

**Orijinal araştırma (Original article)**

**Farklı *Stethorus gilvifrons* (Muls.) (Coleoptera: Coccinellidae) popülasyonlarının bazı insektisit ve akarisitlere duyarlılıkları ve enzimatik özelliklerinin saptanması<sup>1</sup>**

Determination of susceptibility to insecticides and acaricides along with enzymatic characteristics in the different ladybird beetle *Stethorus gilvifrons* (Muls.) (Coleoptera: Coccinellidae) populations

**Pınar HEPHIZLI<sup>2</sup>**

**Nabi Alper KUMRAL<sup>3</sup>**

**Summary**

The susceptibilities to insecticides and acaricides, as well as carboxylesterase (CarE), cytochrome P450 monooxygenase (P450) and glutathione S-transferases (GSTs) activities were evaluated in a susceptible (SSS) and an unsusceptible strain (RSS) of *Stethorus gilvifrons* (Muls.) (Col.: Coccinellidae). Synergism studies using S,S,S-tributylphosphorotrithioate (DEF), piperonyl butoxide (PBO) and diethyl maleate (DEM) in combination with at a discrimination dose (~LD<sub>20</sub>) of selected pesticides were also conducted to test for possible physiological mechanisms. In addition, the insensitivity of acetylcholinesterase (AChE) to the inhibitors, paraoxon and pirimicarb, is also determined. Compared with SSS, tolerance ratios of RSS, as indicated by LC<sub>50</sub> values, was calculated 2.1, 11.2, 6.7, 1.7, 1.6 and 2.3-fold, respectively, for abamectin, bifentazate, chlorpyrifos, cyhexatin, hexythiazox and λ-cyhalothrin. Thus, the field collected resistant *S. gilvifrons* population were tolerant at medium level to four compounds. CarE activity was significantly higher in RSS than in SSS, 1.5-fold for α-naphthyl acetate and 4.3-fold for β-naphthyl acetate. Also significant enhanced GSTs activity were determined in RSS using two substrates, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (4.3-fold) and 2,4-dinitro-1-iodobenzene (1.4-fold), compared with SSS. Inhibition kinetics revealed that AChE from RSS was 2.5-fold more insensitive to inhibition by 1mM pirimicarb than AChE from SSS. The disparity in susceptibility to these pesticides in the predator populations were due to the responsibility of multiple physiological mechanisms, including elevated CarE, GSTs and P-450 enzymes activities.

**Key words:** Spider mite predator, bioassays, resistance mechanisms, synergists, biochemical tests

**Özet**

Bu çalışmada *Stethorus gilvifrons* (Muls.) (Col.:Coccinellidae)'un bir hassas (SSS) ve bir de daha az duyarlı (RSS) popülasyonunda bazı insektisitlere ve akarisitlere duyarlılıklarının saptanması yanında, bu popülasyonların duyarlılıklarıyla ilişkili karboksilesteraz (CarE), sitokrom P450 monooksigenaz (P450) and glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, herbir ilacın bir subletal ayırıcı dozu (~LD<sub>20</sub>) ile karıştırılarak, muhtemel fizyolojik tolerans mekanizmaları test edilmiştir. Bu popülasyonlarda paraoxon ve pirimicarb inhibitörleri kullanılarak, asetilkolinesteraz (AChE)'in duyarlılığı saptanmıştır. SSS popülasyonunun LC<sub>50</sub> değerleri ile karşılaştırıldığında, RSS popülasyonu abamectin, bifentazate, chlorpyrifos, cyhexatin, hexythiazox ve λ-cyhalothrin'e sırasıyla 2.1, 11.2, 6.7, 1.7, 1.6 ve 2.3-kat daha az duyarlı bulunmuştur. Sonuçta, *S. gilvifrons*'un dirençli bahçe popülasyonu 4 ilaca orta düzeyde bir duyarlılık kaybı göstermiştir. Substrat ortamı olarak α-naftil asetat ve β- naftil asetat kullanıldığında, CarE aktivitesi RSS'de SSS'ye oranla sırasıyla 1.5 ve 4.3 kat fazla olmuştur. Ayrıca, 1-chloro-2,4- dinitrobenzene ve 2,4-dinitro-1-iodobenzene substratları kullanıldığında GST'lerin aktivitesi RSS popülasyonunda önemli olarak sırasıyla 4.3 ve 1.4 kat daha fazla bulunmuştur. İnhibasyon kinetiklerine göre, 1mM pirimicarb kullanıldığında RSS'nin AChE'i SSS'ye göre 2.5 kat daha duyarlı olmuştur. Sonuç olarak, popülasyonların pestisitlere karşı duyarlılık farkları artan CarE, GST ve P-450 enzim aktivitelerini içeren çoklu fizyolojik mekanizmalarından kaynaklanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Kırmızıörümcek avcısı, biyoassaylar, dayanıklılık mekanizmaları, sinerjistler, biyokimyasal testler

<sup>1</sup> Bu çalışma 2-5 Ekim 2011 tarihinde Amsterdam'da düzenlenen VI. Uluslararası Moleküler Böcek Bilimi Sempozyumu'nda poster olarak sunulmuş ve özet olarak basılmıştır. Bu makale Pınar HEPHIZLI'nın yüksek lisans tezinin ve U.Ü. BAP 2010/12 nolu projenin bir bölümüdür

<sup>2</sup> Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, 77102, Yalova

<sup>3</sup> Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 16059, Görükle, Bursa

\*Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: akumral@uludag.edu.tr

Alınış (Received): 11.01.2012

Kabul edilmiş (Accepted): 03.04.2012

## Giriş

Günümüzde meyve ve sebze alanlarında kırmızıörümcek zararı oldukça önemli duruma gelmiş olup, üretici bu zararlılarla savaşım için sık aralıklarla çok çeşitli gruplardan akarisitleri uygulamak durumundadır. Bunun dışında, güve, yaprakbiti, thrips, beyazsinek ve kabuklubit gibi böcek zararlılarının da benzer şekilde önemli ekonomik kayıplara neden olması çoğu zaman akarisitlerin yanında insektisitlerin de sık aralıklarla kullanılmasına sebep olmaktadır. Bu, hem kırmızıörümceklerin doğal düşmanlarının popülasyonlarını çok azaltmakta ve hem de zararlının birçok ilaca karşı dayanıklılık oluşturmaya neden olmaktadır (Ay, 2005; Ay & Gurkan, 2005; Whalon et al., 2008; Van Leeuwen et al., 2010). Bursa'da başta elma olmak üzere, armut ve şeftali de Avrupa kırmızıörümceği [*Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae)] çok önemli zararlar meydana getirmekte ve birçok ilaca dayanıklılık gösterdiği için savaşımında başarılı olunamamaktadır (Kumral & Kovanci, 2007a,b). Özellikle, ilaçlamanın yoğun olduğu ilçelerde amitraz, dicofol, bromopropylate, fenpyroximate, chlorpyrifos-ethyl,  $\lambda$ -cyhalothrin ve mancozeb gibi ilaçlara *P. ulmi* popülasyonlarında duyarlılık kaybı saptanmıştır (Kumral & Kovanci, 2007a; Kumral et al., 2009). Üretici bu nedenle, ilaçların dozlarını yükseltmek zorunda kalmakta ve bir yandan üretim maliyetleri çok artarken diğer taraftan üründe pestisit kalıntısı ve çevre kirliliği vb. sorunlar ortaya çıkmaktadır. Buna karşılık, Bursa ili elma ve patlıcan bahçelerinde dikkat çekici bir durum kırmızıörümcek avcılarında *Stethorus gilvifrons* (Muls.) (Col.: Coccinellidae)'un da dirençli akar popülasyonlarının bulunduğu ilaçlamanın çok yoğun yapıldığı İznik ve Gürsu gibi ilçelerdeki ticari bahçelerde zararlının popülasyonuna bağlı olarak yoğun popülasyonlar oluşturmaktadır. Gözlemlerimize göre, eğer üretici yüksek dozda geniş spektrumlu insektisitlerle müdahale etmezse, faydalı böcek kırmızıörümcek popülasyonlarını 2-3 hafta içinde yok etmektedir. Aynı bahçelerde, bu faydalı böceğin popülasyonlarının diğer akar avcısı böcekler [*Orius* spp. (Het.: Anthocoridae), *Chrysoperla carnea* Stephens (Neu.: Chrysopidae), *Scolothrips* spp. (Thy.: Thripidae)]'den çok fazla düzeyde bulunması ve onlardan çok daha etkin olması da dikkat çekici diğer önemli bir durumdur (Gençer & Kumral, 2008; Çobanoğlu & Kumral, 2011). Sonuçta bu gözlemlerimiz bu faydalı böceğin son zamanlarda ilaçlamanın çok fazla yapıldığı Bursa ilindeki koşullara adaptasyonu, yüksek üreme ve beslenme gücünü göstermektedir. Birçok yerde olduğu gibi Bursa üreticisinin uzun yıllardan beri bilinçsiz olarak yoğun ilaçlama yapmasına karşılık, bu faydalı böcek muhtemelen bazı fizyolojik mekanizmaları kullanarak bazı popülasyonlarını canlı tutmayı başarmış olabilir. Bu hipotez, 2009-2010 yılları arasında elma bahçelerinden toplanan 4 farklı *S. gilvifrons* ve *P. ulmi* popülasyonu için ve 2 farklı insektisit (parathion-methyl ve bifenthrin) ele alınarak incelenmiş ve iki *S. gilvifrons* popülasyonda orta derecede duyarlılık saptanmıştır (Kumral et al., 2011). Benzer olarak, diğer *Stethorus* türlerinden *Stethorus punctillum* Wiese (Col.: Coccinellidae) 90'lı yılların sonunda azinphos-methyl'e dayanıklı ırkları sırasıyla İtalya ve ABD'de elma bahçelerinden rapor edilmiştir (Pasqualini & Malavolta, 1985; Croft, 1990). Diğer taraftan, Kumral et al. (2011) duyarlılık kaybı bulunan popülasyonlarda esteraz enziminde ve asetilkolinesteraz hedef alan duyarsızlığından kaynaklanan bir metabolik direnci saptadıklarını bildirmektedirler. Ancak bu ön çalışma popülasyon sayısı ve ilaç çeşitliliği bakımından oldukça dar kapsamlıdır ve bunun dışında *S. gilvifrons*'da ilaçlara dayanıklılık konusunda başka çalışma bulunmamaktadır.

Bu çerçevede farklı ekolojilerden daha çok sayıda avcı böcek popülasyonu toplanarak ve bunların Bursa'da çok kullanılan farklı ilaç gruplarına duyarlılık farklılıkları incelenmesi amaçlanmıştır. Son zamanlarda Bursa ilinde özellikle sebze ve meyve bahçelerinde çok tüketilen farklı gruplardan insektisit ( $\lambda$ -cyhalothrin ve chlorpyrifos) ve akarisit (bifenazate, hexythiazox, cyhexatin ve abamectin)'ler bu çalışmada kullanılmıştır. Daha sonra, dirençli ve çok hassas olduğu düşünülen iki popülasyonda doz-ölüm eğrilerinin belirlenmesi ve detoksifikasyon enzimleriyle ilişkilerinin saptanması için sinerjist+ilaç

karişimlerinin denenmesi hedeflenmiştir. Yine bu iki popülasyonda detoksifikasyon enzimlerinin rolü karboksilesteraz (CarE), Sitokrom P450 monooksijenaz (P450) ve Glutathione S-transferaz (GST) enzimlerinin aktivitesi ve asetilkolineesteraz (AchE) duyarsızlığı saptanarak araştırılmıştır. Hatta, farklı substratların enzim aktivitesinin saptanmasındaki etkinliğinin ortaya koymak amacıyla, CarE ve GST'nin aktivitesinin saptanması için farklı substratlardan yararlanılması hedeflenmiştir.

Sonuçta bu çalışmanın temel amacı doğal koşullar altında zararlı türlerde olduğu gibi bazı doğal düşmanlarda da bazı insektisitlere ve/veya akarisitlere karşı duyarlılık kaybının meydana gelebileceğini ispatlamak ve burada meydana gelen duyarlılık kaybının detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesiyle ilişkili olma olasılığını göstermektir.

## Materyal ve Yöntem

### *Stethorus gilvifrons* popülasyonları ve teşhisi

*Stethorus gilvifrons* popülasyonları Temmuz ve Ağustos aylarında Bursa ilinin farklı ilçelerinde kırmızıörümceklerin bulaşıklığı bulunan Kestel Barakfahik elma bahçesi (40.22623N°, 29.27267E°, 102m), Barakfahik şeftali bahçesi (40.22406N°, 29.26937E°, 83m), Barakfahik 2. elma bahçesi (40.22505N°, 29.27196E°, 107m), İznik Elbeyli elma bahçesi (40.46679N°, 29.71694E°, 90m), Orhangazi Merkez patlıcan bahçesi (40.50085N, 29.33919E°, 97m), İnegöl Hamamlı elma bahçesi (40.01841N°, 29. 60060E°, 91m), İnegöl Canbazlar elma bahçesi (40.24026N°, 29.14860E°, 93m) ve Karacabey Küçükkaağaç elma bahçesi (40.18174N°, 28.26416E°, 13m)'den toplanmıştır. Laboratuara getirilen *Stethorus* sp. erginlerinin erkek genital organlarının preparatı yapılarak Uygun (1981)'in belirtmiş olduğu morfolojik karakterlere göre teşhis edilmiştir. Yukarıda belirtilen popülasyonlardan toplanan pupa dönemlerinden elde edilen yeni nesil erginler laboratuvarında *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae) bireyleri ile beslenerek, 2-3 gün yaşındaki dişi *S. gilvifrons* bireyleri denemelerde kullanılmıştır.

### İnsektisiler, akarisitler, sinerjistler ve inhibitörler

Denemede 1 insektisit –akarisit [abamectin (Plamec, Platin Kimya, İstanbul), 3 selektif akarisit [cyhexatin (Metrostill, Bio Tarım, Antalya), bifenazate (Florimate, Hektaş, Kocaeli) ve hexythiazox (Twister, Hektaş, Kocaeli)] ve 2 insektisit [chlorpyrifos (Dursban 4, Dow Agrisciences, İstanbul) ve λ-cyhalothrin (Karate, Syngenta, Kocaeli)]'in ticari formülasyonları kullanılmıştır. Sinerjist olarak CarE inhibitörü S,S,S-tributylphosphorotrithioate (DEF) (Chem Service; West Chester, ABD), GST inhibitörü diethyl maleate (DEM) (Aldrich, ABD) ve P450 inhibitörü piperonyl butoxide (PBO) (Fluka, ABD) maddeleri kullanılmıştır. Ayrıca, CarE ve AchE İnhibitörü olarak primicarb (Sigma & Aldrich, ABD) ve paraoxon (Chem Service, West Chester, ABD) maddeleri kullanılmıştır.

### İnsektisit ve akarisitlerle biyoassay çalışmaları

Biyoassay denemelerde James (2003) tarafından geliştirilen Kumral et al. (2011) tarafından bazı değişiklik yapılmış yaprak disk-ilaçlama kulesi yöntemi kullanılmıştır. Kısaca bu yöntemde, temiz elma fidanlarından alınan yaprakların alt ve üst yüzeyi ile 9 cm çapındaki Petri'nin kapağı 10 atm. basınçta 2'şer ml ilaçlı sıvı ilaçlama kulesi ile ilaçlanmıştır. Petri kutularının alt kapağına nemlendirilmiş bir kurutma kağıdı, üzerine de üst yüzeyi alta gelecek şekilde ilaçlı yaprak yerleştirilmiştir. Petriler kuruduktan sonra her birine av olarak yeterli sayıda kırmızıörümcek yumurtaları fırçayla bırakılmıştır. Daha sonra denemeye alınacak 10'ar adet dişi birey fırça yardımıyla Petrilere aktarılmıştır. Üst kapağına çok sayıda

havalandırma deliği açılmış Petrilerin kenarı Parafilm ile kaplanarak böceklerin kaçması önlenmiştir. Bulaştırma işlemi tamamlandıktan sonra bu petriler  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta,  $\%65\pm 5$  orantılı nem ve 16:8 saat aydınlık: karanlık koşullarda bekletilmiştir. Denemeler her ilaç dozu için 1 kontrol + 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş ve her bir doz için 30 birey kullanılmıştır. Petriler 24. ve 48. saatte açılarak ölü canlı sayımları ve av takviyesi yapılmıştır. Sayımlarda fırça darbesiyle en az vücut boyu kadar yürüyemeyen bireyler ölü olarak kaydedilmiştir.

Yukarıda belirtilen biyoassay denemelerinde ilaç konsantrasyonları hazırlanırken saf su kullanılmıştır. Uygulama dozlarına karar verirken ilk ele alınan popülasyona (Barakfakih-1) önerilen tarla dozları uygulanmış olup, 24 ve 48 saat sonunda elde edilen sonuçlara göre seri halde dozlar hazırlanmıştır. Bu seri dozların hedef alınan popülasyonun  $\%10-90$ 'ını öldüren dozlardan oluşmasına dikkat edilmiştir. Daha sonra bu bahçeden elde edilen doz-ölüm eğrisine göre bir ayırıcı doz ( $\text{LC}_{50}$ ) diğer popülasyonlara uygulanmıştır. Ayırıcı dozlar abamectin, bifenazate, chlorpyrifos, cyhexatin, hexythiazox, ve  $\lambda$ -cyhalothrin için sırasıyla 72, 2304, 60, 150, 150 ve  $50 \text{ mgL}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Bu ayırıcı dozlara göre birçok ilaca duyarlılık kaybının düşük veya yüksek olduğu hassas (Barakfakih-1) ve dirençli (İznik) popülasyonlarına ise ilaçların en az 6 farklı dozu uygulanarak doz-ölüm eğrileri saptanmıştır.

### **İlaç+sinerjistlerle biyoassay çalışmaları**

Denemeler yukarıda belirtilen biyoassay metoduna göre yapılmış olup, deneme prosedürü farklıdır. Böcekler her ilaç için 5 gruba ayrılmış olup, 1. gruba sadece saf su (kontrol), 2. gruba saf su (sinerjist kontrolü), 3. gruba DEF ( $1000 \text{ mgL}^{-1}$ ), 4. gruba DEM ( $2000 \text{ mgL}^{-1}$ ) ve 5. gruba PBO ( $2000 \text{ mgL}^{-1}$ ) uygulanmıştır. Erginler 24 saat iklim odasında bekletildikten sonra, kısa süreliğine tüplere aktarılmış ve 2., 3., 4. ve 5. grup erginlerin bulunduğu Petrilere her popülasyonun sub-lethal dozu ( $\sim \text{LC}_{20}$ ) değeri olan ilaç dozu uygulanmıştır. Petriler kuruduktan sonra aynı bireyler bunların üstüne aktarılmıştır. İlaç etkinliğine bağlı olarak 24. veya 48. saatte erginlerin ölüm oranları saptanmış olup, Sinerjist etki oranı: ilaç+sinerjist kullanımı sonucu ölüm oranının sadece pestisit kullanımındaki ölüm oranına bölünmesiyle bulunmuştur.

### **Biyokimyasal Çalışmalar**

#### **Sitokrom P450 monooksigenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi**

Bu enzimin aktivitesi Rose et al. (1991; 1995)'in belirttiği metotta bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Özetle, 20 adet *S. gilvifrons* dişi 0.07gr EDTA, 0.03 gr phenylthiourea ve 0.03 gr DTT bulunan  $100 \mu\text{l}$  0.1 mol sodyum fosfat tampon (SFT) (pH 7.8)'da ezilmiştir. Homojenant  $14000 \text{ g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk. santrifüj edildikten sonra, protein miktarı Bradford (1976)'a göre belirlenmiş ve protein miktarına göre SFT ile seyreltilmiştir. Çoklu mikropalakaların her bir hücreğine  $90 \mu\text{l}$  enzim kaynağı,  $100 \mu\text{l}$   $\%50$  ethanolde hazırlanmış 2 mM p-nitroanisole yüklenmiştir. Mikropalaka  $30^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika inkübasyona bırakılıp, inkübasyonun arkasından  $10 \mu\text{l}$  9.6 mM NADPH eklenmiştir. Kör deneylerde enzim kaynağı yerine  $90 \mu\text{l}$  SFT yüklenmiştir. Kinetik okumalar  $30^{\circ}\text{C}$ 'de, 21 saniye aralıklarla 20 dakika 405nm dalga boyunda Bio-Tek mikropalaka okuyucuda (Winooski, ABD) yapılmıştır. Kinetik okuma sonucu elde edilen optik yoğunluk (m.O.D.) ( $\text{nmol p-nitrofenol dak}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) olarak ifade edilmiştir. Bu dönüşümde, ürüne dönüşen madde olarak p-nitrofenol'un standart eğrisinden elde edilen ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon$ ) kullanılmıştır.

### Karboksilesteraz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

CarE izozim'lerinin elektroforetik ayrımında kesikli poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) tekniği kullanılmıştır (Ornstein & Davis, 1964). Yükleme jeli %3.5 ve ayırma jeli ise %7.5 akrilamid konsantrasyonuna sahiptir. Beş *S. gilvifrons* dişi 50µl sukrozlu homojenizasyon sıvısında ezilmiştir. Homojenantlar 12000 g, 4°C'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Jel kuyucuklarına 20 µl süpernetant yüklenmiştir. Tank tamponu (pH 8.3) doldurulduktan sonra koşturma soğutmalı inkübatörde 4°C'de 250 V 1-1.5 saat devam etmiştir. Jeller çıkartıldıktan sonra 0.1 M SFT (pH 7.0)'de hazırlanmış 0.08 g fast blue RR ve 30 mM α-naftil asetat subsratı içeren boyada karanlıkta 25°C'de yaklaşık 1 saat çalkalanmıştır. Daha sonra %7'lik fikzasyon sıvısıyla boyama sabitlenmiştir. Jeller görüntüleme sisteminde fotoğrafları çekildikten sonra, GelQuant protein bantları analiz programında (Jerusalem, İsrail) bant sayıları ve yoğunlukları analiz edilmiştir. Ek olarak esteraz izozim'lerinin inhibitör maddelerle engellenme düzeyleri de bulunmuştur. Bu teknikte, homojenantların süpernetant'ları 20'şer µl çekilerek 2 ayrı tüpe bölünmüştür. Tüplerden birine 100 µM DEF veya 4 µM paraoxon'dan 5 µl eklenmiştir. Diğer 20 µl'lik homojenant bulunan tüp kontrol grubu olarak kabul edilmiş ve çözücü olarak kullanılan 5 µl aseton eklenmiştir. Homojenantlar 25°C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldıktan sonra tümü jele yüklenmiştir. Diğer tüm işlemler bir önceki metotta verildiği gibidir, sadece farklı olarak 30 mM α-naftil asetat kullanılmıştır.

CarE aktivitesi ayrıca spektrofotometrik metotla da belirlenmiştir (Van Leeuwen & Tirry, 2007). Özetle, 5 adet *S. gilvifrons* dişi %0.1'lik Triton-X 100'lü 0.1 M SFT (pH 7.6)'de ezilmiştir. Akabinde, 12000 g 4°C'de 6 dk. santrifüjlendikten sonra, protein miktarı Bradford (1976)'a göre belirlenip, protein miktarına göre SFT ile seyreltilmiştir. Boya çözeltisi olarak, 25ml 0.2M SFT (pH 7.6)'nin içinde 0.05g fast blue RR çözülmüştür. Boya çözeltisine 30 mM α-naftil asetat 125 µl 25 ml boya karışımına ilave edilmiştir. Mikroplakaya yükleme yapılırken 200 µl boya-subsrat karışımının üzerine 10µl enzim kaynağını koyulmuş ve kinetik olarak 450nm'de 25°C'de 30 sn aralıklarla 10 dk. kinetik okuma yapılmıştır. Elde edilen mOD değerleri nmol 1-naphthol min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> protein olarak spesifik aktivite değerlerine dönüştürülmüştür. Bu dönüşümün yapılmasında ürüne dönüşen madde olarak 1-naphthol'un ε<sub>λ</sub> kullanılmıştır.

### Glutathione S-Transferaz enzimlerinin aktivitesinin belirlenmesi

Bu enzim aktivitesi Habig et al. (1974) ve Temizkan ve Arda (2008) metotlarından uyarlanarak belirlenmiştir. Yirmi adet *S. gilvifrons* dişileri 100µl tris-HCL tampon (pH 7.5)'da ezilip, 12000g'de 4°C'de 6 dakika santrifüj yapılmıştır. Daha sonra bu homojenanttan 80 µl süpernetant çekilip, 720 µl tris-HCL tampon (pH 7.5) eklendikten sonra vorteks yapılmıştır. Protein miktarı Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir. Kuyucuklara 50µl homojenant, 100µl 10mM GSH ve 100µl üç substardan biri (1 mM CDNB, 10 mM DCNB, 1 mM DINB) eklenmiştir. Kör kuyucuklarda homojenant yerine 50 µl tris-HCL tampon (pH 7.5) kullanılmıştır. Kuyucuklar mikroplaka okuyucuya 340nm'de 25°C'de 20 dk. aralıklarla 10 saniye'de bir kinetik okuma yapılmıştır. Elde edilen mOD değerleri nmol glutathione bağlanması min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> protein olarak spesifik aktivite değerlerine dönüştürülmüştür. Bu dönüşümün yapılmasında indirgenen madde CDNB için 9.6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, DCNB için 8.5 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> ve DINB için 1.4mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> ε<sub>λ</sub> kullanılmıştır.

### Asetilkolinesteraz duyarsızlığının belirlenmesi

Stumpf et al. (2001) metoduna göre; 10 adet *S. gilvifrons* dişi 100 µl 0.1 mol (pH 7.5) SFT'de ezilmiştir. Daha sonra, 14000 g, 4°C'de 30 dk. santrifüj edilmiştir. Enzim kaynağında bulunan protein miktarına göre süpernetant'tan 80µl çekilip, üzerine 320µl SFT (pH 7.5) eklenerek vorteks ile

kariştirilmiştir. Ayrıca, inhibitör madde olarak primicarb'ın 1 mM ve paraoxon'un 0.4 mM dozu kullanılmıştır. Mikroplakaya 100 µl 1.5 mM DTNB, tüm popülasyonlardan 20 µl homojenat [kör deneylerde 20 µl ml SFT (pH 7.5)] eklenmiş ve 5'şer µl inhibitör maddeler yüklenip, 15- 20 dk oda koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak her bir popülasyonun bir serisine sadece inhibitör madde yerine 5 µl aseton yüklenmiştir. Daha sonra, 100 µl 1.5 mM ATChI eklenmiştir. Hemen bekleme olmaksızın 25°C'de 60 dk. 405 nm'de kinetik okuma yapılmıştır. Kontrol grubundaki spesifik aktiviteden inhibitör etkisiyle kalan aktivite çıkarılarak engellenme miktarı bulunmuş, daha sonra bu değer kontrol grubundaki aktiviteye bölünerek engellenme oranı (%) hesaplanmıştır.

### İstatistiksel değerlendirme

*Stethorus gilvifrons* popülasyonlarını 24 ve 48 saat sonra belirlenen ölüm verileri Abbott formülünden yararlanılarak ön değerlendirmeden geçirilmiş ve kontrol grubunda %10 ölümü geçen değerler bu formülle düzeltilmiştir. Değişen doz oranlarında muamele yapılan ve kontrol grubu popülasyonlarının Probit Logit program kullanılarak (BioStat, 2009) probit analizi yapılmıştır (Finney, 1971). Farklı popülasyonların LD<sub>50</sub> ve LD<sub>90</sub> değerleri %95 güven aralığı kullanılarak tahminlenmiş ve direnç oranları farklı bahçelerden toplanan popülasyonların LD<sub>50</sub> ve LD<sub>90</sub> değerlerinin hassas popülasyonların bu değerlerine bölünmesi ile elde edilmiştir. Kinetik okumalar arasındaki farklılıklar tek yönlü ANOVA'ya göre değerlendirilmiştir (SPSS, 2005). Daha sonra varyans analizine göre önemli bulunanlar LSD testine göre gruplandırılmıştır (SPSS, 2005).

### Sonuçlar ve Tartışma

#### Tüm popülasyonlarının insektisit ve akarisitlere duyarlılığı

Ayırıcı doz sonuçlarına göre abamectin'de *S. gilvifrons* erginlerinde duyarlı popülasyonlar Canbazlar, Barakfakih-2 ve Barakfakih şeftali, dayanıklı popülasyonlar ise Orhangazi, Küçük karaağaç ve İznik popülasyonları olarak bulunmuştur ( $F_{7,19}=11.0$ ;  $P<0.01$ ). Bifenazate'e duyarlı popülasyon Barakfakih-1 olurken dayanıklı popülasyonlar ise; Hamamlı, Küçük karaağaç ve Barakfakih şeftali olmuştur ( $F_{7,20}=4.2$ ;  $P=0.012$ ). Chlorpyrifos'a duyarlı Barakfakih-1, Barakfakih-2 ve Canbazlar popülasyonları bulunurken, dayanıklı olarak İznik, Barakfakih şeftali, Hamamlı ve Küçük karaağaç belirlenmiştir ( $F_{7,20}=8.1$ ;  $P=0.001$ ). Cyhexatin'de duyarlı popülasyonlar Canbazlar ve Barakfakih-1, dayanıklılar ise İznik ve Orhangazi olmuştur ( $F_{7,20}= 36.6$ ;  $P<0.01$ ). Hexythiazox uygulandığında ise en duyarlı popülasyonlar Barakfakih-1, Barakfakih-şeftali ve Canbazlar popülasyonları, dayanıklı popülasyon ise Barakfakih-2, Hamamlı, İznik ve Orhangazi olarak saptanmıştır ( $F_{7,19}=9.9$ ;  $P<0.01$ ). Son olarak λ-cyhalothrin'de Barakfakih şeftali en duyarlı popülasyon bulunurken, Hamamlı, Orhangazi ve İznik dayanıklı popülasyonlar olmuşlardır ( $F_{7,19}=6.3$ ;  $P=0.003$ ). Barakfakih-1 popülasyonu ilaçlara %40-90; İznik popülasyonu %7-68 arasında ölüm cevabı vermesi ve istatistiksel anlamda birçok ilaca sırasıyla duyarlı ve dayanıklı buldukları için bu popülasyonlar doz-ölüm, sinerjist ve enzim testlerinde kullanılmıştır (Çizelge 1). Mori & Gotoh (2001), bifenazate'a *Stethorus japonicus* Kamiya'un oldukça toleranslı olduğunu bildirmektedirler. Kim & Seo (2001), bifenazate'nin avcı akar *Amblyseius womersle*'nin dişi erginlerine *T. urticae*'de nazaran çok daha az zehirli olduğunu bildirmektedirler. Kim et al. (2006), bifenazate'ın afit avcısı *Aphidius colemani* (Vier.)'nin erginlerine çok düşük zehirlilik gösterdiği, buna karşılık chlorpyrifos'un çok zehirli olduğunu bildirmektedirler. Alzoubi & Çobanoğlu (2007; 2008; 2010), *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot ve *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae)'a organik fosforlu dimethoate ve sentetik piretroitli bifenthrin'in çok zehirli olduğunu, hexythiazox'in 24 saatte az, 72 saatte orta düzeyde zehirli

olduğunu kaydetmektedirler. Silva et al. (2009), avcı akar *Agistemus brasiliensis* (Vec. & Oli.) (Acari: Stigmaeidae)'ye abamectin ve chlorpyrifos' un orta derecede zararlı, cyhexatin ve hexythiazox'un yüksek derecede zehirli olduğunu bildirmektedirler.

### Hassas ve dayanıklı popülasyonların doz-ölüm cevapları

*Stethorus gilvifrons*'un duyarlı ve dayanıklı ırklarında tüm ilaçlarda elde edilen LD<sub>50</sub> ve LD<sub>90</sub> değerleri ve dayanıklılık oranları Çizelge 2'de verilmiştir. Probit analizinden elde edilen LD<sub>50</sub> değerine göre İznik popülasyonunda abamectin, bifenezate, chlorpyrifos, cyhexatin, hexythiazox ve λ-cyhalothrin ilaçlarına sırasıyla 2.1, 11.2, 6.7, 1.7, 1.6 ve 2.3 kat duyarlılık kaybı bulunmuştur. Benzer olarak, LD<sub>90</sub> değerine göre İznik popülasyonunda aynı ilaçlara sırasıyla 3.1, 5.0, 6.6, 1.4, 1.0 ve 2.1 kat duyarlılık kaybı bulunmuştur (Çizelge 2). Yu et al. (2005), *T. urticae*'nin bifenezate ile 150 kattan fazla seleksiyona uğratıldığında 248.8 kat direncinin arttığı kaydetmektedirler. Bonafos et al. (2008), avcı akarlar *Typhlodromus pyri* Scheuten ve *Amblyseius andersoni* (Chant) (Acari: Phytoseiidae)'nin Fransa'nın bağ alanlarında chlorpyrifos'a düşükten yüksek düzeye kadar doğal olarak direnç kazandıklarını belirtmektedirler. Pathan et al. (2008), *C. carnea*'nin bir laboratuvar ırkına karşı 5 farklı popülasyonda chlorpyrifos ölüm cevabına göre LD<sub>50</sub> düzeyinde yüksek düzeyde dirençler bulduklarını belirtmektedirler. Maurya et al. (2009), *C. carnea*'nin 15 döl boyunca chlorpyrifos ile yapay seleksiyona tabi tutulmasından sonra, LD<sub>50</sub> değerinin 7 kez artış göstererek en yüksek duyarlılık kaybının bu ilaçta yaşandığını kaydetmektedirler. Kumral et al. (2011)'de elma bahçelerinden toplanan dört popülasyon arasında iki popülasyonda bifenthrin ve parathion-methyl'e orta derecede duyarlılık kaybı bulduklarını bildirmektedirler. Organik fosforlara benzer duyarlılık kayıpları *S. punctillum*, *S. punctum punctum* (LeConte) ve *S. punctum picipes* (Casey)'de İtalya ve ABD'de elma bahçelerinde saptandığı bildirilmektedir (Colburn & Asquith, 1970; Hull & Beers, 1985; Biddinger & Hull, 1995; James, 2002; 2003; Biddinger et al., 2009). Buna ek olarak, bazı araştırmacılar, *Harmonia axyridis* Pallas, *C. septempunctata* ve *Propylea japonica* Thunberg gibi coccinellid türlerde sentetik piretroitli ve organik fosforlara duyarsız popülasyonlar saptadıklarını kaydetmektedirler (Cho et al., 1997; 2002; Wu & Miyata, 2005; Wu et al., 2007).

### Hassas ve dayanıklı popülasyonlarda sinerjist etkiler

*Stethorus gilvifrons*'un duyarlı ve dayanıklı ırklarında ele alınan 6 ilaca karşı sinerjist etkiler Çizelge 3 ve 4'de verilmiştir. Hassas popülasyonda, en yüksek sinerjist etki abamectin ve cyhexatin'e karşı DEF ve DEM uygulandığında meydana gelmiştir. Duyarlı popülasyonlarda genellikle tüm ilaçların öldürücü etkisi DEF uygulandığında artmış ve bu sinerjist madde λ-cyhalothrin hariç diğerlerine göre daha fazla etki göstermiştir (Çizelge 3). Dayanıklı popülasyonda ise DEF yanında diğer sinerjistlerin de ölüm oranını yüksek oranda arttırdığı görülmüştür. Örneğin bifenezate'a karşı yüksek direnç gösteren bu popülasyonda üç sinerjistin de benzer etkisi bulunmuştur. Sonuç olarak, duyarlı popülasyondan farklı olarak, faydalı popülasyonunun ele alınan ilaçlara dayanıklılığında hem CarE hem GST hem de P450'nin rol aldığını göstermektedir (Çizelge 4). Christie & Wright (1990), *Spodoptera littoralis* Bois. ve *Helicoverpa armigera* Hübn. (Lep.: Noctuidae)'de abamectin'e duyarlılığı PBO sinerjistin kullanılmasıyla 5-8 kat arttığını kaydetmektedirler. Ayrıca, *S. littoralis* larvalarına DEF uygulanmasıyla abamectin'in zehirliliğinin 3 kat arttığı bildirilmektedir. Kim et al. (2004), fenpyroximate ile 20 kez seleksiyona uğratılmış *T. urticae* popülasyonunda abamectin'e 24 kat direnç oluştuğunu ve ilaç+sinerjik madde karışımlarında başta PBO yani P450 enziminin rolünün çok yüksek olduğunu, GST ve esteraz enzimlerini engelleyen diğer enzimlerin de az da olsa rol aldığını göstermektedirler. Nieuwenhuysen et al. (2009), *T. urticae*'deki bifenezate direncinin mitokondri sitokrom b mutasyonundan kaynaklandığını kaydetmektedirler. Baker et

al. (1995), depolanmış ürün zararlılarının önemli bir parazitodi *Bracon hebetor* (Say) (Hym.: Braconidae)'nin organikfosforlara göstermiş olduğu dirençte azalmanın DEF sinerjist maddesinin kullanılmasıyla saptandığını bildirmektedirler. Pree et al. (2002), *P. ulmi*'nin cyhexatin'e direncinin kırılmasında hem PBO hem de DEF sinerjistlerinin etkisi olduğunu belirtmektedirler. Liu & Shen (2003), *Spodoptera exigua* (Hübner.) (Lep.: Noctuidae)'de  $\lambda$ -cyhalothrin ile PBO karışımının duyarlılığı 2 kata kadar arttırdığını dolayısıyla P450'nin ilaca dirençte önemli bir rol oynadığını kaydetmektedirler.

### Hassas ve dayanıklı popülasyonlarda enzim aktiviteleri

*Stethorus gilvifrons* popülasyonlarının CarE, GST ve P450 aktiviteleri ve AchE duyarsızlığı sonuçları Çizelge 5'de verilmiştir. İstatistiki anlamda  $\alpha$ -NA ve  $\beta$ -NA substratları kullanıldığında en yüksek CarE aktivitesi İznik popülasyonunda belirlenmiştir ( $\alpha$ -NA  $F_{1,5}= 17.5$ ;  $P= 0.0004$ ;  $\beta$ -NA  $F_{1,5}= 27.72$   $P= 0.002$ ).

GST'lerin aktivitesinde ise üç farklı substrat ortamında da istatistiki farklılık bulunmasına rağmen sadece CDNB ve DINB substratları kullanıldığında İznik popülasyonu önemli seviyede yüksek GST aktivitesine sahip bulunmuştur (CDNB  $F_{1,8}= 27.7$ ;  $P= 0.002$ ; DCNB  $F_{1,8}= 7.43$ ;  $P=0.03$ , DINB  $F_{1,8}= 17.64$ ;  $P<0.01$ ). P450 enzim aktiviteleri, istatistiki olarak önemli olmamasına rağmen, aktivitenin en yüksek olduğu popülasyon İznik olarak saptanmıştır. İnhibitör madde olarak 1mM primicarb kullanıldığında Barakfakih-1 popülasyonundaki AchE enzimi %64 oranında engellenirken, İznik popülasyonunda bu değer %26 oranında kalmış olup, aralarındaki inhibasyon oranı istatistiksel anlamda da önemli bulunmuştur ( $F_{1,8}= 60.83$ ;  $P= 0.001$ ). Paraoxon inhibitöründe engellenme Barakfakih-1 popülasyonunda yine fazla bulunurken, aralarındaki oran farkı önemli bulunmamıştır ( $F_{1,8}= 0.68$ ;  $P= 0.46$ ). Sonuçta, İznik popülasyonunda Barakfakih-1'e oranla bir AchE duyarsızlığı saptanmıştır. *Stethorus gilvifrons*'un hem duyarlı hem de dayanıklı popülasyonlarında 4 esteraz bandı saptanmış olup, tüm bantların yoğunlukları İznik popülasyonunda fazla olmuştur (Şekil 1). Her iki popülasyonda 4  $\mu$ M paraoxon ve 100  $\mu$ M DEF inhibitörleriyle yapılan elektroforez analizi sonucu elde edilen jeller, yoğunlukları ve engelleme oranları Şekil 2'de verilmiştir. Duyarlı popülasyon olan Barakfakih-1'de tüm bantlar paraoxon ile %100 oranında engellenirken; İznik popülasyonunda E1, E2 ve E3 bantlarında sadece sırasıyla %39.2, %50.8 ve %44.4 oranlarında engelleme görülmüştür. Popülasyonlara 100 $\mu$ M DEF uygulandığında İznik'de E1 ve E2 bantlarında engellenme oranları sırasıyla % 3.4 ve % 14.7 bulunmakla birlikte, Barakfakih-1'de E1, E2 ve E3 bantlarında sırasıyla %29.5, %26.5 ve %34.2 oranında saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, dayanıklı popülasyonda ilaçlara dayanıklılıkta esteraz enziminin rolü açıkça ortaya konmuştur. O'brien et al. (1992), *Aphis gossypii* Glover (Hom.: Aphididae)'nin chlorpyrifos'a karşı olan direnci ile toplam esteraz enziminin yoğunluğu arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu ve bu ilacın detoksifikasyonuna bu enzimin neden olduğunu vurgulamaktadırlar. *T. urticae*'nin iki sentetik piretroitli (bifenthrin ve  $\lambda$ -cyhalothrin) ve bir organik fosforlu (dimethoate) ile seleksiyona uğratılmış laboratuvar ırklarında ilaçlara azalan duyarlılığa karşın artan bir genel esteraz enzim aktivitesi tespit ettikleri kaydedilmektedir (Yang et al., 2002). Ayrıca, bir çok araştırmacı tarafından esteraz enzimleri ile metabolik olarak zehirliliği gidermesinin artırılması piretroitlere direnç oluşturmalarındaki ana neden olarak görülmektedir (Ay & Gürkan, 2005; Yang et al., 2001; Van Leeuwen & Tirry, 2007). Yu (2008), böceklerde GST'lerin allelokimyasallara ve organik fosforlara dirençte önemli rol oynadıklarını bildirmektedir. Wu & Miyata (2005), organik fosforlara duyarlılık kaybında CarE ve GST enzimlerinin etkili olduğunu kaydetmektedirler. Van Leeuwen et al. (2006) *T. urticae*'de bifenazate'a karşı direnç artışında P450 enziminin rolünü açıkça ortaya koymuşlardır. Kumral et al. (2011), parathion-methyl ve bifenthrin'e duyarlılık kaybı gösteren *S. gilvifrons* popülasyonlarında yüksek CarE aktivitesi ve AchE duyarsızlığı saptadıklarını bildirmektedirler. Wu & Miyata (2005) *C. septempunctata*'nın tarla popülasyonlarında methamidophos ve fenvalerate dayanıklılıkları saptadıklarını



Çizelge 1. *Stethorus gilvifrons*'un tüm popülasyonlarının ilaçların ayrırcı dozlarına karşı 24 saatte oluşan ortalama ölüm oranları

	Abamectin	Bifenazate*	Chlorpyrifos	Cyhexatin	Hexythiazox	λ-cyhalothrin
	72 mgL <sup>-1</sup> ölüm oranı(%)	2304 mgL <sup>-1</sup> ölüm oranı(%)	60 mgL <sup>-1</sup> ölüm oranı(%)	150mgL <sup>-1</sup> ölüm oranı(%)	150 mgL <sup>-1</sup> ölüm oranı(%)	50 mgL <sup>-1</sup> ölüm oranı(%)
Barakfaki-1	53.3±8.8bc**	73.3±3.3a	46.7± 3.3ab	63.3±6.7 ab	40.0±10.0a	52.8±2.8b
Barakfaki-2	86.9±4.4ab	16.7±6.7b	10.0±0.0b	20.0± 0.0cd	33.3±3.3a	93.3±3.3a
Hamamlı	85.0±5.0abc	30.0±0.0 ab	72.3±17.8a	41.7± 8.3bc	0.0±0.0c	75.0±5.0ab
Kuçukkaraağaç	43.9±10.6bc	11.1±11.1b	11.1±11.1b	0.0± 0.0d	10.6±0.6bc	50.0±16.7b
Canbazlar	38.2±1.8bc	0.0±0.0b	15.5±1.2b	15.6± 4.4cd	0.0±0.0c	65.0±5.0ab
İznik	100.0±0.0a	30.0±15.3ab	71.9±14.1a	82.2± 3.4a	39.3±3.2a	70.0±5.7ab
Orhangazi	53.3±6.7bc	26.7±23.1ab	6.7±6.7b	13.3± 6.7d	25.0±5.0ab	68.3±4.4ab
	31.3±18.8c	30.0±11.5ab	36.4±10.6ab	6.7± 3.3d	7.0±3.5bc	45.7±5.7b

\*Bifenazate etki mekanizması nedeniyle 48 saat sonundaki ölüm oranları alınmıştır.

\*\* Aynı sütündeki farklı harfler ortalamalar arasındaki en az %1 düzeyinde farklılığı göstermektedir.

Çizelge 2. Hassas (Barakfaki-1) ve dayanıklı (İznik) *Stethorus gilvifrons* popülasyonlarının kullanılan pestisitlere karşı gösterdikleri doz ölüm cevapları ve dayanıklılık oranları

İlaçlar	Barakfaki-1 (Hassas popülasyon)		İznik (Dayanıklı popülasyon)		Dayanıklılık oranları <sup>a</sup>	
	LD <sub>50</sub>	LD <sub>90</sub>	LD <sub>50</sub>	LD <sub>90</sub>	LD <sub>50</sub> <sup>a</sup>	LD <sub>90</sub> <sup>b</sup>
Abamectin	11.8	48.4	24.5	152.1	2.1	3.1
Bifenazate	1049.9	28134.2	11729.1	139324.6	11.2	5.0
Chlorpyrifos	42.0	92.3	280.9	608.1	6.7	6.6
Cyhexatin	160.3	391.9	267.4	542.6	1.7	1.4
Hexythiazox	31.6	215.7	51.4	221.3	1.6	1.0
λ-cyhalothrin	49.2	149.5	111.8	312.5	2.3	2.1

<sup>a</sup> Dayanıklı popülasyonunun LD<sub>50</sub> değeri/ hassas popülasyonun LD<sub>50</sub> değeri<sup>b</sup> Dayanıklı popülasyonunun LD<sub>90</sub> değeri/ hassas popülasyonun LD<sub>90</sub> değeri

Çizelge 3. Hassas (Barakfakih-1) *Stethorus gilvifrons* popülasyonunun DEF, DEM ve PBO enzim inhibitörlerine karşı duyarlılıkları

Pestisitler	Sadece ilaç			ilaç+DEF			ilaç+DEM			ilaç+PBO			Sinerjist etkisi (oransal <sup>a</sup> )		
	ilaç ve sinerjist uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	ilaç uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	ilaç+DEF uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	ilaç+DEF uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	ilaç+DEM uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	ilaç+DEM uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	ilaç+PBO uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	DEF	DEM	PBO	DEF	DEM	PBO		
Abamectin 92 mg/l	10.0	10.5±0.5	65.0±5.0	47.2±2.8	20.6±9.4	6.2	4.5	2.0							
Bifenezate 1152 mg/l	10.0	25.0±5.0	64.6±2.1	35.0±3.5	40.0±0.0	2.6	1.5	1.6							
Chlorpyrifos 40 mg/l	6.7	45.0±5.0	91.7±8.3	55.0±5.0	60.0±10.0	2.0	1.2	1.3							
Cyhexatin 100 mg/l	3.3	20.0±20.0	100.0±0.0	68.9±8.9	35.0±15.0	5.0	3.5	1.8							
Hexythiazox 25 mg/l	10.0	23.3±6.7	67.5±7.5	22.2±22.2	12.5±12.5	2.9	0.9	0.5							
λ-cyhalothrin 50mg/l	6.7	52.8±2.8	100.0±0.0	100.0±0.0	90.0±10.0	1.9	1.9	1.7							

<sup>a</sup> Sinerjist etki oranı: Sedace ilaç uygulananlardaki ölüm oranı/ilaç+sinerjist uygulananlardaki ölüm oranı

Çizelge 4. Dayanıklı (Iznik) *Stethorus gilvifrons* popülasyonunun DEF, DEM ve PBO enzim inhibitörlerine karşı duyarlılıkları

Pestisitler	Sadece ilaç			ilaç+DEF			ilaç+DEM			ilaç+PBO			Sinerjist etkisi (oransal <sup>a</sup> )		
	ilaç ve sinerjist uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	ilaç uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	ilaç+DEF uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	ilaç+DEF uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	ilaç+DEM uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	ilaç+DEM uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	ilaç+PBO uygulan- madğinde ölüm oranı (%)	DEF	DEM	PBO	DEF	DEM	PBO		
Abamectin 92 mg/l	5.5	10.0±0.0	46.7±3.3	36.7±6.7	34.1±11.6	4.7	3.7	3.4							
Bifenezate 1152 mg/l	0.0	3.6	21.5±6.5	23.6±6.1	20.0±0.0	6.0	6.6	5.6							
Chlorpyrifos 40 mg/l	6.7	6.7±6.7	50.0±0.0	27.4±6.3	16.7±16.7	7.5	4.1	2.5							
Cyhexatin 100 mg/l	3.3	13.3±6.7	82.2±9.7	85.2±7.4	66.7±8.8	6.2	6.4	5.0							
Hexythiazox 25 mg/l	0.0	6.7±3.3	19.4±4.2	12.8±7.4	22.3±12.9	2.9	1.9	3.3							
λ-cyhalothrin 50mg/l	3.3	13.7±3.2	100.0±0.0	80.0±5.8	96.7±3.3	7.3	5.8	7.1							

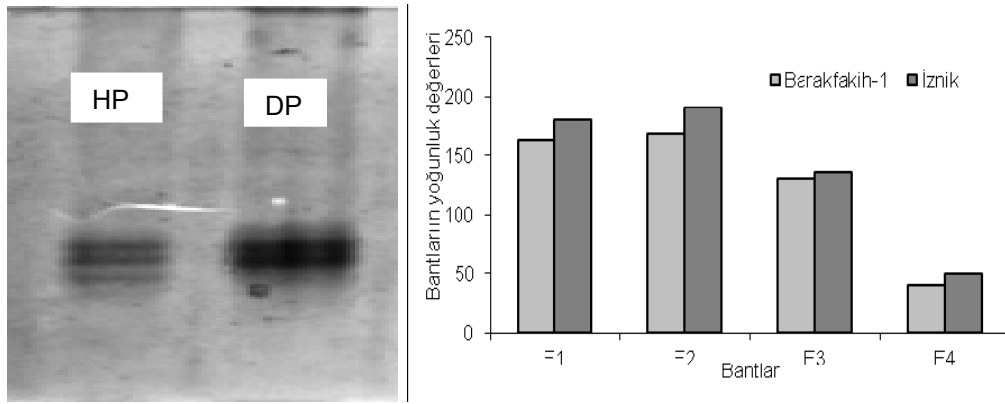
<sup>a</sup> Sinerjist etki oranı: Sedace ilaç uygulananlardaki ölüm oranı/ilaç+sinerjist uygulananlardaki ölüm oranı

Çizelge 5. *Stethorus gilvifrons* popülasyonlarına uygulanan biyokimyasal çalışmalar sonucu elde edilen ortalama spesifik enzim aktiviteleri

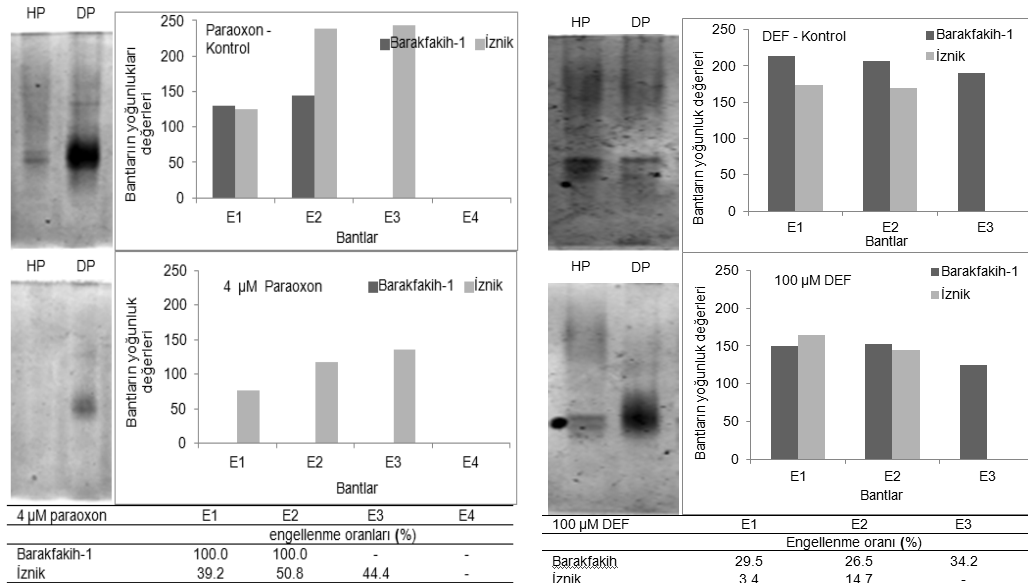
substrat	α-NA	B-NA	CDNB	DCNB	DINB	p- nitroanisole	AChE engellenmesi (%)	
							1-naphthhol dk <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein (±SH)	1 mM
Barakfakih-1	212.5±4.34b*	13.3±5.7b	13.26±3.7b	5.94±0.56a	91.25±15.47ab	0.0012±0.0001	63.87±6.83a	82.35±11.09
Iznik	320.5±22.9a	56.7±1.9a	56.65±1.9a	4.33±0.29b	128.54±10.0a	0.0018±0.0003	25.57±5.07b	76.82±3.46

\* Aynı sütündeki farklı harfler ortalamalar arasındaki en az %1 düzeyinde farklılığı göstermektedir.

ve bunun AchE duyarsızlığı ile ilişkili olduğunu bildirmektedirler. Sonuç olarak, *S. gilvifrons*'un bazı doğal popülasyonlarında hem akarisit hem de insektisitlere duyarlılık farklılıklarının meydana geldiği görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, insektisit ve akarisitlere duyarsız *S. gilvifrons* popülasyonunda dayanıklılık mekanizmaları CarE, GST ve P450 enzimlerinin tamamında aktivite artışı ve AchE'de duyarsızlaşma olduğu açıkça ortaya konmuştur. Zararlılarda olduğu gibi bu doğal düşman böcekte de ilaçlara dayanıklılıkta enzimlerin aktif rol üstlenmesi bu gibi popülasyonların laboratuvar kitle halinde yetiştirilmesi ve tarım alanlarına salınması konusunda önem arz etmektedir. İleride yapılacak çalışmalarda bu türün dayanıklı popülasyonları laboratuvar koşullarında kitle halinde üretilirken, tarımda çok kullanılan bifenazate, abamectin ve diğer akarisitlere yapay seleksiyona tabi tutularak daha fazla dirençli hale getirilebilirler. Ancak, bu çalışmaları yürütürken artan direncin genetik temelli olup olmayışı ve dayanıklılığın stabilitesi konularının da derinlemesine araştırılması gerekmektedir.



Şekil 1. Doğal PAGE yöntemiyle hassas (HP: Barakfaki-1) ve dayanıklı (DP: İznik) *Stethorus gilvifrons* popülasyonlarında esterase izozimlerinin bantları ve bant yoğunlukları.



Şekil 2. Hassas ve dayanıklı *Stethorus gilvifrons* popülasyonlarının doğal PAGE yöntemiyle inhibitör kullanılmadan ve paraoxon veya DEF inhibitörleriyle esterase izozimlerinin analizi.

## Teşekkür

Bu çalışmayı Z 2010/12 nolu proje ile destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederiz.

## Yararlanılan Kaynaklar

- Alzoubi, S. & S. Çobanoğlu, 2007. Effects of sublethal dose of different pesticides on the Two-spotted spider mite "*Tetranychus urticae* Koch" and its predatory mites under greenhouse conditions. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(6): 764-770.
- Alzoubi, S. & S. Çobanoğlu, 2008. Toxicity of some pesticides against *Tetranychus urticae* and its predatory mites under laboratory conditions. *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science*, 3(1): 30-37.
- Alzoubi, S. & S. Çobanoğlu, 2010. Bioassay of some pesticides on two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch and predatory mite *Phytoseiulus persimilis* A-H. *International Journal of Acarology*, 36(3): 267-272.
- 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. *J. Pest. Sci.*, 78: 139-143.
- Ay, R. & M. O. Gürkan, 2005. Resistance to bifenthrin and resistance mechanisms of different strains of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) from Turkey. *Phytoparasitica*, 33: 237-244.
- Baker, J. E., D. K. Weaver, J. E. Throne & J. L. Zettler, 1995. Resistance to protectant insecticides in two field strains of the stored-product insect parasitoid *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Economic Entomology*, 88(3): 512-519.
- Biddinger, D. J. & L. A. Hull, 1995. Effects of several types of insecticides on the mite predator, *Stethorus punctum* (Coleoptera: Coccinellidae), including insect growth regulators and abamectin. *Journal of Economic Entomology*, 88(2): 358-366.
- Biddinger, D. J., D. C. Weber & L. A. Hull, 2009. Coccinellidae as predators of mites: Stethorini in biological control. *Biological Control*, 51: 268-283.
- BioStat, 2009. STATSDIRECT Statistical Software, Statsdirect Ltd.: a user's guide to probit or logit analysis. Statsdirect Statistical Software, Version 6, Cheshire, UK.
- Bonafos, R., V. Vignes, E. Serrano & P. Auger, 2008. Resistance monitoring to deltamethrin and chlorpyrifos-ethyl in 13 populations of *Typhlodromus pyri* Scheuten (Acari: Phytoseiidae) from vineyards in the southwest of France. *Crop Protection*, 27(3/5): 855-858.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Cho, J. R. K. J., J. K. Hong, J. K. Yoo, J. R. Bang & J. O. Lee, 1997. Comparative toxicity of selected insecticides to *Aphis citricola*, *Myzus malisuctus* (Homoptera: Aphididae), and the predator, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Econ. Entomol.*, 90: 11-14.
- Cho, J. R. K. J., Y. J. Kinnt, H. S. Kim & J. K. Yoo, 2002. Some biochemical evidence on the selective insecticide toxicity between the two aphids, *Aphis citricola* and *Myzus malisuctus* (Homoptera: Aphididae), and their predator, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Asia-Pacific Entomol.*, 5: 49-53.
- Christie, P. T. & D. J. Wright, 1990. Activity of abamectin against larval stages of *Spodoptera littoralis* Boisduval and *Heliothis armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) and possible mechanisms determining differential toxicity. *Pesticide Science*, 29(1): 29-38.
- Colburn, R. & D. Asquith, 1970. Contact and residual toxicity of selected acaricides and insecticides to a ladybird beetle, *Stethorus punctum*. *J. Econ. Entomol.*, 63: 1686-1688.
- Croft, B. A., 1990. *Arthropod Biological Control Agents and Pesticides*. John Wiley & Sons, NewYork, 723pp.
- Çobanoğlu, S. & N. A. Kumral, 2011. Ankara, Bursa ve Yalova İllerinde Solanaceae Familyası Bitkilerinde Akar Türlerinin Belirlenmesi ve Önemli Akar Türlerinin Popülasyon Yoğunlukları ile Doğal Düşmanlarının Saptanması Üzerine İncelemeler. TUBITAK TOVAG 108O363 nolu proje sonuç raporu (yayınlanmamış).
- Finney, D. J. 1971. *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, London.

- Gençer, N. S. & N. A. Kumral, 2008. Meyve ve Sebzelerde Zararlı Kırmızıörümceklere Karşı *Stethorus gilvifrons* (Mulstant)'un Biyolojik Mücadele Ajanı Olarak Kullanılma Potansiyelinin Araştırılması. U.Ü. Bil. Araş. Proj. 2008/16, yayınlanmamış proje raporu.
- Habig, W. H., M. J. Pabst & W. B. Jakoby, 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130–7139.
- Hull, L. & E. Beers, 1985. "Ecological Selectivity: Modifying Chemical Control Practices to Preserve Natural Enemies, 103-122". In: *Biological Control in Agricultural IPM Systems* (Eds: M.A. Hoy & D.C. Herzog). Academic Press, New York.
- James, D. G., 2002. Selectivity of the miticide, bifentazate, and aphicide, pymetrozine, to spider mite predators in Washington hops. *Int. J. Acarol.*, 28: 175-179.
- James, D. G., 2003. Pesticide susceptibility of two coccinellids (*Stethorus punctum picipes* and *Harmonia axyridis*) important in biological control of mites and aphids in Washington hops. *Biocon. Sci. Tech.*, 13: 253–259.
- Kim, S. & S. Seo, 2001. Relative toxicity of some acaricides to the predatory mite, *Amblyseius womersleyi* and the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). *Applied Entomology and Zoology*, 36(4): 509-514.
- Kim, Y. J., S. H. Lee, S. W. Lee & Y. J. Ahn, 2004. Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. *Pest Manag. Sci.*, 60: 1001–1006.
- Kim, D., S. Kim, K. Kim & J. Hyun, 2006. Comparative toxicity of some pesticides to the predatory mites, *Neoseiulus fallacis* Garman (Acari: Phytoseiidae). *Korean Journal of Applied Entomology*, 45(2): 179-188.
- Kumral, N. A. & B. Kovancı, 2007a. The diversity and abundance of mites in agrochemical-free and conventional deciduous fruit orchards of Bursa, Turkey. *Türk. Entomol. Derg.*, 31(2): 83-96.
- Kumral, N. A. & B. Kovancı, 2007b. Susceptibility of female populations of *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae) to some acaricides in apple orchards. *J. Pest Sci.*, 80(3): 131-137.
- Kumral, N. A., H. Susurluk, N. S. Gençer & M. O. Gürkan, 2009. Resistance to chlorpyrifos and lambda-cyhalothrin along with detoxifying enzyme activities in field-collected populations of European red mites. *Phytoparasitica*, 37(1): 7-15.
- Kumral, N. A., N. S. Gencer, H. Susurluk & C. Yalcin, 2011. A comparative evaluation of the susceptibility to insecticides and detoxifying enzyme activities in *Stethorus gilvifrons* and *Panonychus ulmi*. *International Journal of Acarology*, 37(3): 255-268.
- Liu, Y. & J. Shen, 2003. Biochemical mechanism and genetics of resistance to lambda-cyhalothrin in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, and the relative fitness of the resistant strain. *Acta Entomologica Sinica*, 46(5): 567-572.
- Maurya, R. P., M. A. Khan, S. Kumar & A. Kumar, 2009. Artificial selection of green lacewing, *Chrysoperla carnea* Stephens for tolerance to insecticides. *Annals of Plant Protection Sciences*, 17(1):1-4.
- Mori, K. & T. Gotoh, 2001. Effects of pesticides on the spider mite predators, *Scolothrips takahashii* (Thysanoptera: Thripidae) and *Stethorus japonicus* (Coleoptera: Coccinellidae). *International Journal of Acarology*, 27(4): 299-302.
- Nieuwenhuys, P. van, T. van Leeuwen, J. Khajehali, B. Vanholme & L. Tirry, 2009. Mutations in the mitochondrial cytochrome b of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) confer cross-resistance between bifentazate and acequinocyl. *Pest Management Science*, 65(4): 404-412.
- O'brien, P. J., Y. A. Abdel-All, J. A. Ottea & J. B. Graves, 1992. Relationship of insecticide resistance to carboxylesterases in *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) from mid-south cotton. *J. Econ. Entomol.*, 85(3): 651-657.
- Ornstein, L. & B. J. Davis, 1964. Disc Electrophoresis. 2, Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404–427.
- Pasqualini, E. & C. Malavolta, 1985. A recommended spray (Acarina:Tetranychidae) on apple in Emilia-Romagna. programme for integrated mite control on apples. *Orch. Bollettino dell ' Istituto di Entomologia ' Guido Grandi della Università degli Studi di Bologna*, 39: 221-230.

- Pathan, A. K., A. H. Sayyed, M. Aslam, M. Razaq, G. Jilani & M. A. Saleem, 2008. Evidence of field-evolved resistance to Organophosphates and Pyrethroids in *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Economic Entomology*, 101: 1676-1684.
- Pree, D. J., L. A. Bittner & K. J. Whitty, 2002. Characterization of resistance to clofentezine in populations of European red mite from orchards in Ontario. *Experimental and Applied Acarology*, 27(3): 181-193.
- Rose R. L., F. Gould, P. E. Levi & E. Hodgson, 1991. Differences in cytochrome-P450 activities in Tobacco budworm larvae as influenced by resistance to host plant allelochemicals and induction. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 99(3): 535-540.
- Rose, R. L., L. Barbhaiya, R. Roe, G. Rock & E. Hodgson, 1995. Cytochrome P450-associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 51:178–191.
- Silva, M. Z. da, C. A. L. de Oliveira & M. E. Sato, 2009. Selectivity of the pesticides to the predaceous mite *Agistemus brasiliensis* Matioli, Ueckermann & Oliveira (Acari: Stigmaeidae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(2): 388-396.
- SPSS, 2005, SPSS 13.0 for Windows. SPSS Inc., Chicago, USA.
- Stumpf, N., C. P. W. Zebitz, W. Kraus, G. D. Moores & R. Nauen, 2001. Resistance to organophosphates and biochemical genotyping of acetylcholinesterases in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 69: 131–142.
- Temizkan, G. & N. Arda, 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 345s.
- Uygun, N. 1981. Türkiye Coccinellidae (Coleoptera) Faunası Üzerinde Taksonomik Araştırmalar. Ç.Ü. Ziraat Fak. Yayınları: 157, Bilimsel Araştırma ve İncelemeler: 48, 110pp.
- Van Leeuwen, T., L. Tirry & R. Nauen, 2006. Complete maternal inheritance of bifentazate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidae) and its implications in mode of action considerations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(11): 869-877.
- Van Leeuwen, T. & L. Tirry, 2007. Esterase-mediated bifenthrin resistance in a multiresistant strain of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Pest Manag. Sci.*, 63: 150–156.
- Van Leeuwen T., J. Vontas, A. Tsagkarakou, W. Dermauw & L. Tirry, 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 563-572.
- Whalon, M. E., R. M. Mota-Sanchez, R. M. Hollingworth & L. Duynslager, 2008. Arthropods Resistant to Pesticides Database (ARPD). <http://www.pesticideresistance.org>.
- Wu, G. & T. Miyata, 2005. Susceptibilities to methamidophos and enzymatic characteristics in 18 species of pest insects and their natural enemies in crucifer vegetable crops. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 82: 79–93.
- Wu, G., T. Miyata, C. Y. Kang & L. H. Xie, 2007. Insecticide toxicity and synergism by enzyme inhibitors in 18 species of pest insect and natural enemies in crucifer vegetable crops. *Pest Manag. Sci.*, 63: 500–510.
- Yang, X., D. C. Margolies, K. Y. Zhu & L. L. Buschman, 2001. Host-plant induced changes in detoxification enzymes and susceptibility to pesticides in the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.*, 94: 381– 387.
- Yang, X. M., L. L. Buschman, K. Y. Zhu & D. C. Margolies, 2002. Susceptibility and detoxifying enzyme activity in two spider mite species (Acari : Tetranychidae) after selection with three insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 95(2): 399- 406.
- Yu J., D. Seo, E. Kim, J. Han, K. Ahn & G. Kim, 2005. Inheritance and cross resistance of bifentazate resistance in twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Korean Journal of Applied Entomology*, 44(2): 151-156.
- Yu, S. J., 2008. *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. CRC press, London, UK.