve UV altında gözlenmiştir.

3.2.5.3 RNA'nın saflaştırılması

Elde edilen RNA'nın saflaştırılması için chloroform ve fenol kullanılmıştır. Bunun için 50 µL RNA ile 25 µL chloroform ve 25 µL fenol kısa süreli vortex'den sonra 2-3 dk 14000*g*'de santrifüj edilmiştir. Fazlar görülmeye başlandıktan sonra en üstteki faz alınarak, kalanın üzerine yeniden eşit miktarda chloroform ilave edilmiştir. Kısa süreli vortex ve santrifüjden sonra üstteki faz yine alınarak üzerine eşit miktarda soğuk isopropanol eklenmiştir. Kısa süreli santrifüjden sonra üstte kalan sıvı tamamen alınmıştır. Dipte kalan pelet RNA içermektedir. Pelet % 70'lik etilalkol ile yıkanarak 5 dk iyice ters düz edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra alkol tamamen uçurularak pelet 20 µL steril suda çözülmüş ve -20 °C'de saklanmıştır. Uygulanan tüm santrifüjler +4 °C'de yapılmıştır.

3.2.5.4 cDNA sentezi

T. urticae'nin ilk zincir cDNA'sı Superscript II reverse transkriptaz (Gibco BRL) kullanılarak sentezlenmiştir.

cDNA sentezi için;

4 µL total RNA (1-1.5µg/µL)
1 µL primer (6 nolu dejenere primer) (200 ng/ µL)
1 µL oligo-dT primer (50 ng)
1.5 µL steril saf su karışımı

70 °C'de 10 dk sıcak su banyosunda inkubasyondan sonra iyice karıştırılarak buz üzerinde hızla soğutulmuş ve kısa süreli santrifüj edilmiştir. Ayrı bir tüp içerisinde cDNA sentez reaksiyonu için aşağıdaki karışım hazırlanmıştır.

3 µl 5 x First strand buffer (Gibco BRL)

1,5 µl 0.1M DTT

1,5 µl 10mM dNTP

0,75 µl Superscript II TM (200U/ µl)(Gibco BRL)

0,75 µl RNAquard (Pharmacia)

karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım ile RNA/primer karışımı birleştirilmiştir. Karışım 37°C'de 15 dk ve 42°C'de 45 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen 15 µl'lik ilk zincir reaksiyonu 90 °C'de 5 dk ısıtılarak buzda soğutulmuş ve kısa süreli santrifüj edilmiştir. Bunun üzerine 1 µl RNAse H (2U/ µL) (Gibco BRL) ilave edilerek, 37°C'de 30 dk inkube edilmiştir. Yöntem Bass *et al.* (2004) tarafından kullanılan yöntem üzerinde yapılan bazı değişikliklerle uygulanmıştır.

3.2.5.4.1 cDNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması

İlk zincir cDNA, PCR ile *T. urticae*'nin sodyum kanalının IIS4–S6 bölgesini çoğaltmak için bir basamak olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonları; dejenere sodyum kanalı primerlerinin kullanılmasıyla iki basamaklı olarak yapılmıştır.

Aşağıda verilen protokol 50 µl PCR reaksiyonu için kullanılmıştır.

2 µl cDNA

4.5 µl 10X Buffer

1 µl dNTP (10 mM)

2.5 µl 1. primer (Paradp 1)(100 ng/ µL)

2.5 µl 2. primer (Paradp 6) (100 ng/µL)

32.5 µl steril distile su karışımı kullanılmıştır.

Hazırlanan PCR reaksiyonu ilk olarak, 94 °C'de 3 dk tutulduktan sonra Thermocycler kapak sıcaklığı 80 °C'ye düşürülmüş ve alet içerisindeki PCR tüplerine 0.5 µl 10X buffer, 0.5 µl dynazyne ve 4 µl steril distile su karışımı konarak 35 döngülü bir reaksiyona tabi tutulmuştur (Çizelge 3.2) Yöntem Martinez-Torres *et al.* (1997) tarafından kullanılan yöntem üzerinde yapılan bazı değişikliklerle uygulanmıştır.

Çizelge 3.2 PCR döngüsü

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	
Hot Start	94	3	
Kapak Sıcaklığının Düşürülmesi	80	-	
Denaturasyon	94	1	X 35
Annealing	50–60	1	
Uzama	72	2-5	
İlave uzama	72	10	

PCR ürününün agaroz jelde görüntülenmesi için elde edilen üründen 5 µL alınarak 3 µl su ve 2 µl DNA loading buffer'la bir ependorfta karıştırılarak jele yüklenmiştir. Daha sonra jel % 2'lik EtBr'de 20 dk boyanmıştır. DNA'nın görüntülenmesi için jel UV transilluminator altına konarak fotoğrafı çekilmiştir Bu reaksiyonda beklenen büyüklükte tek bir bant çok nadir elde edildiğinden 1. PCR ürününden çok az miktarda alınarak ikinci PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.4.2 2. PCR

Elimizdeki 6 primerden en geniş aralık olan 1/6 kombinasyonuyla gerçekleştirilen PCR ile cDNA çoğaltılmış, bunu takiben birinci PCR ürünü farklı primerler kullanılarak ikinci PCR ile çoğaltılmıştır. İkinci PCR reaksiyonlarında kullanılan primer kombinasyonları 1/5, 2/5 ve 2/3 dür. Bu reaksiyonlardan sadece 2/3 çalışmıştır. İkinci PCR reaksiyonu; 1. PCR reaksiyonundan 1-3 µL alınarak toplam hacim 50 µL olacak şekilde aynen 1. PCR koşullarındaki gibi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.4.3 PCR ürünlerinin agaroz jelden ekstraksiyonu

İkinci PCR reaksiyonlarından sadece 2/3 kombinasyonunun çalışması sonucu elde edilen aynı DNA fragmentlerini içeren PCR ürünleri bir araya getirilmiştir (yaklaşık 200 µl). Bunun üzerine eşit hacimde (200 µl) NH_4OAc (5M) ve 4 hacim (800 µl) susuz etil alkol eklenip, 3 kez vortekslenmiş ve bir saat –20 °C'de tutulmuştur. Sürenin sonunda +4°C'de 20 dk 14000*g* de santrifüj edilmiştir. Üste biriken kısım uzaklaştırılmış ve pellet % 95 lik etil alkol ile yıkanmıştır. Alkolün uzaklaştırılması için 5 dk yüksek hızda santrifüj edilmiş ve vakumlu santrifüjde kurutulmuştur. Bunun üzerine 20 µl steril saf su eklenmiştir. Bunun 10 µl'si jel (% 1.2 Agaroz) üzerine yüklenmiş ve 2 saat 80 V'da koşturulmuş, diğer kısmı ise -20 °C'de saklanmıştır. Ekler bölümünde yer alan Qiagen gel ekstraksiyon kiti uygulama protokolü ile jelden kondanse edilen PCR ürünü ekstrakte edilmiştir (EK 6). Bu ürün daha sonra yine ekler bölümünde yer alan protokol ile Microspin S400 kolonuyla (Amersham, Biosciences) saflaştırılmıştır (EK 7).

3.2.5.4.4 pGEM-T vektör içerisine bağlanma

Beklenen büyüklükteki PCR fragmentleri (444 bp), agaroz jelden geri alınıp saflaştırıldıktan sonra pGEM-T Vektör Sistem (Promega) kullanılarak vektöre klonlanmıştır (ligasyon) (Bass *et al.* 2004). Bu amaçla 20 µl PCR ürünü + 1 µl pGEM-T vektör (50 ng/µl) ve 4 µl steril distile su bir eppendorf içinde 3000*g*'de 2 dk santrifüj edilmiş ve üzerine 3 µl 5M NH_4OAc (derin dondurucuda soğutulmuş) ve %100 lük etil alkolden (derin dondurucuda soğutulmuş) 75 µl ilave edilip vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. Kuru buz üzerinde 20 dk, -20 °C'de bir saat süreyle tutulduktan sonra + 4 °C'de 20 dk 14000*g* de santrifüj edilmiştir. Üstte biriken bölüm alınmış, 150 µl % 75 lik alkolle yıkanıp, +4 °C'de maksimum hızda 5 dk santrifüj edilmiştir. Pellet 15 dk vakum altında kurutulmuştur. Bunun üzerine 1 µl 10x ligaz buffer, 0,75 µl T_4 DNA ligaz ve 8,25 µl steril su ilave edilmiş, vorteks ve hızlı santrifüj yapılmıştır. Reaksiyon 15 °C su içinde gece boyunca inkube edilmiştir. Ligasyon ürünü +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.5.4.5 Vektörün transformasyonu

Plazmit vektörlere klonlanan ve istediğimiz bölgeyi içeren plazmit DNA molekülleri sınırlı miktarda olduğu için öncelikle *E. coli*'ye aktarılarak bu vektörlerle transforme rekombinant bakteri stoklarının oluşturulması gerekmektedir. Transformasyon için Stratagene XL1-blue supercompetent hücre kiti kullanılmıştır. Transformasyon kit içerisinde önerilen prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Bu prosedür aşağıdaki şekildedir.

1. Buz üzerine önceden soğutulmuş 14 ml'lik 2 adet alt kısmı yuvarlak BD Falcon polipropilen tüplerden konulmuştur. Biri transformasyon için diğeri pUC18 kontrolü için kullanılmıştır. SOC ortamı 42 °C'ye ısıtılmıştır.

2. Buz üzerinde süperkompetent hücreler çözdürülmüş ve tamamen çözündüğünde yavaşça karıştırılarak önceden soğutulmuş her iki tüpe 100'er µl hücre sıvısı ilave edilmiştir.

3. Daha sonra tüplere 1.7 µl β-merkaptoetanol ilave edilmiştir.

4. Tüpler yavaşça karıştırılarak, 10 dk buz üzerinde tutulmuş ve her 2 dk'da bir karıştırılarak inkube edilmiştir.

5. Tüplerden birine 0.1–50 ng DNA ilave edilmiştir. Diğer tüpe ise 1 µl pUC18 kontrol DNA ilave edilerek yavaşça karıştırılmıştır.

6. Tüpler buz üzerinde 30 dk inkübe edilmiştir.

7. Tüpler 45 saniye 42°C'de su banyosunda bekletilmiştir. Bu ısı süresi maksimum etkinlik için çok önemlidir.

8. Tüpler buz üzerinde 2 dk inkübe edilmiştir.

9. Önceden ısıtılmış SOC ortamından 0.9 ml ilave edilerek çok hafif çalkalayarak 1 saat 37 °C'de tüpler inkübe edilmiştir.

10. Uygun bir antibiyotik içeren (ve arzu edilen rengin izlenmesini sağlayan IPTG ve X-gal içeren) LB agar ortamı üzerine transformasyon ürününden ≤200 µl ilave edilmiştir. pUC18 kontrol transformasyonu için LB ampisilin agar içeren plate'ler üzerine transformasyondan 2.5 µl konmuştur.

11. 37 °C'de tüm plate'ler bir gece inkübe edilmiştir (mavi-beyaz rengi izlemek için en az 17 saat gereklidir). Rekombinant plazmitleri içeren koloniler beyaz renkli, plazmitleri içermeyenler ise mavi renkli kalmıştır.

Ortam ve solüsyonların hazırlanması

SOB Ortamı (1 L)

20.0 g tripton, 5.0 g bira mayası ekstraktı ve 0.5 g NaCl tartılarak 1 litre steril distile suya tamamlanır. Otoklav edilir. Kullanmadan önce üzerine 10 ml, filtreden geçirilerek sterilize edilmiş 1 M MgCl2 ve 10 ml 1M MgSO4 ilave edilir.

SOC Ortamı (100 ml)

Bu ortam kullanmadan hemen önce hazırlanmalıdır. 2 ml % 20'lik glukoz veya 1 ml 2 M glukoz filtreden geçirilip sterilize edilerek otoklavlanmış 100 ml SOB ortamına ilave edilir.

LB Agar (1 L)

10 g NaCl, 10 g tripton, 5 g bira mayası ekstraktı, 20 g agar tartılarak 1 litre steril distile suya tamamlanır. 5 N NaOH ile pH 7'ye ayarlanarak otoklav edilir.

LB–Ampisilin Agar (1 L)

1 litre LB agar otoklavlanarak 55°C'ye soğutulur. 10 mg/ml filtreden geçirilmiş ve sterilize edilmiş ampisilinden 10 ml eklenerek (25 ml/100-mm plate) petri kaplarına dökülür.

Mavi-beyaz rengi izlemek için agar plate'lerinin hazırlanması

Yukarıda belirtildiği şekilde LB agar ortamı hazırlanmıştır. Antibiyotik eklenirken aynı zamanda son hacmi 80 μg/ml (Dimetilformamid, DMF'de hazırlanmış) olacak şekilde 5-bromo-4-chloro-3-inodlyl-β-D galactopyranoside (X-gal) ve steril su ile hazırlanmış son hacmi 20 mM olan isopropyl-1-thio-β-Dgalactopyranoside (IPTG) eklenmiştir. Buna alternatif olarak 100 μl 10 mM IPTG ve 100 μl % 2 X-gal, transformasyondan 30 dk önce katılaşmış LB agar plate'leri üzerine yaydırılabilir. Plate'de kalıcı renk gelişmesi için 100 μl SOC ortamı içerisine X-gal ve IPTG pipetlenmiş ve plate'in her yerine dağıtılmıştır.

3.2.5.4.6 Plazmit izolasyonu

Rekombinant olduğu düşünülen beyaz renkli kolonilerden plazmit izolasyonu yapmak için Qiagen Spin Miniprep Kit kullanılmıştır. Kit içerisinde önerilen protokole göre;

1. Plate üzerinden rekombinant koloniler alınarak 1-5 ml'lik seçici bir antibiyotik içeren LB ortamına inoküle edilmiştir. Kuvvetli bir çalkalayıcıda 37°C'de 12–16 saat inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığında (15–25°C) 3 dk >8000 rpm'de santrifüjleme ile bakteri hücreleri elde edilmiştir. Bakteri hücreleri aynı zamanda 4°C'de 10 dk 5400g'de 15 ml'lik santrifüj tüplerinden de elde edilebilmektedir. Tüm ortam süzülünceye kadar süpernatant uzaklaştırılmıştır.

2. Falcon tüplerinde pelet şeklinde bulunan bakteri hücrelerinin üzerine 250 µl P1 buffer eklenerek çözündürülmüş ve bu karışım 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.

3. Üzerine 250 µl P2 buffer eklenerek sıvıların birbirine karışması sağlanmıştır.

4. 350 µl N3 buffer eklenerek 10 dk 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

5. Santrifüjden sonra üstte kalan sıvı QIAprep spin kolona aktarılmıştır. 1 dk santrifüj edilerek kolonun altındaki sıvı atılmıştır.

6. 0,5 ml PB buffer eklenerek 1 dk daha santrifüj edilmiştir. Kolonun altındaki sıvı atılarak üzerine 0,75 ml PE buffer eklenmiştir.

7. 1 dk santrifüjledikten sonra kolonun altına toplanan sıvı atılmıştır. Kolon içinde kalan yıkama buffer'ını uzaklaştırmak için 1 dk daha santrifüjlenmiştir.

8. Daha sonra üstteki kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konularak üzerine 50 µl distile su eklenmiştir. Yaklaşık 5 dk oda sıcaklığında bekletilerek 1 dk santrifüjlenmiştir.

3.2.5.4.7 Etanol presipitasyonu

Bu şekilde izolasyonları yapılan plazmitlerden cDNA, alkol ile çökeltilerek içinde bulunduğu sıvıdan ayrılmış ve santrifüj yardımıyla da dibe çökmesi sağlanmıştır. Sıvı içinde kalan tüm diğer maddeler ise atılmıştır. Böylece dizi analizi yapılmak istenen gen parçaları saf olarak elde edilmiştir. 80 µL reaksiyon için; 80 µL 4 M NH_4OAc ve 400

µL oda sıcaklığındaki etanol ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hemen oda sıcaklığında 20 dk santrifüj edilmiştir. % 75'lik etanol ile pelet yıkanarak iyice kurutulmuştur. 20 µL steril saf su ile çözülmüş ve -20 °C'de saklanmıştır. Yapılan çalışmanın sonuçları %1 lik agarose jel de 80 V'da 100 dk koşturularak test edilmiştir. İyi sonuç veren örneklerden DNA sekansı gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.4.8 Sekans reaksiyonu

Sekans reaksiyonu "ABI Dye Terminator Sequencing Kit" kullanılarak 373 A sekans cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için;

- 5 µL plazmit
- 4 µL 2.5 X buffer
- 4 µL bigdye terminator (-20 C)
- 2 µL primer (2,6,4,5) (50 ng)
- 20 µL steril su karıştırılmıştır.
- Sekans profili;
- 95 °C'de 2 dk
- 94 °C'de 30 saniye
- 50 °C'de 30 saniye } 25 döngü
- 60 °C'de 3.5 dk
- 37 °C de 20 dk programıyla thermocycler'da reaksiyona tabii tutulmuş ve daha sonra sekans için kullanılmıştır.

Elde edilen sekansı gen bankasındaki diğer sodyum kanallarına ait cDNA sekansları ile karşılaştırmak için NCBI (National Center for Biotechnology Institute) veri bankaları kullanılmıştır. Sekans alignment'leri EBI Clustal X bilgisayar programları kullanılarak yapılmıştır.

3.2.5.5 Genomik DNA ekstraksiyonu

T. urticae'nin hassas popülasyonu ile daha fazla direnç oranı elde ettiğimiz bifenthrin ile selekte edilen BEYDOM popülasyonunun 8. seleksiyon popülasyonundan genomik DNA ekstraksiyonu için iki ayrı yöntem uygulanmıştır. Yöntemler sonucunda elde edilen ürün miktarı açısından herhangi bir farklılık görülmemiştir.

3.2.5.5.1 DNAZOL ile genomik DNA izolasyonu

Temiz bir ependorfa 20-25 mg kırmızı örümcek konularak üzerine 1 ml DNAZOL ilave edilmiş ve ependorfa uyan çubuklarla homojenize edilmiştir. 5-10 kez yapılan vuruş darbeleri homojenizasyon için yeterlidir. Oda sıcaklığında veya +4°C'de 10000*g*'de 10 dk homojenize edilmiştir. Homojenizasyondan sonra tüpün üstünde kalan süpernatant temiz bir tüpe alınmıştır. Bu işlem polisakkarit fazlalıklarını ve RNA'yı ortamdan uzaklaştırır. İzolasyon için kullanılan her 1 ml DNAZOL için %100'lük etanolden 0.5 ml ilave edilerek homojenattan DNA çöktürülmüştür. Ters düz edip karıştırılarak oda sıcaklığında 1-3 dk inkübe edilmiştir. Bu aşamada DNA bulutumsu bir görüntü alarak görünür hale gelmektedir. Dikkatli bir şekilde süpernatant alınarak altta kalan DNA peleti 1 dk yüksek hızda santrifüj edilmiştir. % 75'lik etanolden alınan 0.8-1.0 ml ile DNA iki kez yıkanmıştır. Her bir yıkamada 3-6 kez tüpün ters düz edilmesiyle DNA etanolde çözdürülür. Daha sonra tüp dik bir şekilde tutularak 0.5-1 dk DNA'nın tüpün alt kısmına yerleşmesi sağlanmış ve pipetleme ile etanol tüpten uzaklaştırılmıştır. Bir pipet yardımı ile tüpün alt kısmında kalan alkol de uzaklaştırılmıştır. 5-15 dk tüp açık bir şekilde oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra kurutma yapmadan bir pipet yardımı ile 8 mM NaOH veya su içerisinde DNA çözdürülmüştür. Yaklaşık 0.2-0.3 µg/µl DNA konsantrasyonuna uygun miktarda 0.2 - 0.3 ml 8 mM NaOH ilave edilmiştir. ile yapılan DNA ekstraksiyonlarında elde edilen DNA TE veya steril distile suda tam olarak çözülmeyeceği için 8 mM NaOH tavsiye edilmektedir. DNA 8 mM NaOH'ta +4 C'de aylarca -20 C'de ise 1 yıldan daha fazla süre ile stabil kalabilmektedir.

3.2.5.5.2 Ctab buffer kullanılarak yapılan genomik DNA izolasyon protokolü

Kültürden 50 adet ergin dişi birey alınarak steril ependorf tüplere konmuştur. DNA ekstraksiyonu hemen yapılmayacaksa akarlar -80 ^{o}C'de ekstraksiyon yapılıncaya kadar dondurulmuştur. Ekstraksiyon için öncelikle CTAB (pH 8.0) ekstraksiyon solüsyonuna son hacim % 0.2 olacak şekilde 2-merkaptoetanol eklenmiştir. Solüsyon sıcaklık 65 ^{o}C oluncaya kadar ısıtılmıştır. Akarlar tüpler içerisinde ependorf çubukları ile ezilerek üzerine her bir tüpe bu solüsyondan 50 µl konmuş ve akarlar ezmeye devam edilmiştir. Daha sonra aynı solüsyondan 150 µl daha konarak ependorf çubukları ile iyice homojenize edilmiştir. Su banyosunda 65 ^{o}C'de yaklaşık 1 saat inkube edilmiştir. Üzerine 200 µl 24:1 oranında chloroform/isoamilalcohol eklenerek 5 dk ters düz edilerek karıştırılmıştır. +4 ^{o}C'de 8000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı faz alınarak üzerine tüpteki hacim kadar +4 ^{o}C'de soğutulmuş isopropanol eklenmiş ve ters düz edilip karıştırılmıştır. Nükleik asitlerin çökmesi için tüpler -80 ^{o}C'de 1 saat veya -20 ^{o}C'de 2 saat çöktürülmüştür. Daha sonra tekrar +4 ^{o}C'de 13.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Pelet tüpün dibinde kalacak şekilde tüp ters çevrilerek isopropanol boşaltılmış ve DNA peleti üzerine +4 ^{o}C'de soğutulmuş %70'lik etanolden 500 µl konmuştur. +4 ^{o}C'de 13000 rpm'de tekrar 30 dk santrifüj edilmiştir. Dipte pelet kalacak şekilde etanol alınarak tüpler etanol uzaklaşıncaya kadar kurutulmuş, tüplere 20 µl steril saf su eklenmiş ve DNA'ların +4 ^{o}C'de 4 saat ultra saf suda bekletilerek iyice çözünmeleri sağlanmıştır. Tüpler daha sonra –20 ^{o}C'ye alınmıştır (Navajas *et al.* 1998). DNA'nın varlığını belirlemek için DNA % 1'lik agaroz jele yüklenerek, 20 dk etidyum bromid ile boyanıp UV'de görüntülenmiştir.

3.2.5.5.2.1 Genomik DNA'nın PCR ile çoğaltılması

Sentetik piretroitlerin esas hedef yeri sodyum kanalları olup bu kanallarda meydana gelen mutasyonlar piretroit direncinin olası sebepleri arasında yer almaktadır. Olası mutasyonları belirlemek için bu kanallara spesifik primerler kullanılarak hedef bölge çoğaltılmıştır. Bu amaçla 6 adet sodyum kanalına spesifik primer kullanılmıştır. Bu primerler;

Dirençli popülasyon için;	Hassas popülasyon için ;
R1.Primer 1/Primer 6	S1.Primer 1/Primer 6
R2. Primer 3/ Primer 5	S2. Primer 3/ Primer 5
R3.Primer 1/Primer 3	S3.Primer 1/Primer 3

Kullanılan PCR döngüsü aşağıdaki gibidir.

94 °C'de 3 dk (döngü)

80 °C (tüplere 5 µl 10X Buffer, 0.5 µl Taq Polimeraz ve 4 µl steril distile su karışımı konur).

94 °C'de 1 dk
45 °C'de 1 dk
72 °C'de 3 dk
} 35 döngü
72 °C'de 10 dk

Kullanılan protokol 50 µl PCR reaksiyonu için verilmiştir. İlk PCR'da 2 µl DNA, 2.5 µl 1. primer, 2.5 µl 2. primer, 1 µl dNTP, 4.5 µl 10X Buffer ve 32.5 µl dI su, kullanılmıştır. PCR aleti içine tüpler yerleştirildikten sonra döngü başlatılmıştır. 94 °C'de 3 dk (5 döngü)'dan sonra kapak sıcaklığı 80 °C'ye düşürülmüştür. Bu sırada alet içerisindeki PCR tüplerine 0.5 µl 10X Buffer, 0.5 µl Taq Polimeraz ve 4 µl steril distile su karışımı konarak 35 döngülü bir reaksiyona tabi tutulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 80 V'da 1 saat koşturulmuştur.

İkinci PCR'da 2 µL 1. PCR ürünü, 2.5 µl 1. primer, 2.5 µl 2. primer, 1 µl dNTP, 4.5 µl 10X Buffer ve 32.5 µl steril distile su kullanılmıştır. PCR aleti içine tüpler yerleştirildikten sonra 94°C'de 3 dk ısıtılmış ve kapak sıcaklığı 80°C'ye düşürülmüştür. Bu sırada alet içerisindeki PCR tüplerine 0.5 µl 10X Buffer, 0.5 µl Taq Polimeraz ve 4 µl steril distile su karışımı konarak 35 döngülü bir reaksiyona tabi tutulmuştur. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 80 V'ta 1.5 saat koşturulmuştur. Ardından 20 dk EtBr içinde bekletildikten sonra jel UV altında incelenmiştir.

3.2.5.6 Nükleotid Sekansı

T. urticae'nin sodyum kanallarında *kdr* ve *süper-kdr* mutasyonlarının en sık görüldüğü II. domain'e ait 444 bp'lik bir bölümün sekansı çıkarıldıktan sonra bu sekansa göre hazırlanan spesifik primerler, bifenthrin'e dirençli 8. seleksiyon popülasyonu ve hassas popülasyonlardan elde edilen genomik DNA'da hedef bölgedeki mutasyonların taranmasında kullanılmıştır.

Genomik DNA ekstraksiyonu ve 1. PCR'dan sonra yapılan 2. PCR sonucu elde edilen ürünlerle 12 adet sekans reaksiyonu hazırlanmıştır. Reaksiyon "ABI Dye Terminator Sequencing Kit" kullanılarak 373 A sekans cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için; 2.5 µl PCR ürünü, 0.6 µl primer (20 ng/µl), 4 µl sekans mix. (BIGDYE), 4 µl 2.5X buffer, 9 µl steril saf su ilave edilerek sekans profili 95 °C'de 2 dk, (94 °C'de 30 saniye, 50 °C'de 30 saniye ve 60 °C'de 3.5 dk) olacak şekilde 25 döngülü olarak ayarlanmıştır. Nükleotid ve amino asit sekansları Blast sekans programı ile karşılaştırılmıştır.

Yukarıda bahsedilen 12 adet sekans reaksiyonu aşağıdaki şekildedir.

1. R31(1+4) p 5
2. R31(1+4) p 6
3. R32 (2+3) p 5
4. R32 (2+3) p 6
5. S31(1+4) p 2
6. S31(1+4) p 5
7. S31(1+4) p 6
8. R1(1+6) p 2
9. R2(3+5) p 4
10. R3(1+3) p 2
11. R3(1+3) p 4
12. R3(1+3) p 6

R31: Primer 1/Primer 4

R32: Primer 2/Primer 3

S31: Primer 1/Primer 4

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma 2003–2007 yılları arasında A. Ü. Z. F. Bitki Koruma Bölümü'nde yapılmıştır. Ülkemizin yoğun ilaç kullanılan illerinden biri olan Antalya'nın Gazipaşa ilçesi Beyobası köyü domates serasından *T. urticae* popülasyonu toplanarak yetiştirmeye alınmıştır. Bu popülasyon 2 farklı sentetik piretroitle selekte edilerek dirençli popülasyonlar elde edilmeye çalışılmıştır. Her seleksiyonda hassasiyet, standart hassas popülasyon (GSS) ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Seleksiyon çalışmalarından sonra, bu popülasyonlarda piretroit direncinden sorumlu olabilecek bazı enzim grupları biyokimyasal ve sinerjistik yöntemlerle incelenmiş ve sentetik piretroitlere karşı oluşan dirençte metabolik detoksifikasyon enzimlerinin rolü olup olmadığı araştırılmıştır. Yine seleksiyon çalışmalarından sonra hassas ve dirençli popülasyonlar (8. seleksiyon) arasında resiprokal çaprazlamalar yapılarak direncin kalıtım şekli ve direnç yönetim stratejilerinde kalıtım şeklinin önemi tartışılmaya çalışılmıştır. Bu analizlerden sonra piretroit direncinden sorumlu olabilecek sodyum kanallarındaki olası mutasyonları belirlemek amacı ile moleküler düzeyde çalışmalar yapılarak direncin hem biyokimyasal hem de moleküler düzeyde sebepleri ortaya konmaya çalışılmıştır.

4.1 Biyoassay ve Seleksiyon Çalışmalarının Sonuçları ve Tartışma

Biyoassay denemelerinde petri kabı yöntemi kullanılmak sureti ile BEYDOM ve GSS popülasyonlarına uygulanan lambda cyhalothrin ve bifenthrin'in probit analizleri yapılarak LC_{50} ve LC_{90} değerleri belirlenmiştir. Buna göre Çizelge 4.1 ve 4.2'de BEYDOM ve GSS popülasyonlarına uygulanan lambda cyhalothrin ve bifenthrin'in LC_{50} ve LC_{90} değerleri, güven aralıkları ve popülasyonların direnç oranları verilmektedir.

Çizelge 4.1'den anlaşılacağı üzere hassas *T. urticae* popülasyonuna (GSS) karşı kullanılan lambda cyhalothrin formulasyonu için LC_{50} ve LC_{90} değerleri sırasıyla 2.779

ve 25.728 ppm olarak bulunurken, Çizelge 4.2'ye bakıldığında bifenthrin için bu değerler sırasıyla 0.147 ve 18.255 ppm olarak bulunmuştur.

BEYDOM popülasyonuna (Seleksiyon (0)) uygulanan lambda cyhalothrin ve bifenthrin'in petri kabı yöntemine göre LC_{50} ve LC_{90} değerleri sırasıyla lambda cyhalothrin için 0.347 ve 19.179 ppm olarak bulunurken, bifenthrin için LC_{50} ve LC_{90} değerleri sırasıyla 0.075 ve 15.339 ppm olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Başlangıç popülasyonu (Seleksiyon (0)) hassas popülasyona göre kullanılan ilaçlara daha duyarlı bulunmuştur.

Çizelge 4.1 Lambda cyhalothrin için hassas (GSS) ve BEYDOM (Seleksiyon (0)) popülasyonlarının probit-ölüm verileri

Lambda cyhalothrin	**n**	**eğim±SE**	**χ^2 (df)**	**LC_{50} (ppm) (Güven aralıkları)**	**LC_{90} (ppm) (Güven aralıkları)**	**LC_{50}'ye göre RR**	**LC_{90}'a göre RR**
GSS	459	1.326±0.176	18.326 (13)	2.779 (1.180-4.624)	25.728 (16.337-51.414)	-	-
Seleksiyon (0)	569	0.736±0.072	8.180 (16)	0.347 (0.222-0.539)	19.179 (9.071-54.834)	-	

n=Kullanılan akar sayısı
RR= Direnç oranı (Popülasyonun LC_{50} veya LC_{90} değeri/ Hassas popülasyonun LC_{50} veya LC_{90} değeri)

Çizelge 4.2 Bifenthrin için hassas (GSS) ve BEYDOM (Seleksiyon (0)) popülasyonlarının probit-ölüm verileri

Bifenthrin	**n**	**eğim±SE**	**X^2 (df)**	**LC_{50} (ppm) (Güven aralıkları)**	**LC_{90} (ppm) (Güven aralıkları)**	**LC_{50}'ye göre RR**	**LC_{90}'a göre RR**
GSS	570	0.612±0.080	18.788 (16)	0.147 (0.051-0.319)	18.255 (6.481-101.740)	-	-
Seleksiyon (0)	570	0.555±0.073	21.172 (16)	0.075 (0.023-0.172)	15.339 (4.814-117.413)	-	

n=Kullanılan akar sayısı
RR= Direnç oranı (Popülasyonun LC_{50} veya LC_{90} değeri/ Hassas popülasyonun LC_{50} veya LC_{90} değeri)

BEYDOM popülasyonu üzerinde seleksiyon baskısının oluşması için lambda cyhalothrin ve bifenthrin bu popülasyon üzerine 8 seleksiyon yapılarak devamlı olarak uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'te verilmiştir. Çizelge

4.3'ten anlaşılacağı üzere BEYDOM popülasyonuna, hassas popülasyonun lambda cyhalothrin için elde edilen LC_{90} değerinin uygulanması sonucu elde edilen LC_{50} ve LC_{90} değerleri sırasıyla 1. seleksiyon için; 0.430 ve 22.942 ppm, 2. seleksiyon için; 0.674 ve 21.990 ppm; 3. seleksiyon için; 1.054 ve 41.386 ppm, 4. seleksiyon için; 1.386 ve 39.665 ppm, 5. seleksiyon için; 2.230 ve 180.444 ppm, 6. seleksiyon için; 28.176 ve 201.055 ppm, 7. seleksiyon için, 29.617 ve 162.237 ppm ve 8. seleksiyon için, 50.706 ve 209.836 ppm olarak bulunmuştur.

Çizelgeden de görüleceği üzere LC_{50} değerlerine göre 6. seleksiyona gelinceye kadar lambda cyhalothrin için direnç oranı tespit edilememiştir. Hassas popülasyonun lambda cyhalothrin'e karşı gösterdiği LC_{50} değeri 6. seleksiyona gelinceye kadar BEYDOM popülasyonunun LC_{50} değerinden daha yüksek bulunmuştur. 6. seleksiyondan sonra hassasiyette bir azalma gözlenmiş olup, 8. seleksiyona kadar hassasiyet azalması giderek artmaya devam etmiştir. Sırasıyla hassas popülasyonun LC_{50} değerine oranla 6, 7 ve 8. seleksiyonlardan elde edilen direnç oranları; 10.13, 10.65 ve 18.24 olarak bulunmuştur. LC_{90} değerlerine göre ise ilk direnç oranı 3. seleksiyonda tespit edilmiştir. Sırasıyla hassas popülasyonun LC_{90} değerine oranla 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. seleksiyonlardan elde edilen direnç oranları; 1.60, 1.54, 7.01, 7.81, 6.30 ve 8.15 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının lambda cyhalothrin'e karşı gösterdiği probit-ölüm verileri ve direnç oranları

Lambda cyhalothrin	n	eğim±SE	χ^2 (df)	LC_{50} (ppm) (Güven aralıkları)	LC_{90} (ppm) (Güven aralıkları)	LC_{50}'ye göre RR	LC_{90}'a göre RR
GSS	459	1.326±0.176	18.326 (13)	2.779 (1.180-4.624)	25.728 (16.337-51.414)	-	-
Seleksiyon (0)	569	0.736±0.072	8.180 (16)	0.347 (0.222-0.539)	19.179 (9.071-54.834)	-	-
Seleksiyon (1)	564	0.742±0.073	12.003 (16)	0.430 (0.276-0.669)	22.942 (10.709-67.015)	-	-
Seleksiyon (2)	564	0.847±0.077	10.279 (16)	0.674 (0.464-1.003)	21.990 (11.181-55.545)	-	-
Seleksiyon (3)	564	0.804±0.074	13.753 (16)	1.054 (0.715-1.636)	41.386 (19.229-120.233)	-	1.60
Seleksiyon (4)	623	0.880±0.068	16.721 (18)	1.386 (0.992-1.984)	39.665 (21.781-86.835)	-	1.54
Seleksiyon (5)	630	0.672±0.061	9.705 (18)	2.230 (1.160-3.781)	180.444 (101.760-375.786)	-	7.01
Seleksiyon (6)	720	1.502±0.200	28.412 (21)	28.176 (15.704-40.858)	201.055 (136.178-378.275)	10.13	7.81
Seleksiyon (7)	630	1.735±0.129	17.780 (18)	29.617 (24.924-34.750)	162.237 (128.383-218.038)	10.65	6.30
Seleksiyon (8)	630	2.078±0.137	32.009 (18)	50.706 (41.412-61.830)	209.836 (158.463-306.151)	18.24	8.15

n= Kullanılan akar sayısı
RR= Direnç oranı (Popülasyonun LC_{50} veya LC_{90} değeri/ Hassas popülasyonun LC_{50} veya LC_{90} değeri)

Çizelge 4.4'ten anlaşılacağı üzere BEYDOM popülasyonuna, hassas popülasyonun bifenthrin için elde edilen LC_{90} değerinin uygulanması sonucu elde edilen LC_{50} ve LC_{90} değerleri sırasıyla 1. seleksiyon için; 0.189 ve 66.171 ppm, 2. seleksiyon için; 0.271 ve 60.351 ppm; 3. seleksiyon için; 0.242 ve 256.555 ppm, 4. seleksiyon için; 0.441 ve 309.936 ppm, 5. seleksiyon için; 0.426 ve 1344.691 ppm, 6. seleksiyon için; 6.757 ve 1887.390 ppm, 7. seleksiyon için, 4.148 ve 2110.961 ppm ve 8. seleksiyon için 10.913 ve 2447.600 ppm olarak bulunmuştur.

Çizelgeden de görüleceği üzere LC_{50} ve LC_{90} değerlerine göre 1. seleksiyondan itibaren hassasiyette bir azalma gözlenmiş olup, 8. seleksiyona kadar hassasiyet azalması giderek artmaya devam etmiştir. Sırasıyla hassas popülasyonun LC_{50} değerine oranla 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. seleksiyonlardan elde edilen direnç oranları; 1.28, 1.84, 1.64, 3.00,

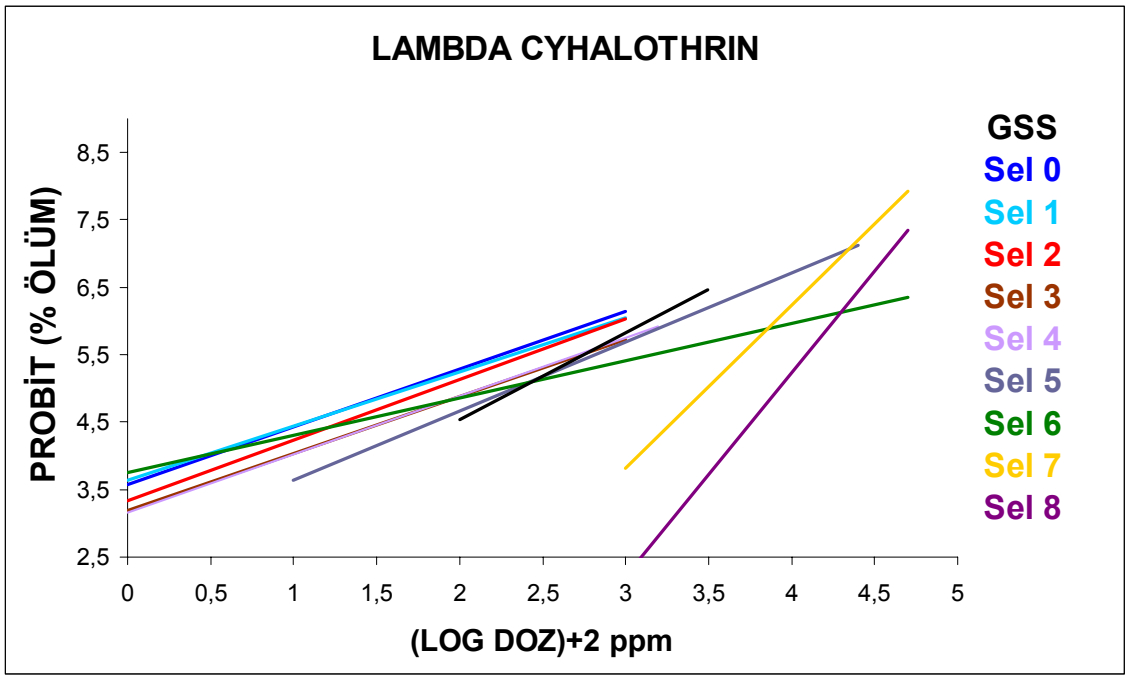
2.89, 45.96, 28.21 ve 74.23 olarak bulunmuştur. Hassas popülasyonun LC_{90} değerine oranla sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. seleksiyonlardan elde edilen direnç oranları ise 3.62, 3.30, 14.05, 16.97, 73.66, 103.39, 115.63 ve 134.07 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.4 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının bifenthrin'e karşı gösterdiği probit-ölüm verileri ve direnç oranları

Bifenthrin	**n**	**eğim±SE**	**χ^2 (df)**	**LC_{50} (ppm) (Güven aralıkları)**	**LC_{90} (ppm) (Güven aralıkları)**	**LC_{50}'ye göre RR**	**LC_{90}'a göre RR**
GSS	570	0.612±0.080	18.788 (16)	0.147 (0.051-0.319)	18.255 (6.481-101.740)	-	-
Seleksiyon (0)	570	0.555±0.073	21.172 (16)	0.075 (0.023-0.172)	15.339 (4.814-117.413)	-	
Seleksiyon (1)	570	0.504±0.083	38.420 (16)	0.189 (0.012-0.780)	66.171 (10.076- 13506.614)	1.28	3.62
Seleksiyon (2)	570	0.546±0.101	29.076 (16)	0.271 (0.016- 0.993)	60.351 (12.425- 4108.102)	1.84	3.30
Seleksiyon (3)	558	0.424±0.071	39.847 (16)	0.242 (0.021-1.199)	256.555 (20.742-761762.258)	1.64	14.05
Seleksiyon (4)	554	0.450±0.072	12.168 (16)	0.441 (0.167-1.063)	309.936 (59.834-6027.563)	3.00	16.97
Seleksiyon (5)	552	0.366±0.065	10.659 (16)	0.426 (0.149-1.189)	1344.691 (146.281-108927.85)	2.89	73.66
Seleksiyon (6)	558	0.524±0.087	13.251 (16)	6.757 (2.860-21.962)	1887.390 (292.087-63611.019)	45.96	103.39
Seleksiyon (7)	558	0.473±0.088	5.718 (16)	4.148 (1.557-13.625)	2110.961 (278.400-130224.81)	28.21	115.63
Seleksiyon (8)	569	0.545±0.069	7.252 (16)	10.913 (4.977-36.060)	2447.600 (419.599-44019.243)	74.23	134.07

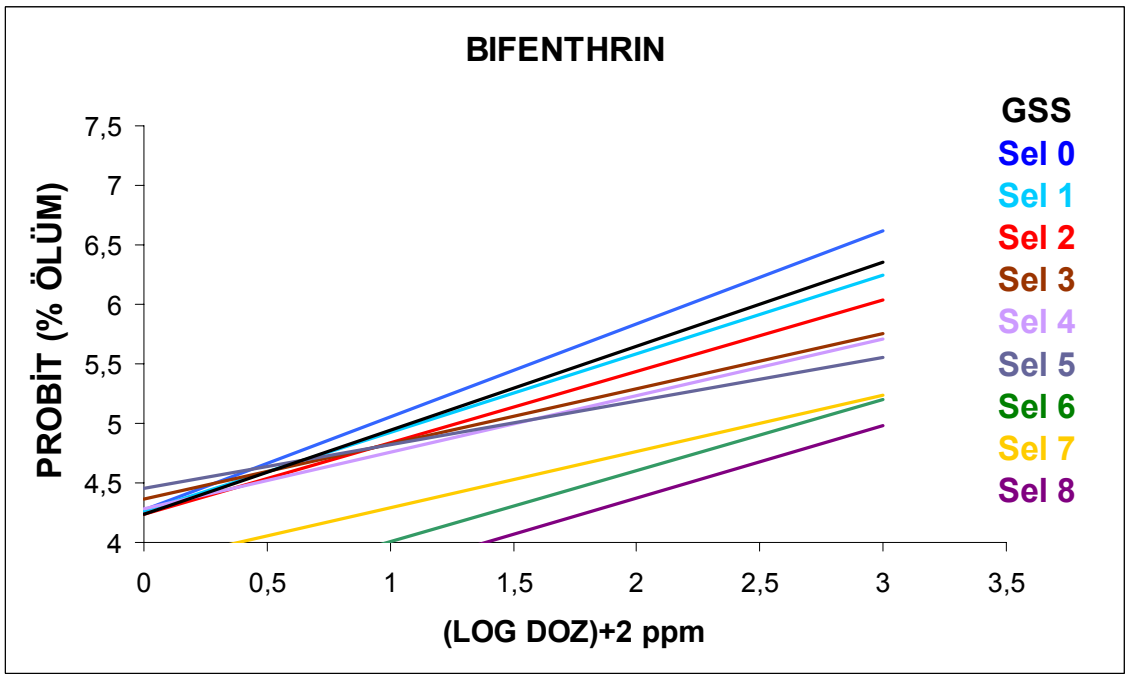
n= Kullanılan akar sayısı
RR= Direnç oranı (Popülasyonun LC_{50} veya LC_{90} değeri/ Hassas popülasyonun LC_{50} veya LC_{90} değeri)

Lambda cyhalothrin ve bifenthrin ile selekte edilen BEYDOM popülasyonuna ait logaritmik doz-probit doğruları ayrı ayrı çizilerek Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Sel: Seleksiyon

Şekil 4.1 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının lambda cyhalothrin'e karşı gösterdiği logaritmik doz- probit doğruları



Sel: Seleksiyon

Şekil 4.2 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının bifenthrin'e karşı gösterdiği logaritmik doz- probit doğruları

Logaritmik doz-probit doğrusunun eğimi, zehirli bir maddeye karşı reaksiyondaki değişimi göstermektedir (Hoskins 1960). Dik eğim, dozda meydana gelen en küçük bir değişimde ölüm oranında büyük bir değişikliğe neden olurken, yatık eğim bireyler arasındaki farklılığın fazla olduğunu ve daha fazla ölüm oranı elde etmek için daha yüksek dozlara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Eğimdeki belli bir azalma direncin oluşmaya başladığının işareti olup, seleksiyon devam ettikçe önce eğim azalmakta, daha sonra popülasyon içerisinde dirençli bireylerin oranının artması ile popülasyon daha homojen bir hale geldiğinde eğim tekrar artmaktadır. Homojen hassas veya dirençli popülasyonların, hassas ve dirençli bireyleri içeren heterojen popülasyonlara göre daha dik bir logaritmik doz-probit doğrusu eğimleri bulunmaktadır (Hoskins and Gordon 1956). Seleksiyon baskısı arttıkça eğim düşmekte ve grafiğin sağına doğru kaymaktadır.

Şekil 4.1'de BEYDOM popülasyonuna uygulanan lambda cyhalothrin'in 8 kez seleksiyonu ile elde edilen verilere göre logaritmik doz-probit doğruları verilmektedir. Şekil 4.1 ve Çizelge 4.3 birlikte incelendiğinde 6. seleksiyona gelinceye kadar selekte edilen tüm popülasyonların hemen hemen birbirine çok yakın LC_{50} değerlerine sahip olduğu ve bu yüzden doğruların da birbirine çok yakın olduğu, hatta GSS'in 7. seleksiyona gelinceye kadar diğer selekte edilen popülasyonlardan daha dik bir doğruya sahip olduğu görülmektedir. Bu doğrular grafiğin sol tarafında olup, daha heterojen bir yapıya sahiptirler. Lambda cyhalothrin ile selekte edilen BEYDOM popülasyonunda en dik doğrular 7 ve 8. seleksiyon popülasyonlarından elde edilmiş olup bu iki seleksiyona ait doğrular grafiğin en sağında yer almıştır. Bu durum bu popülasyonlarda bireylerin duyarlılık yönünden daha homojen ve dirençli olduklarını göstermektedir. Homojen ve dirençli popülasyonlar, direnç yönetim stratejilerinde kontrol edilebilmeleri oldukça zor olduğu için arzu edilmeyen bir popülasyon yapısını oluşturmaktadır.

Şekil 4.2'de BEYDOM popülasyonuna uygulanan bifenthrin'in 8 kez seleksiyonu ile elde edilen verilere göre logaritmik doz-probit doğruları verilmektedir. Şekil 4.2 ve Çizelge 4.4 birlikte incelendiğinde lambda cyhalothrin'de olduğu gibi 6. seleksiyona gelinceye kadar tüm doğruların birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Bifenthrin ile selekte edilen BEYDOM popülasyonunda 6, 7 ve 8. seleksiyon popülasyonlarına ait doğrular grafiğin sağ tarafında yer almış olup, direncin GSS'e oranla oldukça

farklılaştığını göstermektedir. Direnç oranı 8. seleksiyon popülasyonunda 74.23 katlık bir artışı göstermesine rağmen diğer seleksiyon popülasyonlarına göre daha yatık bir logaritmik doz-probit doğrusu çizmiştir. Bu durum bu popülasyonun hala homojen bir yapıya sahip olmadığını ve seleksiyon baskısının devam etmesi halinde direnç oranının çok yüksek düzeylere çıkabileceğini göstermektedir.

Belli bir akarisite karşı direncin gelişmesini belirlemede basit ve güvenilir biyoassay yöntemlerinin kullanımı son derece önemlidir. Petri kabı yöntemi, uygulamasının diğer yöntemlere göre daha kolay olması, hızlı sonuç vermesi ve güvenilir olması açısından direncin kısa sürede belirlenmesinde etkili bir şekilde kullanılabilir. Direnç oranlarını uygulanan metodun pek çok parametresi etkilemektedir (Dennehy *et al.* 1983). Yapraklı veya yapraksız biyoassay, kontakt veya rezidüel biyoassay, daldırma veya püskürtme uygulaması, farklı zaman aralıklarında ölüm oranlarının değerlendirilmesi ve kırmızı örümceklerde denemelerde kullanılan biyolojik dönemler elde edilen direnç düzeylerini değiştirebilmektedir (Stumpf and Nauen 2001). Bu çalışmada uygulanan petri kabı yöntemi, *T. urticae* gibi gözle görülmesi oldukça zor, küçük bireylerle rahatlıkla çalışılabilecek bir biyoassay yöntemidir. Ayrıca bu çalışmada, bu yöntemin akarisit uygulamasından yaklaşık 4 saat önce uygulanan sinerjistlerle yapılan çalışmalar için de oldukça uygun bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Test edilen bileşiklerin etki mekanizmalarına bağlı olarak *T. urticae*'nin ergin veya yumurtalarında kullanılmak üzere pek çok direnç izleme çalışması yapılmıştır (Keena *et al.* 1991, Herron *et al.* 1993, Campos *et al.*1996, Herron and Rophail 1998). Direncin izlenmesinde seleksiyon için ayırt edici bir dozun belirlenmesi direncin etkili bir şekilde kontrolü için gerekli bir yaklaşımdır. Kırmızı örümceklerde akarisitlere çok hızlı bir direnç gelişimi olduğu için, direncin erken belirlenmesi direnç yönetim stratejilerinin en temel gerekliliklerinden biridir. Ayırt edici bir dozla yapılan seleksiyon çok düşük (direncin pozitif izlenmesini engeller) veya çok yüksek (düşük düzeylerdeki direnci görmeyi engeller) bir doz arasında olmalıdır (Roush and Miller 1986). Bu çalışmada seleksiyon için kullanılan doz hassas popülasyonun LC_{90} değeri olup bu doz, düşük seviyelerde direncin izlenmesine imkan vermiştir. Yapılan seleksiyon çalışmaları sonucu BEYDOM popülasyonu LC_{50} ve LC_{90} değerlerine göre 8. seleksiyon

popülasyonunda lambda cyhalothrin'e sırasıyla 18.24 ve 8.15 kat, bifenthrin'e ise 74.23 ve 134.07 kat direnç kazanmıştır. Lambda cyhalothrin'e direnç oranı bifenthrin'e göre laboratuarda oldukça yavaş gelişmiştir. Benzer bir çalışmada Yang *et al.* (2002) 10 seleksiyon sonra *T. urticae*'de lambda cyhalothrin hassasiyetinin 5.7 kat, bifenthrin hassasiyetinin ise 14.8 kat azaldığını belirtmişlerdir. Bifenthrin direncinde meydana gelen bu hızlı artış selekte edilen popülasyonda bifenthrin direncinden major bir genin sorumlu olabileceğini göstermektedir. Aynı şekilde Yang *et al.* (2002) *T. urticae*'de 10 seleksiyon sonra organik fosforlu insektisit dimethoat'a 289.2 kat oranında azalan hassasiyetin sebebinin major bir gen olabileceğini ifade etmişlerdir.

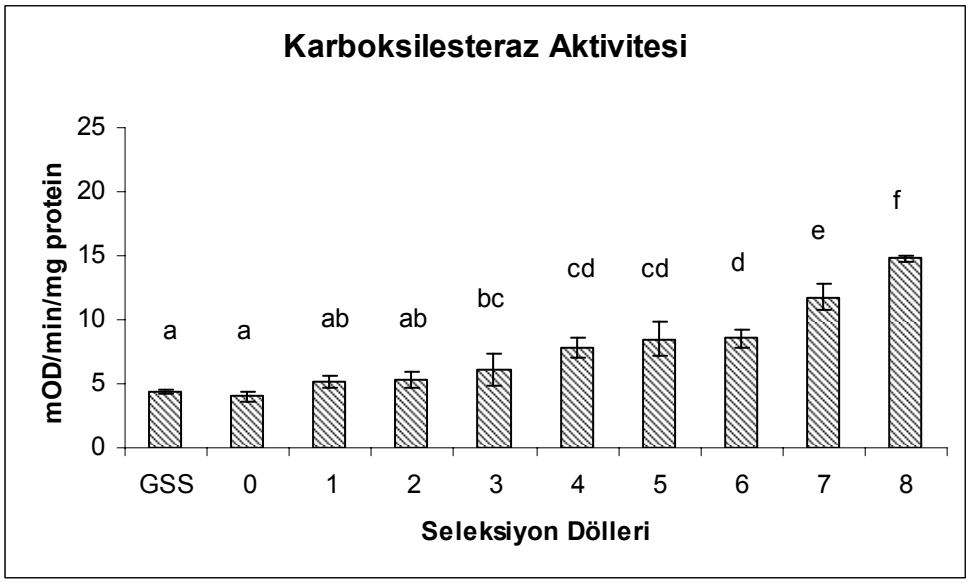
4.2 Biyokimyasal Sonuçlar ve Tartışma

Biyokimyasal çalışmalarda karboksilesteraz, glutation S-transferaz ve sitokrom P-450 monooksijenaz enzimlerinin aktiviteleri uygun metotlarla saptanmıştır. Karboksilesteraz enzimi ayrıca poliakrilamit jel elektroforez yöntemi ile de incelenmiştir.

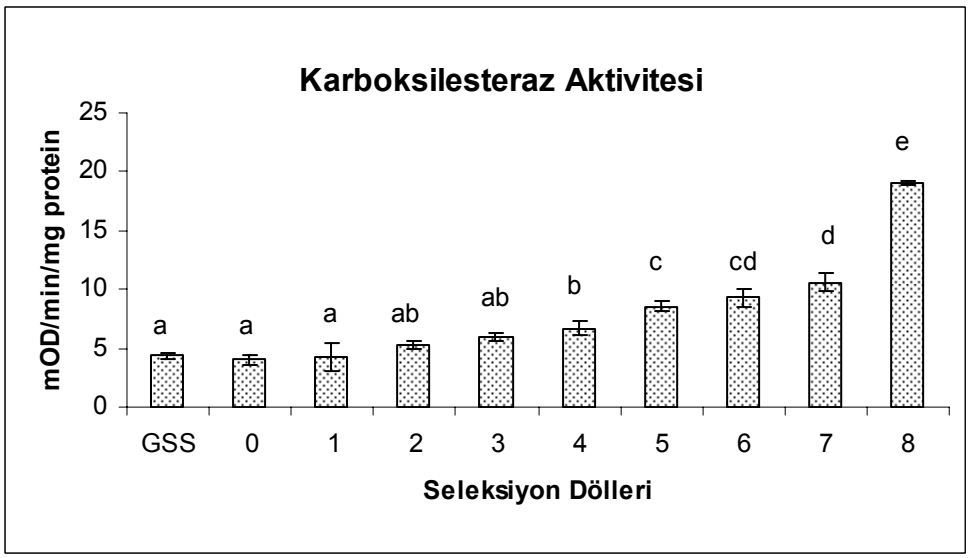
4.2.1 Karboksilesteraz enzim aktivitesinin ölçümü

Hassas ve selekte edilmiş popülasyonlara ait karboksilesteraz enzim aktiviteleri substrat α-naphtil acetate ile girdiği reaksiyonda kinetik olarak belirlenmiş ve 20 dk'daki toplam karboksilesteraz enzim aktiviteleri optik yoğunluk (O. D.) olarak ortaya konmuştur. Karboksilesteraz enzimlerine ait kinetik okuma sonuçları ve hassas popülasyona göre lambda cyhalothrin ve bifenthrin ile selekte edilmiş popülasyonlar arasındaki farklılıklar Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bu çalışmada her iki şekilde görüldüğü üzere karboksilesteraz enzim aktivitesi hassas popülasyona oranla seleksiyon sayısı arttıkça artış göstermiştir. Lambda cyhalothrin ile yapılan seleksiyonda karboksilesteraz enzim aktivitesi 3. seleksiyondan itibaren, bifenthrin için ise 4. seleksiyon popülasyonundan itibaren hassas popülasyona göre istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Her iki piretroitle ayrı ayrı selekte edilen BEYDOM popülasyonunda seleksiyon sayısının artması ile doğru orantılı olarak artan karboksilesteraz enzim aktivitesi lambda cyhalothrin ve bifenhtrin'e azalan hassasiyetle

ilişkili olarak bulunmuştur. Bifenthrin ile yapılan seleksiyon lambda cyhalothrin ile yapılan seleksiyona göre enzim aktivitesinin daha fazla artmasına sebep olmuştur.



Şekil 4.3 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının lambda cyhalothrin'e karşı gösterdiği karboksilesteraz enzim aktivitesi (P<0.05) (ANOVA, LSD test; F=41,25; df = 9, 130; P=0.00)



Şekil 4.4 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının bifenthrin'e karşı gösterdiği karboksilesteraz enzim aktivitesi (P<0.05) (A NOVA, LSD test; F=69,28; df = 9, 136; P=0.00)

Pek çok piretroit için karboksilesteraz hidrolizi detoksifikasyonda çok önemli bir yer tutmaktadır (Sogorb and Vilanova 2002). Yang *et al.* (2002) *T. urticae*'de bifenthrin'le seleksiyondan sonra esteraz aktivitesinde 1.3 katlık artış belirlemişlerdir.

Yang *et al.* (2002) benzer şekilde bifenthrin ile selekte edilen *T. urticae* popülasyonunun esteraz enzim aktivitesinin, lambda cyhalothrin ile selekte edilene göre daha yüksek düzeyde olduğunu belirtmişlerdir. *T. urticae*'de esteraz enzim aktivitesi bifenthrin ve lambda cyhalothrin gibi piretroitlere hassasiyette meydana gelen değişikliklerle ilişkili olarak bulunmuştur (Yang *et al.* 2001). Yine Yang *et al.* (2001) esteraz aktivitesini etkileyen bir sinerjist olan triphenyl phosphate (TPP) ile yaptıkları çalışmada *T. urticae*'de bifenthrin ve lambda cyhalothrin direncinin önemli derecede azaldığını bulmuşlardır. Bu sonuçlar *T. urticae*'de esteraz enzimlerinin piretroit insektisitlere dirençte önemli rol oynadığını göstermektedir. Kim *et al.* (2004) fenpyroximate'e dirençli FR-20 ırkında hassas (S) ırka göre α- ve β- naphtil acetate kullanılarak ölçülen esteraz hidroliz aktivitesinde sırasıyla 2.5 ve 2.2 katlık bir artış olduğunu belirlemişlerdir. Ay and Gürkan (2005) esteraz enzim aktivitesi ve bifenthrin direnci arasında poliakrilamit jel elektroforezi ve kinetik enzim aktivitesi ölçümlerine göre bir ilişkinin varlığını ortaya koymuşlardır. Leeuwen *et al.* (2006a) chlorfenapyr'e dirençli *T. urticae*'nin bir ırkında esteraz aktivitesi ve direnç arasında bir ilişki bulmuştur. Leeuwen *et al.* (2005) bifenthrin, dicofol ve fenbutatin oxit'e yüksek derecede direnç gösteren *T. urticae*'nin MR-VL ırkında daha çok esteraz aktivitesi olduğunu göstermiştir. Leeuwen and Tirry (2007) *T. urticae*'nin bifenthrin'e yüksek düzeyde direnç gösteren bir ırkında esteraz inhibitörü S,S,S tributyl-phosphorotrithioate (DEF)'in bifenthrin toksisitesini oldukça önemli düzeyde sinejize ettiğini bulmuştur. Rauch and Nauen (2003) spirodiclofen ile selekte edilen bir *T. urticae*'de ırkın selekte edilmeden kalan ilk hali ile karşılaştırıldığında karboksilesteraz aktivitesinde 1.2 katlık bir artış gözlemişlerdir. Leeuwen *et al.* (2004) *T. urticae*'nin chlorfenapyr ile 12 kez selekte edilen hassas bir ırkında esteraz inhibitörü DEF ile yapılan sinerjizm çalışmalarında chlorfenapyre karşı oluşan dirençte esteraz enzimlerinin büyük bir role sahip olduğunu bulmuşlardır. Leeuwen *et al.* (2006b) *T. urticae*'nin bifenazat'a hassas bir ırkına esteraz inhibitörü DEF uygulandığında bifenazate'in akarisit etkisinin tamamen ortadan kalktığını bildirmişlerdir.

Böceklerle yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara kısaca bakılacak olursa; yaprakbiti ve sivrisineklerde belli bir pestisit grubuna karşı direncin oluşmasında bir veya daha fazla karboksilesterazın aşırı ekspresyonunun sebep olduğu gösterilmiştir (Mouches *et al.* 1986, Field *et al.* 1988). *Myzus persicae*'de esteraz E4, organik fosforlu, karbamatlı insektisitler ve piretroitlerden permethrin'e karşı oluşan dirençten sorumlu bulunmuştur (Devonshire and Moores, 1982). Schoknecht and Otto (1989) böceklerde uygulanan karboksilesteraz assay'inin *T. urticae* bireylerinde 1-naftil asetatın hidrolize olma aktivitesini belirlemek için de oldukça uygun olduğunu belirtmişlerdir.

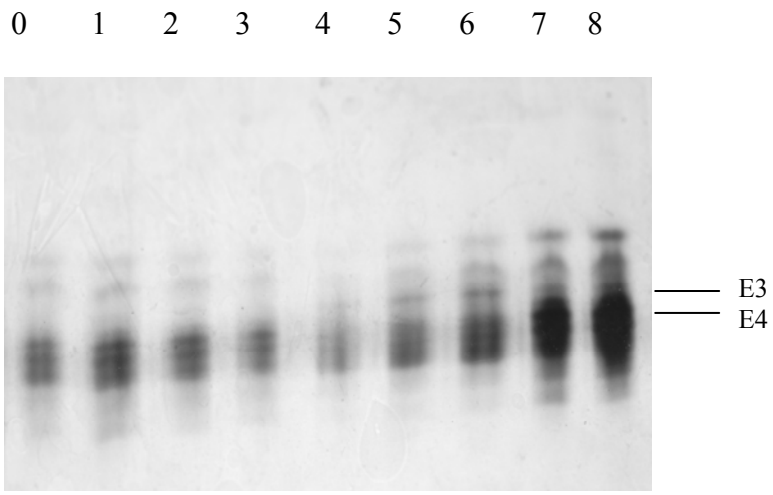
Poliakrilamit jel elektroforezi ile spesifik olmayan karboksilesteraz izozimlerinin incelenmesi

Organizmalarda ırkları veya popülasyonlar arasındaki genetik farklılıkları belirlemek için jel elektroforezi kullanılmaktadır (Goka and Takafuji 1992). Kırmızıörümceklerde elektroforez genetik farklılıkların yanında dirençli ve hassas popülasyonlardaki esteraz bantları arasındaki farklılıkları ortaya koymak için de kullanılmaktadır (Ay *et al.* 2005).

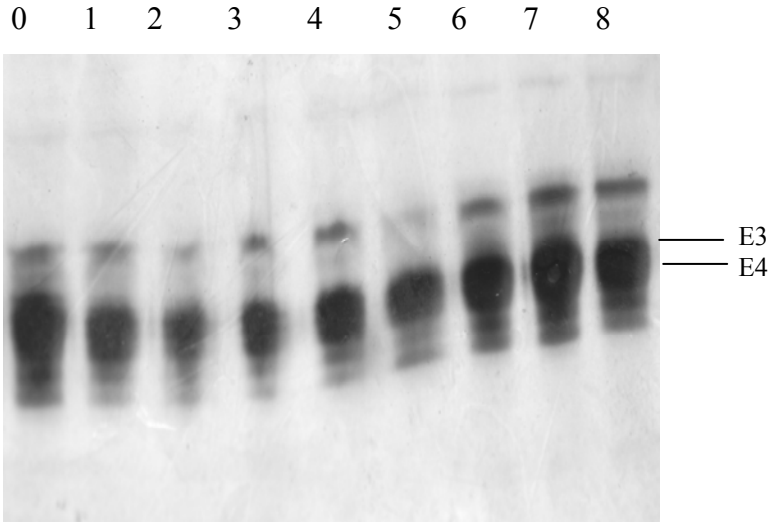
Pek çok akar türünde akarisit direnci esteraz enzimleri ile ilişkili bulunmuştur. α-naphtil acetate'ın substrat olarak kullanıldığı bu yöntemde, direnç ile kantitatif ilişkisinin olduğu belirlenen karboksilesteraz enzimi incelenmiştir. Lambda cyhalothrin ve bifenthrin ile selekte edilen BEYDOM popülasyonunda sırasıyla jelde her seleksiyon için yapılan elektroforetik ayrımda her iki piretroit için de artan seleksiyon sayısına bağlı olarak karboksilesteraz enzim bantlarının da kalınlaştığı gözlenmiştir. Her iki piretroitle seleksiyon sonucu kinetik enzim aktivite düzeyleri BEYDOM popülasyonunda geniş ölçüde birbirine benzer olup sadece miktar olarak birbirinden farklı bulunmuştur.

Lambda cyhalothrin ve bifenthrin ile yapılan seleksiyon sonucu elde edilen seleksiyon popülasyonlarının spektrofotometre ile yapılan analizlerle birlikte elektroforez sonuçları birlikte değerlendirildiğinde bant kalınlıkları ile enzim miktarlarından elde edilen

sonuçların beklendiği gibi birbiri ile paralel oldukları görülmüştür (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.5 Lambda cyhalothrinle selekte edilmiş seleksiyon popülasyonlarının (Seleksiyon (0-8)) karboksilesteraz aktivitesi



Şekil 4.6 Bifenthrin ile selekte edilmiş seleksiyon popülasyonlarının (Seleksiyon (0-8)) karboksilesteraz aktivitesi

Her iki direnç için yorum yapmak gerektiğinde artan karboksilesteraz enzim aktivitesinin lambda cyhalothrin ve bifenthrin direnci ile pozitif bir korelâsyona sahip olduğunu söylemek mümkündür.

Benzer çalışmalar incelenecek olursa; Kim and Lee (1990) akarisitlerden carbophenothion, ethion, dicofol, cyhexation ve bifenthrin ile *T. urticae*'de seleksiyon yapmış ve seleksiyon sonrası poliakrilamit jel elektroforezi ile esteraz izozimlerini ayırmışlar ve dirençli ve hassas ırkların esteraz izozimlerinde farklılıklar gözlemlemişlerdir. Yine *T. urticae*'de Weyda *et al*. (1984) thiometon'a dirençli ve hassas ırklar arasında poliakrilamit jel elektroforezinde faklı bant şekilleri ve bant sayıları bulmuşlardır. Bu farklılıklar esterazların test edilen akarisitlerin direnç mekanizmaları ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar pek çok benzer çalışmada da doğrulanmıştır (Sundukov *et al.* 1989, Capua *et al.* 1990). *T. kanzawai* Kishida (Acarina: Tetranychidae)'de malathion direnci E3 ve E4 bantlarında görülen esteraz aktivitesindeki bir artışla ilişkili olarak bulunmuştur (Kuhawara 1984). Yaptığımız çalışmada da her iki jel fotoğrafında 6. seleksiyondan itibaren yukarından aşağı doğru bantlar sayıldığında E3 ve özellikle de E4 esteraz bantlarında hassas popülasyona ve selekte edilen diğer popülasyonlara göre kalınlaşma olduğu gözlenmiştir. Yine Ay and Gürkan (2005) bifenthrin'e dirençli PAM ve URF popülasyonlarında E4 bandının daha kalın olduğunu buna karşılık hassas popülasyonda bu bandın gözlenmediğini belirtmiştir.

Sonuç olarak çalışmamız lambda cyhalothrin ve bifenthrin detoksifikasyonunda karboksilesteraz enzimlerinin rolü olduğunu göstermektedir.

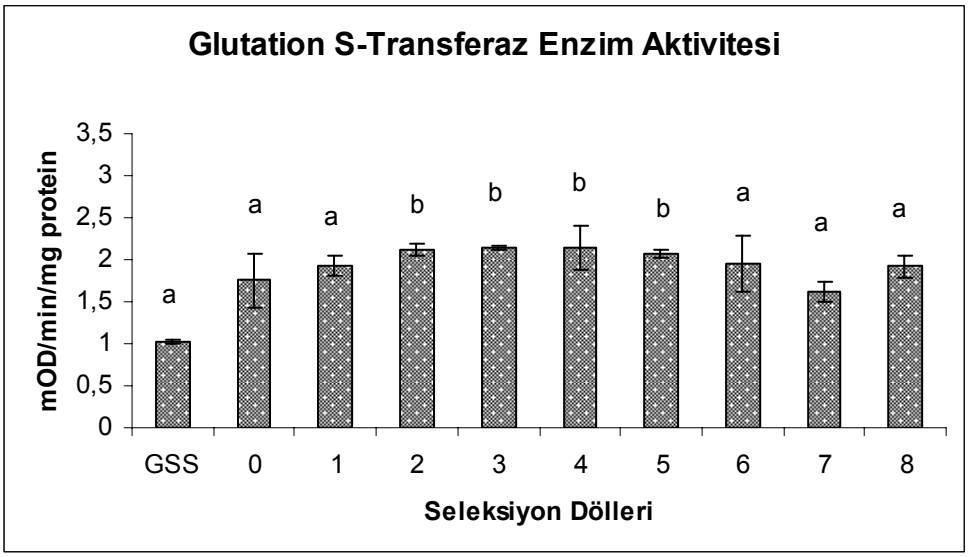
4.2.3 Glutation S-transferaz enzim aktivitesinin ölçümü

Böceklerde GST aktivitesi genellikle yapay substrat CDNB ile ölçülmektedir. Bu bileşik glutation ile konjugasyona girerek böceklerde test edilen tüm GST izoenzimlerini katalizlemektedir (Clark 1989). İnsektisitlere karşı dayanıklılıkta GST'lerin önemli bir role sahip olduğuna dair birçok çalışma Lewis (1969) tarafından gösterilmiştir.

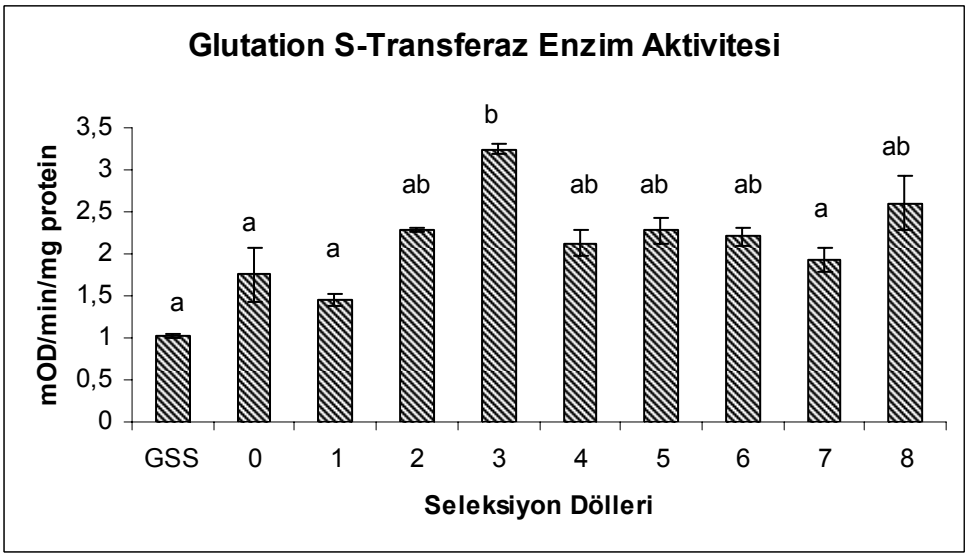
Çalışmamızda hassas popülasyon ve selekte edilmiş popülasyonların her bir seleksiyonuna ait GST enzim aktiviteleri kinetik olarak belirlenmiş ve 20 dk'daki

toplam enzim aktivitesi optik yoğunluk (O. D.) olarak ortaya konmuştur. Glutation S-transferaz enzimlerine ait kinetik okuma sonuçları ve hassas popülasyona göre lambda cyhalothrin ve bifenthrin ile selekte edilmiş popülasyonlar arasındaki farklılıklar Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Şekil 4.7 incelendiğinde BEYDOM popülasyonunun GST enzim aktivitesinin hassas popülasyona göre 2, 3, 4 ve 5. seleksiyon popülasyonlarında arttığı daha sonra ise tekrar hassas popülasyonla aynı seviyeye düştüğü belirlenmiştir. Bu seleksiyon popülasyonlarında GST aktivitesi hassas popülasyona göre istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Şekil 4.7).

Bifenthrin ile selekte edilen döllerin GST enzim aktivitesi incelendiğinde artan seleksiyona bağlı olarak oluşan dirençte özellikle 3. seleksiyon popülasyonunda hassas popülasyona göre istatistiki olarak önemli bir enzim artışı görülmüştür. Fakat takip eden seleksiyonlarda enzim aktivitesi hassas popülasyon ile istatistiki olarak aynı seviyeye düşmüştür. 3. seleksiyon popülasyonu hariç GST enzim aktivitesinin bifenthrin direncinde herhangi bir rolü bulunmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.8). Benzer çalışmalara bakılacak olursa; Yang *et al.* (2002)'a göre GST enzim aktivitesi bifenthrin'e karşı oluşan hassasiyet azalması ile ilişkili bulunmamıştır. Kim *et al.* (2004) fenpyroximate'e dirençli FR-20 ırkı ile hassas ırk (S) arasında GST aktivitesi açısından herhangi bir farklılık gözlememişlerdir. Leeuwen *et al.* (2006a) chlorfenapyr'e dirençli ve hassas *T. urticae* ırkları arasında GST aktivitesi açısından önemli düzeyde farklılık bulmamışlardır. Leeuwen *et al.* (2005) bifenthrin, dicofol ve fenbutatin oxit'e yüksek derecede direnç gösteren *T. urticae*'nin MR-VL ırkında GST enzimlerinin herhangi bir role sahip olmadıklarını belirtmiştir. Rauch and Nauen (2003) spirodiclofen ile selekte edilen bir *T. urticae* ırkında substrat olarak CDNB kullanılarak ölçülen GST enzim aktivitesinde 1.2 katlık bir artış olduğunu belirtmişlerdir. *T. urticae*'nin abamectin'e dirençli NL-00 ve COL-00 ırklarında hassas ırk GSS'e göre GST aktivitesi CDNB ve monochlorobimane substratları ile ölçülmüştür. COL-00 ve NL-00 ırklarında CDNB substratı kullanılarak ölçülen GST aktivitesinde sırasıyla 1.6- ve 2.0-katlık bir artış gözlenmiştir (Stumpf and Nauen 2002).



Şekil 4.7 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının lambda cyhalothrin'e karşı gösterdiği glutation S- transferaz enzim aktivitesi (P<0.05) (ANOVA, LSD test; F=0,968; df = 9, 29; P=0,485)



Şekil 4.8 GSS ve seleksiyon popülasyonlarının bifenthrin'e karşı gösterdiği glutation S-transferaz enzim aktivitesi (P<0.05) (ANOVA, LSD test; F=1,468; df = 9, 75; P=0,175)

4.2.4 Sitokrom P450 monooksijenaz (MO) enzim aktivitesinin ölçülmesi

Genel olarak yapay substratlarla bu enzimin ölçülmesi arthropodlarda karboksilesteraz veya GST aktivitesinin ölçümleri ile karşılaştırıldığında daha zor olmaktadır. Bu enzim sisteminin incelenebilmesi için çok fazla miktarda biyolojik materyale ihtiyaç vardır. Kırmızıörümcek homojenatlarında bu enzimin ölçülebilmesi için mikroplate'in her hücresinde en az 100 adet ergin dişiye ihtiyaç duyulmaktadır. Kısacası bu assay'in çok fazla sayıda kırmızı örümceğe gereksinim duyulması ve 100000*g* gibi oldukça yüksek santrifüj isteğinin olması gibi 2 dezavantajı bulunmaktadır.

Çizelge 4.5'te görüldüğü üzere sitokrom P450-MO enzim aktivitesi substrat olarak PNOD kullanıldığında hassas popülasyona oranla her iki piretroitle selekte edilen 8. seleksiyon popülasyonunda istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Substrat olarak ECOD kullanıldığında sitokrom P450 enzim aktiviteleri hassas popülasyona oranla istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır (Çizelge 4.6). Bu sonuçlar NADPH ilavesi ile ECOD aktivitesinin ölçülmesinin çok küçük bir vücut yapısına sahip olan kırmızı örümceklerde bireysel olarak mümkün olmadığına dair sonuçları doğrulamaktadır (Stumpf 2001). Çalışmamızda da substrat olarak ECOD kullanıldığında anlamlı bir enzim aktivitesi elde edilememiştir ve bu substratla ölçülen sitokrom P450-MO enzim aktivitesi için *T. urticae*'nin uygun bir organizma olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.5 Lambda cyhalothrin ve bifenthrin ile selekte edilen 8. seleksiyon ve GSS popülasyonlarında PNOD'a göre sitokrom P450-MO enzim aktivitesi (P<0.05) (ANOVA, LSD test; F=8,31; df = 2, 29; P=0,001)

Popülasyon	**PNOD (*p*-nitroanisole) (mOD/min/µg protein)**
GSS (hassas)	0,015±0.002 a
L (Seleksiyon (8))	0,037±0.003 b
B (Seleksiyon (8))	0,042±0.006 b

L: Lambda cyhalothrin; B: Bifenthrin

Çizelge 4.6 Lambda cyhalothrin ve bifenthrin ile selekte edilen 8. seleksiyon ve GSS popülasyonlarında ECOD'a göre sitokrom P450-MO enzim aktivitesi (P<0.05) (ANOVA, LSD test; F=0,67; df = 2, 25; P=0,519)

Popülasyon	**ECOD (7-ethoxycoumarin) (unit/ml/µg protein)**
GSS (hassas)	0,00031±0.00 a
L (Seleksiyon (8))	0,00036±0.00 a
B (Seleksiyon (8))	0,00048±0.00 a

L: Lambda cyhalothrin; B: Bifenthrin

Monooksijenazlar akarlarda çok iyi çalışılmamıştır. Motoba *et al.* (2000) türe spesifik detoksifikasyonun fenproxymate direncinin başlıca sebebi olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcılar *T. urticae*'de P450 izoformlarının lepidoptera takımını da içeren diğer organizmalardan farklı olduğunu belirtmişlerdir. Mozes-Koch *et al.* (2000) *Varroa* akarda 2000*g*'de elde ettikleri homojenatta substrat olarak *p*-nitroanisole kullanarak yüksek MO aktivitesi elde etmişlerdir. Stumpf and Nauen (2001) ve Sato *et al.* (2004) *T. urticae*'de fenproximate direncinin artan monooksijenaz enzim aktivitesinden kaynaklandığını ve direncin de eksik (tam olmayan) baskın tek bir gen tarafından kontrol edildiğini belirtmişlerdir.

Kim *et al.* (2004), MO ile metabolik detoksifikasyonun *T. urticae*'nin fenpyroximate'e dirençli FR20 ırkında önemli bir role sahip olduğunu ve fenpyroximate toksisitesinin sinerjist PBO ile önemli düzeyde arttığını bulmuşlardır. Bu popülasyonla mücadelede PBO'nun etkili bir sinerjist olarak kullanılabileceğini de önermişlerdir. Leeuwen *et al.* (2006a), chlorfenapyr'e karşı oluşan direnci P450 monooksijenaz aktivitesinin artışı ile ilişkili olarak bulmuşlardır. Leeuwen *et al.* (2005) bifenthrin, dicofol ve fenbutatin oxit'e dirençli *T. urticae*'nin MR-VL ırkında 7-EFC ve 7-EC substratları kullanıldığında sitokrom P450 monooksijenaz enzim aktivitesinde sırasıyla 3 ve 4 katlık bir artış gözlemişlerdir. Roditakis *et al.* (2006) *B. tabaci*'nin dirençli bir Q biyotipinde α-cypermethrin'e direncin mekanizmalarını çalışmışlardır. Substrat olarak ethoxycoumarin kullanılarak ölçülen sitokrom P450 enzim aktivitesi hassas SUD-S ırkı ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Sato *et al.* (2006) *Amblyseius womersleyi* Schicha'nin methidathion'a dirençli ve hassas ırklarında MO aktivitesini biyokimyasal olarak ölçmüşlerdir. Monooksijenaz enzim aktivitesi Kanaya ırkının selekte edilmiş dirençli ırkında (Kanaya R), selekte edilmemiş ırkına (Kanaya S) ve hassas ırka (Ishigaki S) oranla sırasıyla 3.60- ve 5.42 kat daha yüksek bulunmuştur. Rauch and Nauen (2003) spirodiclofen ile selekte edilen bir *T. urticae* ırkının selekte edilmeden kalan ilk hali ile karşılaştırıldığında monooksijenaz aktivitesinde 2.1 katlık bir artış gözlemişlerdir. Zhang *et al.* (2007) Beijing'de bir çöplükten 1998 yılında topladıkları bir karasinek ırkında piretroit direncinin olası mekanizmalarını belirlemek için bu ırkı beta-cypermethrin ile selekte etmişlerdir. Dirençli ırk ve hassas ırk sitokrom P450 enzim aktiviteleri açısından karşılaştırıldığında aradaki farkın önemli olmadığı bulunmuştur.

Sinerjistik Çalışmaların Sonuçları ve Tartışma

Sinerjistler, kendi başlarına zehirli olmamalarına rağmen bir insektisitin zehirliliğini arttıran bileşikler olarak tanımlanır. Kısacası zehirli olmayan bileşikler, böcek öldürücü ilaçların zehirliliğini arttırmaya katkıda bulunduğunda sinerjist olarak adlandırılırlar. Bazı enzim inhibitörleri de özellikle dirençli ırklarda insektisitleri detoksifiye eden enzimleri bloke ederek iyi sinerjistler olarak davranırlar. Yine de bazı böcek öldürücü ilaçlar karışım şeklinde kullanıldığında zehirli olmayan dozlarda diğer böcek öldürücü ilaçların zehirliliğini de artırabilirler.

Dirençli böcek ırklarında bazı insektisitlerin toksisitesini artırmak için enzim inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu durumda sinerjistler direncin metabolik mekanizmalarının faydalı göstergeleri olarak görev yapmaktadırlar. Sinerjistik çalışmalar olası metabolik direnç mekanizmalarının belirlenmesinde ilk basamak olarak düşünülmektedir (Scott 1990). Spesifik bir sinerjistin varlığında ve yokluğunda yapılan bir biyoassay sonucu elde edilen sinerjizm derecesi pestisit metabolizmasında detoksifikasyon enzimlerinin rolünü ortaya koymaktadır (Brindley and Selim 1984).

Bu çalışmada da *T. urticae*'de piretroit insektisitlerden lambda cyhalothrin ve bifenthrin'e karşı oluşabilecek olası direnç mekanizmalarını araştırmak için 3 sinerjist kullanılmıştır. Karboksilesteraz enzimlerini inhibe eden S,S,S-tributyl-phosphorotrithioate (DEF) (2000 mg/L) ilaç ile birlikte uygulandığında, lambda cyhalothin ile selekte edilerek elde edilen 8. seleksiyon popülasyonunun 50.706 ppm olan LC_{50} değeri 36.297 ppm'e düşmüştür. Aynı şekilde bifenthrin ile selekte edilerek elde edilen 8. seleksiyon popülasyonunun 10.913 ppm olan LC_{50} değeri 1.870 ppm'e düşmüştür. Sinerjizm oranları LC_{50} değerlerine göre lambda cyhalothrin ve bifenthrin için sırasıyla 1.39 ve 5.83 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7). Elde edilen LC_{50} değerlerinin güven aralıkları arasındaki farkın önemli olduğu ve bu iki ilaca karşı *T. urticae*'de oluşan piretroit direncinde karboksilesteraz enzim aktivitesinin katkısının olduğu bulunmuştur. Gerek spektrofotometre ile selekte edilen tüm döllerde ölçülen enzim aktivitesi, gerekse poliakrilamit jel elektroforezi sonucu elde edilen sonuçlar, sinerjistik çalışmadan elde edilen sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde her iki

piretroite karşı oluşan dirençte karboksilesteraz enzim aktivitesinin artışının önemli rol oynadığı söylenebilir.

Glutation S-transferaz enzimlerini inhibe eden diethylmaleate (DEM) (100 µg/mL) ilaç ile birlikte uygulandığında, lambda cyhalothin ile selekte edilerek elde edilen 8. seleksiyon popülasyonunun 50.706 ppm olan LC_{50} değeri 53.867 ppm olarak bulunmuştur. Aynı şekilde bifenthrin ile selekte edilerek elde edilen 8. seleksiyon popülasyonunun 10.913 ppm olan LC_{50} değeri 6.295 ppm olarak bulunmuştur. Sinerjizm oranları; lambda cyhalothrin ve bifenthrin için sırasıyla 0.94 ve 1.73 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7). Elde edilen LC_{50} değerlerinin güven aralıklarına bakıldığında herhangi bir farklılık olmadığı ve sonuç olarak bu iki ilaca karşı *T. urticae*'de oluşan piretroit direncinin glutation S-transferaz enzim aktivitesinden kaynaklanmadığı düşünülmektedir. Spektrofotometre ile selekte edilen tüm popülasyonlarda ölçülen enzim aktivitesi, sinerjistik çalışmadan elde edilen sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde her iki piretroite karşı direncin oluşmasında glutation S-transferaz enzim aktivitesinin herhangi bir öneme sahip olmadığı söylenebilir.

Sitokrom P450-MO enzim inhibitörlerinden piperonylbutoxide (PBO) (1000 µg/mL) ilaç ile birlikte uygulandığında, lambda cyhalothin ile selekte edilerek elde edilen 8. seleksiyon popülasyonunun 50.706 ppm olan LC_{50} değeri 3.104 ppm'e düşmüştür (Çizelge 4.7). Aynı şekilde bifenthrin ile selekte edilerek elde edilen 8. seleksiyon popülasyonunun 10.913 ppm olan LC_{50} değeri de 0.565 ppm'e düşmüştür. Sinerjizm oranları; lambda cyhalothrin ve bifenthrin için oldukça yüksek olup sırasıyla 16.33 ve 19.31 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7). Sinerjizm oranları lambda cyhalothrin ve bifenthrin direncinde sitokrom P450-MO enzim aktivitesinin çok etkili olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.7). Elde edilen LC_{50} değerlerinin güven aralıkları arasındaki farkın önemli olduğu ve bu iki ilaca karşı *T. urticae*'de oluşan piretroit direncinde sitokrom P450-MO enzim aktivitesinin katkısının yüksek olduğu düşünülmektedir. Spektrofotometre ile 8. seleksiyon popülasyonunlarında ölçülen enzim aktivitesi, sinerjistik çalışmadan elde edilen sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde her iki piretroite karşı oluşan dirençte sitokrom P450-MO enzim aktivitesinin büyük rol oynadığı söylenebilir.

Çizelge 4.7 *Tetranychus urticae*'nin 8. seleksiyon popülasyonları üzerinde esteraz, glutation S-transferaz ve sitokrom P450-MO enzim inhibitörlerinin sinerjistik etkisi

Seleksiyon	İlaç+ sinerjist	n	eğim±SE	χ^2 (df)	LC_{50} (ppm) (Güven aralıkları)	LC_{90} (ppm) (Güven aralıkları)	LC_{50}'ye göre SR	LC_{90}'a göre SR
Lambda cyhalothrin (Seleksiyon(8))		630	2.078±0.137	32.009 (18)	50.706 (41.4-61.8)	209.836 (158.4-306.1)		
	+ DEF	626	2.569±0.174	12.483 (18)	36.297 (32.0- 40.9)	114.481 (96.3-141.4)	1.39	1.83
	+ DEM	624	2.010±0.139	22.511 (18)	53.867 (44.7-64.4)	233.875 (181.3-324.7)	0.94	0.89
	+ PBO	442	1.557±0.202	44.948 (12)	3.104 (0.4- 6.6)	20.646 (10.1- 69.5)	16.33	10.1
Bifenthrin (Seleksiyon(8))		569	0.545±0.069	7.252 (16)	10.913 (4.9-36.0)	2447.600 (419.5-44019.2)		
	+ DEF	575	0.608±0.110	6.071 (16)	1.870 (0.8-3.9)	240.502 (62.7-3363.1)	5.83	10.1
	+ DEM	521	0.552±0.075	8.165 (15)	6.295 (2.8- 21.3)	1317.963 (218.1- 28281.5)	1.73	1.85
	+ PBO	525	0.826±0.214	11.193 (15)	0.565 (0.0- 1.2)	20.073 (8.2-201.9)	19.31	121.9

n= Kullanılan akar sayısı
SR= Sinerjism oranı (Popülasyonun LC_{50} değeri/ Sinerjist uygulanmış popülasyonun LC_{50} değeri)

Her 3 enzim grubu birlikte değerlendirildiğinde bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçları destekleyen diğer çalışmalara bakılacak olursa; *T. urticae*'de DEF, TPP ve profenofos gibi esteraz inhibitörleri abamectin, organik fosforlu ve piretroit direncini sinerjize etmişlerdir (Bynum and Archer 2001, Stumpf and Nauen 2002, Tsagkarakou *et al.* 2002). *T. urticae*'de TPP, PBO ve DEM sinerjistleri bifenthrin'in toksisitesini artırmışlardır. Bu çalışmaya göre elde edilen sinerjizm oranları sırasıyla TPP, PBO ve DEM için 6.2, 4.1 ve 4.5 olarak bulunmuştur (Yang *et al.* 2001). Bynum *et al.* (1997) esteraz inhibitörü DEF'in *O. pratensis* (Banks) ve *T. urticae*'de bifenthrin toksisitesini sırasıyla 2.9 ve 7.7 kat artırdığını bulmuşlardır. NL-00 ırkında gözlenen abamectin direncinin PBO ve DEM sinerjistleri tarafından sırasıyla 4.4 ve 6.1 gibi yüksek düzeylerde sinerjize edildiğini ve bu durumda da abamectin direncinde MO ve GST enzimlerinin rol oynadığını belirtmişlerdir (Stumpf and Nauen 2002). Yine aynı araştırıcılar abamectin direncinde esteraz sinerjisti profenofos ile yaptıkları sinerjist denemesinde 1.1 gibi çok düşük miktarda bir sinerjizm oranı elde ederek esteraz

enzimlerinin dirençte bir rolü olmadığını da ortaya koymuşlardır. Leeuwen and Tirry (2007) bifenthrin'e yüksek düzeyde direnç gösteren *T. urticae*'nin tarladan toplanmış dirençli bir ırkında esteraz inhibitörü DEF'in bifenthrin toksisitesini en az 9 kat sinerjize ettiğini bulmuşlardır. Roditakis *et al.* (2006) *B. tabaci*'nin oldukça dirençli bir Q biyotipinde α-cypermethrin'e karşı oluşan direncin metabolik inhibitörler PBO ve DEF tarafından sinerjize edildiğini bulmuşlardır. Leeuwen *et al.* (2004) chlorfenapyr'e dirençli *T. urticae*'de esteraz, monooksijenaz ve glutation S-transferaz enzimlerinin inhibitörleri DEF, PBO ve DEM ile yaptıkları sinerjizm çalışmalarından elde ettikleri sinerjizm oranlarını sırasıyla 2.11, 0.98 ve 0.98 olarak bulmuşlar ve esteraz enzimlerinin chlorfenapyr direncinde büyük bir role sahip olduğunu göstermişlerdir. Leeuwen *et al.* (2006b) bifenazate'a dirençli *T. urticae*'de metabolik direnç mekanizmalarını test etmek için in vitro enzim çalışmaları ile birlikte sinerjistler kullanarak detoksifikasyon enzimlerini de çalışmışlardır. Dirençli ırkta herhangi bir sinerjizm bulmamışlardır. Kim *et al.* (2006) *T. urticae*'nin pyridaben'e dirençli bir tarla popülasyonunda farklı metabolik inhibitörlerle yaptıkları sinerjizm çalışmalarında kullanılan sitokrom P450-MO enzim inhibitörü PBO'nun pyridaben direncinde önemli rol oynadığını bulmuşlardır. Diğer bir çalışmada ise *T. urticae*'de organik fosforlu ve piretroit direncini DEF, TPP ve profenofos gibi esteraz inhibitörleri sinerjize etmiştir (Bynum and Archer 2001, Tsagkarakou *et al.* 2002).

4.4 Resiprokal Çaprazlama Sonuçları ve Tartışma

Tarla popülasyonlarında insektisit direncinin genetiğini anlamak bilimsel bir direnç yönetiminin ön koşullarından birisidir. Popülasyon genetiği dirence sebep olan genlerin belirlenmesi, direnç genlerinin tarla popülasyonlarında bulunma sıklığının belirlenmesi, direncin kalıtımı ve zaman içerisinde direnç allel sıklığındaki artışı etkileyen faktörleri içermektedir. Direnç mekanizmalarının tanımlanması, belirlenmesi ve direnci izleme metotlarından oluşan genetik çalışmalar direnç yönetim stratejilerinin temellerini oluşturmaktadır.

Yeni bir toksik madde zararlının savaşımı için kullanıldığında direnç allellerinin popülasyonlarda çok az olduğu tahmin edilmektedir. Eğer popülasyonlar ilgili veya ilgisiz toksinlere önceden maruz kalmışsa (yeni bir toksik maddeyi içeren moleküllere karşı dirence sebep olan mekanizmalar seçilmiş olabilir) bu durum geçerli olmayabilir. Çapraz direnç yoksa direnç allellerinin sıklığının az olması beklenir. Bu aşamada küçük popülasyonlardan dirençli böcek genotiplerini izole etmek çok zordur. Sonuç olarak, direncin kendi kendine seleksiyonunun zor olduğu tahmin edilir. Buna rağmen, popülasyonlar bir toksik maddenin belli dozlarına devamlı olarak maruz kalırlar ise direnç allellerinin sıklığı artmaya başlar ve seleksiyon baskısı altında önceden var olan birden fazla direnç mekanizması seçilmiş olabilir. Bu durum dirençli popülasyonlarda olan çok genel bir durumdur.

Kırmızıörümceklerde etkili bir direnç yönetimi; bu türün ekolojisinin ve popülasyon genetiğinin çok iyi anlaşılmasını gerektirir. Kırmızıörümceklerde bir veya daha fazla bileşiğe karşı oluşan direncin genetiği *T. urticae, T. kanzawai, T. pacificus, T. telarius, P. ulmi* ve *P. citri*'de çalışılmıştır (Cranham and Helle 1985). Bu zararlılarda görülen direnç genellikle monogenik (tek bir lokusta major bir gen tarafından kontrol edilen özellik), baskın veya eksik baskın özelliklerini taşımaktadır. *Tetranychus* cinsinde pek çok akarisite direncin kalıtımı çalışılmıştır. Direncin kalıtımı kullanılan akarisitlere, kırmızıörümcek türlerine ve kırmızıörümceklerin çoğalma şekillerine göre değişmektedir (Croft and Van De Baan 1988, Rizzieri *et al.* 1988, Hoy and Conley

1989, Keena and Granett 1990, Martinson *et al.* 1991, Herron and Rophail 1993, Yamamoto *et al.* 1995, Goka 1998, Uesugi *et al.* 2002).

Sonuçları incelemek gerekirse; lambda cyhalothrin için hassas ve dirençli 8. seleksiyon popülasyonlarının LC_{50} değerleri sırasıyla 2.779 ve 50.706 ppm olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8). Resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F1 dişilerinin gösterdiği LC_{50} değerleri birbirinden farklı bulunmuştur. Bu durum F1 dişilerinde lambda cyhalothrin direncinde dişiden gelen bir etkinin olduğunu göstermektedir. SR ve RS tipi resiprokal çaprazlamalarda F1 dişilerinin LC_{50} değerleri birbirinden farklı olup 10.989 ve 15.892 ppm olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8). SR ve RS çaprazlamalarından elde edilen F1 dişilerinde formülden hesaplanan baskınlık dereceleri ise sırasıyla eksik (tam olmayan) baskın (0.649) ve tam baskın (0.903) olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.8 Resiprokal F1 ve F2 dişilerinin lambda cyhalothrin'e karşı gösterdiği probit-ölüm verileri ve direnç oranları

Popülasyon	**Genotip**	**N**	**eğim±SE**	**χ^2 (df)**	**LC_{50} (ppm) (Güven aralıkları)**	**LC_{50}'ye göre RR**	***D***
GSS	S	459	1.326±0.176	18.326 (13)	2.779 (1.180-4.624)	-	
L (Seleksiyon(8))	R	630	2.078±0.137	32.009 (18)	50.706 (41.412-61.830)	18.24	
F1	SR	523	1.630±0.160	10.312 (15)	10.989 (8.813- 13.218)	3.95	0.649
F1	RS	569	1.755±0.146	11.308 (16)	15.892 (13.384-18.617)	5.71	0.903
F2	SR × S	538	1.449±0.127	10.832 (15)	7.804 (6.341-9.474)	2.80	
F2	RS × R	565	1.995±0.225	4.135 (16)	30.099 (23.273-37.068)	10.83	

L= Lambda cyhalothrin
n= Kullanılan akar sayısı
RR= Direnç oranı (Popülasyonun LC_{50} veya LC_{90} değeri/ Hassas popülasyonun LC_{50} veya LC_{90} değeri)

Dirençten sorumlu olan lokus sayılarını belirlemek için direkt ve dolaylı bazı modeller kullanılmaktadır. Geriye dönük olarak çaprazlamalar, direncin monogenik modelini belirlemek için direkt test olarak kullanılmaktadır. Monogenik model için kullanılan bu direkt testte gözlenen ve beklenen tepkiler χ^2'ye göre hesaplanmaktadır (Sokal and Rohlf 1995). Serbestlik derecesi 1'e göre olan bir χ^2 dağılımı ile yapılan karşılaştırmada test sonuçları $p<0.05$ ise hipotez geri çevrilir yani direncin kalıtımında monogenik hipotez ret edilir. Poligenik hipotez kabul edilir. Bu hipoteze göre de direnç özelliği pek çok gen tarafından kontrol edilmektedir. $P>0.05$ olduğunda ise monogenik hipotez kabul edilir. Hipotez; direnç özelliğinin tek bir lokusta ve major bir gen tarafından kontrol edildiğini varsaymaktadır.

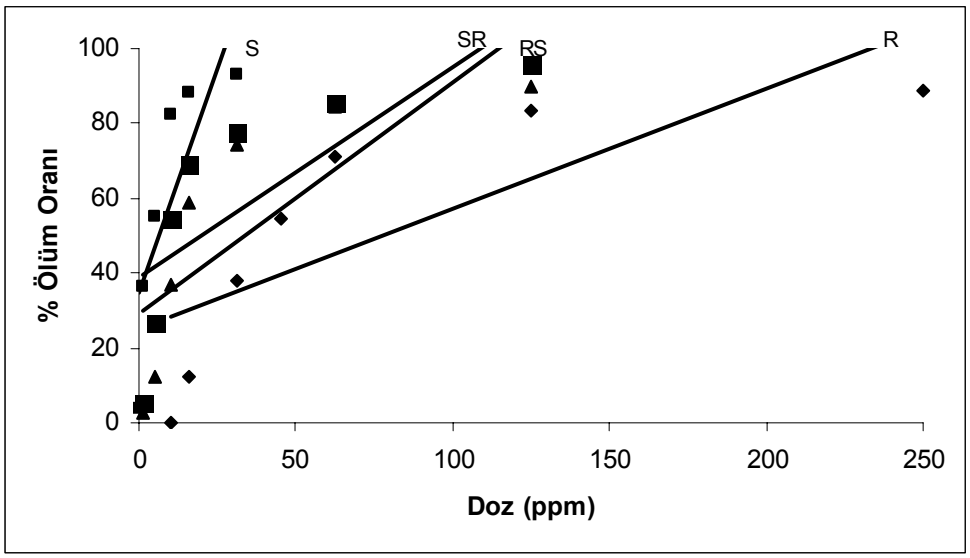
Lambda cyhalothrin için yapılan çalışmada serbestlik derecesi 1' göre olan χ^2 testine göre F2 dişileri için (R × S)F1 (♀) ve R (♂) arasında yapılan çaprazlamada 5, 10, 15.625 ve 31.25 ppm'de monogenik hipotez ret edilir ($p<0.05$) yani direnç özelliğinin birden çok gen tarafından kontrol edildiği varsayılır. 62.5 ve 125 ppm'de ise hipotez kabul edilir ($p>0.05$) (Çizelge 4.9). Elde edilen sonuçlar yüksek dozlarda direncin, tek bir lokustaki major bir genin kontrolünde olabileceğini göstermektedir

Çizelge 4.9 *Tetranychus urticae*'nin lambda cyhalothrin'e dirençli 8. seleksiyon popülasyonu ile yapılan RSR çaprazlamasında gözlenen ve beklenen ölüm oranları, kikare ve tek gen hipotezini belirlemek için kullanılan *P* değerleri

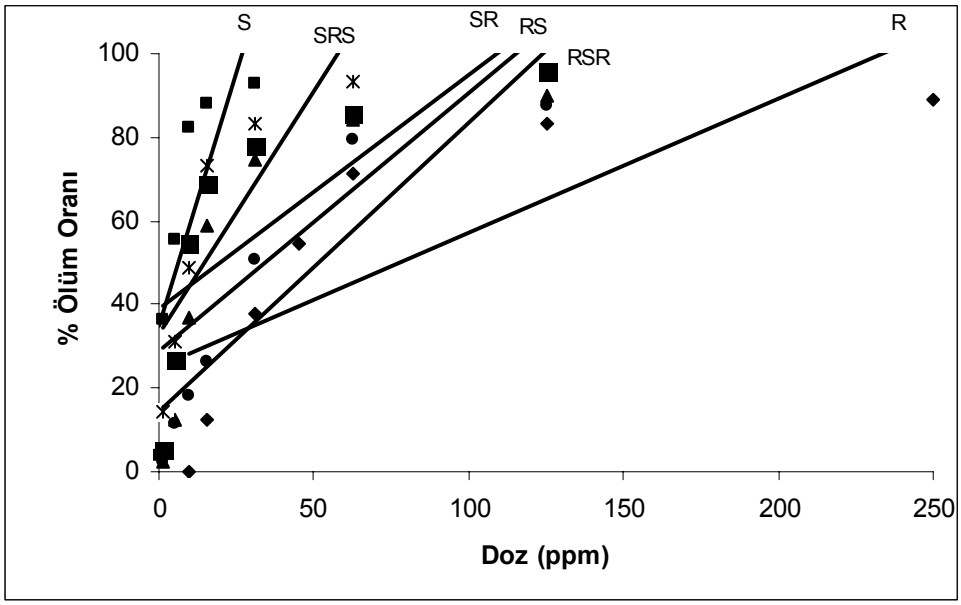
Doz (ppm)	Ölüm oranı %				
	Gözlenen	Beklenen	[a] χ^2	*P* değeri	
5	12.22	6.11	6.11	0.013	
10	36.67	18.335	18.335	0.000019	Poligenik
15.625	58.89	35.55	15.32	0.000091	
31.25	74.44	56.11	5.98	0.014469	
62.5	84.44	77.775	0.571	0.44	Monogenik
125	90	86.665	0.128	0.72	

[a] $\chi 2$= (Gözlenen ölüm oranı - beklenen ölüm oranı)^2/ Beklenen ölüm oranı

Resiprokal F1 dişilerinden (SR ve RS) elde edilen doz-ölüm eğrilerinin ebeveyn dişi ve erkeğe ait doz-ölüm eğrilerinin arasında yer aldığı görülmektedir (Şekil 4.9). Resiprokal F2 dişilerinden (SRS ve RSR) elde edilen doz-ölüm eğrileri incelendiğinde ise yine eğrilerin ebeveyn dişi ve erkeğe ait doz-ölüm eğrilerinin arasında yer aldığı fakat SRS tipi çaprazlamadan elde edilen eğrinin hassas popülasyon eğrisine daha yakın iken RSR tipi çaprazlamadan elde edilen eğrinin de dirençli popülasyon eğrisine (R) daha yakın olduğu saptanmıştır (Şekil 4.10). SRS tip çaprazlama eğrisine bakıldığında SR, RS ve RSR tip çaprazlamalara göre eğiminin daha dik yani popülasyonun daha hassas bir yapıya bir sahip olduğu ve grafiğin sol tarafında yer aldığı yani daha homojen olduğu saptanmıştır. RSR tip çaprazlamadan elde edilen eğriye bakıldığında ise popülasyonun daha heterojen ve daha dirençli olduğu görülmektedir.



Şekil 4.9 *Tetranychus urticae*'nin R ve S popülasyonlarında ve iki popülasyon arasındaki resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F1 dişilerinde lambda cyhalothrin için gözlenen doza bağlı ölüm oranı eğrileri



Şekil 4.10 *Tetranychus urticae*'nin R ve S popülasyonlarında ve iki popülasyon arasındaki resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F1 ve F2 dişilerinde lambda cyhalothrin için gözlenen doza bağlı ölüm oranı eğrileri

Bifenthrin için hassas ve dirençli 8. seleksiyon popülasyonunun LC_{50} değerleri sırasıyla 0.147 ve 10.913 ppm olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10). Resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F1 dişilerinin gösterdiği LC_{50} değerleri güven aralıklarına göre birbirinden farksız bulunmuştur (Çizelge 4.10). Bu durum F1 dişilerinde bifenthrin direncinde dişiden gelen bir etkinin olmadığını ve direncin otozomal olduğunu göstermektedir. SR ve RS tipi resiprokal çaprazlamalardan F1 dişilerinin LC_{50} değerleri 1.010 ve 1.609 ppm olarak bulunmuştur. SR ve RS çaprazlamalarından elde edilen F1 dişilerinde formülden hesaplanan baskınlık derecesi ise sırasıyla tam çekinik (-0,99) ve eksik (tam olmayan) çekinik (-0,77) olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.10 Resiprokal F1 ve F2 dişilerinin bifenthrin'e karşı gösterdiği probit-ölüm verileri ve direnç oranları

Popülasyon	**Genotip**	**n**	**eğim±SE**	**χ^2 (df)**	**LC_{50} (ppm) (Güven aralıkları)**	**LC_{50}'ye göre RR**	***D***
GSS	S	570	0.612±0.080	18.788 (16)	0.147 (0.051-0.319)	-	
B (Seleksiyon(8))	R	569	0.545±0.069	7.252 (16)	10.913 (4.977-36.060)	74.23	
F1	SR	661	0.854±0.061	15.540 (19)	1.010 (0.742-1.401)	6.87	-0.99
F1	RS	660	0.863±0.061	13.925 (19)	1.609 (1.173-2.268)	10.94	-0.77
F2	SR × S	751	0.835±0.054	24.955 (22)	0.288 (0.207-0.405)	1.95	
F2	RS × R	630	0.900±0.068	10.689 (18)	2.117 (1.529-3.052)	14.40	

B= Bifenthrin
n= Kullanılan akar sayısı
RR= Direnç oranı (Popülasyonun LC_{50} veya LC_{90} değeri/ Hassas popülasyonun LC_{50} veya LC_{90} değeri)

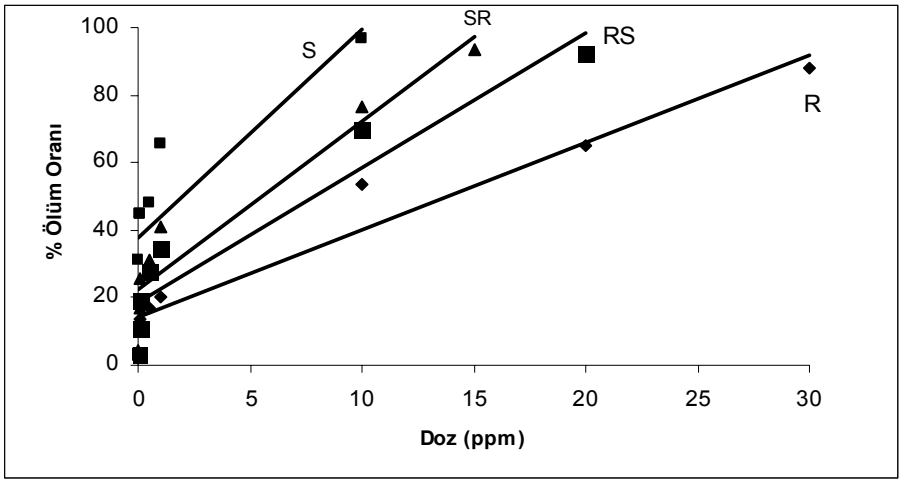
Serbestlik derecesi 1'e göre yapılan χ^2 testine göre F2 dişileri için (R × S)F1 (♀) ve R (♂) arasında yapılan çaprazlamada uygulanan her dozda gözlenen ve beklenen ölüm oranları $p>0.05$'e göre önemsiz bulunmuştur. Bu durumda monogenik hipotez kabul edilmiştir ve bifenthrin direncinin tek bir lokustaki major bir gen tarafından kontrol edildiği öne sürülebilmektedir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 *Tetranychus urticae*'nin bifenthrin'e dirençli 8. seleksiyon popülasyonu ile yapılan RSR çaprazlamasında gözlenen ve beklenen ölüm oranları, kikare ve tek gen hipotezini belirlemek için kullanılan *P* değerleri

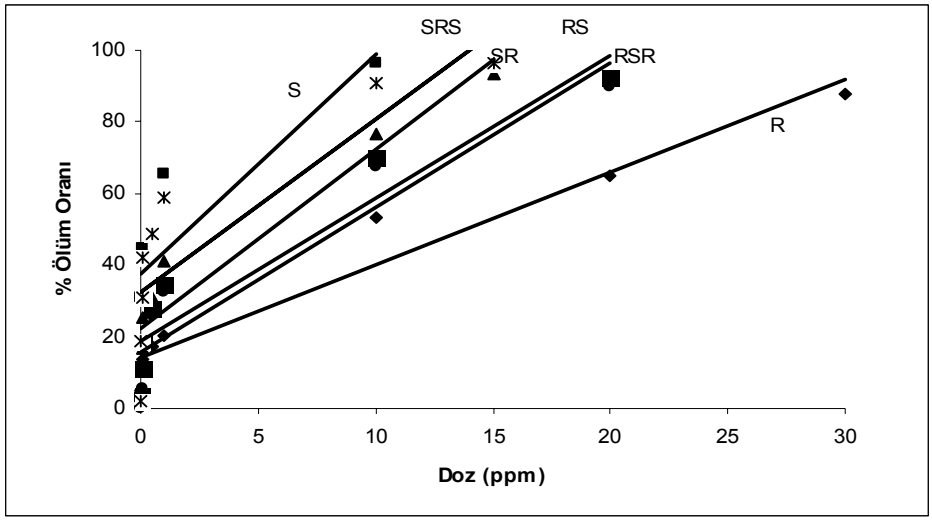
Doz (ppm)	Ölüm oranı %			
	Gözlenen	Beklenen	[a] χ^2	*P* değeri
0.01	3.33	2.8	0.1	0.75
0.05	11.11	11.805	0.04	0.84
0.1	18.89	16.26	0.425	0.51
0.5	28.89	22.96	1.531	0.21
1	34.44	27.445	1.78	0.18
10	70	61.7	1.116	0.29
20	92.22	90.91	0.01	0.92

[a]χ^2= (Gözlenen ölüm oranı - beklenen ölüm oranı)^2/ Beklenen ölüm oranı

Lambda cyhalothrin direncinde olduğu gibi resiprokal F1 dişileri (SR ve RS) ve F2 dişilerinden (SRS ve RSR) elde edilen doz-ölüm eğrileri ebeveyn dişi ve erkeğe ait doz-ölüm eğrilerinin arasında yer almıştır (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). SRS tipi çaprazlamadan elde edilen eğrinin SR tipi çaprazlamadan elde edilen eğriye göre hassas popülasyon eğrisine daha yakın olduğu, RSR tipi çaprazlamadan elde edilen eğrinin de RS tip çaprazlamadan elde edilen eğri ile daha yakın olduğu saptanmıştır (Şekil 4.12). SRS tip çaprazlama eğrisine bakıldığında SR, RS ve RSR tip çaprazlamalara göre eğiminin daha dik yani popülasyonun daha hassas bir yapıya bir sahip olduğu ve grafiğin sol tarafında yer aldığı yani daha homojen olduğu saptanmıştır. RSR tip çaprazlamadan elde edilen eğriye bakıldığında grafiğin daha sağında yer aldığı için daha dirençli bir yapıya sahip olduğu yorumu getirilebilir.



Şekil 4.11 *Tetranychus urticae*'nin R ve S popülasyonlarında ve iki popülasyon arasındaki resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F1 dişilerinde bifenthrin için gözlenen doza bağlı ölüm oranı eğrileri



Şekil 4.12. *Tetranychus urticae*'nin R ve S popülasyonlarında ve iki popülasyon arasındaki resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F1 ve F2 dişilerinde bifenthrin için gözlenen doza bağlı ölüm oranı eğrileri

Çalışma sonuçları özetlenecek olursa *T. urticae*'de görülen lambda cyhalothrin direncinin RS tip çaprazlamada baskın karakterde olduğu, oluşan dirençte dişiden gelen bir etkinin olduğu ve direncin kullanılan doza bağlı olarak düşük dozlarda birden fazla genin, yüksek dozlarda ise tek bir genin kontrolü altında olduğu bulunmuştur. Bifenthrin direncinin kalıtım şeklinin ise otozomal ve RS tip çaprazlamada eksik çekinik karakterde olduğu ve kullanılan dozlarda direncin tek bir gen tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir.

Kırmızıörümceklerde direncin kalıtımı ile ilgili yapılan çalışmalar değerlendirilecek olursa; *T. urticae*'de direnç genellikle major bir genin kontrolü altında bulunmaktadır (Dennehy and Granett 1984, Martinson *et al.* 1991, Herron and Rophail 1993). Fakat cyhexatin, abamectin ve propargite direncinin birden fazla genin kontrolünde olduğu bulunmuştur (Mizutani *et al.* 1988, Keena and Granett 1990, Clark *et al.* 1995). Roush and McKenzie (1987) direnç yönetiminde laboratuar seleksiyonlarının önemine değinmiştir. Pek çok araştırıcı tarlada akarisit veya insektisitlerle yapılan yüksek seleksiyon baskısının direnç allellerini teşvik ettiğini ve bunun da monogenik dirence sebep olduğunu öne sürmektedirler (McKenzie *et al.* 1992, McKenzie and Batterham 1994). Buna karşılık laboratuar denemelerinde direnç pek çok genin ilave katkısından

dolayı daha yavaş gelişmektedir ve çok yüksek düzeylere çıkamamaktadır (Roush and McKenzie 1987). Bizim çalışmamızda 8. seleksiyon popülasyonlarında yapılan resiprokal çaprazlamalarda lambda cyhalothrin direnci düşük dozlarda birden fazla genin, yüksek dozlarda ise tek bir genin kontrolü altında bulunmuştur. Bu durum lambda cyhalothrin'e direncin laboratuarda bifenthrin direncine göre neden daha yavaş geliştiğine açıklık getirmektedir.

Cranham and Helle (1985), *T. urticae, T. kanzawai ve P. citri*'de dicofol direncinin eksik çekinik gen tarafından kontrol edildiğini ve bu türlerde direnç mekanizmasının birbirine benzer olduğunu belirtmişlerdir. *T. kanzawai*'de fenpyroximate direnci eksik baskın ve tek bir major gen tarafından kontrol edilmektedir (Goka 1998). *T. kanzawai*'de dicofol ve chlordimeform direnci sırasıyla eksik çekinik ve baskın olarak bulunurken her iki direncin de tek bir gen tarafından kontrol edildiği bulunmuştur (Kuhawara 1977). Mizutani *et al.* (1988) kırmızıörümceklerde cyhexatin direncinin poligenik faktörler tarafından kontrol edildiğini belirtmişlerdir. Devine *et al.* (2001) *T. urticae*'de METI akarisit direnç özelliğinin eksik baskın olduğunu bildirmişlerdir. Direnç genleri çekinik olduğunda tarla koşullarında yapılan bir insektisit seleksiyonu hassas homozigot ve heterozigot bireyleri öldüreceği için bir sonraki nesile sadece dirençli homozigot bireyler aktarılacaktır. Bundan dolayı Croft and Van De Baan (1988) çekinik direncin tarlada monogenik dirence göre daha az kalıcı olduğunu ve bu durumun direnç yönetimine harika bir fırsat verdiğini rapor etmişlerdir. Leeuwen *et al.* (2004) chlorfenapyr ile selekte edilen *T. urticae*'de direncin kalıtım şeklinin eksik çekinik ve birden fazla gen tarafından kontrol edildiğini bulmuşlardır. Leeuwen *et al.* (2006b) *T. urticae*'de bifenazate direncinin tamamen dişiden geldiğini ve direncin hassas erkekler dirençli dişilerle çaprazlandığında tam baskın olduğunu fakat dirençli erkekler hassas dişilerle çaprazlandığında ise tam çekinik olduğunu göstermişlerdir. Uesugi *et al.* (2002) *T. urticae*'de chlorfenapyr ve etoxazole'a direncin genetiğini çalışmışlardır. F_1 dölünde chlorfenapyr ve etoxazole'a direncin kalıtım şeklinin sırasıyla tam baskın ve tam çekinik oldukları bulunmuştur. F_2 dölünden elde edilen LC_{50} değerlerine göre de her iki akarisite direncin tek bir gen tarafından kontrol edildiği bulunmuştur. Stumpf ve Nauen (2001) hassas ırk GSS ve METI akarisitlere dirençli ırk AKITA arasında yapılan resiprokal çaprazlamalardan elde edilen sonuçlara göre

pyridaben ve fenpyroximate'e direncin kalıtım şeklinin eksik baskın olduğunu ortaya koymuşlardır. Sato *et al.* (2004) *T. urticae*'de fenpyroximate direncinin genetiği üzerine yaptıkları çalışmada direncin tek bir gen tarafından kontrol edildiğini ve eksik baskın olduğunu ortaya koymuşlardır. Auger *et al.* (2005) *T. pyri* (Acari: Phytoseiidae)'nin mancozebe dayanıklı bir tarla popülasyonunda resiprokal çaprazlamalardan elde edilen F_1 dölünde direncin oluşmasında dişi bireylerin herhangi bir katkısının olmadığını ve baskınlık derecesinin -0.1 olduğunu bulmuşlardır. Young *et al.* (2004) etoxazole'e dirençli *T. urticae* ırkında baskınlık derecesinin F_1 ve F_2 döllerinde R dişi x S erkek olduğunda sırasıyla 0.98 ve 0.98 olarak bulunduğunu, S dişi x R erkek olduğunda F_1 ve F_2 döllerinde baskınlık derecesinin -0.97 ve -0.68 olarak bulunduğunu belirtmişlerdir. R dişi x S erkek çaprazlamasında F_1 ve F_2 döllerinde kalıtım tam baskın, S dişi x R erkek çaprazlamasında F_1 ve F_2 döllerinde direnç eksik çekinik olarak bulunmuştur.

Genellikle monogenik direncin yayılmasının poligenik dirence göre daha muhtemel olduğu varsayılmaktadır Bu varsayım Hoy *et al.* (1980) ve Roush and Hoy (1981) tarafından piretroitlere ve karbamatlılara dirençli avcı akar *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) ırklarında desteklenmiştir. Bu zararlıda pestisit direncinin kalıtım şekli (poligenik vs. monogenik) direnç sıklığının evrim oranını etkileyebilmektedir. Şayet insektisit veya akarisit uygulamaları birkaç generasyon geçici olarak azaltılır veya durdurulursa veya mozaik bir ürün deseni uygulanırsa hassas genotiplerle poligenik dirence sahip olan genotiplerin çiftleşmesi sonucu direnç allellerinin sıklığı azalmaktadır (Roush and McKenzie 1987). Eğer dirençten major bir gen sorumlu ise baskınlık çekinik ise, ortaya çıkan fenotipler bir sonraki pestisit uygulamasında yeteri kadar canlı olamayacaklardır. Direncin yayılmasına katkıda bulunan diğer bir faktör ise direnç allellerinin baskınlığıdır (Georghiou and Taylor 1986). Şayet tarlada uygulanan doz heterozigot bireyleri öldürmek için yeterli ise direncin baskınlık özelliği işlevsel olarak çekinik karaktere dönüşmektedir (Curtis *et al.* 1978).

Her iki piretroite karşı oluşan direnç elde edilen sonuçlar ışığında incelendiğinde direnç geni lokuslarının birbirinden farklı olduğu ortaya çıkmaktadır. Genellikle monogenik dirençle sonuçlanan laboratuar seleksiyonlarında laboratuar denemeleri başlamadan önce direnç belli düzeylerde genellikle tarlada önceden mevcuttur. Sonuç olarak

üreticilerimizin devamlı olarak yüksek doz kullanmaya meyilli olduğu ülkemizde lambda cyhalothrin'de görülen monogenik ve baskın direnci tarla koşullarında yönetmek kolay olmayacaktır. Bifenthrin ile selekte edilen 8. seleksiyon popülasyonuna ait logaritmik doz-probit doğrusu incelenecek olursa bu popülasyona ait bireylerde yüksek düzeyde direnç olmasına rağmen bireylerin hala heterojen yapıda oldukları görülmektedir. Baskınlık dereceleri incelendiğinde ise direncin SR ve RS tip çaprazlamalarda genel olarak çekinik karakterde olduğu ve ayrıca dirençten tek bir major genin sorumlu olduğu belirlenmiştir. Bifenthrin direncinin tek bir gen tarafından kontrol edilmesi hipotezi bizim sonuçlarımızla bağdaşmamaktadır. Bifenthrin direncinin kalıtım şekli poligenik bir model veya daha gelişmiş bir model ile açıklanabilir. Çünkü bifenthrin direncinin biyokimyasal analizleri incelendiğinde dirençte hem monooksijenaz hem de esteraz enzimlerinin önemli bir role sahip oldukları bulunmuştur. Bu durumda direncin tek bir gen tarafından kontrol edilmesi hipotezi kabul edilmemektedir. Ayrıca bifenthrin direncinde F2 dölünde SRS tipi çaprazlamada SR tipi çaprazlamaya göre LC_{50} değerinin düşmesi bunun yanında RSR tipi çaprazlamada RS tipi çaprazlamaya göre LC_{50} değerinin artması dirençte dişiden gelen bir etkinin olduğunu göstermektedir. Fakat F1 döllerinde LC_{50} değerleri arasındaki fark önemsiz bulunmuş ve dişiden gelen bir etkinin olmadığı belirlenmiştir. Bu durumun sebepleri de tam olarak açıklanamamaktadır. Fakat yukarıda da değinildiği gibi dirençten major bir gen sorumlu ise ve baskınlık çekinik karakterde ise böyle bir direnç tipinin tarla koşullarında direnç yönetim programları ile kontrol altına alınması daha kolay olacaktır.

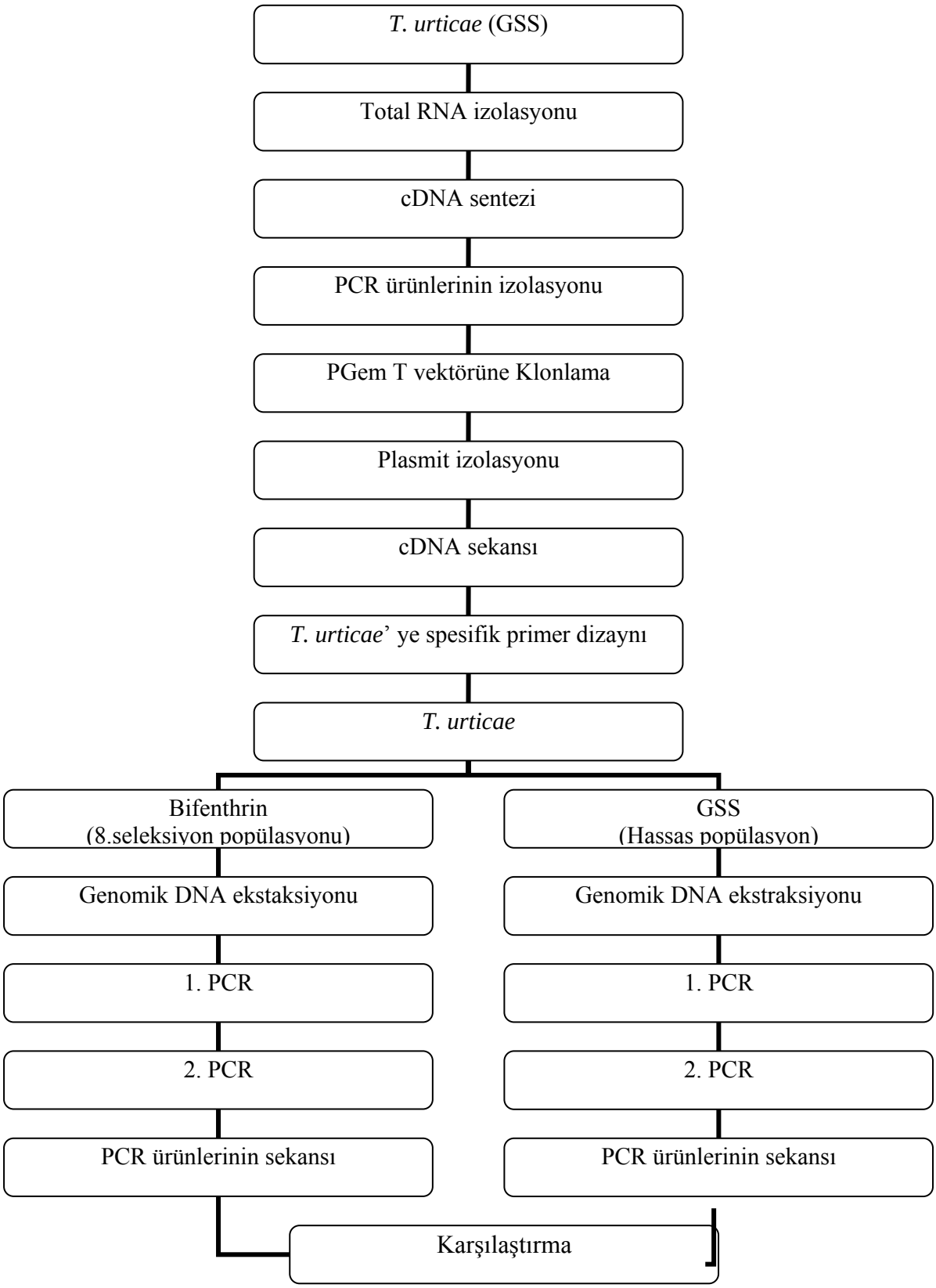
Laboratuar seleksiyonlarında pestisit kullanım yoğunluğu daha az olduğu için ve tarla koşullarına göre daha küçük bir popülasyon büyüklüğü ile çalışıldığı için genellikle poligenik direnç gelişmektedir (Roush and McKenzie 1987). Dirençli bireylerin üreme kapasiteleri diğer arthropodlarda olduğu gibi kırmızıörümcek popülasyonlarında da direnci etkilemektedir (Roush and McKenzie 1987). Tetranychid'lerde üreme şekli pestisit direncinin gelişmesini etkileyen önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Kırmızı örümceklerde haplo-diploidi olması ve erkek bireylerin haploid olup kromozomlarının dişi orijinli olması direncin gelişmesini etkilemektedir. Çünkü erkek haploidisi "etkili" popülasyon büyüklüğünü ve cinsiyet oranına bağlı olarak genetik

varyasyonu düşürmektedir (Crozier 1985). Özet olarak kırmızı örümceklerde pestisit direncinin hızlı gelişmesi kısmen arrhenotokie tip üreme biyolojilerinden kaynaklanabilir. Özellikle bu durum seralar gibi üreme için en uygun çevre koşullarında direncin gelişmesine etkide bulunan en önemli faktör olabilir. Direncin gelişmesini etkileyen diğer bir faktör ise zararlının verdiği döl sayısı olup, bir sezonda daha az döl veren diğer zararlılara göre direnç daha hızlı gelişmektedir (Georghiou and Taylor 1986). Yine direncin gelişmesinde etkili olan diğer faktörler arasında üreme, beslenme alışkanlıkları (monofag, polifag), barınaklarda yer alma ve göç etme karakteristikleri de yer almaktadır (Georghiou and Taylor 1976, 1986, Tabashnik and Croft 1982).

4.5 Moleküler Çalışmaların Sonuçları ve Tartışma

Hassas popülasyon ile yapılan total RNA izolasyonu ve cDNA sentezinden sonra cDNA veya DNA, dejenere primerlerin kullanımı ile 1. ve 2. PCR ile çoğaltılmıştır. İzole edilen PCR ürünleri pGEM T vektöre bağlanarak Stratagene XL1-blue supercompetent hücre kullanılarak transforme edilmiştir. Daha sonra rekombinant plazmitler izole edilerek etanol ile çöktürülüp DNA dizi analizi yapılmıştır.

T. urticae sodyum kanalının II. domain'ine ait DNA dizi analizi sonucu dizayn edilen spesifik primerler elde edildikten sonra hassas popülasyon ve bifenthrin ile selekte edilen 8. seleksiyon popülasyonunda yapılan genomik DNA ekstraksiyonu ve PCR aşamalarından sonra bu bölgenin sekansı yapılarak nükleotid dizilimleri elde edilmiş ve sodyum kanalındaki olası mutasyonlar değerlendirilmiştir. Tez kapsamında yapılan bu çalışmaların şematik gösterimi Şekil 4.13'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13 Tez kapsamında yapılan moleküler çalışmaların genel şeması

4.5.1 *T. urticae* sodyum kanalının 2. domain'inin dejenere primerleri

Daha önce çalışılmış ve sodyum kanal sekansları çıkarılmış türlerin genbankta kayıtlı sekansları align edilerek elde edilen korunmuş bölgeler dikkatli bir şekilde analiz edilmiş ve bu bölgelerden 6 adet dejenere primer dizayn edilmiştir (EK 5). Primerler hedeflenen bölge yani sodyum kanalının II. domain'i için dizayn edilmiştir.

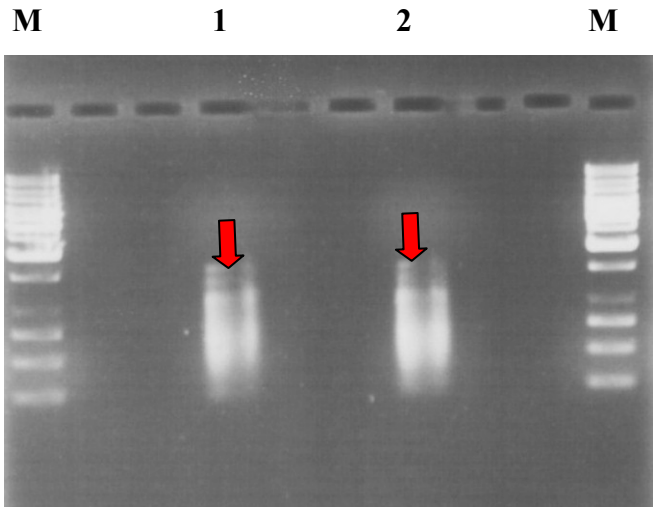
Çizelge 4.12 Dejenere primerlerin nükleotid dizi yapısı

Primer Adı	5'-3'	Primer Çiftleri Nükleotid Uzunlukları	Primer Dizisi	Pozisyonu	Dejenere Olma Durumu
Paradp 1	F	23 bp	5'-GARGGNTGGAAYATHTTYGAYTT-3'	976-1050	192
Paradp 2	F	23 bp	5'-TTYAARYTNGCNAARWSNTGGCC-3'	976-1050	4096
Paradp 3	R	23 bp	5'- GCYTCYTGNARYTTYTTNGTRTC-3'	1126-1200	1024
Paradp 4	R	27 bp	5'-CATYTCRAARAARAADATNACNGTRAA-3'	1501-1575	1536
Paradp 5	R	24 bp	5'-CCARCACCANGCRTTNGTRAARTA-3'	1501-1575	256
Paradp 6	R	23 bp	5'-ACRAARTCNARCCARCACCANGC-3'	1576-1650	256

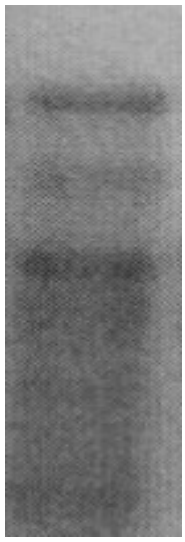
Dejenere Primer Kodları:
R=AG; N=ACGT; Y=CT; H=ACT; D=AGT; S=CG; W=AT

4.5.2 Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için Promega SV Total RNA izolasyon kitinde belirtilen prosedür uygulanmıştır. Bu metotla elde edilen RNA, cDNA sentezi için oldukça yeterli görülmüştür. Elde edilen ve daha sonra etanol ile saflaştırılan RNA bantları Şekil 4.14 ve 4.15'de gösterilmiştir.



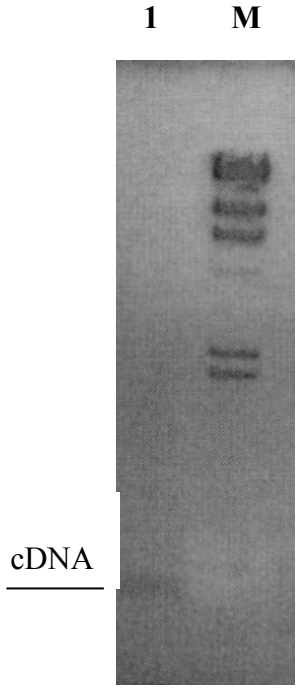
Şekil 4.14 Agaroz jelde (%1) izole edilen total RNA örneklerinin görünümü
M: Marker; **1-2:** RNA bantları



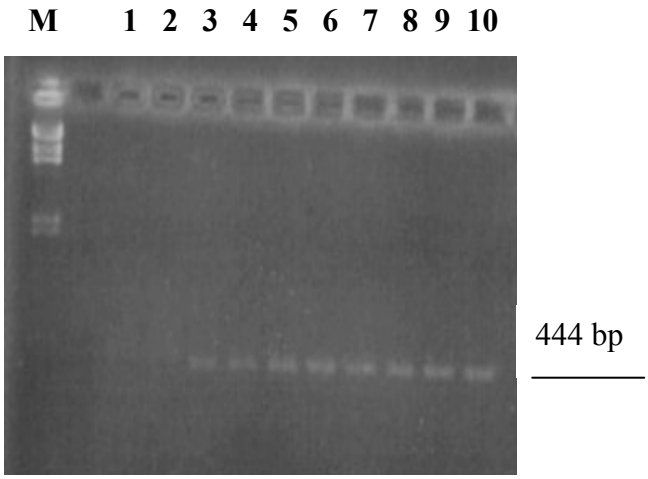
Şekil 4.15 Temizlenmiş saf RNA

4.5.3 cDNA sentezi ve PCR ile çoğaltılması

Domain IIS4-IIS6 ile ilişkili olan cDNA fragmenti hedeflenen PCR'ların gerçekleşebilmesi için uygun olarak görülmüştür (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).



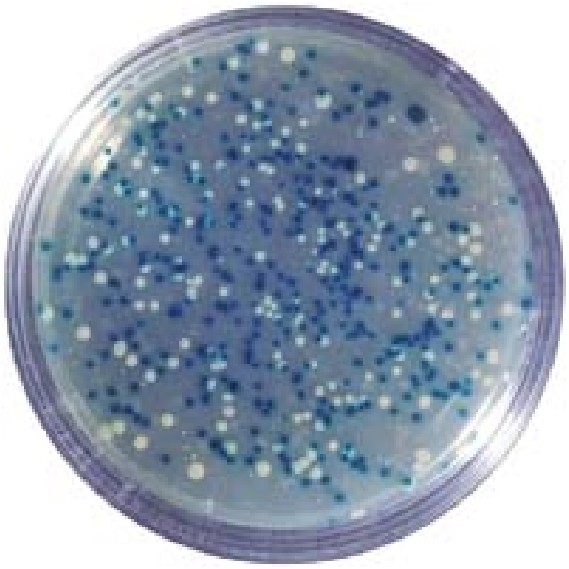
Şekil 4.16 cDNA'nın PCR ile çoğaltılması
M: Marker; **1:** cDNA bandı



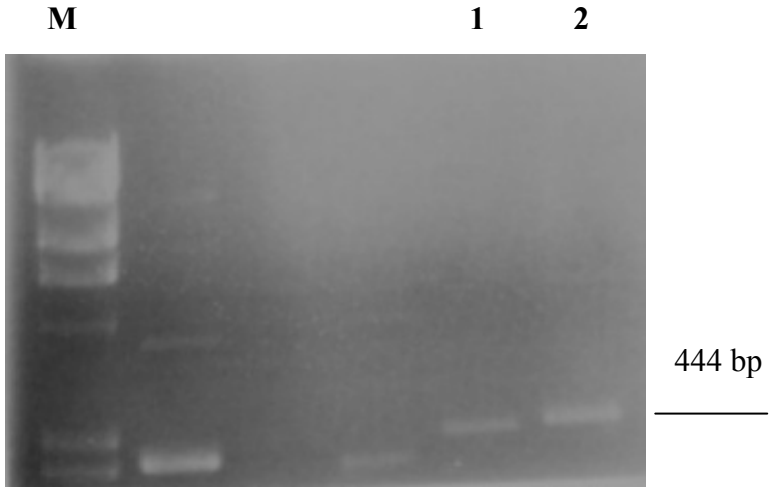
Şekil 4.17 İkinci PCR reaksiyonunda kullanılan (2/3) primer kombinasyonlarından elde edilen bantlar **M:** Marker; **1-10:** 2/3 primer kombinasyonları ile elde edilen PCR ürünleri

4.5.4 Klonlama ve transformasyon

Agaroz jelden elde edilen ve saflaştırılan PCR ürünleri pGEM T vektörü içerisine klonlanmıştır. XL-1 blue supercompetent hücre kiti kullanılarak ligasyon ürünü transforme edilmiştir. Ampisilin içeren LB ortamı üzerinde mavi kolonilerle birlikte pek çok transforme edilmiş beyaz koloniler de görülmüştür (Şekil 4.18). Seçilen 5 adet beyaz rekombinant koloni bir gece 37 °C'de 4 ml LB ortamında inkübe edilmiş ve Qiaprep spin miniprep kiti kullanılarak plasmid izolasyonu yapılmıştır. Yapılan çalışmanın sonuçları %1 lik agarose jel de 80 V'da 100 dk koşturularak test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



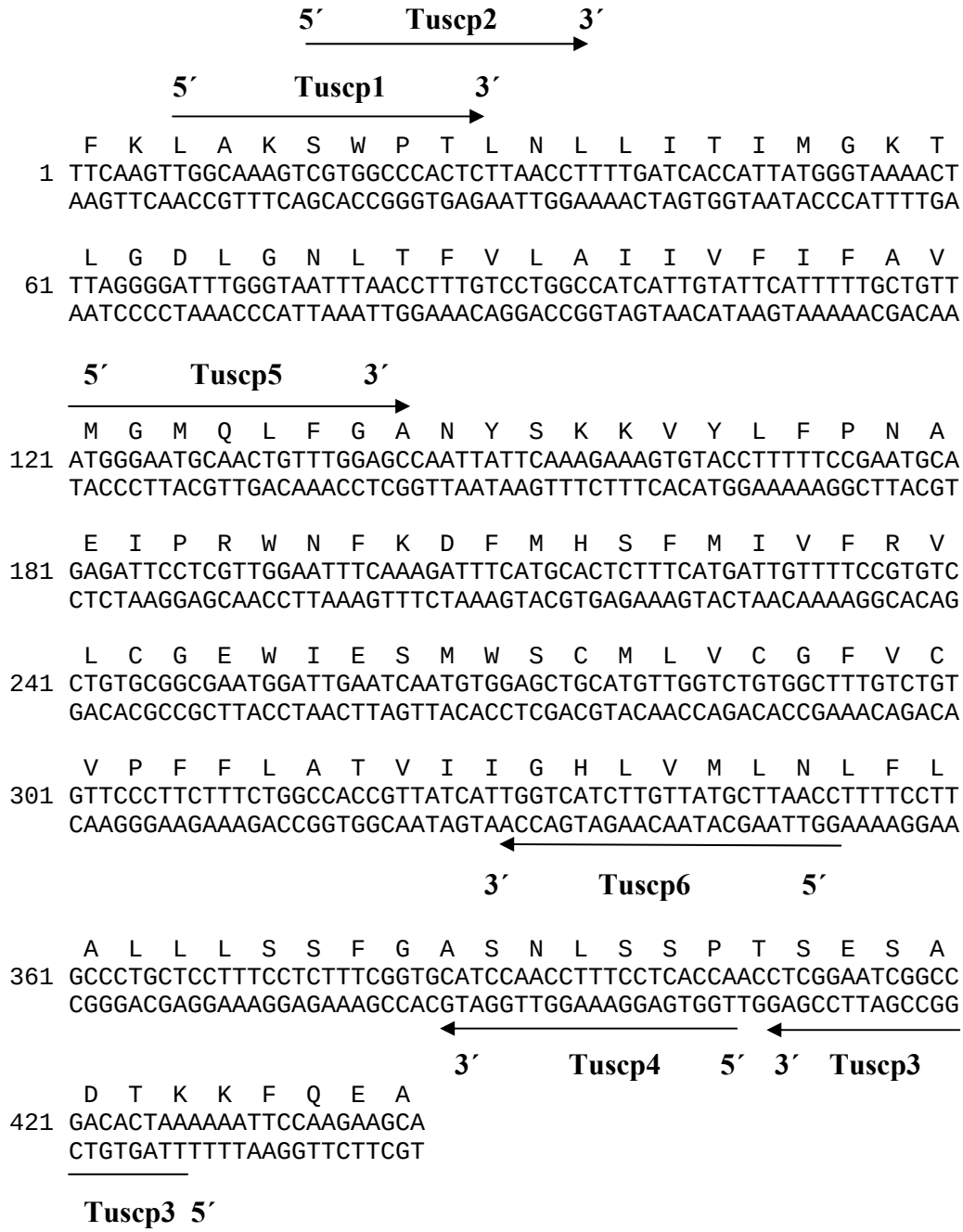
Şekil 4.18 Rekombinant kolonilerin bulunduğu LB ortamı



Şekil 4.19 Plazmit cDNA izolasyonu
M: Marker ; **1 ve 2:** *T. urticae* plazmit cDNA

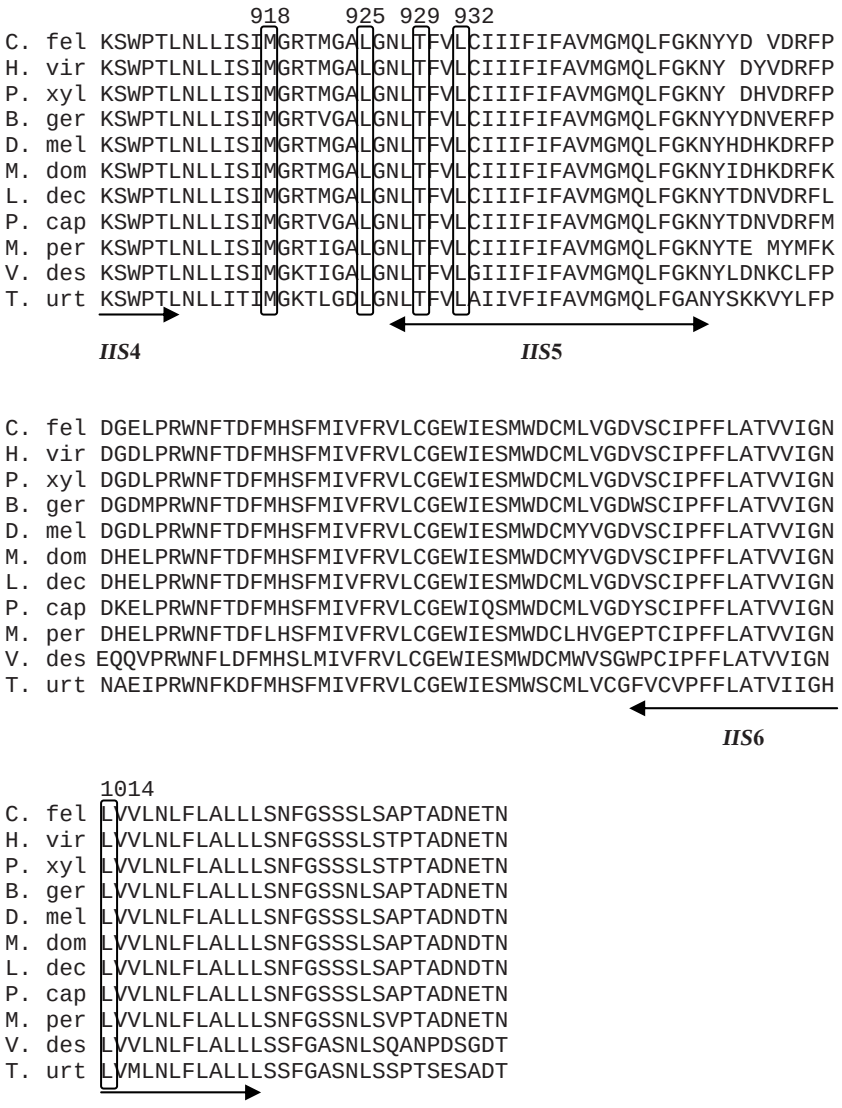
4.5.5 Dizi Analizi

Sekans sonucunda *T. urticae*'nin sodyum kanallarında *kdr* ve *süper-kdr* mutasyonlarının çokça görüldüğü II. domaine ait 444 bp lik bir bölümün sekansı çıkarılmıştır (Şekil 4.20). Bu sekansa göre hazırlanan spesifik primerler, dirençli ve hassas popülasyonlardan elde edilen genomik DNA'da hedef bölgedeki mutasyonların taranmasında kullanılmıştır.



Şekil 4.20 *Tetranychus urticae*'nin hassas ırkı (GSS)'nın sodyum kanallarının II. domain'ine ait 444 bp'lik bölümün cDNA ve amino asit sekansları ve buna göre hazırlanan spesifik primerler (Tuscp1-6)

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda sodyum kanallarında rapor edilen mutasyonların pozisyonları farklı türlerde (M918T, L925I, T929I, L932F ve L1014F) kutular içerisinde işaretlenmiştir (Şekil 4.21). Şekil incelendiğinde *T. urticae*'nin sodyum kanalının IIS4-S6 transmembran segmentlerinin cDNA sekansında herhangi bir aminosit yer değişimi belirlenmemiştir.



Şekil 4.21 *Tetranychus urticae*'nin sodyum kanal geninin II. domain'inin S4, S5, S6 transmembran segmentlerinin cDNA sekansının gen bankasında bulunan homolog sekanslarla karşılaştırılması ve daha önce rapor edilen mutasyonların pozisyonları (M918T, L925I, T929I, L932F ve L1014F) kutular içerisinde işaretlenmiştir (Bass *et al.* 2004)

T. urticae cDNA'sının amplifikasyonu ve sekansı hassas *T. urticae* popülasyonunda (GSS) dünyada ilk kez yapılmış bir çalışma olması sebebiyle orjinaldir. Bu sekans sonucunda genomik DNA'da istediğimiz bölgeyi çoğaltmak amacı ile *T. urticae*'nin sodyum kanallarına spesifik olarak hazırlanan 6 adet primer dizayn edilmiştir. Bu primerler aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 *Tetranychus urticae*'ye spesifik primerlerin adı, nükleotid uzunlukları, dizileri ve Tm dereceleri

Primer Adı	5'-3'	Primer Çiftleri Nükleotid Uzunlukları	Primer Dizisi	Tm
Tuscp1	F	21 bp	5′- TGG CAA AGT CGT GGC CCA CTC-3′	61.7 °C
Tuscp2	F	20 bp	5′- TCG TGG CCC ACT CTT AAC CT -3′	53.6 °C
Tuscp3	R	21 bp	5′- TTA GTG TCG GCC GAT TCC GAG-3′	58.7 °C
Tuscp4	R	20 bp	5′- TGG TGA GGA AAG GTT GGA TG-3′	52.2 °C
Tuscp5	F	23 bp	5′- ATG GGA ATG CAA CTG TTT GGA GC-3′	58.9 °C
Tuscp6	R	22 bp	5′- GCC ACA GAC CAA CAT GCA GCT C-3′	59.2 °C

4.5.6 Genomik DNA ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen DNA'ların, spektrofotometrede yoğunluklarına bakılarak her bir örnek için 50 ng olacak şekilde 100 µl hacme uygun DNA miktarları tespit edilmiştir (Çizelge 4.14).

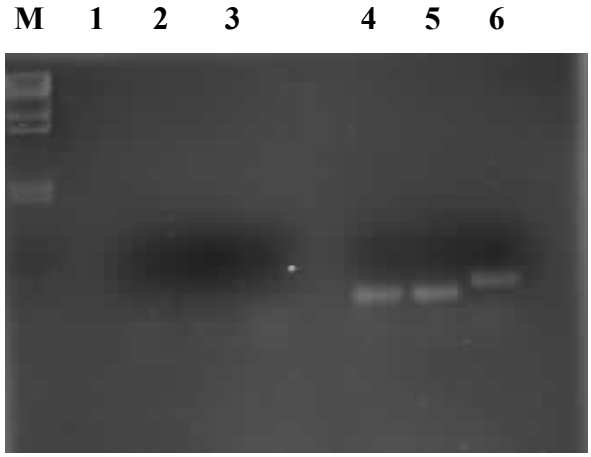
Çizelge 4.14 Hassas popülasyon (GSS) ve bifenthrin'in 8. seleksiyon popülasyonuna ait DNA yoğunlukları, saflık dereceleri

Popülasyon	Yoğunluk (ng/µl)	Saflık Dereceleri (A260/A280)
Hassas	111.7	1.79
BIF (F8)	74.1	1.93

DNA saflığının genellikle 1.8 ve 2.0 arası olması istenir. Elde edilen DNA örneklerinin saflık dereceleri istenen sınırlar arasında bulunmuştur.

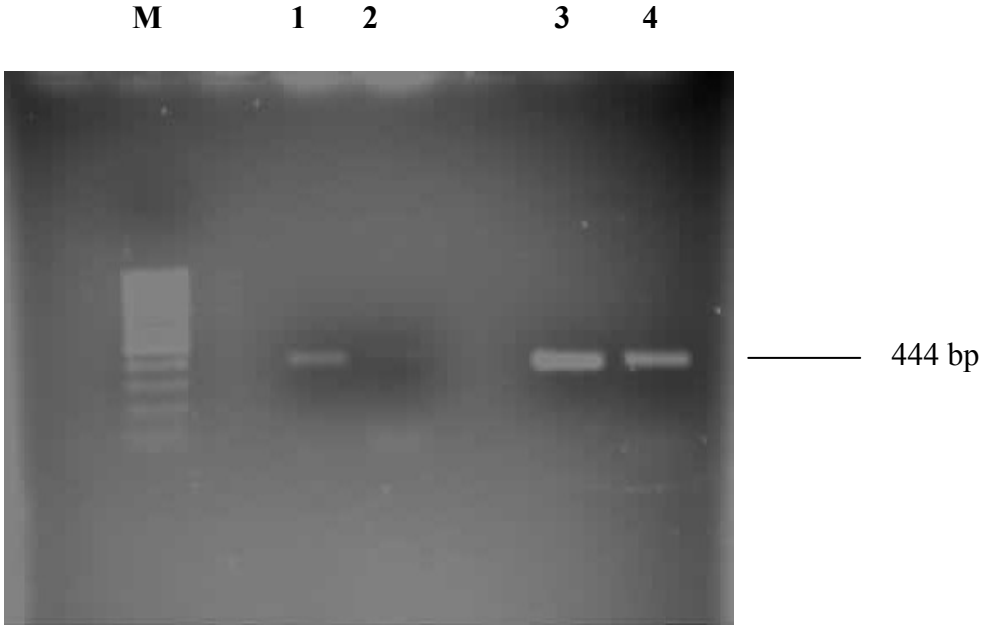
4.5.7 Genomik DNA'nın PCR ile çoğaltılması

Elde edilen genomik DNA'ların PCR'lar ile çoğaltılması sonucu elde edilen bantlar Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'de gösterilmiştir.



Şekil 4.22 PCR ile genomik DNA nın spesifik primerlerle çoğaltılması

M: Marker
1: S1; Primer 1/ Primer 6 **2:** S2; Primer 3/ Primer 5
3: S3; Primer 1/ Primer 3 **4:** R1; Primer 1/ Primer 6
5: R2; Primer 3/ Primer 5 **6:** R3; Primer 1/ Primer 3



Şekil 4.23 PCR sonucu elde edilen 444 bp'lik bantlar

M: Marker
1= S31: 1+3/1+4 primer kombinasyonları sonucu elde edilen bant
2=S32: 1+3/2+3 primer kombinasyonları sonucu elde edilen bant
3=R31: 1+3/1+4 primer kombinasyonları sonucu elde edilen bant
4=R32: 1+3/2+3 primer kombinasyonları sonucu elde edilen bant

4.5.8 Sekans analizi

Direncin mekanizmasını veya mekanizmalarını anlayabilmek, etkili direnç yönetim stratejilerinin oluşturulmasında ilk basamak olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan bu çalışmada *T. urticae*'de piretroit direncinin mekanizmaları ortaya konmaya çalışılmıştır. Öncelikle bu çalışmada *T. urticae*'nin sodyum kanal geni (TuNa)'nde *kdr* ve *süper-kdr* mutasyonlarının en çok görüldüğü II. domainin belli bir kısmı ilk kez tanımlanarak cDNA sekansı elde edilmiştir. Bu bölgenin nükleotid ve kodlanmış aminoasit sekansı Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar TuNa'nın IIS4-S6 bölgesinin diğer organizmaların sodyum kanal proteinlerinin aynı bölgesi ile büyük oranda amino asit benzerliği taşıdığını göstermiştir (Şekil 4.21).

cDNA sekansına göre spesifik primerler dizayn edildikten sonra hassas ve bifenthrin'in dirençli olarak kabul ettiğimiz 8. seleksiyon popülasyonundan yapılan genomik DNA izolasyonları ve istenen bölgenin PCR ile amplifikasyonundan sonra olası

mutasyonların taranması için sekans analizi yapılmıştır. Yapılan 12 adet sekans reaksiyonu sonucunda hassas popülasyon ile yapılan 5 numaralı sekans reaksiyonu ile dirençli popülasyon ile yapılan 3, 10, 11 ve 12 numaralı sekans reaksiyonları sonuçları aşağıda verilmiştir. Diğer sekans reaksiyonlarının sonuçları EK 8'de verilmiştir.

Hassas pop. (5)

Sekans Reaksiyonu S31(1+4) p 2

NNNNNCNNTNGGGTAAAACTTTAGGGGATTGGGTAATTTAACCTTTGTCCT
GGCCTCATTGTATTCATTTTTGCTGTTATGGGAATGCAACTGTTTGGAGCCA
ATTATTCAAAGAAAGTGTACCTTTTTCCGAATGCAGAGATTCCTCGTTGGAA
TTTCAAAGATTTCATGCACTCTTTCATGATTGTTTTCCGTGTCCTGTGCGGCG
AATGGATTGAATCAATGTGGAGCTGCATGTTGGTCTGTGGCTTTGTCTGTGT
TCCCTTCTTTCTGGCCACCGTTATCATTGGTCATCTTGTTATGCTTAACCTTT
TCCTTGCCCTGCTCCTTTCCTCTTTCGGTGCATCCAACCTTTCCTCACCAA

Hassas pop. (7)

Sekans Reaksiyonu S31(1+4) p 6

TTTTCNGGGCCCTNNNNCNGNTTTNGGCAGGGAAACAGGTTAGGCTAACAG
GNANGACCAATGATAACGGNGGCCAAAAAGAAGGGAACACAGCCAAAGCC
ACANACCAACATGCAGCTCCACATTGNTTCAATCNATTCGCCGCACAGGNC
ACGGAAAACANTCATGAAAGAGTGCATGAAATCTTTGAAATTCCAACGAGG
AATCTNTGCTTTCGGAAAAGGGTCCACTTTCTTTGAATAATNGGCTCCAANC
AGTTGCNTTCCCATAACAGCAAAAATGAATNCANTGATGGCCAGGACAAAG
GTTAAATTACCCAAATCCCNTAAAGTTTTNCCCATAATGGTGATCAAAAGGT
TAAGAGTGGGCCACGACTTTGCCAAA

Dirençli Pop. (3)

Sekans Reaksiyonu R32 (2+3) p 5

CNTTCTTCAAGNAAGTGTACCTTTTTCCGAATGCAGAGATTCCTCGTTGGAA
ATTCAAAGANTTCATGCACTCTTTCATGAATGTTTTCCGTGTCCTGTGCGGC
GAATGGATTGAATCAATGTGGAGCTGCATGTTGGTCTGTGGCTTTGTCTGTG
TTCCCTTCTTTCTGGCCACCGTTATCATTGGTCATCTTGTTATGCTTAACCTT
TTCCTTGCCCTGCTCCTTTCCTCTTTCGGTGCATCCAACCTTTCCTCACCAAC
CTCGGAATCGGCGAACACTAAA

Dirençli pop. (10)

Sekans Reaksiyonu R3(1+3) p 2

CNTTTGGGTAAAACTTTAGGGGACTTGGGTAACNTAACCNNTGTACCTGGC
CATCANTGTANTCANNTTTGCTGATATGGGAATGCAACTGTTTGGAGCCAAT
TAATCAAAGAAAGTGTACCTTTTTCCGAATGCAGAGAATCCTCGTTGGAATT
TCAAAGANTTCATGCACTCTTTCATGATTGTTTTCCGTGTCCTGTGCGGCGA
ATGGATTGAATCAATGTGGAGCTGCATGTTGGTCTGTGGCTTTGTCTGTGTT
CCCTTCTTTCTGGCCACCGTTATCATTGGTCATCTTGTTATGCTTAACCTTTT
CCTTGCCCTGCTCCTTTCCTCTTTCGGTGCATCCAACCTTTCCTCACCAACCT
CGGAATCGNCG

Dirençli pop. (11)

Sekans Reaksiyonu R3(1+3) p 4

TNCNNNNNNGGNAAGGTGCAGGGCAAGGAAAAAGGTTAAGCATAACAGG
NTGACCAATGATAACGGTGGCCAGAAAGAAGGGAACACAGCACAAAGCCA
CAGACCAACATGCAGCTCCACATTGATTCAATCCATTCGCCGCACAGGACA
CGGAAAACAATCATGAAAGAGTGCATGAAATCTTTGAAATTCCAACGAGGA
ATCTCTGCATTCGGAAAAAGGTACACTTTCTTTGAATAATTGGCTCCAAACA
GTTGCATTCCCATAACAGCAAAAATGAATACAATGATGGCCAGGACAAAGG
TTAAATTACCCAAATCCCCTAAAGTTTTACCCATAATGGTGATCAAAAGGTT
AAGAGTGGGCCCNNTTTTTGCCAAANNTTGG

Dirençli pop. (12)

Sekans Reaksiyonu R3(1+3) p 6

NNNNNCCCCTNGCATACNTTTCGCGCGCACAGGCACACGGGAAAACAATCA
TGAAAAGAGTGCATTGAAATCTTTCGAAATTCCAACGAGGAAATCTCTGCA
TTCGGAAAAAGGTNCACTTTCTTTGAATAATTGGCTCCAAACAGTTGCNTTC
CCATAACAGCAAAAATGAATACNATGATGGCCAGGACAAAGGTTAAATTAC
CCAAATCCCCTAAAGTTTTACCCATAATGGTGATCAAAAGGTTAAGAGTGG
GCCACGATTTTGCCAAGNNTCCCNGCGTTNNCTTNNNNNTGGCCNCCGNTA
TNANTGCTCNNCTNGNNANGCNTAACGTTTTNNTTNCCCTGNCCCTTCNGTT
TTCCCTGCATCGNNNNTNTCNGGNNAACNNTGGNNTCCGCTTTNCCAA

Mevcut gen veya DNA sekanslarını karşılaştırmak için NCBI'dan sekans araştırması yapılmıştır. 4 ve 8 numaralı sekansların sonuçları alınamamış olup 1, 2, 6 ve 9 numaralı sekans reaksiyonlarında çok fazla sayıda belirlenemeyen nükleotid bulunduğu için bu sonuçlar elemine edilmiştir. Hassas popülasyon ile yapılan 5 numaralı sekans

reaksiyonu ile dirençli popülasyon ile yapılan 3 ve 10 numaralı sekans reaksiyonları karşılaştırıldığında hassas ve dirençli popülasyonlar arasında nükleotid ve aminoasit dizilimi bakımından herhangi bir faklılık olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.24). Yine aynı şekilde pek çok böcekte sodyum kanalının II: domain'inde *kdr* dirençle sonuçlanan L1014F mutasyonunun pozisyonu gösterilmektedir. Bizim çalışmamızda bu mutasyon görülmemiştir. Yine hassas popülasyon ile yapılan 7 numaralı reaksiyon ile dirençli popülasyonlar 11 ve 12 numaralı reaksiyonlar arasında herhangi bir nükleotid ve aminoasit farklılığı belirlenmemiştir (Şekil 4.25). Bu çalışmada pek çok böcek ve akar türünde piretroit direnci ile ilişkili olan *kdr* veya *süper-kdr* mutasyonu veya mutasyonları bulunmamıştır.

Hassas (5): KKVYLFPNAEIPRWNFKDFMHSFMIVFRVLCGEWIES
Dirençli (3):KKVYLFPNAEIPRWKFKDFMHSFMIVFRVLCGEWIES

Hassas (5): MWSCMLVCGFVCVPFFLATVIIGHLVMLNLFLALLLSSFGASNLSSP
Dirençli (3): MWSCMLVCGFVCVPFFLATVIIGHLVMLNLFLALLLSSFGASNLSSP

Hassas (5): MGMQLFGANYSKKVYLFPNAEIPRWNFKDFMHSFMIVFRVLCGEWIES
Dirençli (10): MGMQLFGANYSKKVYLFPNAENPRWNFKDFMHSFMIVFRVLCGEWIES

Hassas(5): MWSCMLVCGFVCVPFFLATVIIGHLVMLNLFLALLLSSFGASNLSSP
Dirençli(10): MWSCMLVCGFVCVPFFLATVIIGHLVMLNLFLACCLSSFGASNLSSP

L1014 F
*

Şekil 4.24 Hassas ve dirençli (BIF) popülasyonun sekansından elde edilen aminoasit diziliminin karşılaştırılması

```
GSS             TCCACATTGNTTCAATCCATTCGCGCGCACAGGCACACGGGAAAACAATCATGAAAAGAG 60
BIF11           --CACATTGATTCAATCCATTCGCGCGCACAGGCACACGGGAAAACAATCATGAAAAGAG 58
BIF12           -----CCCCTNGCATACCTTTCGCGCGCACAGGCACACGGGAAAACAATCATGAAAAGAG 55
                     **  ** ****************************************

GSS             TGCATTGAAATCTTTCGAAATTCCAACGAGGAAATCTCTGCTTTCGGAAAAGGGTCCACT 120
BIF11           TGCATTGAAATCTTTCGAAATTCCAACGAGGAAATCTCTGCATTCGGAAAAAGGTACACT 118
BIF12           TGCATTGAAATCTTTCGAAATTCCAACGAGGAAATCTCTGCATTCGGAAAAAGGTNCACT 115
                **************************************** ********* *** ****

GSS             TTCTTTGAATAATTGGCTCCAAACAGTTGCATTCCCATAACAGCAAAAATGAATACAATG 180
BIF11           TTCTTTGAATAATTGGCTCCAAACAGTTGCATTCCCATAACAGCAAAAATGAATACAATG 178
BIF12           TTCTTTGAATAATTGGCTCCAAACAGTTGCATTCCCATAACAGCAAAAATGAATACAATG 175
                ************************************************************

GSS             ATGGCCAGGACAAAGGTTAAATTACCCAAATCCCCTAAAGTTTTACCCATAATGGTGATC 240
BIF11           ATGGCCAGGACAAAGGTTAAATTACCCAAATCCCCTAAAGTTTTACCCATAATGGTGATC 238
BIF12           ATGGCCAGGACAAAGGTTAAATTACCCAAATCCCCTAAAGTTTTACCCATAATGGTGATC 235
                ************************************************************

GSS             -AAAAGGTTAAGAGTGGGCCACGACTTTGCCAAA 273
BIF11           -AAAAGGTTAAGAGTGGGCCCCGTTTTTGCCAAA 271
BIF12           -AAAAGGTTAAGAGTGGGCCACGATTTTGCCAAG 268
                 ****************** **  ********
```

Şekil 4.25. Hassas, 11 ve 12 numaralı sekans sonuçlarının nükleotid diziliminin karşılaştırılması

1940'lı yıllarda DDT'nin çok yaygın bir şekilde kullanılmaya başlaması ile birlikte hedef yeri olan voltaj kapılı sodyum kanalında meydana gelen mutasyonlar seleksiyon baskısı ile yayılmaya başlamıştır. Işığa yüksek düzeyde stabilite gösteren piretroitlerin geliştirilmesinden sonra 1970'li yıllardan beri bu grup insektisitler yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Leahey 1979). Piretroit insektisitlerin bu aşamadan sonra tarla ürünlerine karşı yaygın bir şekilde kullanımı sonucu dünya insektisit pazarının yaklaşık %25'ini piretroitler almıştır (Hemingway *et al.* 2004). Sonuç olarak da bu insektisitlere karşı oluşan dirence sebep olan sodyum kanalı mutasyonları belli başlı pek çok böcek takımlarında giderek artmaya başlamıştır.

Farklı böcek takımlarında ortaya çıkan piretroit direnci ile sodyum kanallarında görülen mutasyonlar arasındaki ilişkiyi açıklayan makalelere bakılacak olursa; olası *kdr* direnci ile ilişkili sodyum kanalı mutasyonlarını belirlemek için permethrin'e dirençli ve hassas *Pediculus capitis* (De Geer) (Anoplura: Pediculidae) popülasyonlarının cDNA sekansları yapılmış ve yapılan karşılaştırmada permethrin'e dirençli olan popülasyonun II. domainin 1. ve 2. transmemran segmentlerini birbirine bağlayan fragmentte yeni bir mutasyon (M815I) belirlenmiştir (Lee *et al.* 2003). Permethrin'e 17 ve 688 kat, cyhalothrin'e de 17 ve 11300 kat direnç gösteren 2 *Haematobia irritans* (Dip:

Muscidae) popülasyonunda RT-PCR yapılarak hassas ve dirençli sineklerden 0.9 kb'lık sodyum kanal gen fragmenti klonlanarak sekansı yapılmıştır. Her iki dirençli popülasyonda *kdr* direnci ile ilişkili olarak leucine yerine phenylalanine aminoasidi, *süper-kdr* direnci ile ilişkili olarak da methionine ile threonine aminoasidinin yer değiştirdiği 2 mutasyon belirlenmiştir (Guerrero *et al.* 1997). *M. domestica*, *H. virescens* ve *B. germanica* gibi pek çok türün sodyum kanalı genlerinde meydana gelen mutasyonlarla (*kdr*) piretroit direnci arasında bir ilişki bulunmuştur. *M. domestica*, *B. germanica*'da *kdr*-tip direncin sodyum kanalının 2. domaininde görülen L1014F ve M918T nokta mutasyonlarından kaynaklandığı bildirilmiştir (He *et al.* 1999). *H. virescens* ve *Helicoverpa armigera*'da piretroitlere karşı görülen hassasiyet azalmasının sebebi olarak sodyum kanalının 3. ve 4. domainlerini birbirine bağlayan fragmentte görülen D1561V ve E1565G mutasyonları gösterilmiştir (Head *et al.* 1998). *Kdr* direnci pek çok böcek türünde sodyum kanal proteininin II. domainin 6. transmembran segmentinde leucine aminoasidi yerine phenylalanine aminoasidinin gelmesi ile oluşan L1014F mutasyonu ile ilişkili olarak bulunmuştur (Taylor *et al.* 1993, Miyazaki *et al.* 1996, Williamson *et al.* 1996, Dong 1997, Guerrero *et al.* 1997, Park *et al.* 1997, Martinez-Torres *et al.* 1998; 1999a, 1999b). Bu mutasyonla birlikte iki varyantı da (L1014H and L1014S) pek çok böcekte rapor edilmiştir. Piretroitlerden fenpropathrin ile organik fosforlulardan acephate karışımına 100 kattan daha fazla direnç gösteren *B. tabaci* (Hom: Aleyrodidae) ırklarında sodyum kanalının II. domainin 918. aminoasit pozisyonunda 4. ve 5. transmembran segmentlerini birbirine bağlayan fragmentte methionine aminoasidi valine ile yer değiştirmiştir. Aynı şekilde 925. pozisyonda ise leucine ile isoleucine aminoasidinin yer değiştirmesi ile oluşan 2 mutasyon belirlenmiştir (Morin *et al.* 2002). Moleküler düzeyde elde edilen bu sonuçlar *B. tabaci*'de görülen piretroit direncini anlama, izleme ve yönetmede yardımcı olmaktadır. *Plutella xylostella* (Lep: Yponomeutidae)'da IIS4-IIS6 domainlerine karşılık gelen DNA fragmentleri (340 bp) hassas ve piretroitlere dirençli popülasyondan RT-PCR reaksiyonu ile çoğaltılmış ve klonlanarak sekansı yapılmıştır. Dirençli popülasyonun sırasıyla IIS5 ve IIS6 bölgelerinde threonine aminoasidinin yerini isoleucine ve leucine amino asidinin yerini de phenylalanine aminoasidinin aldığı belirlenmiştir. Bu mutasyonlar piretroit direnci ile ilişkili olarak bulunmuştur (Tsukahara *et al.* 2003).

Kdr direncine göre daha yüksek düzeylerde dirence sebep olan *süper-kdr* mutasyonları olarak *H. irritans* ve *M. domestica*'nın II. domaininde görülen M918T (Williamson *et al.* 1996, Guerrero *et al.* 1997), *P. capitis* ve *P. xylostella*'da T929I (Schuler *et al.* 1998, Lee *et al.* 2000) ve *B. tabaci*'de L925I (Morin *et al.* 2002) mutasyonları gösterilebilir. Bu mutasyonlar L1014F *kdr* mutasyonu ile birlikte olduğunda bazı piretroitlere karşı 1000 kata kadar yakın dirence sebep olmaktadır (Vais *et al.* 2001, Soderlund and Knipple 2003).

T. urticae'de şu ana kadar piretroit direnci ile ilişkili sodyum kanalında görülen herhangi bir mutasyon çalışması yapılmamıştır. Fakat yakın türlerde görülen piretroit direnci ile sodyum kanal gen mutasyonları arasındaki ilişki hakkında bilgi vermek gerekirse; *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) ve bal arısının ektoparaziti olan Varroa akar *Varroa destructor* gibi arachnid zararlıların kontrolünde piretroit insektisitlerin yaygın kullanımı bu zararlılarda piretroit direncinin gelişmesine sebep olmaktadır. Fakat böceklerde görülen *kdr* mutasyonlarının hiçbiri piretroitlere direnç gösteren bu iki türde belirlenmemiştir (Wang *et al.* 2002). He *et al.* (1999) yaptıkları çalışmada piretroitlere dirençli *B. microplus*'un sodyum kanalının kısmi cDNA sekansını yaparak 3. ve 4. domainleri kapsayan cDNA sekanslarını gene spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltmışlar ve çoğalttıkları DNA'yı saflaştırarak direkt sekans yapmışlardır. Sonuç olarak III. domainin 6. transmembran segmentinde 1538. aminoasit pozisyonunda phenylalanine yerine isoleucine aminoasidinin gelmesi ile oluşan bir mutasyon (F1538I) belirlemişlerdir. Aynı mutasyon piretroit insektisitlere kanal hassasiyetini tamamen kaybeden hamamböceği sodyum kanallarında da belirlenmiştir (Tan *et al.* 2005). Bal arısı akarı *V. destructor*'da piretroitlere direnç ile ilişkili pek çok mutasyon belirlenmiştir. Bu mutasyonlar, III. domainin 6. segmentinde F758L mutasyonu, IV. domainin 5. segmentinde I982V mutasyonu, IV. domainin 6. segmentinde M1055I mutasyonu, III. ve IV. domainleri birbirine bağlayan bölgede görülen L826P mutasyonlarıdır (Wang *et al.* 2002). Direnç ile ilişkili mutasyonların büyük kısmı piretroitlerin bağlanma yerleri olan I. II. ve III. domainlerin 6. transmembran segmentlerinde belirlenmiştir. Bu mutasyonlarda meydana gelen yapısal değişimler sodyum kanalları ile piretroitlerin interaksiyonunu değiştirebilmekte ve piretroitlere hassasiyeti azaltabilmektedir. Yine *Varroa* ile yapılan diğer bir çalışmada

VmNa olarak isimlendirilen sodyum kanal geninin ilk kez komple cDNA sekansı çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 2215 amino asiti kodlayan bir açık okuma çerçevesine sahip olan cDNA, 254 kDa molekül ağırlığına sahip olup toplam 6645 nükleotid içermektedir. VmNa'nın çıkarılan amino asit sekansı sırasıyla *Drosophila* para geni ile % 51.2 memeli sodyum kanalı Nav1.2 ile'de % 41.1 benzerlik taşımaktadır (Wang *et al.* 2003). VmNa sodyum kanal genine en çok benzerlik gösteren tür *B. microplus* olup 3 ve 4. domainleri kapsayan bölgede ve 3. domainin hücreiçi bağında sırasıyla % 80.7 ve % 98 amino asit benzerliği bulunmuştur. Daha önce böceklerde ve arachnid'lerde tanımlanan II. domainin dışında görülen diğer sodyum kanal mutasyonları ise domain III ve IV'ü birbirine bağlayan fragmentte görülen D yerine V ve E yerine G mutasyonları (Head *et al.* 1998) ve IIIS6'da görülen F yerine I mutasyonlarıdır (He *et al.* 1999).

Yaptığımız bu çalışmada daha önce pek çok böcek türünde tanımlanan *kdr* ve *süper kdr* direncine sebep olan mutasyonlar gözlenmemiştir. TuNa'yı kodlayan diğer bölgelerin sekans analizi bifenthrin direncine sebep olabilecek mutasyonların olup olmadığını ortaya koymak açısından gereklidir. Sonuç olarak TuNa'nın tamamlanmış sekans analizinde *T. urticae*'de bifenthrin direnci ile ilişkili olası mutasyonların belirlenmesi direnç yönetim stratejilerinin geliştirilmesi açısından son derece önemli olacaktır.

5. SONUÇ

Türkiye'de üretici kesimi genellikle tarımsal zararlılara karşı geniş spektrumlu insektisit kullanmayı tercih etmektedir. Aynı etki mekanizmasına sahip olan geniş spektrumlu insektisitlerin yoğun kullanımı kırmızı örümcek, afit gibi hızlı üreyen türlerde insektisit direncinin oluşmasını teşvik etmektedir. Belirli bir akarisite karşı oluşan direncin başarılı bir şekilde yönetimi ise direncin genetik tabanı ve mekanizmalarının bilinmesine bağlıdır. Direnç yönetiminin başlıca hedefi zararlılarda direnci mümkün olduğunca geciktirmektir. Direncin kalıtım şekli, direncin belirlenmesi, izlenmesi ve risk yönetiminde yardımcı olmaktadır.

İnsektisit direncinin genetiği üzerine yapılan araştırmalar, direncin ve direnç mekanizmalarının belirlenmesini ve ayrıca uygun direnç yönetim stratejilerinin geliştirilmesini sağlamaktadır (Tabashnik and Cushing 1989, Roush and Daly 1990). Direncin kalıtım şeklinin bilinmesi ise özellikle insektisit direnci ortaya çıktığı anda mutlaka değerlendirilmelidir (Gould *et al.* 1994). Şayet direnç allellerinin baskınlığı biliniyorsa buna göre her bir genotipik direnç düzeyini birbirinden ayırt etmek için insektisitlerin uygun konsantrasyonları belirlenerek direncin gelişmesi geciktirilebilir (Mcdonald and Schmidt 1987, Heim *et al.* 1992).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre lambda cyhalothrin direncinde direnç genlerinin eşeye bağlı ve baskın olması *T. urticae*'de piretroit direncinin gelişmesi üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir. Buna zıt olarak bifenthrin direncinden elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirildiğinde direnç geninin çekinik karakterde olması, bundan sonra yapılacak seleksiyon baskılarında hassas homozigot (S) veya heterozigotların (RS) elemine edilmesine ve gelecek döle dirençli homozigot bireylerin aktarılmasına sebep olabilir. Buna karşı olarak direnç geninin baskın olması, dirençli heterozigot bireyler yeni döle aktarılacağından hassas genlerin uzunca bir süre popülasyon içerisinde varlığını sürdürmesine sebep olabilir (Falconer 1989). Direnç genlerinin çekinik olması, tarla koşullarında heterozigot bireylerin ölmesi daha kolay olacağından direnç yönetimi için bir avantaj olarak düşünülmektedir (Horowitz *et al.*

2003). Arrhenotokie'nin görüldüğü böceklerde çekiniklik özelliği direncin gecikmesine katkıda bulunmaktadır (Croft and Van De Bann 1988). Bifenthrin direncinde gözlenen otozomal ve çekinik direnç özelliği ile yüksek doz kullanımı gibi direnç yönetim pratiklerinin uygulanması ile başarı elde edilebilir. Fakat bifenthrin ile selekte edilen 8. seleksiyon popülasyonundan elde edilen eğimde hala heterozigot bireylerin fazla olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum birkaç piretroit uygulamasından sonra tarla popülasyonlarında dirençli bireylerin sıklığının artabileceğini işaret etmektedir. Bu durumda farklı etki mekanizmasına sahip insektisitlerin rotasyonu direncin gelişmesini önlemek için kullanılabilir. Yine yeni etki mekanizmasına sahip insektisitler direnç yönetim stratejileri içerisine dahil edilebilir. Aynı şekilde ürün rotasyonu, genetik çeşitliliğin artmasına ve dirençli homozigot bireylerin sıklığının azalmasını sağlayacaktır. Özellikle lambda cyhalothrin ve bifenthrin direncinin oluşmasında oldukça önemli katkıları olan metabolik detoksifikasyon mekanizmalarından karboksilesterazlar ve sitokrom P-450 monooksijenaz enzimlerinin etkinliğini azaltmak için direnç yönetim programlarında insektisit uygulamaları ile birlikte sinerjistler (DEF ve PBO) kullanılabilir.

Direnç yönetim stratejilerinde tavsiye edilen sığınakların varlığı pestisite maruz kalmış hassas bireylerin yaşamasına izin vermektedir. Hassas bireyler komşu tarlalardan ortaya çıkan dirençli bireylerle çiftleşmekte ve hassas bireylerin varlığı popülasyon içerisinde daha uzun süre varlığını korumaktadır. Tavsiye edilen diğer bir strateji olan yüksek doz stratejisinde ise; direncin çekinik olması durumunda dirençli ve hassas bireylerin çiftleşmesinden meydana gelen F1 döllerinin yüksek dozda yapılan pestisit uygulamaları ile çok kolay elemine edilebileceği beklenmektedir (Tabashnik *et al.* 1997).

Direnç moleküler düzeyde incelendiğinde ise seleksiyon baskısı sonucu daha yüksek düzeyde direnç elde ettiğimiz bifenthrin'in 8. seleksiyon popülasyonu ve hassas popülasyon ile yapılan çalışmalardan elde edilen sekans analizleri sonucu bu iki popülasyon arasında herhangi bir nükleotid ve aminoasit farklılığı olmadığı belirlenmiştir. Sekans sonuçlarına göre taranan kısım kanalın II. domain'inin S4-6 transmembran segmentlerini içeren bir bölümünü ihtiva etmektedir. *T. urticae*'de ilk

kez sekansı çıkarılan sodyum kanalının II. domainin S4-S6 transmembran segmentlerine ek olarak kanalın tüm sekansının çıkarılması, *T. urticae*'de bifenthrin direnci ile ilgili olarak sodyum kanalının bifenthrin ile olan interaksiyonunu ve kanalın temel fonksiyonlarını anlamamıza yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

Akgünlü, F.Z. 2005. *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)'nin değişik popülasyonlarının sentetik piretroitli ilaçlara karşı meydana getirdiği direncin izlenmesi. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, 41 s., Ankara.

Alkan, B. 1960. Insect resistance to insecticides. Proceding of the regional symposium, 11-13 May 1959, Cairo, UAR. 182-186.

Alon, M., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Alon, F. and Morin, S. 2006. Multiple origins of pyrethroid resistance in sympatric biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36, 71–79.

Anonim. 2002a. Bitki Koruma Ürünleri. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, 336s. Ankara.

Anonymous. 2000. The Pesticide Manuel (Incorporating the Agrochemical Handbook) Eleventh Edition, Tomlin C. (Ed.) Crop Protection Publications, 49 Downing street. U.K.1341 p.

Anonymous. 2002a. Web sitesi. http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2002/Tim_Smith/channels/sodium/ Erişim Tarihi: 12.02.2008.

Anstead, J.A., Williamson, M.S. and Denholm, I. 2005. Evidence for multiple origins of identical insecticide resistance mutations in the aphid *Myzus persicae*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35, 249–256.

Atak, E.D. ve Atak, U. 1977. Marmara Bölgesi'nde Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)'nin insektisitlere karşı direnci üzerinde çalışmalar. Bitki Koruma Bülteni, 17 (1), 29-40.

Auger, P., Bonafos, R., Kreiter, S. and Delorme, R. 2005. A genetic analysis of mancozeb resistance in *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae). Experimental and Applied Acarology, 37, 83–91.

Ay, R. 2005. Determination of susceptibility and resistance of some greenhouse populations of *Tetranychus urticae* Koch to chlorpyrifos (Dursban 4) by the petri dish–Potter tower method. Journal of Pest Science, 78, 139–143.

Ay, R. 2006. Antalya ili örtüaltı sebze üretim alanlarında zararlı olan *Tetranychus urticae* Koch popülasyonlarının bazı akarisitlere karşı tepkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi, 12 (3), 301-306.

Ay, R. and Gürkan, M. O. 2005. Resistance to bifenthrin and resistance mechanisms of different strains of the Two-Spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae*) from Turkey. Phytoparasitica, 33(3), 237-244.

Ay, R., Sökeli, E. and Karaca, İ. 2005b. Enzyme variation among some southwest Turkey populations of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. Journal of Pest Science, 78, 175–178.

Ay, R., Sökeli, E., Karaca, İ. and Gürkan, M. O. 2005a. Response to some acaricides of the Two-spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae* Koch) from protected vegetables in Isparta. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 29, 165-171.

Bass, C., Schroeder, I., Turberg, A., Field, L.M. and Williamson, M.S. 2004. Identification of mutations associtaed with pyrethroid resistance in the *para*-type sodium channel of the cat flea, *Ctenocephalides felis*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 34 (12), 1305-1313.

Borror, D.J., Triplehorn, C.A. and Johnson, N.F. 1989. An introduction to the study of insects. Saunders College Publishing, 875 pp.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 248–254.

Brandenburg, R.L. and Kennedy, G.G. 1987. Ecological and agricultural considerations in the management of twospotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). Agricultural Zoology Reviews, 2, 185-236.

Brindley, W.A. and Selim, A.A. 1984. Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. Environmental Entomology, 13, 348–353.

Brun-Barale, A., Bouvier, J.C., Pauron, D., Berge, J.B. and Sauphanor, B. 2005. Involvement of a sodium channel mutation in pyrethroid resistance in *Cydia pomonella* L, and development of a diagnostic test. Pest Management Science, 61, 549–554.

Bynum, E.D. and Archer, T.L. 2001. Susceptibility of populations of Banks grass mites (Acari: Tetranychidae) suspected of developing bifenthrin resistance from three maize fields. Experimental and Applied Acarology, 27, 303–312.

Bynum, E.D., Archer, T.L. and Plapp, F.W. Jr. 1997. Comparison of Banks grass mite and twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae): Responses to insecticides alone and in synergistic combinations. Journal of Economic Entomology, 90, 1125–1130.

Campos, F., Dybas, R.A. and Krupa, D.A. 1995. Susceptibility of twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in California to abamectin. Journal of Economic Entomology, 88(2), 225-231.

Campos, F., Krupa, D.A. and Dybas, R.A. 1996. Susceptibility of population of twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae) from Florida, Holland and the Canary Islands to abamectin and characterization of abamectin resistance. Journal of Economic Entomology, 89(3), 594-601.

Campos, F., Krupa, D.A. and Jansson, R. 1997. Evaluation of petri plate assay for assessment of abamectin susceptibility in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology, 90(3), 742-746.

Capua, S., Cohen, E. and Gerson, U. 1990. Non-specific esterase in mites "a comparative study". Comparative Pharmacology and Toxicology, 96, 125-130.

Clark, A.G. 1989. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. Comparative Biochemistry and Physiology, 92B, 419–446.

Clark, J.M., Scott, J.G., Campos, F. and Bloomquist, J.R. 1995. Resistance to avermectins-extent, mechanisms, and management implications. Annual Review of Entomology, 40, 1–30.

Cranham, J.E and Helle, W. 1985. Pesticide resistance in Tetranychidae, in *Spider Mites: Their Biology,Natural Enemies and Control*, Vol. 1B, ed. by Helle W. and Sabelis, M. W. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 405–421.

Croft, B.A. and Van De Baan, H.E. 1988. Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in Tetranychid and Phytoseiid mites. Experimental and Applied Acarology, 4, 277–300.

Croft, B.A., Hoyt, S.C. and Westigard, P.H. 1987. Spider mite management on pome fruits, revisited: Organotion and acaricide resistance management. Journal of Economic Entomology, 80, 304-311.

Croft, B.A., Miller, R.W., Nelson, R.D. and Westigard P.H. 1984. Inheritance of early-stage resistance to formetanate and cyhexatin in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology, 77(3), 574-578.

Crozier, R.H. 1985. Adaptive consequences of male-haploidy. In: Helle, W. and Sabelis, M.W. (Editors), Spider Mites, Their Biology, Natural Enemies and Control, Vol. 1A. Elsevier, Amsterdam, pp. 201–219.

Curkovic, T.M., González, R.H. and Barría, G. 1997. Efecto de fenazaquin, fenpyroximate y pyridaben sobre *Panonychus ulmi* Koch (Acarina: Tetranychidae) y su enemigo natural *Neoseiulus californicus* McGregor (Acarina: Phytoseiidae) en manzonas y perales. Revista Frutícola, 18(3), 81-86.

Curtis, C.F., Cook, L.M. and Wood, R.J. 1978. Selection for and against insecticide resistance and possible methods of inhibiting the evolution of resistance in mosquitoes. Ecological Entomology, 3, 273-287.

Dağlı, F. and Tunç, İ. 2001. Dicofol resistance in *Tetranychus cinnabarinus*: resistance and stability of resistance in populations from Antalya, Turkey. Pest Management Science, 57 (7), 609-614.

Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R. and Williamson, M.S. 2007. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. Insect Molecular Biology, 16 (3), 361–375.

Dennehy, T.J. and Granett, J. 1984. Monitoring dicofol resistant spider mites (Acari: Tetranychidae) in California cotton. Journal of Economic Entomology, 77, 1386- 1392.

Dennehy, T.J., Farnham, A.W. and Denhom, I. 1993. The microimmersion biyoassay: a novel method for the topical application of pesticides to spider mites. Pesticide Science, 39,47-54.

Dennehy, T.J., Grafton- Cardwell, E.E., Granett, J. and Barbour, K. 1987. Practitioner-assesable biyoassay for detection of dicofol resistance in spider mites (Acari: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology, 80(5), 998-1003.

Dennehy, T.J., Granett, J. and Leigh, T. 1983. Relevance of slide- dip and residual biyoassay comparisons to detection of resistance in spider mites. Journal of Economic Entomology, 76, 1225-1230.

Dennehy, T.J., Nyrop, J.P., Reissig, W.P. and Weires, R.W. 1988. Characterisation of to dicofol in spider mites (Acari: Tetranychidae) from New York apple orchards. Journal of Economic Entomology, 81(6), 1551-1561.

Devine, G.J., Barber, M. and Denholm, I. 2001. Incidence and inheritance of resistance to METI-acaricides in European strains of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) (Acari: Tetranychidae). Pest Management Science, 57, 443-448.

Devonshire, A.L. 1977. The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. Biochemical Journal, 167, 675–683.

Devonshire, A.L. and Moores, G.D. 1982. A carboxylesterase with broad substrate specifity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 18, 235-246.

Dindar, Ö.N. ve Kılınçer, N. 1992. Farklı yapay beslenme koşullarında *Ceratitis capitata* (Wied) (Diptera: Tephritidae) erginlerine malathion'un toksisitesi

üzerinde bir araştırma. Türkiye II. Entomoloji Kongresi Bildirileri, 329-334. Entomoloji Derneği Yayınları No: 5. Bornova-İzmir, 747 s.

Dindar, Ö.N. ve Yılmaz, D. 1989. Karadeniz Bölgesi'nde fındıklarda zarar yapan fındık kurdu *(B. nucum* L.)'na karşı kullanıma yeni verilen ilaçlar üzerinde toksikolojik ön çalışmalar. Ank. Zirai Mücadele Araş. Ens. KKGA-B-01-T-044 nolu proje nihai raporu (basılmamış).

Dindar, Ö.N. ve Yılmaz, D. 1990. Orta Anadolu bölgesinde patateslerde zarar yapan patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) üzerinde toksikolojik çalışmalar. Ank. Zir. Müc. Araş. Ens. KKGA-B-01-T-43 nolu proje nihai raporu (basılmamış).

Dong, K. 1997. A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides in the German cockroach. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 27, 93–100.

Doyle, K.E. and Knipple, D.C. 1991. PCR-based phylogenetic walking: isolation of para-homologous sodium channel gene sequences from seven insect species and an arachnid. Insect Biochemistry, 21(6), 689-696.

Dörtbudak, N., Yılmaz, D. ve Aydın, M. 1987. Ankara ve Eskişehir illerinde depolanmış tahılda zarar yapan Buğday biti *(Sitophilus granarius* L.)'nin uygulamada kullanılan koruyucu ilaca karşı direnç durumunun araştırılması. Bitki Koruma Bülteni, 27 (1-2), 101-109.

Düzgüneş, Z. 1953. Mücadele ilaçlarına karşı mukavemetin meydana gelişi. Bitki Koruma Bülteni, 5, 39-47.

Ecevit, O. 1977. Probit analiz metodunun değiştirilmiş şeklinin uygulaması ve dört akar *Tetranychus urticae, Panonychus ulmi* (Acarina: Tetranychidae), *Neoseiulus fallacis, Agistemus fleschneri* (Acarina:Phytoseiidae, Stigmaeidae) üzerinde mukavemet çalışmaları. Atatürk Üniversitesi Yayınları, 507, 1-52.

Erdoğan, C. ve Gürkan, M.O. 1997. Patates böceği *Leptinotarsa decemlineata* Say. (Col.: Chrysomelidae)'nin değişik popülasyonlarının bazı insektisitlere karşı duyarlılığının belirlenmesi üzerinde araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış), Ankara Üniversitesi, 72 s., Ankara.

Erdoğan, C., Moores, G.D., Gürkan, M.O., Gorman, K.J. and Denholm, I. 2008. Insecticide resistance and biotype status of populations of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Turkey. Crop Protection, 27 (3-5), 600-605.

Erkam, B. ve Gürkan, S. 1983. Marmara bölgesi meyve ağaçlarında zararlı Avrupa kırmızıörümceği (*Panonychus ulmi* Koch)'nin akarisitlere karşı direnci üzerinde ön çalışmalar. Bitki Koruma Bülteni, 23 (3), 115-123.

Falconer, D.S. 1989. Introduction to Quantitative Genetics. 3rd ed. Longman, London, 137 pp.

Fasulo, T.R. and Denmark, H.A. 2000. Twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. UF/IFAS Featured Creatures EENY-150.

Ferguson-Kolmes, L.A., Scot, J.G. and Dennehy, T.J. 1991. Dicofol resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): Cross-resistance and pharmacokinetics. Journal of Economic Entomology, 84(1), 41-48.

Field, L.M., Devonshire, A.L. and Forde, B.G. 1988. Molecular evidence that insecticide- resistance in peach-potato aphids *(Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. Biochemical Journal, 185, 186-188.

Forgash, A.J. 1984. History, evolution and consequences of insectisides resistance. Pesticide Biochemistry and Physiology, 22 (2), 178-186.

Georghiou, G.P. 1969. Genetics of resistance to insecticides in house flies and mosquitoes. Experimental Parasitology, 26, 224–255.

Georghiou, G.P. 1980. Insectiside resistance and prospects for its management. Residue Reviews, 76, 131-145.

Georghiou, G.P. and Taylor, C.E. 1976. Pesticide resistance as an evolutionary phenomenon. Pp. 759-785. in Proc. 15 th. Int. Congr. Entomol., Washington, D. C. College Park, Md.: Entomological Society of America.

Georghiou, G.P. and Taylor, C.E. 1986. Factors influencing the evolution of resistance. In: Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management, pp. 157-169. National Academy Press, Washington, DC.

Goka, K. 1998. Mode of inheritance of resistance to three new acaricides in the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae). Experimental and Applied Acorology, 22, 699-708.

Goka, K. and Takafuji, A. 1992. Enzyme variations among Japanese populations of the two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch. Applied Entomology and Zoology, 27:141-150.

Gotoh, T., Kitashima Y. and Adachi, I. 2004. Geographic variation of susceptibility to acaricides in two spider mite species, *Panonychus osmanthi* and *P. citri* (Acari: Tetranychidae) in Japan. International Journal of Acarology, 30(1), 55-61.

Gould, F., Follett, P., Nault, B. and Kennedy, GG. 1994. Resistance management strategies for transgenic potato plants. pp. 255-277. In G. W. Zehnder, M.L. Powelson, R.K. Jansson, and K,V. Raman (eds.). Advances in potato pest biology and management. APS Press. St. Paul, MN. 655p.

Guerrero, F.D., Jamroz, R.C., Kammlah, D. and Kunz, S.E. 1997. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of *kdr* and *super-kdr* point mutations. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 27, 745–755.

Guo, F., Zhang, Z-Q. and Zhao, Z. 1998. Pesticide resistance of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) in China: a review. Systematic and Applied Acarology, 3, 3-7.

Hardman, J. M., Franklin, J. L., Moreau, D. L. ve Bostanian, N. J. 2003. An index for selective toxicity of miticides to phytophagous mites and their predators based on orchard trials. Pest Management Science, 59(12), 1321-1332.

He, H., Chen, A.C., Davey, R.B., Ivie, G.W. and George, J.E. 1999. Identification of a point mutation in the *para*-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. Biochemical and Biophysical Research Communications, 261, 558–561.

Head, D.J., McCaffery, A.R. and Callaghan, A. 1998. Novel mutations in the para-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliothine lepidoptera. Insect Molecular Biology, 7(2):191–196.

Heim, D.C., Kennedy, G.G., Van Duyn, J.W. and Gould, F. 1992. Inheritance of fenvalerate and carbofuran resistance in North Carolina Colorado potato beetles. Pesticide Science, 34, 303-311.

Helle, W. and Sabelis, M.W. 1985. Spider mites: their biology, natural enemies and control. Volume 1B. Elsevier Amsterdam. 458 pp.

Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L. and Ranson, H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 34, 653–665.

Herron, G. A. and Rophail, J. 1993. Genetics of hexythiazox resistance in 2-spotted spider-mite, *Tetranychus urticae* Koch. Experimental and Applied Acarology, 17, 423–431.

Herron, G. A. and Rophail, J. 1998. Tebufenpyrad (Pyranica) resistance detected in two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) from apples in Western Australia. Experimental and Applied Acarology, 22, 633–641.

Herron, G.A. and Rophail, J. 2002. The stability of tebufenpyrad resistance in two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) under laboratory conditions. Experimental and Applied Acarology, 26(3-4), 253-256.

Herron, G.A., Edge, V. and Rophail, J. 1993. Clofentezine and hexythiazox resistance in *Tetranychus urticae* Koch in Australia. Experimental and Applied Acarology, 17, 433-440.

Herron, G.A., Rophail, J. and Wilson, L.J. 2001. The development of bifenthrin resistance in two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from Australian cotton. Experimental and Applied Acarology, 25, 301–310.

Herron, G.A., Rophail, J. and Wilson, L.J. 2004. Chlorfenapyr resistance in two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from Australian cotton. Experimental and Applied Acarology, 34, 315–321.

Herron, G.A., Rophail, J., Holloway, J. and Barchia, I. 2003. Potentiation of a propargite and fenpyroximate mixture against two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Experimental and Applied Acarology, 29, 115–119.

Hodgson, E., Rose, R.L., Goh, D.K.S., Rock, G.C. and Roe, R.M. 1993. Insect cytochrome P-450: metabolism and resistance to insecticides. Biochemical Society Transactions, 21, 1060-1065.

Horowitz, A.R., Gorman, K., Ross, G. and Denholm, I. 2003. Inheritance of pyriproxyfen resistance in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Q Biotype). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 54, 177-186.

Hoskins, W.M. 1960. Use of the dosage-mortality curve in quantitative estimination of insecticide resistance. Miscellaneous Publication of the Entomological Society of America, 2(1), 85-91.

Hoskins, W.M. and Gordon, H.T. 1956. Arthropod resistance to chemicals. Annual Review of Entomology, 1, 89-122.

Hoy, M.A. and Conley, J. 1989. Propargite resistance in Pacific spider mite (Acari: Tetranychidae): stability and mode of inheritance. Journal of Economic Entomology, 82, 11–16.

Hoy, M.A., Knop, N.F. and Joos, J.L. 1980. Pyrethroid resistance persists in spider mite predator. California Agriculture, 34, 11-12.

Hoyt, S.C., Westigard, P.H. and Croft, B.A. 1985. Cyhexatin resistance in Oregon populations of *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology, 78, 656-659.

Huffaker, C.B., Van De Vrie, M. and McMurty, J.A. 1969. The ecology of tetranychid mites and their natural control. Annual Review of Entomology, 14, 125-174.

Humeres, E.C. and Morse, J.G. 2005. Baseline susceptibility of persea mite (Acari: Tetranychidae) to abamectin and milbemectin in avocado groves in Southern California. Experimental and Applied Acarology, 36, 51-59.

Ingles, P.J., Adams, P.M. Knipple, D.C. and Soderlund, D.M. 1996. Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant housefly strains. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 26, 319-326.

Jamroz, R.C., Guerrero, F.D., Kammlah, D.M. and Sidney, E.K. 1998. Role of the *kdr* and *super-kdr* sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 28, 1031–1037.

Jamroz, R.C., Guerrero, F.D., Pruett, J.H., Oehler, D.D. and Miller, R.J. 2000. Molecular and biochemical survey of acaricides resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. Journal of Insect Physiology, 46, 685–695.

Jeppson, L.R., Keifer, H.H. and Baker, E.W. 1975. Mites Injurious to Economic Plants. University of California Press, Berkeley, CA, USA, pp. 614.

Kabir, K.H. and Chapman, R.B. 1997. Operational and biological factors influencing responses of spider mites (Acari: Tetranychidae) to propargite by using the petri dish-potter tower method. Journal of Economic Entomology, 90(2), 272-277.

Kasamatsu, K. 1992. Negative correlation to tetradifon sensitivity in fenpropathrin selected strain of the two-spotted spider, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Applied Entomology and Zoology, 27(3), 458-460.

Kasap, İ. 2001. Turunçgil üretim alanlarında kullanılan bazı tarımsal savaş ilaçlarının daldırma yöntemi ile Turunçgil kırmızıörümceği *Panonychus citri* (McGregor) (Acarina:Tetranychidae)' nin iki farklı ırkı üzerine etkilerinin saptanması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi, 11(2), 41-45.

Keena, M.A. and Granett, J. 1990. Genetic analysis of propargite resistance in pacific spider mites and twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology, 83(3), 655-661.

Keena, M.A., Grafton-Cardwel, E. and Granett, J. 1991. Variability in response of laboratory-reared and field-collected populations of *Tetranychus* spp. (Acari: Tetranychidae) to hexythiazox. Journal of Economic Entomology, 84(4), 1128-1134.

Kim, S.S, and Lee, S.C.1990. Development of acaricidal resistance esterase isozyme of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Korean Journal of Applied Entomology, 29, 170-175.

Kim, Y., Lee, S., Lee, S. and Ahn, Y. 2004. Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and biochemical resitance mechanisms. Pest Management Science, 60, 1001-1006.

Kim, Y.J., Park, H.M., Cho, J.R. and Ahn, Y.J. 2006. Multiple resistance and biochemical mechanisms of pyridaben resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology, 99(3), 954-958.

Knipple, D.C., Doyle, K.E., Marsella-Herrick, P.A. and Soderlund, D.M. 1994. Tight genetic linkage between the *kdr* insecticide resistance trait and a voltage-

sensitive sodium channel gene in the house fly. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 91:2483-2487, Agricultural Sciences.

Kolmes, S.A., Dennehy, T.J. and Sam, Y. 1994. Contrasting behaviour of twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae) on discontinuous residues of a pyrethroid and a chlorinated hydrocarbon acaricide. Journal of Economic Entomology, 87(3), 559-565.

Konanz, S. and Nauen, R. 2004. Purification and partial characterization of a glutathione S-transferase from the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 79, 49–57.

Kuhawara, M. 1977. The development and inheritance of resistance in the Kanzawa spider mite,*Tetranychus kanzawai* Kishida, selected with chlordimeform, dicofol, and phenthoate. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology, 21, 163–168.

Kuhawara, M. 1982. Insensitivity of the acetylcholinesterase from the organophosphate resistant Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acarina: Tetranychidae), to organophosphorus and carbamate insecticides. Applied Entomology and Zoology, 17 (4), 486-493.

Kuhawara, M. 1984. Studies on the resistance of the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawi* Kishida, to acaricides. Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences. 39:1-75.

Kuhawara, M., Miyata, T., Saito, T. and Eto, M. 1982. Activity and substrate spesicificity of the esterase associated with organophosphorus insecticide resistance in the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acarina: Tetranychidae). Applied Entomology and Zoology, 17 (1), 82-91.

Kumral, N.A. and Kovancı, B. 2007. Susceptibility of female populations of *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae) to some acaricides in apple orchards. Journal of Pest Science, 80, 131–137.

Landeros, J., Ail, C., Badi, M.H., Guerrero, E. and Cerna, E. 2006. Susceptibility and mechanisms of resistance of *Tetranychus urticae* (Tetranychidae) populations from greenhouse roses. 12th International Congress of Acarology, Amsterdam, The Netherlands, 105 p.

Leahey, J.P. 1979. The metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides. Outlook Agric. 10, 135–142.

Lee, S.H., Dunn, J.B., Clark, J.M. and Soderlund, D.M. 1999. Molecular analysis of *kdr* like resistance in a permethrin-resistant strain of Colorado potato beetle. Pesticide Biochemistry and Physiology, 63, 63–75.

Lee, S.H., Gao, J.R., Yoon, K.Y., Mumcuoglu, K.Y., Taplin, D., Edman, J.D., Lee, M.T. and Clark, J.M. 2003. Sodium channel mutations associated with knockdown resistance in the human head louse, *Pediculus capitis* (De Geer). Pesticide Biochemistry and Physiology, 75, 79–91.

Lee, S.H., Yoon, K.S., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Takano-Lee, M., Edman, J.D., Devonshire, A.L. and Clark, J.M. 2000. Molecular analysis of kdr-like resistance in permethrin-resistant strains of head lice, *Pediculus capitis*. Pesticide Biochemistry and Physiology 66, 130–143.

Leeuwen, T. and Tirry, L. 2007. Esterase-mediated bifenthrin resistance in a multiresistant strain of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae.* Pest Management Science, 63 (2), 150-156.

Leeuwen, T., Stillatus, V. and Tirry, L. 2004. Genetic analysis and cross-resistance spectrum of a laboratory-selected chlorfenapyr resistant strain of two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). Experimental and Applied Acarology, 32, 249–261.

Leeuwen, T., Van Pottelberge, S. and Tirry, L. 2005. Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. Pest Management Science, 61, 499–507.

Leeuwen, T., Van Pottelberge, S. and Tirry, L. 2006a. Biochemical analysis of chlorfenapyr selected resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch. Pest Management Science, 62, 425–433.

Leeuwen,T., Tirry, L. and Nauen, R. 2006b. 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.

LeOra Software. 1987. POLO-PC: A user's guide to Probit or Logit analysis. Berkeley, 20p.

Lewis, J.B. 1969. Detoxification of diazinon by subcellular fractions of diazinon-resistant and susceptible houseflies. Nature, 224, 917-918.

Li, A.Y., Davey, R.B., Miller, R.J. and George, J.E. 2005. Mode of inheritance of amitraz resistance in a Brazilian strain of the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Experimental and Applied Acarology, 37, 183-198.

Lin, H., Zhimo, Z., Xinping, D., Jinjun, W. and Huai, L. 2003. Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to methrin, abamectin, pyridaben and their mixtures in the spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*. International Journal of Pest Management, 49 (4), 271–274.

Liu, Z., Tan, J., Huang, Z.Y. and Dong, K. 2006. Effect of a fluvalineate-resistance-associated sodium channel mutation from varroa mites on cockroach sodium channel sensitivity to fluvalineate, a pyrethroid insecticide. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36, 885–889.

Liu, Z., Tan, J., Valles, S.M. and Dong, K. 2002. Synergistic interaction between two cockroach sodium channel mutations and a tobacco budworm sodium channel mutation in reducing channel sensitivity to a pyrethroid insecticide. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32, 397–404.

Liu, Z., Valles, S.M. and Dong, K. 2000. Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30, 991-997.

Loughney, K., Kreber, R. and Ganetzky, B. 1989. Molecular analysis of the para locus, a sodium-channel gene in *Drosophila*. Cell, 58, 1143–1154.

Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Berge´, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N. and Pauron, D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. Insect Molecular Biology, 7, 179–184.

Martinez-Torres, D., Chevillon, C., Brun-Barale, A., Berge´, J.B., Pasteur, N. and Pauron, D. 1999a. Voltage-dependent Na+ channels in pyrethroid- resistant *Culex pipiens* L. mosquitoes. Pesticide Science, 55, 1012–1020.

Martinez-Torres, D., Devonshire, A.L., Williamson, M.S., 1997. Molecular studies of knockdown resistance to pyrethroids: cloning of domain II sodium channel gene sequences from insects. Pesticide Science, 51, 265–270.

Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Field, L.M., Devonshire, A.L. and Williamson, M.S. 1999b. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Insect Molecular Biology, 8, 339–346.

Martinson, T.E., Dennehy, T.J., Nyrop, J.P. and Reissig, W.H. 1991. Field-measurements of selection for 2-spotted spider-mite (Acari: Tetranychidae) resistance to dicofol in apple orchards. Journal of Economic Entomology, 84, 7–16.

McDonald, P.T. and Schmidt, C.D. 1987. Genetics of permethrin resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). Journal of Economic Entomology, 80, 433-437.

Mckenzie, J.A. and Batterham, P. 1994. The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. Trends in Ecology and Evolution, 9, 166-169.

McKenzie, J.A., Parker, A.G. and Yen, J.L. 1992. Polygenic and single gene responses to selection for resistance to diazinon in *Lucilia cuprina*. Genetics, 130, 613–620.

Miyazaki, M., Ohyama, K., Dunlap, D.Y. and Matsumura, F. 1996. Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant german cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). Molecular and General Genetics, 252, 61–68.

Mizutani, A. Kumayama, F. Ohba, K. Ishiguro, T. and Hayashi, Y. 1988. Inheritance of resistance to cyhexatin in the Kanzawa spider mite *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acarina: Tetranychidae). Applied Entomology and Zoology, 23, 251–255.

Morin, S., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Brown, J.K., Tabashnik, B.E. and Dennehy, T.J. 2002. Mutations in the *Bemisia tabaci para* sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32, 1781-1791.

Motoba, K., Nishizawa, H., Suzuki, T., Hamaguchi, H., Uchida, M. and Funayama, S. 2000. Species-specific detoxification metabolism of fenpyroximate, a potent acaricide. Pesticide Biochemistry and Physiology, 67, 73–84.

Mouches, C., Pasteur, N, Berge, J.B. Hyreien, O., Raymond, M., de Sain Vincent, B.R., De Silvestri, M. and Georghiou, G.P. 1986. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in California culex mosquito. Science, 233, 778-780.

Mozes-Koch, R., Slabezki, Y., Efrat, H., Kamer, Y., Yakobson, B.A. and Dag, A. 2000. First detection of fluvinate resistance in the Varroa mite using bioassay and biochemical methods. Experimental and Applied Acarology, 24, 35–43.

Mullin, C.A. and Scott, G.J. 1992. Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC.

Narahashi, T. 1986. Mechanisms of action of pyrethroids on sodium channel and calcium channel gating. In Neuropharmocology in Pesticide Action (Edited by Ford M. G.. Lunt G. G., Reay R. C. and Usherwood P. N. R.), pp. 36-60. Horwood, Chichester.

Nauen, R., Stumpf, N., Elbert, A., Zebitz, C.P.W. and Kraus, W. 2001. Acaricide

toxicity and resistance in larvae of different strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). Pest Management Science, 57, 253-261.

Navajas, M., Lagnel, J., Gutierrez, J. and Boursot, P. 1998. Species-wide homogenity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. Heredity, 80, 742-752.

O'brien, R.D. 1971. Insecticides action and metabolism (fourty edition) Academic press, 332p., New York and London.

Ornstein, L. and Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis I. Background and theory. Ann. NY. Acad. Sci., 121, 321-349.

Osborne, M.P., Hart, R.J. 1979. Neurophysiological studies of the effects of permethrin upon pyrethroid resistant *(kdr)* and suseptible strains of dipteran larvae. Pesticide Science, 10, 407-413.

Öden T., Temizer, A. ve Ersoy, G. 1972. DDT ve BHc'nin kımıl (*Aelia rostrata* Boh.)'a etkisi üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 12(1), 145-152.

Öden, T., Ersoy, G. ve Temizer, A. 1971. Lindane ve Carbaryl'e karşı Bambul'un (*Anisoplia austrica*) mukavemet durumu üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 11, 65-71.

Öden, T., Temizer, A., Ersoy, G. ve Kunter, K. 1975. Fındık kurdu (*Blaninus nucum* L.)'nun carbaryl ve methiocarb'a karşı direnci üzerinde çalışmalar. Bitki Koruma Bülteni, 15(1), 36-40.

Önçağ, G. 1981. Ege bölgesinde çeşitli kültür bitkilerinde zarar yapan iki noktalı akar (*Tetranychus urticae* Koch.) savaşımında kullanılan ilaçlara karşı popülasyondaki direnç seviyelerinin araştırılması. TÜBİTAK TOAG Proje No. 365., 37 s.

Park, Y. and Taylor, M.F. 1997. A novel mutation L1029H in sodium channel gene hscp associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera:Noctuidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 27, 9–13.

Park, Y., Taylor, M.F.J. and Feyereisen, R. 1997. A valine 421 to methionine mutation in IS6 of the *hscp* voltage-gated sodium channel associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* F. Biochemical and Biophysical Research Communications, 239, 688–691.

Pittendrigh, B., Reenan, R., Ffrench-Constant, R. and Ganetsky, B. 1997. Point mutations in the *Drosophila para* voltage-gated sodium channel gene confer resistance to DDT and pyrethroid insecticides. Molecular and General Genetic, 256, 602–610.

Pottelberge, S.V., Leeuwen, T.V., Caluwe, L.D. and Tirry, L. 2006. Cross-resistance, inheritance and biochemistry of METI-acaricide resistance in a field-collected Belgian strain of the two-spotted spidr mite (Tetranychidae). 12th International Congress of Acarology, Amsterdam, The Netherlands, 209 p.

Pree, D.J. 1987. Inheritance and management of cyhexatin and dicofol resistance in the European red mite (Acari:Tetranychidae). Journal of Economic Entomology, 80 (6), 1106-1112.

Pree, D.J., Whitty, K.J. and Driel, V. 2005. Baseline susceptibility and cross resistances of some new acaricides in the European red mite, *Panonychus ulmi*. Experimental and Applied Acarology, 37, 165-171.

Pritchard, A.E. and Baker, E.W. 1955. A revision of the spider mite family Tetranychidae. The Pacific Coast Entomological Society, 2 (436).

Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J. and Collins, F.H. 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Molecular Biology, 9, 491–497.

Rauch, N. and Nauen, R. 2003. Spirodiclofen resistance risk assessment in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): a biochemical approach. Pesticide Biochemistry and Physiology, 74, 91–101.

Rizzieri, D.A., Dennehy, T.J. and Glover, T.J. 1988. Genetic analysis of dicofol resistance in two populations of twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from New York apple orchards. Journal of Economic Entomology, 81(5), 1271-1276.

Roditakis, E., Tsagkarakou, A. and Vontas, J. 2006. Identification of mutations in the para sodium channel of *Bemisia tabaci* from Crete, associated with resistance to pyrethroids. Pesticide Biochemistry and Physiology, 85, 161–166.

Rose, R.L., Barbhaiya, L., Roe, R.M., Rock, G.C. and Hodgson. E. 1995. Cytochrome P450-associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in *Heliothis virescens.* Pesticide Biochemistry and Physiology, 51, 178-191.

Roush, R.T. and Daly, J.C.1990. The role of population genetics in resistance research and management, pp. 128– 142. *In* R. T. Roush and B. E. Tabashnik [eds.], Pesticide resistance in arthropods. Chapman & Hall, New York.

Roush, R.T. and Hoy, M.A. 1981. Laboratory, glasshouse, and field studies of artificial selected carbaryl resistance in *Metaseiulus occidentalis*. Journal of Economic Entomology, 74, 142-147.

Roush, R.T. and Mckenzie, J.A. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Annual Review of Entomology, 32, 361-380.

Roush, R.T. and Miller, G.L. 1986. Considerations for design of insecticide and acaricide resistance. Annual Review of Entomology, 32, 361-380.

Salgado, V.L., Irving, S.N. and Miller, T.A. 1983. Depolarization of motor nerve terminals by pyrethroid in susceptible and *kdr*-resistant house flies. Pesticide Biochemistry and Physiology, 20, 100-l14.

Sato, E.M., Tanaka, T. and Miyata, T. 2006. Monooxygenase activity in methidathion resistant and susceptible populations of *Amblyseius womersleyi* (Acari: Phytoseiidae). Experimental and Applied Acarology, 39, 13–24.

Sato, M.E., Miyata, T., Da Silva, M., Raga, A. and De Souza, 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, 293–302.

Schoknecht, U. and Otto, D. 1989. Enzymes involved in the metabolism of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides. Chemistry of Plant Protection (Germany, F. R.), v. 2, p. 117-156.

Schuler, T.H., Martinez-Torres, D., Thompson, A.J., Denholm, I., Devonshire, A.L., Duce, I.R. and Williamson, M.S. 1998. Toxicological, electrophysiological, and molecular characterisation of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). Pesticide Biochemistry and Physiology 59, 169–182.

Scott, J.G. 1990. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies and pitfalls. In: Roush R.T. and Tabashnik B.E. (eds) Pesticide Resistance in Arthropods. Chapman and Hall, New York, pp. 39–57.

Scott, J.G. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 29, 757–777.

Shen, B., Dong, H.Q., Tian, H.S., Ma, L., Li, X.L., Wu, G.L. and Zhu, C.L. 2003. Cytochrome P450 genes expressed in the deltamethrin-susceptible and resistant strains of *Culex pipiens pallens*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 75, 19-26.

Smissaert, H.R. 1965. Esterases in spider mites hydrololysing α- naphtylasetat. Nature, 205, 158-160.

Soderlund, D. 2005. Sodium channels. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), Comprehensive Insect Science, vol. 5-Pharmacology, Elsevier, Amsterdam, pp. 1–24.

Soderlund, D.M. 1997. Molecular Mechanism of Insecticide Resistance. In:Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals (ed. Sjut, V.). Springer, 21-56, Germany.

Soderlund, D.M. 1998. Molecular mechanisms of insecticide resistance, in Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals, ed. by Sjut V. Springer, Berlin, Germany, pp. 57–77.

Soderlund, D.M. and Knipple, D.C. 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33, 563-577.

Sogorb, M.A. and Vilanova, E. 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. Toxicology Letters, 128, 215–228.

Sokal, R.R and Rohlf F.J. 1995. Biometry, 3rd edition. W.H Freeman and Co., New York, NY, 887 pp.

Stone, B.F. 1968. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. Bulletin of the World Health Organization, 38, 325-326.

Stumpf, N. 2001. Acaricide resistance in the phytophageous spider mites *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi*: Risk assessment and biochemical mechanisms. Ph.D. Thesis.

Stumpf, N. and Nauen, R. 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. and Nauen, R. 2002. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 72, 111–121.

Sundukov, O.V., Zil-Bermints, I.V., Golovkina, L.S. and Novozhilov, K.V. 1989. Problemy Izbiratel'nosti Deistviya Insektitsidov I Akaritsidov I Ee Znachenie V Zashchite Rastenii, 19:64-69.

Tabashnik, B.E. and Croft, B.A. 1982. Managing pesticide resistance in crop - arthropod complexes: interactions between biological and operational factors. Environmental Entomology, 11, 1137-1144.

Tabashnik, B.E. and Cushing, N.L. 1989. Quantitative genetic analysis of insecticide resistance: variation in fenvalerate tolerance in a diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) population Journal of Economic Entomology, 82, 5-10.

Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Malvar, T., Heckel, D.G., Masson, L., Ballester, V., Granero, F., Mensua, J.L. and Ferre, J. 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis.* Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 94, 12780-12785.

Takeyama, K., Mori, N. and Osakabe, M.H. 2006. Effect of cytochrome P450 inhibitor, piperonyl butoxide, on survival of *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) on citrus leaves. Applied Entomology and Zoology, 41 (3), 487–491.

Tan, J., Liu, Z., Tsai, T.D., Valles, S.M., Goldin, A.L. and Dong, K. 2002. Novel sodium channel gene mutations in *Blattella germanica* reduce the sensivity of expressed channels to deltamethrin. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32, 445-454.

Tan, J., Liu, Z., Wang, R., Huang, Z.Y., Chen, A.C., Gurevitz, M. and Dong, K. 2005. Identification of amino acid residues in the insect sodium channel critical for pyrethroid binding. Molecular Pharmacology, 67, 513–522.

Tapia-Perez, G., Garcia-Vazquez, Z., Montaldo, H. and George, J. 2003. Inheritance of resistance to flumethrin in the Mexican Aldama strain of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Experimental and Applied Acarology, 31, 135-149.

Taylor, M.F.J., Heckel, D.G., Brown, T.M., Kreitman, M.E. and Black, B. 1993. Linkage of pyrethroid insecticide resistance to a sodium channel locus in the Tobacco Budworm. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 23, 763–775.

Temizer, A. 1972. Süne (*Eurygaster integriceps* Put.)'nin değişik hayat dönemlerinin ilaçlara karşı direnci konusunda çalışmalar. Ank. Zir. Müc. İlaç ve Alet Ens. çalışması (basılmamış).

Terriere, L.C. 1984. Induction of detoxification enzymes in insects. Annual Review of Entomology, 29, 71-88.

Tian, T., Grafton-Cardwel, E. and Granett, J. 1992. Resistance of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to cyhexatin and fenbutatin-oxide in California pears. Journal of Economic Entomology, 85(6), 2088-2095.

Tomita, T., Yaguchi, N., Mihara, M., Takahashi, M., Agui, N. and Kasai, S. 2003. Molecular analysis of a *para* sodium channel gene from pyrethroid-resistant Head Lice, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). Journal of Medical Entomology, 40(4), 468-474.

Toros, S., Maden, S. ve Sözeri, S. 2001. Tarımsal savaş yöntem ve ilaçları. (genişletilmiş 3. baskı). A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları:1520, 417s., Ankara.

Tsagkarakou, A., Navajas, M., Lagnel, J., Gutierrez, J. and Pasteur, N. 1996. Genetic variability in *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae) from Greece: Insecticide resistance and Isosyme. Journal of Economic Entomology, 89 (6), 1354 – 1358.

Tsagkarakou, A., Pasteur, N., Cuany, A., Cuany, A., Chevillon, C. and Navajas, M. 2002. Mechanisms of resistance to organophosphates in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Greece. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32, 417–424.

Tsukahara, Y., Sonoda, S., Fujiwara, Y., Nakasuji, F. and Tsumuki, H. 2003. Molecular analysis of the *para*-sodium channel gene in the pyrethroid-resistant diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). Applied Entomology and Zoology, 38 (1), 23–29.

Uesugi, R., Goka, K. and Osakabe, M.H. 2002. Genetic basis of resistance to chlorfenapyr and etoxazole in the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology, 95, 1267–1274.

Uğurlu, S. and Gürkan, M.O. 2007. Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* from cotton-growing areas in Turkey. Phytoparasitica, 35(4), 376-379.

Ullrich, V. and Weber, P. 1972. The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. A direct fluorometric test. Hoppe Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie, 353(7), 1171–1177.

Ural, İ., Işık, M., Kırtıloğlu, T. ve Özdemir, N. 1986. Karadeniz Bölgesinde *Balaninus nucum*'a karşı ilaç denemeleri. Ank. Zir. Müc. İlaç ve Alet Ens. 108.600 nolu proje nihai raporu (basılmamış).

Ünal, G. ve Uğurlu, S. 1998. Orta Anadolu Bölgesinde Patates Böceği *Leptinotarsa decemlineata* Say) popülasyonlarının yaygın olarak kullanılan insektisitlere karşı duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi üzerinde çalışmalar. Türkiye 4. Entomoloji Kongresi Bildirileri, Aydın, s. 285-294.

Ünal, G., Yilmaz, D., Kılıç, B. ve Dindar, Ö. N. 1994. Orta Anadolu Bölgesi hububat alanlarında zarar yapan kımıl (*Aelia rostrata* Boh)'ın insektisitlere karşı duyarlılıklarının araştırılması. Bitki Koruma Bülteni, 34 (3-4), 135-142.

Vais, H., Williamson, M.S., Devonshire, A.L. and Usherwood, P.N.R. 2001. The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. Pest Management Science, 57, 877–888.

Velioğlu, A.S. 1999, Değişik bölgelerden toplanan *Myzus persicae* (Sulz.) popülasyonlarının farklı gruptan bazı insektisitlere karşı duyarlılık farklarının belirlenmesi üzerinde araştırmalar. Doktora tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, 106s., Ankara.

Wang, R., Huang, Z.Y. and Dong, K. 2003. Molecular characterization of an arachnid sodium channel gene from the varroa mite (*Varroa destructor*). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33, 733–739.

Wang, R., Liu, Z., Dong, K., Patti, J., Jeff, P. and Zacharyy, H. 2002. Association of novel mutations in a sodium channel gene with fluvalineate resistance in the mite, *Varroa destructor*. Journal of Apicultural Research, 41(1-2), 17-25.

Weyda, F., Sula, J. and Gresner, M. 1984. Sbornik Uvtiz Ochrana Rostlin, 20,123-129.

Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A. and Devonshire, A.L. 1996. Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. Molecular and General Genetics, 252, 51–60.

Xu, Q., Liu, H., Zhang, L., and Liu, N. 2005. Resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and possible mechanisms for resistance. Pest Management Science, 61, 1096–1102.

Yamamoto, A., Yoneda, H., Hatano, R. and Asada, M. 1995. Genetic analysis of hexythiazox resistance in the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor). Journal of Pesticide Science, 20, 513–519.

Yang, X., Buschman, L.L., Zhu, K.Y. and Margolies, D.C. 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.

Yang, X., Zhu, K.Y., Buschman, L.L. and Margolies, D.C. 2001. Comparative susceptibility and possible detoxification mechanisms for selected miticides in Banks grass mite and two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). Experimental and Applied Acarology, 25, 293-299.

Young, L., KiSu, A., ChulSu, K., SangChul S. and GilHah, K. 2004. Inheritance and stability of etoxazole resistance in twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*, and its cross resistance. Korean Journal of Applied Entomology, 43 (1), 43-48.

Zhang, L., Gao, X. and Liang, P. 2007. Beta-cypermethrin resistance associated with high carboxylesterase activities in a strain of house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 89(1), 65-72.

E K L E R

EK 1 Karboksilesteraz Enzim Aktivitesinin Ölçümü İçin Gerekli Olan Malzemelerin Hazırlanışı

EK 2 Polikarilamit Jel Elektroforez Yapılışı İçin Gerekli Olan Malzemelerin Hazırlanışı

EK 3 Glutation S-Transferaz Aktivitesinin Ölçümü İçin Gerekli Olan Malzemelerin Hazırlanması

EK 4 Sitokrom P-450 Monooksijenaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü İçin Gerekli Olan Malzemelerin Hazırlanması

EK 5 *Blattella, Pediculus, Musca, Heliothis, Boophilus* ve *Varroa*'nın NCBI Web Sayfasında Kayıtlı Sodyum Kanalı Sekanslarından EBI Cluster W Programı ile Yapılan Alignment

EK 6 Qiaquick Jel Ektraksiyon Kiti Kullanılarak Poliakrilamit Jelden DNA Fragmentlerinin Ekstraksiyonu

EK 7 MicroSpin™ S-400 HR Kolonları ile PCR Ürünlerinin Temizlenmesi Kolonun Hazırlanması

EK 8 Sekans Sonuçları

EK 1 Karboksilesteraz Enzim Aktivitesinin Ölçümü İçin Gerekli Olan Malzemelerin Hazırlanışı

0.1 M (pH 7.6) sodyum fosfat buffer hazırlanışı;

$Na_2HPO_4.12H_20$ 15.179 g
$NaH_2PO_4.2H_20$ 1.014 g tartılarak 500 ml suya tamamlanır ve içerisinde 0.5 g Triton X-100 ilave dilerek pH ayarlanır.

0.2 mol (pH 6.0) sodyum fosfat buffer hazırlanışı;

$Na_2HPO_4.12H_20$ 31.158 g

$NaH_2PO_4.2H_20$ 2.028 g tartılarak 1 L suya tamamlanır ve pH ayarlanır.

100 mM α-naphtil acetate hazırlanışı;

1.86 g α-naphtil acetate tartılır ve 100 ml'ye aseton ile tamamlanır.

EK 2 Polikarilamit Jel Elektroforez Yapılışı İçin Gerekli Olan Malzemelerin Hazırlanışı

Küçük porlu jel

10 ml Bis akrilamit (%2 lik çözelti), 19 ml Akrilamit (% 40 lık çözelti), 3.85 g Tris-Base, 0.923 g Tris HCl ve 60 µl TEMED 88 ml steril distile suda çözülür. Üzerine 0.075 g amonyumpersulfat ve 12.5 ml Triton X 100 (% 1.6'lık çözelti) konarak iyice karıştırılır ve cam plakalar arasına dökülerek yarım saat donması beklenir. Bu karışım üzerine jelin düzgün donması için az miktarda n-butanol eklenir.

Büyük porlu jel

19 ml Bis akrilamit (%2 lik çözelti), 4 ml Akrilamit (% 40 lık çözelti), 0.02 g Tris-Base, 0.566 g Tris HCl ve 40 µl TEMED 45 ml steril distile suya tamamlanır. Üzerine %0.005' lik 7.5 ml riboflavin ve 7.5 ml Triton X 100 (% 1.6'lık çözelti) konarak iyice karıştırılır ve cam plakalar arasına dökülerek 1 gün soğuk ışık altında donması beklenir.

Glycine (Koşturma) Buffer

7.2 g glycine, 1.5 g tris base 2.5 L destile suda çözülür.

Koşturma

+4 °C' de soğutularak 1.5 saat süre ile 250 volt ile yapılır. Koşturma sırasında elektroforez tankının etrafı buz kalıbıyla kaplanarak ortam sıcaklığı +4 ^{o}C' de sabit tutulmaya çalışılmıştır.

Boyama (1 jel için)

Jel boyanmadan önce pH 6.0 fosfat bufferda 10 dk bekletilir. 0.1 g Fast Blue RR tuzu tartılarak 50 ml Fosfat Buffer (pH 6.0) içerisine karıştırılır. Üzerine 100 mM α-naphtil acetate'tan 1 ml eklenir ve 15-20 dk. boyanır Boyandıktan sonra %7'lik asetik asit içinde fikse edilir. Tarayıcı ile taranarak saklanır.

EK 3 Glutation S-Transferaz Aktivitesinin Ölçümü İçin Gerekli Olan Malzemelerin Hazırlanması

Tris HCL buffer pH (7.5) hazırlanışı;

HCL	Base	
6.35 g	1.18 g	1 L
3.175 g	0.5 g	500 ml

4 mM GSH hazırlanışı;

10 ml (pH 7.5) Tris HCL buffer içerisinde 0.0368 g GSH çözdürülür. Plate'in her hücresine 100 µl konur.

0.4 mM CDNB hazırlanışı;

10 ml EtOH içerisinde 0.242 g CDNB çözdürülür. Bu karışım içerisinden 10 µl alınarak 990 µl (pH 7.5) Tris HCL buffer'a tamamlanır. Plate'in her hücresine 1.2 mM'lık bu karışımdan 100 µl konur. Böylelikle 0.4 mM konulmuş olur.

EK 4 Sitokrom P-450 Monooksijenaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü İçin Gerekli Olan Malzemelerin Hazırlanması

2 mM p-nitroanisol (PNA) hazırlanışı;

400 mM stok solüsyon hazırlamak için 61 mg PNA 1 ml % 100'lük etanol içerisinde çözdürülür ve bu karışımdan 125 µl alınarak 25 ml ılık sodyum fosfat buffer (0.1M, pH 7.8) içerisine eklenir.

9.6 mM NADPH hazırlanışı;

4 mg NADPH 500 µl sodyum fosfat buffer (0.1M, pH 7.8) içerisinde çözdürülür.

0.5 mM 7-ethoxycoumarin hazırlanışı;

20 mM 7 ethoxycoumarin elde etmek için 1.902 mg 7-ethoxycoumarin 500 µl % 100'lük etanol içerisinde çözdürülür ve daha sonra 0.5 mM7-ethoxycoumarin elde etmek için 10 µl yukarıdaki karışımla 390 µl sodyum fosfat buffer (0.1M, pH 7.8) kombine edilir.

0.1 M (pH 7.8) sodyum fosfat buffer hazırlanışı;

$Na_2HPO_4.12H_20$ 32.770 g
$NaH_2PO_4.2H_20$ 1.326 g tartılarak 1 L suya tamamlanır ve pH ayarlanır.

EK 5 *Blattella, Pediculus, Musca, Heliothis, Boophilus* ve *Varroa*'nın NCBI Web Sayfasında Kayıtlı Sodyum Kanalı Sekanslarından EBI Cluster W Programı ile Yapılan Alignment

```
 Blattella      ----------------------------------------------MSDDSSSISEEE 12
[Pediculus      ----------------------------------------------MSDISDFHSEEE 12
[Musca          ----------------------------------------------MTEDSDSISEEE 12
[Heliothis      ----------------------------------------------MSEDLDSISEEE 12
[Boophilus      ------------------------------------------------------------
[Varroa         MPPAPAETALSANTEQPAFSTSSATPHALALPIAEDGVHADHDDDDFHDHDIEHMLGDEP 60

[Blattella      RSLFRPFTRESLAAIEARIAEEYAKQKELEKKRAEGE-----------VRYDDEDEDEGP 61
[Pediculus      QRLFRPFTRESLAAIEQRIAQENEKFKELEKKRADGE-----------IRYDDEDEDEGP 61
[Musca          RSLFRPFTRESLLQIEQRIA-EHEKQKELERKRAAEG---------EQIRYDDEDEDEGP 62
[Heliothis      RSLFRPFTRESLAAIEARIAEEHAKQKELEKKRAEGENDLGRTKKKKEVRYDDEDEDEGP 72
[Boophilus      ------------------------------------------------------------
[Varroa         QSIFRPFTRESLATQLARLAEEAAKKAQLEKMREEGI----------EPEPQFYHHKEAP 110

[Blattella      QPDATLEQGAPIPVRMQGLFPPELASTPLEDIDPFYHNQRTFVVVSKGKDIFRFSATDAM 121
[Pediculus      QPDPTLEQGVPIPVRMQGEFPQELASTPLEDIDSYYHNQRTFVVISKGKDIFRFSATNAM 121
[Musca          QPDPTLEQGVPIPVRMQGSFPPELASTPLEDIDPFYSNVLTFVVISKGKDIFRFSASKAM 122
[Heliothis      QPDATLEQGLPLPVRMQGTFPAEVSSIPLEDIDPFYHNQRTFVVISKGKDIFRFSATNAL 132
[Boophilus      ------------------------------------------------------------
[Varroa         DPDPGLEAGGPLPKRIVNDFPPELIATPVEEIDKYYENKRTFMVISKGKDIFRFSSTNAL 170

[Blattella      WILDPFNPIRRVAIYILVHPLFSLFIITTILTNCIFMIMPTTPTIESTEVIFTGIYTFES 181
[Pediculus      WILDPFNPIRRVAIYILVHPLFSLFIITTILTNCILMIMPTTPAVESTEVIFTGIYTFES 181
[Musca          WLLDPFNPIRRVAIYILVHPLFSLFIITTILTNCILMIMPTTPTVESTEVIFTGIYTFES 182
[Heliothis      WILDPFNPIRRVAIYILVHPLFSLFIITTILVNCILMIMPTTPTVESTEVIFTGIYTFES 192
[Boophilus      ------------------------------------------------------------
[Varroa         WILSPFNPIRRLAICILVHPLFSFFIIVAILVNCVLMTMPANGKIEQTETIFTTIYTFES 230

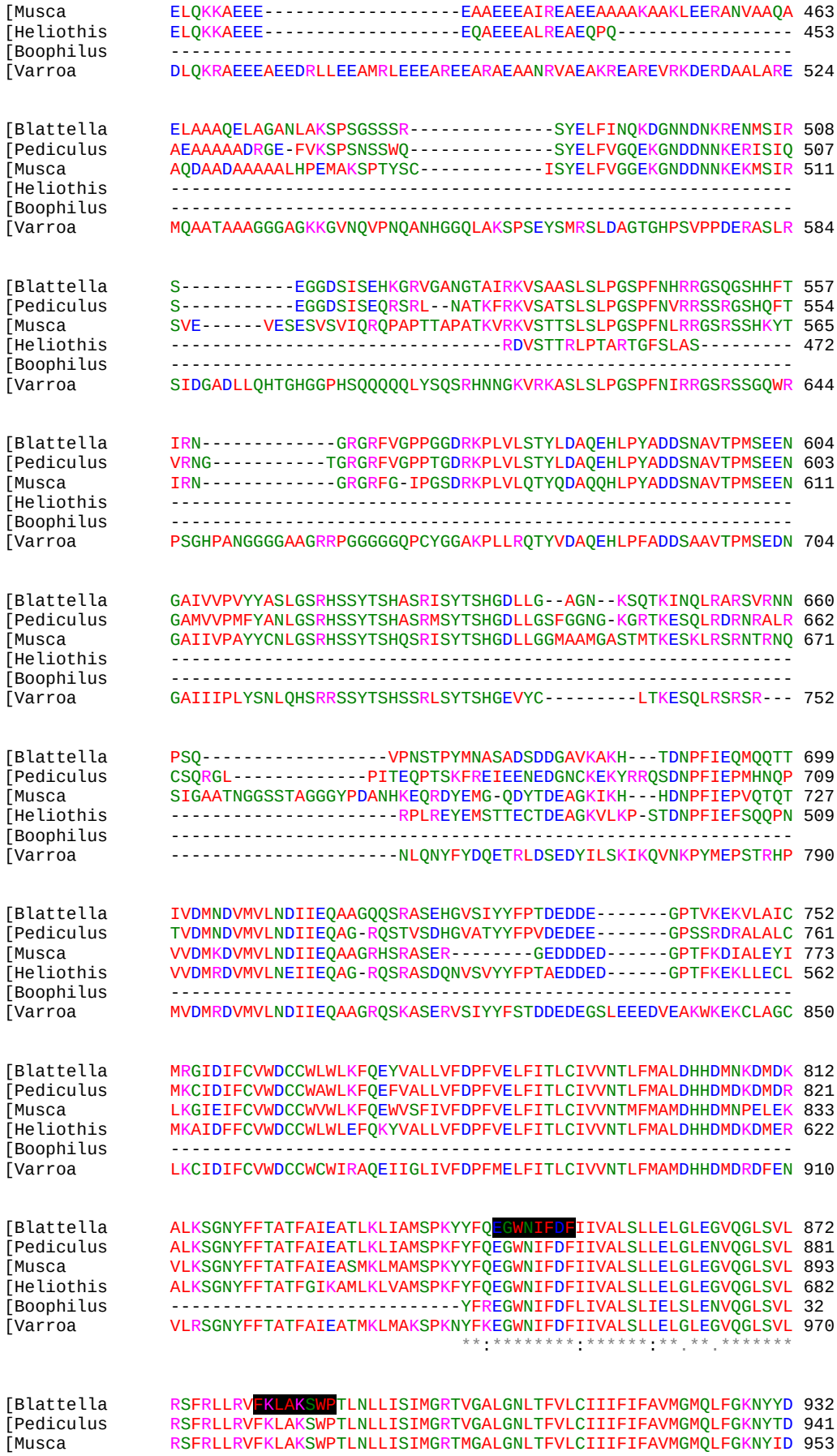
[Blattella      AVKVMARGFILQPFTYLRDAWNWLDFVVIALAYVTMGIDLGNLAALRTFRVLRALKTVAI 241
[Pediculus      AVKVMARGFILQPFTYLRDAWNWLDFIVISLAYVTMGIDLGNLAALRTFRVLRALKTVAI 241
[Musca          AVKVMARGFILCPFTYLRDAWNWLDFVVIALAYVTMGIDLGNLAALRTFRVLRALKTVAI 242
[Heliothis      AVKVMARGFILQPFTYLRDAWNWLDFVVIALAYVTMGIDLGNLAALRTFRVLRALKTVAI 252
[Boophilus      ------------------------------------------------------------
[Varroa         FIKILARGFILERFTYLGDPWNWLDFIVITLAYVTMFVNLGNLSALRTFRVLRALKTVAI 290

[Blattella      VPGLKTIVGAVIESVKNLRDVIILTMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCIKNFPINGSWGE 301
[Pediculus      VPGLKTIVGAVIESVKNLRDVIILTMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCIRNFPMDGSVGN 301
[Musca          VPGLKTIVGAVIESVKNLRDVIILTMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCIKRFPLDGSWGN 302
[Heliothis      IPGLKTIVGAVIESVKNLRDVIILTMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCIKVFPEDGSWGN 312
[Boophilus      ------------------------------------------------------------
[Varroa         VPGLKTIVGAVIESVKNLRDVIILTMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCVQQPPAG----- 345

[Blattella      LNDENWHAFCSNNTNWYFPEGAPEVPLCGNSSGAGTCPPDYTCLQGFGENPNYGYTSFDT 361
[Pediculus      LTDENWKQFCENTSNWLFNEAKGEYPLCGNSTGAGQCGSNYTCLQGFGPNPDYGYTSFDS 361
[Musca          LTDENWFLHNSNSSNWFTENDGESYPVCGNVSGAGQCGEDYVCLQGFGPNPNYDYTSFDS 362
[Heliothis      LTDENWEFCQN-ETNWYG--DGGEYPLCGNSSGAGQCEPGYVCLQGYGPNPNYGYTSFDT 369
[Boophilus      ------------------------------------------------------------
[Varroa         LSPPEWYDFVHNETHWFK-DSNGDFPLCGNGTGAKQCSADYICMQGIGENPNYGFTNFDT 404

[Blattella      FGWAFLSAFRLMTQDYWENLYQLVLRSAGPWHMLFFIVIIFLGSFYLVNLILAIVAMSYD 421
[Pediculus      FGWAFLSSFRLMTQDFWENLYQQVLRSAGPWHMLFFIVIIFLGSFYLVNLILAIVAMSYD 421
[Musca          FGWAFLSAFRLMTQDFWEDLYQHVLQAAGPWHMLFFIVIIFLGSFYLVNLILAIVAMSYD 422
[Heliothis      FGWAFLSAFRLMTQDYWENLYQLVLRSAGSWHVLFFVVIIFLGSFYLVNLILAIVAMSYD 429
[Boophilus      ------------------------------------------------------------
[Varroa         FGWAFLSAFRLMTQDYWESLYQMILRSAGPWHMCFFVVIIFLGSFYLVNLILAIVAMSYD 464

[Blattella      ELQKKAEEE-------------------EAAEEEALREAEEAALAKEAKKLRQADKLAAQ 462
[Pediculus      ELQKKAEEE-------------------EAAEEEAMREAEAAAEAKENRAAARAAAAAGR 462
```


[Musca ELQKKAEEE----------EAAEEEAIREAEEAAAAKAAKLEERANVAAQA 463
[Heliothis ELQKKAEEE----------EQAEEEALREAEQPQ---------- 453
[Boophilus ----------
[Varroa DLQKRAEEEAEEDRLLEEAMRLEEEAREEARAEAANRVAEAKREAREVRKDERDAALARE 524
[Blattella ELAAAQELAGANLAKSPSGSSSR----------SYELFINQKDGNNDNKRENMSIR 508
[Pediculus AEAAAAADRGE-FVKSPSNSSWQ----------SYELFVGQEKGNDDNNKERISIQ 507
[Musca AQDAADAAAAAALHPEMAKSPTYSC----------ISYELFVGGEKGNDDNNKEKMSIR 511
[Heliothis ----------
[Boophilus ----------
[Varroa MQAATAAAGGGAGKKGVNQVPNQANHGGQLAKSPSEYSMRSLDAGTGHPSVPPDERASLR 584
[Blattella S----------EGGDSISEHKGRVGANGTAIRKVSAASLSLPGSPFNHRRGSQGSHHFT 557
[Pediculus S----------EGGDSISEQRSRL--NATKFRKVSATSLSLPGSPFNVRRSSRGSHQFT 554
[Musca SVE------VESESVSVIQRQPAPTTAPATKVRKVSTTSLSLPGSPFNLRRGSRSSHKYT 565
[Heliothis ----------RDVSTTRLPTARTGFSLAS--------- 472
[Boophilus ----------
[Varroa SIDGADLLQHTGHGGPHSQQQQQLYSQSRHNNGKVRKASLSLPGSPFNIRRGSRSSGQWR 644
[Blattella IRN----------GRGRFVGPPGGDRKPLVLSTYLDAQEHLPYADDSNAVTPMSEEN 604
[Pediculus VRNG----------TGRGRFVGPPTGDRKPLVLSTYLDAQEHLPYADDSNAVTPMSEEN 603
[Musca IRN----------GRGRFG-IPGSDRKPLVLQTYQDAQQHLPYADDSNAVTPMSEEN 611
[Heliothis ----------
[Boophilus ----------
[Varroa PSGHPANGGGGAAGRRPGGGGGQPCYGGAKPLLRQTYVDAQEHLPFADDSAAVTPMSEDN 704
[Blattella GAIVVPVYYASLGSRHSSYTSHASRISYTSHGDLLG--AGN--KSQTKINQLRARSVRNN 660
[Pediculus GAMVVPMFYANLGSRHSSYTSHASRMSYTSHGDLLGSFGGNG-KGRTKESQLRDRNRALR 662
[Musca GAIIVPAYYCNLGSRHSSYTSHQSRISYTSHGDLLGGMAAMGASTMTKESKLRSRNTRNQ 671
[Heliothis ----------
[Boophilus ----------
[Varroa GAIIIPLYSNLQHSRRSSYTSHSSRLSYTSHGEVYC---------LTKESQLRSRSR--- 752
[Blattella PSQ----------VPNSTPYMNASADSDDGAVKAKH---TDNPFIEQMQQTT 699
[Pediculus CSQRGL----------PITEQPTSKFREIEENEDGNCKEKYRRQSDNPFIEPMHNQP 709
[Musca SIGAATNGGSSTAGGGYPDANHKEQRDYEMG-QDYTDEAGKIKH---HDNPFIEPVQTQT 727
[Heliothis ----------RPLREYEMSTTECTDEAGKVLKP-STDNPFIEFSQQPN 509
[Boophilus ----------
[Varroa ----------NLQNYFYDQETRLDSEDYILSKIKQVNKPYMEPSTRHP 790
[Blattella IVDMNDVMVLNDIIEQAAGQQSRASEHGVSIYYFPTDEDDE-------GPTVKEKVLAIC 752
[Pediculus TVDMNDVMVLNDIIEQAG-RQSTVSDHGVATYYFPVDEDEE-------GPSSRDRALALC 761
[Musca VVDMKDVMVLNDIIEQAAGRHSRASER--------GEDDDED------GPTFKDIALEYI 773
[Heliothis VVDMRDVMVLNEIIEQAG-RQSRASDQNVSVYYFPTAEDDED------GPTFKEKLLECL 562
[Boophilus ----------
[Varroa MVDMRDVMVLNDIIEQAAGRQSKASERVSIYYFSTDDEDEGSLEEEDVEAKWKEKCLAGC 850
[Blattella MRGIDIFCVWDCCWLWLKFQEYVALLVFDPFVELFITLCIVVNTLFMALDHHDMNKDMDK 812
[Pediculus MKCIDIFCVWDCCWAWLKFQEFVALLVFDPFVELFITLCIVVNTLFMALDHHDMDKDMDR 821
[Musca LKGIEIFCVWDCCWVWLKFQEWVSFIVFDPFVELFITLCIVVNTMFMAMDHHDMNPELEK 833
[Heliothis MKAIDFFCVWDCCWLWLEFQKYVALLVFDPFVELFITLCIVVNTLFMALDHHDMDKDMER 622
[Boophilus ----------
[Varroa LKCIDIFCVWDCCWCWIRAQEIIGLIVFDPFMELFITLCIVVNTLFMAMDHHDMDRDFEN 910
[Blattella ALKSGNYFFTATFAIEATLKLIAMSPKYYFQEGWNIFDFIIVALSLLELGLEGVQGLSVL 872
[Pediculus ALKSGNYFFTATFAIEATLKLIAMSPKFYFQEGWNIFDFIIVALSLLELGLENVQGLSVL 881
[Musca VLKSGNYFFTATFAIEASMKLMAMSPKYYFQEGWNIFDFIIVALSLLELGLEGVQGLSVL 893
[Heliothis ALKSGNYFFTATFGIKAMLKLVAMSPKFYFQEGWNIFDFIIVALSLLELGLEGVQGLSVL 682
[Boophilus ----------YFREGWNIFDFLIVALSLIELSLENVQGLSVL 32
[Varroa VLRSGNYFFTATFAIEATMKLMAKSPKNYFKEGWNIFDFIIVALSLLELGLEGVQGLSVL 970
[Blattella RSFRLLRVFKLAKSWPTLNLLISIMGRTVGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYYD 932
[Pediculus RSFRLLRVFKLAKSWPTLNLLISIMGRTVGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYTD 941
[Musca RSFRLLRVFKLAKSWPTLNLLISIMGRTMGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYID 953

```
[Heliothis      RSFRLLRVFKLAKSWPALNLIISIMGRTVGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYTD 742
[Boophilus      RSFRLLRVFKLAKSWPTLNLLISIMGKTIGALGNLTFVLGIIIFIFAVMGMQLFGKNYEE 92
[Varroa         RSFRLLRVFKLAKSWPTLNLLISIMGKTIGALGNLTFVLGIIIFIFAVMGMQLFGKNYLD 1030
                ****************:***:*****:*:********** ****************** :

[Blattella      NVERFPDGDMPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDWSCIPFFLATVVIGN 992
[Pediculus      NVDRFMDKELPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIQSMWDCMLVGDYSCIPFFLATVVIGN 1001
[Musca          HKDRFKDHELPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMYVGDVSCIPFFLATVVIGN 1013
[Heliothis      YVDRFPDGDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGN 802
[Boophilus      SKHKFKDNMVPRWNFVDFMHSFMIVFRVLCGEWIQSMWDCMWVSGWPCIPFFLATVVIGN 152
[Varroa         NKCLFPEQQVPRWNFLDFMHSLMIVFRVLCGEWIESMWDCMWVSGWPCIPFFLATVVIGN 1090
                    * :  :***** *****:***********:****** *.. .************

[Blattella      FVVLNLFLALLLSNFGSSNLSAPTADN-ETNKIAEAFERFSRFFNWIKRSALNVAKMLRA 1051
[Pediculus      LVVLNLFLALLLSNFGSSSLSAPTADN-DTNKIAEAFNRISRFNAWVKRSILNFLKMLRA 1060
[Musca          LVVLNLFLALLLSNFGSSSLSAPTADN-DTNKIAEAFNRIARFKNWVKRNIADCFKLIRN 1072
[Heliothis      LVVLNLFLALLLSNFGSSSLSTPTADQ-DTNKIAEAFNRISRFIDWVKRNVADVMKLLKN 861
[Boophilus      LVVLNLFLALLLSSFGASNLSQANPDSGDTKKLQEAIDRFHRASRWIKSNSMKLFKSFRR 212
[Varroa         LVVLNLFLALLLSSFGASNLSQANPDSGDTKKLQEAIDRFHRAGRWIKKKFRDLFMLCSG 1150
                :************.**:*.** ...*. :*:*: **::*: *   *:* .  .

[Blattella      KLTNQISDQT----------------------PDAHERDTDLDLTADEILADGIVYRDKK 1089
[Pediculus      KISNQIGDHTGL--------------------PDGRDRDTDLELG-DEILVDGMVFRDKK 1099
[Musca          KLTNQISDQP-----------------------SEHGDNELELGHDEIMGDGLIKKGMK 1108
[Heliothis      KLTNQIAIHA-----------------------PERVDNELELGTD--LDDAVLYKDKK 895
[Boophilus      KPRNQIGDQT----------------TDIRGGGAGEELEADPGVAGEVVLLDGRVPMRDR 256
[Varroa         KQRNQISDQTYAEDLDLDTGVIIMDGQVIKKDSPTPELIDGLDVGFQADKQQAQVIVMQK 1210
                *  ***. :.                                  :  :    :. :    :

[Blattella      SPKEQ-------TQLEVAIGDGMEFTIH-------GDLKNKLKKDKLMMN-STKVIGNSL 1134
[Pediculus      NSKD---------QLEVAIGDGMEFTIH-------GDFKEKLRRSKMALNNKNNVIGNSY 1143
[Musca          ---GE--------TQLEVAIGDGMEFTIH-------GDMKNNKPKKSKFIN-NTTMIGNSI 1150
[Heliothis      ---LK--------DQVEVAIGDGMEFTIP-------GDNKYKKGK--ILLN-NINAITD-- 933
[Boophilus      KPQHN-------NDLEVVVGDGLDIAIQ-----GDGKAVKMKLKNNSKPVMNSVWVGPMI 304
[Varroa         LKNNSRPIIGDSKEFSNKVHPGPDFCLVKPNDNGEGLVQDTELGASTPLSSPSCIVEQPL 1270
                             :..  :  * :: :        *                  :

[Blattella      N--HKDNR-----------IESGDYLHNRQDEDTLSTGSYGSHKNRP------------- 1168
[Pediculus      AGLNSDNR-----------FESDYITHN--EEDTYSNISYGSHRKRI------------- 1177
[Musca          NHQDNRLE-----------HELNHRGLSIQDDDTASINSYGSHKNRP------------- 1186
[Heliothis      NHRDNRLD-----------CELNHHGYPIQDDDTISQKSYGSHKIRS------------- 969
[Boophilus      EPKNKQLEKDNKEKEK---EAQGNKVYPQKDEDTLSEKSASSPKEKVLLGNKPS------ 355
[Varroa         SHDSVGLPPGGQQRTTTTTAAVGGGATPAMENNLTTPLTAGTGLTSVRFSGEPPNLDQHE 1330
                                  .       :::  :  : .:

[Blattella      ----YKDDSHKGSAETMDGEEKKDASKEDLDQEGEGEEDGEG-EGPLEE----------- 1212
[Pediculus      ----YKDESHKGSIDTFEEDEKGDMSKE---EDEEMDEEEEG-ESIPEI----------- 1218
[Musca          ----FKDESHKGSAETIEGEEKRDVSKEDLGLDEELDEEAEGDEGQLDG----------- 1231
[Heliothis      ----FKDESHKGSADTIDGEEKKDASKEELGLEEEMVEEEE--DGKLDGGL--------- 1014
[Boophilus      -----KDLSNSSLYLGNNLEE----EKKDASKEDLGTKEGE--EAPTEEPINP------- 397
[Varroa         NNPQFADATPVSLAASKDKSSGDDGDEVDGKLEGLADDVGDGGDATVSLPANAEGKENAG 1390
                      * :  .     : ..    .:     :    .  :  :.  .

[Blattella      --------------DMVLDAGTEDVMMSEYPADCCPDHCYKRFPFLAGDEDS-PFWQGWG 1257
[Pediculus      --------------DVIIDANMEDVMLQDYPSDCCPDHCYKRFPFLAGDDDA-PFWQGWS 1263
[Musca          --------------DIIIHAQNDDEIIDDYPADCFPDSYYKKFPILAGDEDS-PFWQGWG 1276
[Heliothis      -------------GKTDIIVAADEEVVDDSPADCCPEPCYAKFPFLVGDDES-PFWQGWG 1060
[Boophilus      --------DTEDVDTDKLETATSDIIIPEMPADCCPDWCYTRFAFACFFDENKIFWQRYK 449
[Varroa         GSDVGAEEDKEQLEGGALETAASDLIIPELPADCCPECCYVKFACCCIFDDSQPLFAKYK 1450
                       : .  .: :: : *:** *:  * :*.     ::   ::  :

[Blattella      NLRLKTFQLIENKYFETAVITMILLSSLALALEDVHLPHRPILQDILYYMDRIFTVIFFI 1317
[Pediculus      NLRLKTFQLIENKYFETAVITMILLSSLALALEDVHLQQRPVLQDILYYMDRIFTVIFFI 1323
[Musca          NLRLKTFQLIENKYFETAVITMILMSSLALALEDVHLPDRPVMQDILYYMDRIFTVIFFL 1336
[Heliothis      MLRLKTFKLIENTYFETAVITMILLSSLALALEDVNLPHRPILQDILYYMDRIFTVIFFI 1120
[Boophilus      IVRTKAYALVEHKYFETIVVVLILTSSLALALEDVNLKDRPTLKAVLTYMDKTFTVIFFF 509
[Varroa         LYRSQAFALVENEYFETIVVVLILTSSLALALEDVNLKQRQWLINILNVMDKTFTVIFFS 1510
                  * ::: *:*: **** *:.** **********:* .*  :  :*  **: ******



[Blattella      EMLIKWLALGFKKYFTNAWCWLDFIIVMVSLINFVASLVGAGGIQAFKTMRTLRALRPLR 1377
[Pediculus      EMLIKWLALGFKEYFTNAWCWLDFVIVMVSLINFVASLCGAGGIQAFKTMRTLRALRPLR 1383
[Musca          EMLIKWLALGFKVYFTNAWCWLDFVIVMLSLINLVAVWSGLNDIAVFRSMRTLRALRPLR 1396
```

```
[Heliothis      EMLIKWLALGFQKYFTNAWCWLDFIIVMVSLINFVAGLCGAGGIQAFKTMRTLRALRPLR 1180
[Boophilus      EMMLKWLAFGFKKYFTNAWCWLDFVIVLVSFFNMAVAMMGYGRIPAFKTMRTLRALRPLR 569
[Varroa         EMLLKWLAFGFQKYFTNAWCWLDFVIVLVSVINLVATWLGAGKIQAFKTMRTLRALRPLR 1570
                **::****:**: **********:**::*.:*:..   * . * .*::**********

[Blattella      AMSRMQGMRVVVNALVQAIPSIFNVLLVCLIFWLIFAIMGVQLFAGKYHKCVDSNSTTLS 1437
[Pediculus      AMSRMQGMRVVVNALVQAIPSIFNVLLVCLIFWLIFAIMGVQLFAGKYFKCLDHNKEVVN 1443
[Musca          AVSRWEGMKVVVNALVQAIPSIFNVLLVCLIFWLIFAIMGVQLFAGKYFKCKDGNDTVLS 1456
[Heliothis      AMSRMQGMRVVVNALVQAIPSIFNVLLVCLIFWLIFAIMGVQLFAGKYFKCVDLNHTTLS 1240
[Boophilus      AMSRLEGMRVVVNALVQAIPAIFNVLLVCLIFWLIFSIMGVQMLAGKFYRCVDGNGTRLN 629
[Varroa         ALSRFQGMRVVVNALVQAIPAIFNVLLVCLVFWLIFSIMGVQMFAGRFYHCVDANNSQLN 1630
                *:** :**:**********:*********:*****:*****::**::.:* * *   :.

[Blattella      HEIIPDRNACIAENYTWENSPMNFDHVGKAYLCLFQVATFKGWIQIMNDAIDSRE-LHKQ 1496
[Pediculus      HEIIGDSIACAAENYTWENSRMNFDHVGKAYLCLFQVATFKGWIEIMNDAIDSRE-VGAQ 1502
[Musca          HEIIPNRNACKSENYTWENSAMNFDHVGNAYLCLFQVATFKGWIQIMNDAIDSRE-VDKQ 1515
[Heliothis      HEIIPDRNACILENYTWENSPMNFDHVGKAYLCLFQVATFKGWIQIMNDAIDSRE-VGRQ 1299
[Boophilus      STHVPNRKACEANNFTWDNPMINFDNVLNAYLALFQVATFKGWTDIMDNAIDSRGGKEDQ 689
[Varroa         STFIPNKEACINNNFTWKNPMINFDNVLNAYLALFQVATFKGWTEIMAHATDSRG-KDDQ 1689
                   : :  **  :*:**.*. :***:* :***.********** :** .* ***     *

[Blattella      PIRETNIYMYLYFVFFIIFGSFFTLNLFIGVIIDNFNEQKKKAGGSLEMFMTEDQKKYYN 1556
[Pediculus      PIRETNIYMYLYFVFFIIFGSFFTLNLFIGVIIDNFNEQKKKAGGSLEMFMTEDQKKYYN 1562
[Musca          PIRETNIYMYLYFVFFIIFGSFFTLNLFIGVIIDNFNEQKKKAGGSLEMFMTEDQKKYYN 1575
[Heliothis      PIRETNIYMYLYFVFFIIFGSFFTLNLFIGVIIDNFNEQKKKAGGSLEMFMTEDQKKYYN 1359
[Boophilus      PEYEANIYMYLYFVFFIIFGSFFTLNLFIGVIIDNFNEQKKKAGGSLEMFMTEDQKKYYN 749
[Varroa         PDYEVNIYMYLYFVFFIIFGAFFTLNLFIGVIIDNFNEQKKKAGGSLEMFMTEDQKKYYS 1749
                *  *.***************:************************************.

[Blattella      AMKKMGSKKPLKAIPRPKWRPQAIVFEICTDKKFDMIIMLFIGFNMLTMTLDHYQQSKQF 1616
[Pediculus      AMKKMGSKKPLKAIPRPKWKPQAIVFEICMNTKFDMIIMLFIGLNMLTMTLDHYKQTETF 1622
[Musca          AMKKMGSKKPLKAIPRPRWRPQAIVFEIVTDKKFDIIIMLFIGLNMFTMTLDRYDASEAY 1635
[Heliothis      AMKKMGSKKPLKAIPRPKWRPQAIVFEIVTDKKFDMIIMLFIGLNMLTMTLDHYQQSETF 1419
[Boophilus      AMKKMGSKKPAKAIPRPRFKLQAMVFDLTTNKMFDMAIMIFIVLNMTVMALDHYKQSRLF 809
[Varroa         AMKKMGSKKPAKAIPRPRFKLQAMIFDLTTNRMFDMAIMIFIVLNMTVMAMEHYQQSDFF 1809
                ********** ******::: **::*::  :  **: **:** :** .*::::*. :  :

[Blattella      SDVLDYLNMIFIVIFSSECLMKIFALRYHYFKEPWNLFDFVVVILSILGLVLSDIIEKYF 1676
[Pediculus      SKVLDTLNLIFIVIFSSECLMKIFALRYHYFVEPWNLFDFVVVILSILGLVLSDIIEKYF 1682
[Musca          NNVLDKLNGIFVVIFSGECLLKIFALRYHYFKEPWNLFDVVVVILSILGLVLSDIIEKYF 1695
[Heliothis      STVLDYLNMIFIVIFSSECLLKMFALRYHYFVEPWNLFDFVVVNFSILSLVLSDIIEKYF 1479
[Boophilus      ESILERLNIFFIAVFTAECLLKIFALRWHYFREPWNMFDFVVVILSILGTVLKDLIAAYF 869
[Varroa         ESILERLNIFFIAVFTAECVLKIFALRWHYFKEPWNMFDFVVVILSILGTVLKDLIAAYF 1869
                . :*: ** :*:.:*:.**::*:****:*** ****:**.*** :***. **.*:*  **

[Blattella      VSPTLLRVVRVAKVGRVLRLVKGAKGIRTLLFALAMSLPALFNICLLLFLVMFIFAIFGM 1736
[Pediculus      VSPTLLRVVRVAKVGRVLRLVKGAKGIRTLLFALAMSLPALFNICLLLFLVMFIFAIFGM 1742
[Musca          VSPTLLRVVRVAKVGRVLRLVKGAKGIRTLLFALAMSLPALFNICLLLFLVMFIFAIFGM 1755
[Heliothis      VSPTLLRVVRVAKVGRVLRLVKGAKGIRTLLFALAMSLPALFNICLLLFLVMFIFAIFGM 1539
[Boophilus      VSPTLLRVVRVVKVGRVLRLVKGARGIRTLLFALAMSLPALFNICLLLFLVMFIYAIFGM 929
[Varroa         VSPTLLRVVRVVKVGRVLRLVKGARGIRTLLFALAMSLPALFNICLLLFLVMFIYAIFGM 1929
                **********.**********:****************************:*****

[Blattella      SFFMHVRDKGGLDDVYNFKTFGQSMILLFQMSTSAGWDGVLDGIMNEEDCNKPNSEI--G 1794
[Pediculus      SFFMHVKPNSGIDDVYNFQTFGQSMILLFQMSTSAGWDGVLNGIINEEDCDVPDNEM--G 1800
[Musca          SFFMHVKEKSGINAVYNFKTFGQSMILLFQMSTSAGWDGVLDAIINEEDCDPPDNDK--G 1813
[Heliothis      SFFMHVKDKGGLDDVYNFKTFVQSMILLFQMSTSAGWDGVLDGIINEEECDLPDNER--G 1597
[Boophilus      SFFMHVKHRYGVDENFNFETFGQSMILLFQMCTSAGWDGVLAAIMDEHDCNRPTD----E 985
[Varroa         SFFMNVKHRYGVDENFNFETFGQSMILLFQMCTSAGWSDVLAAIMDETDCEEPTIDEDGE 1989
                ****:*: . *::  :**:** *********.*****..** .*::* :*: *

[Blattella      YPGDCGSATVGIAFLLSYLVISFLIVINMYIAVILENYSQATEDVQEGLTDDDYDMYYEI 1854
[Pediculus      FPGNCGNSTIGITFLLSYLVISFLIVINMYIAVILENYSQATEDVQEGLTDDDYDMYYEI 1860
[Musca          YPGNCGSATVGITFLLSYLVISFLIVINMYIAVILENYSQATEDVQEGLTDDDYDMYYEI 1873
[Heliothis      YPGNCGSATIGITYLLSYLVISFLIVINMYIAVILENYSQATEDVQEGLTDDDYDMYYEI 1657
[Boophilus      SEGNCGKRGIAVAYLVSYLIISFLVIINMYIAVILENYSQATEDVQEGLTDDDYDMYYEI 1045
[Varroa         TEGNCDKKGIAVAYLVSYLIISFLVIINMYIAVILENYSQATEDVQEGLTDDDYDMYYEI 2049
                  *:*..  :.:::*:***:****::************************************

[Blattella      WQQFDPDGTQYIRYDQLSDFLDVLEPPLQIHKPNKYKIVSMDIPICKGDLMFCVDILDAL 1914
[Pediculus      WQNFDPDGTRYIRYDQLSEFLDVLEPPLQIHKPNKYKIVSMDIPICKGDKMFCVDILDAL 1920
[Musca          WQQFDPEGTQYIRYDQLSEFLDVLEPPLQIHKPNKYKIISMDMPICRGDMMYCVDILDAL 1933
```

```
[Heliothis      WQRFDPDGTQYIRYDQLSDFLDVLEPPLQIHKPNKYKI---------------------- 1695
[Boophilus      WQQFDPKGTQYVAYSNLTNFVNALEEPLQIPKPNKYKLIALDIPICKDDMVYCVDILDAL 1105
[Varroa         WQQFDPKGTQYLPYSHLSNFVNALEEPLQIPKPNKYKLIALDIPICKGDMVYCVDILDAL 2109
                **.***.**:*: *.:*::*::.** **** ******:

[Blattella      TKDFFARKGNPIEESAELGEVQPGRPDEVGYEPVSSTLWRQREEYCARLIQNAWRKHKQQ 1974
[Pediculus      TKDFFARKGNPIEETVELGEVQ-ARPDEAGYEPVSSTLWRQREEYCARLIQNAWRKHKQQ 1979
[Musca          TKDFFARKGNPIEETGEIGEIA-ARPDTEGYDPVSSTLWRQREEYCAKLIQNAWRRYKNG 1992
[Heliothis      ------------------------------------------------------------
[Boophilus      TRDFFARKGHAIEEPPRFFS-----------------LPRQK------------------ 1130
[Varroa         TRDFFARKGHQIEEPPELTEQV-IHIDRPGYEPISSTLLRQRQEYCARVIQHAWRRSKGE 2168

[Blattella      RQ--------------------------GAPGED--------SDEAG-------DDPEL 1992
[Pediculus      RV--------------------------GTDNEEEKPESGSRTPEAGGPGSKDQSPTDS 2012
[Musca          PPQEGDEGEAAGGEDGAEGGEGEGGSGGGGGGGDDGGSATGATAAAAGATSPSDPDAGEA 2052
[Heliothis      ------------------------------------------------------------
[Boophilus      ------------------------------------------------------------
[Varroa         YD----------------------------------------------------DSDEE 2175

[Blattella      Q-----------------DRHQTAVLVESDGFVTKNGHRVVIHSRSPSVTSRSTDV-- 2031
[Pediculus      S-----------------NARQTEILVESDGFVTKNGHKVVIHSRSPSIGSKQADV-- 2051
[Musca          DGASVGGPLSPGCVSGGSNGRQTAVLVESDGFVTKNGHKVVIHSRSPSITSRTADV-- 2108
[Heliothis      ------------------------------------------------------------
[Boophilus      ------------------------------------------------------------
[Varroa         TG-----------------GAQDTAIVVVDGDDTKT-KVVIRPSPAPLADASRSDAQV 2215
```

EK 6 Qiaquick Jel Ektraksiyon Kiti Kullanılarak Poliakrilamit Jelden DNA Fragmentlerinin Ekstraksiyonu

Bu prosedür QIAquick Jel Ektraksiyon Kit Protokolüne göre uygulanmıştır.

1. Keskin ve temiz bir bistüri ile DNA bandını içeren jel dilimi kesilerek çıkarılır. Mümkün olduğunca jel büyüklüğü minimize edilmelidir.

2. Jel diliminin ağırlığı tartılarak jelin 1 birim hacmine difüzyon bufferdan 1-2 hacim eklenir. Örneğin her 100 mg jel için 100-200 µl eklenir.

3. 50°C'de 30 dk inkübe edilir ve daha sonra 1 dk santrifüj edilir.

4. Pastör pipeti veya bir pipet yardımı ile süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılır. Residüel poliakrilamiti uzaklaştırmak için de silikonize cam veya Whatman GF/C filtre içeren bir şırınga veya plastik bir filtreden süpernanant geçirilir ve geri kazanılan süpernatantın hacmi belirlenir.

5. Süpernatant karışımının 1 hacmine 3 hacim QG buffer eklenir ve karıştırılır. Karışım renginin sarı olup olmadığı kontrol edilir. Eğer renk turuncu veya menekşe rengi ise 10 µl 3 M sodyum asetat (pH 5.0) ilave edilir. Karışımın rengi sarıya döner.

6. 2 ml'lik toplama tüpleri içerisinde QIAquick Spin kolon yerleştirilir.

7. DNA'nın bağlanması için QIAquick Spin kolona örnek koyularak 30–60 saniye santrifüj edilir.

8. Altta toplanan sıvı atılarak QIAquick Spin kolon aynı tüpe tekrar yerleştirilir.

9. Kolonu yıkamak için 0.75 ml PE buffer ilave edilerek 30–60 saniye tekrar santrifüj edilir.

10. Altta toplanan sıvı atılarak QIAquick Spin kolon aynı tüpe tekrar yerleştirilir. Maksimum hızda ilave 1 dk daha santrifüj edilir.

11. Temiz 1.5 ml'lik tüpler içerisine QIAquick Spin kolon yerleştirilir.

12. DNA'yı elde etmek için 50 µl EB buffer eklenir (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) veya QIAquick Spin kolonun tam ortasına su ilave edilerek 1 dk santrifüj yapılır. Alternatif olarak altta toplanan sıvı atılarak QIAquick Spin kolon aynı tüpe tekrar yerleştirilir. DNA konsantrasyonunu artırmak için kolonun tam ortasına 30 µl elution buffer ilave edilir ve 1 dk beklenir ve santrifüj yapılır. Saflaştırılmış DNA TE buffer (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0)'da saklanabilir.

EK 7 MicroSpin™ S-400 HR Kolonları ile PCR Ürünlerinin Temizlenmesi

Kolonun Hazırlanması

600 µl Sephacryl S-400 HR resin (4 °C) ile Micro Bio-Spin kromatografi hazırlanır. Destek için kolona 1.5 ml'lik santrifüj tüpü yerleştirilir ve 1 dk 3000 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüjden sonra süzülen buffer uzaklaştırılır. Kolonun ucuna sarı altlık yerleştirilir. 300 µl TE (pH 7.6) kolona uygulanır ve beyaz bir kapakla kolon kapatılır. Vorteks yapılarak kolondaki resin karıştırılır ve kolon +4°C'de saklanır.

PCR ürünlerinin saflaştırılması

Vorteksle kolondaki resin tekrar çözdürülür. Destek için kolona 1.5 ml'lik santrifüj tüpü yerleştirilir ve 1 dk 3000 rpm'de santrifüj edilir ve süzülen TE buffer ortamdan uzaklaştırılır. Kolona yeni bir 1.5 ml'lik tüp transfer edilerek kapak uzaklaştırılır ve resin'in tam merkezine gelecek şekilde yaklaşık 50 µl örnek yavaş bir şekilde uygulanır. 3000 rpm'de 2 dk kolon döndürülerek saflaştırılan örnek destek tüpünde toplanır ve -20 °C'de saklanır.

EK 8 Sekans Sonuçları

Dirençli pop. (1)

Sekans Reaksiyonu R31(1+4) p 5

GGNTTTCTTNGGGGGCCTGGAANNTNTTTTGGGGGGNACCAGGTNAGGCAT
AACAGGAAGGACCAATGTTTTNGGGGGCCAANAAGCNGGGAACACAGCCA
AAGCCNCAGACCAACANGCAGCTCCACATTGATTNAATCNATTNGCCNCAC
AGGNCACGGAAAACAATCATGAAAGAGTGCANGAAATCTTTGAAATTCCA
ACGAGGAATCTTTNCTTTTGGAAAAGGGTNTTTTTCTTNGAATAATNGGNTC
CAANCAGTTGCNTTCCCATAACAGCAAAAATGAATNCATTNTTGGCCAGGA
CAAAGGTTAAATTCCCAAATCCCNTAAAGTTTTNCCCATAANGGTGATCAA
AAGGTTAAGAGNGGGCCACGANTTTGCCAA

Dirençli pop. (2)

Sekans Reaksiyonu R31(1+4) p 6

GNNNNNNTTTTTTCGGGCCCTNGANCNGNTTTNGGGGGGGAACAAGGTTAN
GCTANCAGGTAGGNCCAANGTTAACGGNGGCCAAAAAGAAGGGAACACAG
CCAAAGCCACANACCAACNTGCAGNTCCACATTGNTTCAATCCATTCNCCG
CACAGGNCACGGAAAACANTCNTGAANGAGTGCNTGAAATCTTTGAAATTC
CAACGAGGAATCTNTGCTTTCGGAAAAGGGTNCACTTTCTTTNAATAATTGG
CTCCAANCAGTTGCTTTCCCATAACANCAAAAATGAATNCANTGNTGGCCA
GGNCAAAGGTTAAATTNCCCAAATCCCNTAAAGTTTTCCCATAATGGTGAT
CAAAAGGTTAAGAGTGGNCCNCGNCTTTNCCAAAA

Hassas pop. (6)

Sekans Reaksiyonu S31(1+4) p 5

TGNCNTCCGGGGNCCTGNCCNNNANCGCAACTGGATCANCAACTTANCCGG
ANTCCCCCTTAAAACTACCCANNCNTAACTTTAAATTAANGGCCTGATGTTT
NNGCCGGTAANTTNGTNNTTNGNGACCNNAGCCGAAAANAGTNGTCAAAC
AGNCGNCCAANTGGGCCAANGTTGATTCACCANTGTGCNGGGTGCCAAAAA
CCTTNNGGGTGGGCCANTANGCCCGTTGAANGAGGTNGGGTTTCNATGATA
AAACNCAGTTTAGGCNCCNTACCNGAAACCGCAAGGTTTCAANTTTNGAAA
AGGGGTTTCGTAGCCNNCNTGAAAACNGAACAGCCTTNTCAGGGTTAAA

Dirençli pop. (9)

Sekans Reaksiyonu R2(3+5) p 4

TTTNNNNNNCCTGGNAAGGTTNGTGCNCNTTAACGCAGAAAAGGAGCNNG
GCAAGGTAAAAGGTTAAGCATAACAAGGNTGACCAATGATNACGGTGGCC
AGTAAAGAAGGGNACACAGANNAAGCCACAGACCAACATGCAGCTCCACA
TTGATTCAATCCATTCGCCGCNCAGGACACGGAAAACAATCATGAAAGAGT
GCATGAAATCTTTGAAATTCCNACGAGGAATCTCTGCTTTCGGAAAAAGGT
NCACTTTCTTTGAATAATTGGCTCCGAACAGTTGCATTCCCATAA

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hilal SUSURLUK

Doğum Yeri : Yenişehir /BURSA

Doğum Tarihi: 02.11.1977

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kalaba Lisesi (1994)

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü (1999)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı (2002)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, ANKARA (2000-2006)

Tarım İl Müdürlüğü, Bitki Koruma Şubesi, Osmangazi/BURSA (2006-devam ediyor)

Yayınları (SCI ve diğer)

Aydın, H. 2000. The situation and evaluation of pesticide residue studies in Turkey. The Sixth International Training Workshop on Use of Nuclear Techniques in Studies of Agriculture with Emphasis on Transport and Fate of pesticides in Eco-environment, October 16-27, in Beijing, P. R. of China.

Aydın, H. ve Gürkan, M.O. 2003. A new product which can be used in agricultural control: Baculovirus. Ekin, 7(24), 78-82.

Aydın, H. ve Gürkan, M.O. 2003. Antifeedants and their using in agricultural control. Ekin, 7(25), 89-92.

Çalışkan, Z., Aydın, H., Kırmızıgül, S., Gürkan, M.O. ve Gören, N. 2004. Determination of structure and activation of seconder metobolites of *Tanacetum cadmeum* spp. *cadmeum*. 18. National Chemistry Congress.

Aydın, H. and Susurluk, A. 2005. Competition abilities of entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in the same host at different temperatures. Turkish Journal of Biology, 29, 35-39.

Aydın, H. and Gürkan, M.O. 2005. The efficacy of spinosad on different strains of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). Turkish Journal of Biology, 29, 35-39.

Aydın, H., Çobanoğlu, S. ve Gürkan M.O. 2005. Molecular mechanisms of insecticide resistance in insects. Journal of the Faculty of Agriculture, Cukurova University, 20 (3), 43-52.

Susurluk, H., Toprak, U. and Gürkan, M.O. 2006. Impact of SDS in Baculovirus Occlusion Body Purification Buffer on Biological Activity. Society for Invertebrate Pathology Annual Meeting, Wuhan-China, August 27-September 1.

Susurluk, H., Çalışkan Z., Gürkan, M.O., Kırmızıgül, S. and Gören, N. 2007. Antifeedant activity of some *Tanacetum* species and bioassay guided isolation of the secondary metabolites of *Tanacetum cadmeum* ssp. *cadmeum* (Compositae). Industrial Crops and Products, 26, 220–228.

Toprak, U., Susurluk, H. and Gürkan, M.O. 2007. Viral-enhancing activity of an optical brightener for *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. Biocontrol Science and Technology, 17(4), 423-431.

Kumral, N.A., Susurluk, H., Gençer N.S. and Gürkan, M.O. 2008. Resistance to chlorpyrifos and lambda-cyhalothrin and detoxifying enzyme activities in field collected female populations of European red mite. Phytoparasitica (Accepted).