

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**PAMUK YAPRAK KURDU *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera:
Noctuidae)'NDA PYRETHROID VE NEONİKOTİNOİD DİRENCİNİN
BİOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

Abdollah DINI POUR

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

05.03.2014

Abdollah DINI POUR

ÖZET

DOKTORA TEZİ

PAMUK YAPRAK KURDU *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae)'DE PİRETİROİD VE NEONİKOTİNOİD DİRENCİNİN BİOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Abdollah DINI POUR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. Oktay GÜRKAN

Mevcut çalışmada, 2008 yılında Adana'dan toplanan ve laboratuarda yetiştirilmekte olan pamuk yaprak kurdu *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) popülasyonlarının sentetik piretroitli (gamma-cyhalothrin) ve neonikotenoidli (imidakloprid) insektisitlere karşı gelişen direnç mekanizmalarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gamma-cyhalothrin ve imidaklopride dirençli ırklar elde etmek amacıyla popülasyonlara ilaçlara göre sırasıyla 12 ve 6 nesil boyunca LC₇₅ konsantrasyonunda seleksiyon baskısı uygulanmış ve LC₅₀ bazında aynı ilaçlar için sırasıyla 16.85 ve 9.76 kat hassasiyet azalışı saptanmıştır.

Direnç mekanizmasının hangi detoksifikasyon enzim grubu ile ilişkisi olduğunun tespit edilmesi amacıyla S,S,S-tributilfosforotritioat (DEF), piperonyl butoxide (PBO) ve diethyl maleate (DEM) olmak üzere üç farklı enzim inhibitörü sinerjist olarak kullanılmıştır. Sinerjistik çalışmalarda, gamma-cyhalothrin etkisinin incelemesinde, LC₅₀ değerlerine göre DEF, PBO ve DEM için sırasıyla 3.1, 2.1 ve 3.6 kat sinerjizm oranı (SR) tespit edilmiştir. İmidakloprid'le yapılan çalışmaların sonuçları ise sırasıyla 1.7, 1.2 ve 2 kat olarak elde edilmiştir.

Biyokimyasal analizler sonucunda, artan direnç oranıyla doğru orantılı olarak, karboksilesteraz, acetylcholinesterase (AChE) ve glutatyon S-transferaz enzim aktivitelerinin anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

Mart 2014, 81 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyoassay, piretroit direnci, neonikotinoid direnci, gamma-cyhalothrin, imidacloprid, *Spodoptera littoralis*, karboksilesteraz, AChE, GST, sinerjist

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF PYRETHROID AND NEONICOTINOID RESISTANCE OF *Spodoptera littoralis* (Boisd.)(Lepidoptera: Noctuidae)

Abdollah DINI POUR

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

Supervisor: Prof. Dr. M. Oktay GÜRKAN

In the current study, it is aimed to determine the resistance mechanisms developed by the Cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) populations collected from Adana province in 2008 and being reared under laboratory conditions against synthetic pyrethroids (gamma-cyhalothrin) and neonicotinoids (imidacloprid).

A selection pressure was created using LC₇₅ values for 12 and 6 generations for gamma-cyhalothrin and imidacloprid, respectively, in order to obtain insecticide-resistant strains, which revealed sensitivity decreases for 16.85 and 9.76 fold for gamma-cyhalothrin and imidacloprid.

In order to detect the relation between the resistance mechanism and detoxification enzyme groups, three enzyme inhibitor, S, S, S-tributylfosforotritioat (DEF), piperonyl butoxide (PBO) and diethyl maleate (DEM) were used as synergists. In the synergistic examination for gamma-cyhalothrin, the effect of above three synergists in LD₅₀ values, synergism ratio (SR) were determined, 3.1, 2.1 and 3.6-fold respectively. The results of studies for imidacloprid were achieved 1.7, 1.2 and 2-fold SR for these synergists, respectively.

Biochemical analysis revealed that the activities of carboxylesteras, acetylcholinesteras (AChE) and glutathione-S-transferase were found to increase by the increasing resistance ratio.

March 2014, 81 pages

Key Words: Bioassay, pyrethroid resistance, neonicotinoid resistance, gamma-cyhalothrin, imidacloprid, *Spodoptera littoralis*, carboxylesterase, AChE, GST, synergists

TEŞEKKÜR

Önemli bir tarım zararlısı *Spodoptera littoralis* üzerinde, iki farklı insektisit ile biyoassay ve biyokimyasal yöntemler aracılığıyla tespit ettiğimiz dirençte, çalışmalarım süresince bana her türlü desteği sağlayan ve çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendiren değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. M. Oktay GÜRKAN'a (Ankara Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı) çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmamın, özellikle tez yazım süresinde, bir danışman hoca gibi, bana hem maddi ve hem manevi desteği sunan Sayın Yrd. Doç. Dr. Umut TOPRAK'a (Ankara Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı) sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmanın şekillendirilmesinde ve yürütülmesinde sağladığı önemli katkılar ve yardımlarından dolayı, tezimin izleme komitesinde 2 yıl boyunca yer alan ve çalışmanın yürütülmesinde önemli katkılar ve açılımlar sağlayan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Şerife BAYRAM'a (Ankara Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. M. Recep AY'a (Süleyman Demirel Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı) teşekkür ederim.

Çalışmamda, bana her türlü yardımı ve desteği sunan değerli meslektaşlarım ve sevgili arkadaşlarım Sayın Tuğba ERDOĞAN'a, Sayın Yeliz DEMİRCİ'ye ve Sayın Ahmad HEKMAT KASHTIBAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında ve hayatım boyunca bana göstermiş oldukları sevgi, anlayış ve sabır için anneme, babama ve eşime de çok teşekkür ederim.

Abdollah DINI POUR

Ankara, Mart 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 İnsektisitlerin Sınıflandırılma	5
1.2 Zararlı Böcekler	6
1.2.1 Pamuk yaprak kurdu <i>Spodoptera littoralis</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	7
1.3 Direnç ve Tipleri.....	7
1.3.1 Davranışsal direnç.....	9
1.3.2 Morfolojik direnç	10
1.3.3 Metabolik direnç	10
1.3.4 Çapraz direnç	11
1.4 İnsektisitlerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırmaları.....	11
1.5 Direncin Saptanması.....	14
1.5.1 Geleneksel biyoanalizler	15
1.5.2 Biyokimyasal analizler	15
1.5.3 Moleküler analizler	15
1.5.4 Bağışıklık testleri.....	15
1.6 Detoksifikasyon	16
1.6.1 Detoksifikasyon enzimleri	18
1.6.1.1 Sitokrom P450 monooksijenaz	18
1.6.1.2 GST (Glutasyon S-Transferaz)	19
1.6.1.3 Esterazlar	19
1.7 Sentetik Piretroitlere Karşı Görülen Direnç	20
1.8 İmidakloprid'e Karşı Görülen Direnç	22
2. KAYNAK ÖZETLERİ	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1 Materyal.....	30
3.2 Yöntem	32
3.2.1 <i>Spodoptera littoralis</i> popülasyonları.....	32
3.2.2 Biyoassay ve seleksiyon çalışmaları.....	33
3.2.3 Sinerjistik çalışmalar	35
3.2.4 Biyokimyasal çalışmalar	35
3.2.4.1 Protein miktarının ölçümü	35
3.2.4.2 Toplam karboksilesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi	37
3.2.4.3 Asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi	37
3.2.4.4 Glutasyon S-transferaz (GST) enzim aktivitesinin belirlenmesi	38
3.2.5 İstatistiksel değerlendirme	38
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	39
4.1 Biyoassay ve Seleksiyon Çalışmaları	40
4.2 Sinerjistik Çalışmaları	46

4.3 Biyokimyasal Sonuçlar	51
4.3.1 Karboksilesteraz enzim aktivitesinin lümü.....	51
4.3.2 Asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesinin ölçüm sonuçları	56
4.3.3 Glutasyon S-Transferaz (GST) enzim aktivitesinin ölçüm sonuçları.....	61
4.4 neriler	66
KAYNAKLAR	68
EKLER.....	77
EK 1 Yapay besin hazırlama prosedürü	78
EK 2 Ergin besin hazırlama prosedürü	79
ÖZGEÇMİŞ.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Pestisitlerin kullanım amaçlarına göre sınıflandırılması.....	3
Şekil 1.2 Pestisit gruplarına göre dünyada tarım ilacı kullanımı.....	4
Şekil 1.3 Pestisit gruplarına göre Türkiye’de tarım ilacı kullanımı.....	4
Şekil 1.4 Türkiye’deki pestisit üretim miktarı trend analizi.....	5
Şekil 1.5 Direnç gelişimini etkileyen ana faktörler.....	8
Şekil 1.6 Detoksifikasyonun genel biyokimyasal mekanizması.....	16
Şekil 1.7 İnsektisit kimyasal sınıflarının detoksifikasyonuna etkili fizyolojik mekanizmalar.....	17
Şekil 1.8 Voltaj kapalı sodyum kanalı.....	21
Şekil 3.1 Sinir hücresinde bulunan sodyum ve potasyum iyon kanalları.....	31
Şekil 3.2 <i>Spodoptera littoralis</i> popülasyonları yetiştirme kapları.....	33
Şekil 3.3 Deneme kapların hazırlaması.....	34
Şekil 3.4 İlaçlı yaprak disklerin kurutması.....	34
Şekil 3.5 Biyoassaylerde kullanılan Spectrophotometer.....	36
Şekil 4.1 <i>Spodoptera littoralis</i> popülasyonlarının gamma-cyhalothrin’e karşı gösterdikleri probit doz LC_{50} ve LC_{90} değerlerin eğril.....	42
Şekil 4.2 Seleksiyon popülasyonlarının LC_{50} ve LC_{90} ’a göre direnç oranı.....	42
Şekil 4.3 Ölmüş prepupa döneminde olan <i>S. littoralis</i>	44
Şekil 4.4 <i>Spodoptera littoralis</i> popülasyonlarının imidaklopid’e karşı gösterdikleri logaritmik ppm doz LC_{50} eğrileri.....	44
Şekil 4.5 <i>Spodoptera littoralis</i> popülasyonlarının imidaklopid’e karşı gösterdikleri logaritmik ppm doz LC_{75} eğrileri.....	45
Şekil 4.6 Gamma-cyhalothrin’in farklı sinerjistler ile kullanılarak elde edilmiş, dirençli ve hassas populasyonda sinerjizim oranlarının ($SR LC_{50/90}$) grafiği.....	48
Şekil 4.7 İmidaklopid’in farklı sinerjistler kullanılarak elde edilmiş dirençli ve hassas populasyonunda sinerjizim oranlarının ($SR LC_{50}$ ve 90) grafiği.....	50
Şekil 4.8 Gamma-cyhalothrin ile selekte edilen populasyonun karboksilesteraz enzim aktivitesi grafiği.....	54

Şekil 4.9 İmidaklopid ile selekte edilen populasyonun karboksilesteraz enzim aktivitesi.....	56
Şekil 4.10 Gamma-cyhalothrin ile selekte edilen populasyonların AChE enzim aktiviteleri.....	59
Şekil 4.11 İmidaklopid ile selekte edilen populasyonun AChE enzim aktivitesi grafiği.....	61
Şekil 4.12 Gamma-cyhalothrin ile selekte edilen populasyonun GST enzim aktivitesi grafiği.....	63
Şekil 4.13 İmidaklopid insektisidi ile selekte edilen populasyonların GST enzim aktivitesi grafiği.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 <i>Spodoptera littoralis</i> popülasyonların gamma-cyhalothrin'e karşı gösterdikleri probit ölüm verileri.....	41
Çizelge 4.2 <i>S. littoralis</i> popülasyonların imidakloprid'e karşı gösterdikleri probit ölüm verileri.....	43
Çizelge 4.3 PBO, DEM ve DEF'in hassas ve dirençli (F12) <i>Spodopteralittoralis</i> popülasyonlarında gamma-cyhalothrin'e karşı sinerjistik etkileri.....	47
Çizelge 4.4 PBO, DEM ve DEF'in hassas ve dirençli (F6) <i>Spodoptera littoralis</i> popülasyonlarında imidacloprid'e karşı sinerjistik etkileri.....	49
Çizelge 4.5 Gamma-cyhalothrin ilacı ile selekte edilen populasyonların karboksilesteraz enzim aktiviteleri.....	52
Çizelge 4.6 Gamma-cyhalothrin insektisidi ile selekte edilen karboksilesteraz enzimin farklı döllerde verilerin istatistiksel analizleri.....	52
Çizelge 4.7 Gamma-cyhalothrin insektisidi ile selekte edilen gruplanmış karboksilesteraz enzim değreleri.....	53
Çizelge 4.8 İmidakloprid ilacı ile selekte edilen populasyonların karboksilesteraz enzim aktiviteleri.....	54
Çizelge 4.9 İmidakloprid insektisidi ile selekte edilen karboksilesteraz enzimin farklı döllerde verilerin istatistiksel analizleri.....	55
Çizelge 4.10 İmidakloprid insektisidi ile selekte edilen gruplanmış karboksilesteraz enzim değreleri.....	55
Çizelge 4.11 Gamma-cyhalothrin ilacı ile selekte edilen popülasyonların asetilkolinesteraz enzim aktiviteleri.....	57
Çizelge 4.12 Gamma-cyhalothrin insektisidi ile selekte edilen popülasyonların farklı döllerde AChE enzimi miktarlarının istatistiksel analizi.....	57
Çizelge 4.13 Gamma-cyhalothrin insektisidi ile selekte edilen gruplanmış AChE enzim değreleri.....	58
Çizelge 4.14 İmidakloprid ile selekte edilen popülasyonların asetilkolinesteraz enzim aktiviteleri.....	59
Çizelge 4.15 İmidakloprid insektisiti ile selekte edilen AChE enzimin farklı döllerde verilerin istatistiksel analizleri.....	60

Çizelge 4.16 İmidaklopid ile selekte edilen gruplanmış AChE değreleri.....	60
Çizelge 4.17 Gamma-cyhalothrin ilacı ile selekte edilmiş popülasyonların GST enzim aktiviteleri.....	62
Çizelge 4.18 Gamma-cyhalothrin insektisiti ile selekte edilen GST enzimin farklı döllerde verilerin istatistiksel analizleri.....	62
Çizelge 4.19 İmidaklopid ilacı ile selekte edilen popülasyonların GST enzim değerleri.....	63
Çizelge 4.20 İmidaklopid insektisiti ile selekte edilen GST enzimin farklı döllerde verilerin istatistiksel analizleri.....	64
Çizelge 4.11 İmidaklopid insektisidi ile selekte edilen gruplanmış AChE enzim değerleri.....	64
Çizelge 4.22 Gamma-cyhalothrin (VANTEX) ve imidaklopid ile selekte edilmiş en son jenerasyonları ve hassas popülasyonu karşılaştırılması.....	65

1. GİRİŞ

Dünya nüfusu hızlı artışı ile beraber, insanların gıda ihtiyacı da artmaktadır. Bu ihtiyacı karşılamak amacı ile tarım alanlardan daha fazla ürün elde edilmesi gerekmektedir. Pestisitler kimyasal bir gruba olarak tarımda, tarım ürünlerde zarar yapan ve hastalık taşıyan vektörlere karşı, sıklıkla kullanılmaktadır. Pestisidin çeşitli tanımları vardır; Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), madde veya madde karışımı olarak, insan veya hayvan hastalıkları taşıyan vektörlere, depolama veya gıda pazarlamada, bitkilerin üretiminde, tarım ürünleri, ahşap ve ahşap ürünleri ve hayvan yemlerinde zararlı olan ve müdahale eden böcekler, akarlar veya diğer zararlıların önlenmesi veya kontrol altında tutma amacı için tasarlanmıştır (Jeyaratnam 1990).

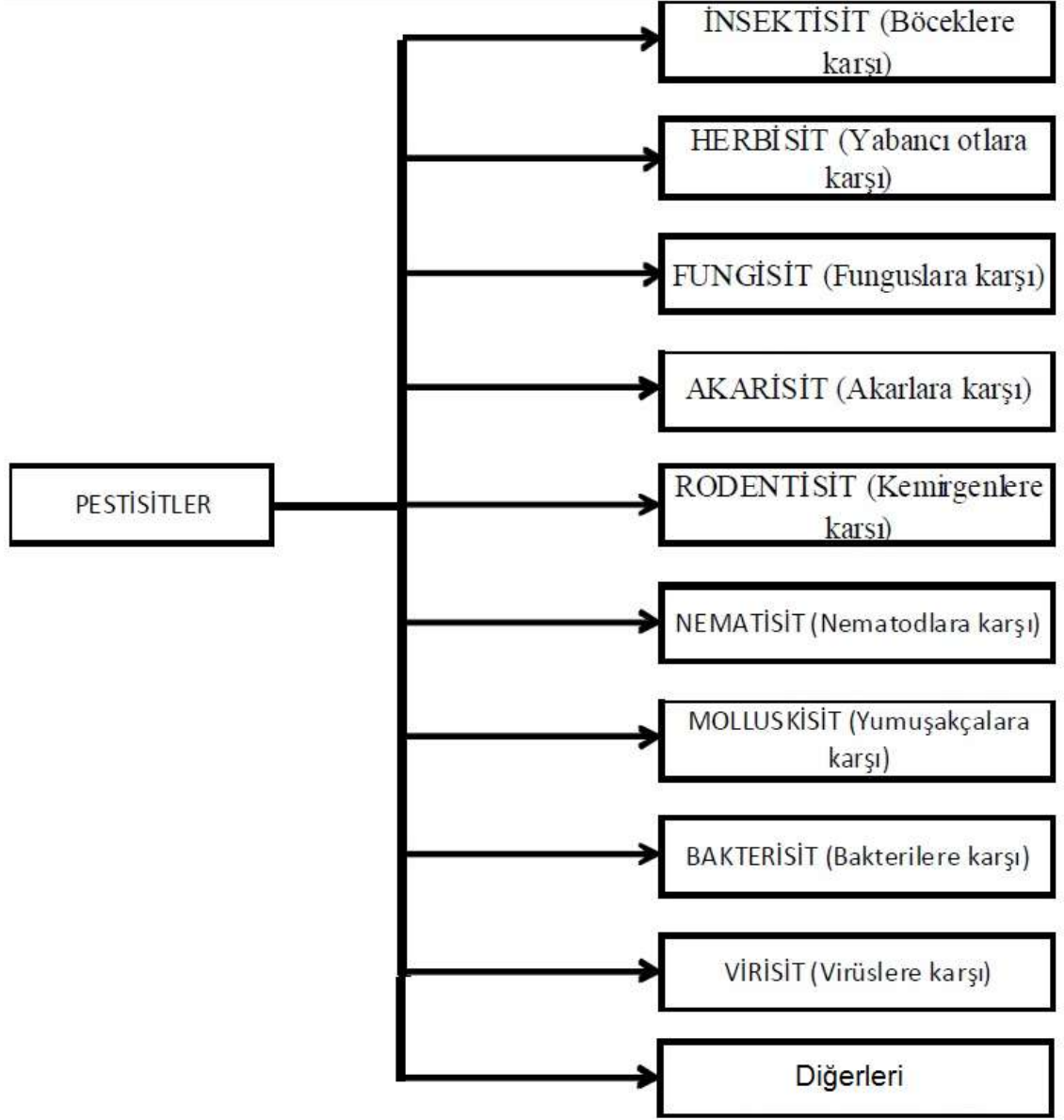
Zararlıların, yabancı otların ve hastalıkların tarımsal üretimde neden olduğu kayıplar, ortalama olarak % 20 – 40 arasında değişmektedir. Bu kayıplar hasat, depolama, kurutma, işleme aşamalarında da devam etmektedir. Dünya hububat üretiminde, bu kayıplar yaklaşık % 20'si hasat öncesi ve hasat sonrası aşamalarda ortaya çıkmaktadır. Pestisitler, tarım zararlılarının verdikleri zararları azaltmaktadır. Bunun sonucunda da kalite yükselmekte, üretim ve ekonomik geri dönüş ise artmaktadır. 1940'lı yıllardan beri pestisit kullanımı, tarımsal üretimi arttıran en önemli faktör olarak bilinmektedir (Yıldız vd. 2000).

Günümüzde tarımsal ilaçlardan faydalanılması, tarım ürünlerini korumak ve açlık tehlikesini önlemek için tarımsal mücadelede bir zorunluluk haline gelmiştir ve bu nedenle tüm dünyada tarımsal ilaç kullanımında artış gözlenmiştir (Özel 2004).

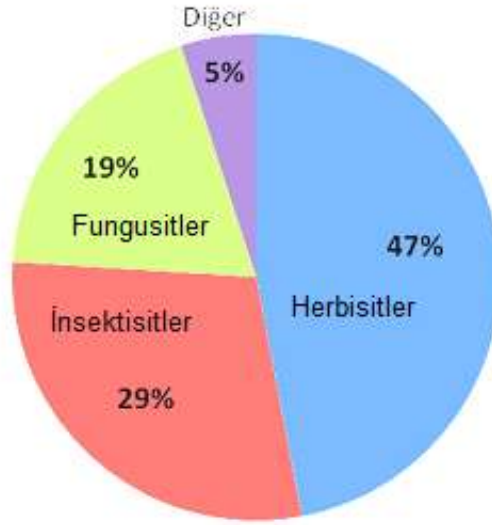
Tarımsal üretimde kayba neden olan zararlılar, hastalık ve yabancı otlarla mücadelede, pestisitlerin kullanılması kaçınılmazdır. Ancak kimyasal mücadelenin sahip olduğu birçok avantajlarının yanında, çevre kirliliği, insan sağlığına olan tehlikeleri, hedef olmayan böceklerin etkilenmesi ve dirençli popülasyonların oluşması gibi dezavantajları da kaçınılmazdır. Günümüzde beslenme sorunu artarak devam etmektedir. Özellikle gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde açlık hala ölümlerin birinci nedenidir. Artan nüfusa rağmen, mevcut tarım arazileri, erozyon, yeni tarım

arazilerinin açılmaması, tarım alanlarının sanayi bölgelerine dönüşmesi ve yeni yolların yapılması gibi nedenlerden dolayı daha da küçülmektedir. Bu açıdan tarım alanlarından en yüksek miktarda verim alınması, tek hedef olarak önemsenmektedir. Verimin artırılması için gübreleme, sulama ve toprak işleme gibi kültürel yöntemler yanında birçok kültür bitkisinde ise hastalık, zararlılar ve yabancı otlarla mücadele kaçınılmazdır. Son yıllarda biyoteknik yöntemler sayesinde zararlılara ve hastalıklara karşı geliştirilen dayanıklı bitki çeşitleri, artan nüfusun tarımsal ürün ihtiyaçlarını ve bitki koruma problemlerini tam olarak çözememiştir. Dünyada, tarım üretimleri ve bu ürünlerin kalitesinin artırılması için, tarım ilaçlarının kullanılması vazgeçilmez hale gelmektedir. Aksi takdirde, tarım ilaçları kullanılmadığı durumlarda ürün kayıpları meydana gelebilmektedir. Kimyasal mücadele de, genelde pestisitler ve özellikle insektisitler, akarisitler, fungusitler vb. kimyasal maddeler kullanılmaktadır (Şekil 1.1). Bu kimyasal maddeler tarım ürünü üretiminin ekim, hasat, depolama ve taşınması gibi farklı aşamalarında, herhangi bir zararlıya veya yabancı otlara karşı kullanılmaktadır. Tarım ürünlerinde zarar yapan, herhangi bir böcek veya hastalığı kontrol amacıyla uygulanan kimyasal madde veya madde karışımlarına pestisit veya tarım ilacı adı verilmektedir (Tiryaki vd. 2010).

Günümüzde bitkisel üretimde fiziksel mücadele, mekaniksel mücadele, biyoteknik mücadele, biyolojik mücadele, kimyasal mücadele, karantina önlemleri ve kültürel önlemler gibi yöntemler, verim üzerinde olumsuz etki yapan etmenlere karşı kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında kimyasal mücadele en çok tercih edilen yöntemlerden biri olarak uygulanmaktadır. Bu yöntemin diğer yöntemlere göre daha fazla tercih edilmesinin nedeni, genellikle daha az işgücü ve masrafla geniş alanlarda mücadele yapılabilmesi, uygulanmasının daha kolay olması ve kısa zamanda etkili sonuç alınabilmesi gibi avantajlara sahip olmasıdır. Ancak bu kapsamda uygulanan yöntemin hem ürün miktarını ve ürün kalitesini artırması, hem de ekonomik olması gerekmektedir (Delen vd. 2002).



Şekil 1.1 Pestisitlerin kullanım amaçlarına göre sınıflandırılması (Tiryaki vd. 2010)



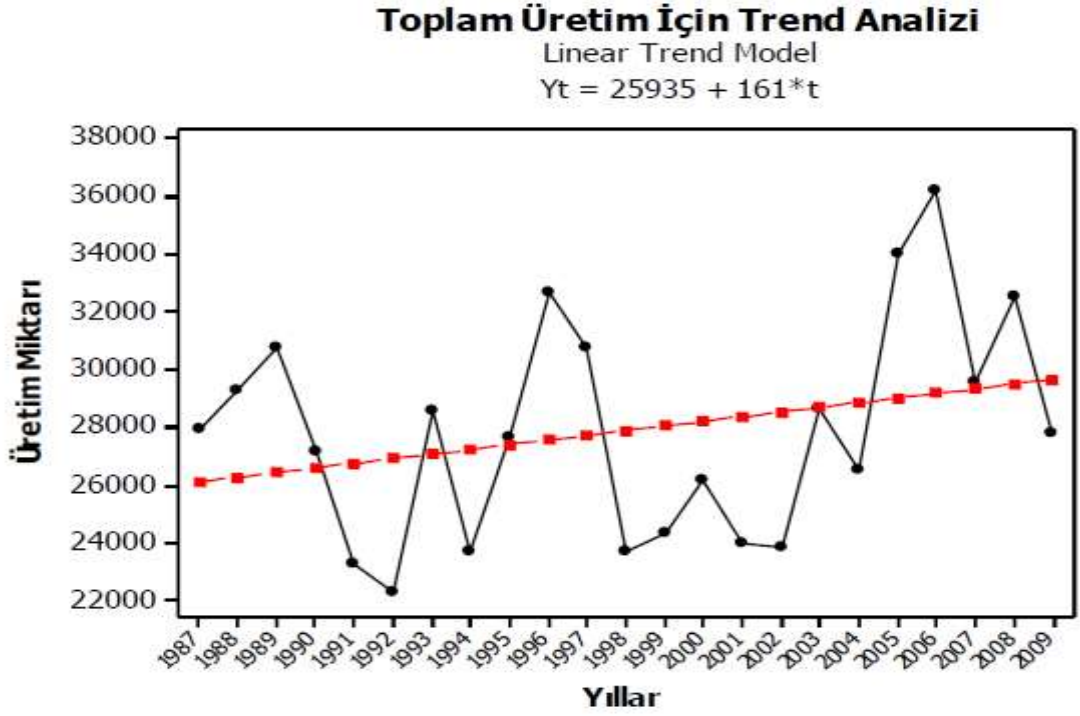
Şekil 1.2 Pestisit gruplarına göre dünyada tarım ilacı kullanımı (Tiryaki vd. 2010)



Şekil 1.3 Pestisit gruplarına göre Türkiye’de tarım ilacı kullanımı (Tiryaki vd. 2010)

İnsektisit veya böcek ilacı, böceklere karşı kullanılan pestisitlerin bir çeşididir. İnsektisitler böceklere karşı, yumurta, larva (nimf) veya ergin dönemlerine kullanılmaktadır. Larvalara ve yumurtalara karşı uygulanan preparatlara sırasıyla larvisid ve ovisid gibi özel adlar da verilmektedir. Böcek öldürücüler ziraat, tıp, ev içi ve endüstri alanlarında kullanılabilir (Şekil 1.2). İnsektisitler 20. yüzyılda tarımsal verimlilik artışının arkasındaki en önemli faktörlerden biridir. İnsektisitlerin

birçoğu insanlar için zararlıdır (Anonymous 2013a). Delen vd. (2008) bildirildiklerine göre, Türkiye’de yıllık pestisit tüketimi, yıllık iniş ve çıkışlara rağmen, 1979-2007 yılları arasında % 270 oranında artmıştır (Şekil 1.3 - 1.4).



Şekil 1.4 Türkiye’deki pestisit üretim miktarı trend analizi (Kızılaslan vd. 2011)

Avrupa ve kuzey Amerika gibi gelişmiş ülkeler, pestisitlerin çevre ve insan sağlığı açısından risklerini ciddi biçimde değerlendirmektedirler. Bir yandan pestisitleri çok bilinçli ve dikkatli kullanırlarken, diğer yandan da riskli pestisitlerin kullanımlarını kısıtlamakta ya da tamamen uygulamadan kaldırılmaktadırlar. Günümüzde tüm ülkelerde, tüketilen pestisitlerin sağlık ve çevre kirliliği gibi kriterler açısından incelemesi, ciddi bir konu olarak araştırılmaktadır (Canık vd. 2012).

1.1 İnsektisitlerin Sınıflandırılması

İnsektisitlerin etki mekanizmaları ve böceklerde etkileyen hedef bölgeye göre IUPAC (2006) tarafından belirtilen genelde dört gruba ayrılabilir:

- Sistematik ilaçlar: Bitkilere verilir. Bitkiler üzerinden beslenen böcekler insektisidi ağız yolu ile bünyelerine alarak ölürler.
- Temas insektisitleri: Böceklere doğrudan temas ettirilerek kullanılır. Pestisit uygulamasının etkinliğini arttırmak için genellikle küçük damlacıklar şeklinde kullanılırlar.
- Fümigasyon: Zararlı olduğu düşünülen akar, böcek ve bakteriler, kapalı bir ortamda gaz halde kimyasal maddeler (fümigant) verilip boğularak öldürülür.
- Bitkiye entegre edilmiş koruyucular (PIP): Genetik modifikasyondan sonra, bitkiler tarafından üretilen insektisit maddelerdir. Örneğin, belirli bir *Bacillus thuringiensis* biyosidal proteini kodlayan bir gen, kültür bitkisinin genetik materyaline dahil edilir. Daha sonra, bitki ilgili proteini üretmeye başlar ve insektisit etkisi ortaya çıkar (Anonymous 2013b).

Her ne kadar insektisitlerin kullanılmasının bazı yararları olsa da insanlar ve diğer hayvanlar için potansiyel toksik etkileri nedeniyle birçok soruna yol açabilmektedir. İnsektisitlerin tümü, ekosistemleri değiştirme potansiyeline sahip olmaları, insanlar için zehirli olmaları ve besin zincirinde birikme olasılığından dolayı her zaman kontrollü kullanılmaları gerekmektedir. İnsektisitler kullanılırken tarımsal ihtiyaçların çevre ve sağlık sorunları ile dengelenmesi her zaman bir gereklilik olarak önemsenmektedir (Zülküf 2010).

1.2 Zararlı Böcekler

Yeryüzünde, böcekler en yaygın bulunan ve en fazla türe sahip olan canlı sınıftır. Ancak % 0,5'i insanlara karşı zararlı olabilmektedir. Bazı böcekler insan sağlığı için sorun yapabilmekte, tarım bitkileri, süs bitkileri, ya da doğal bitkilere zarar vererek yok edebilmektedir. Tarım, artan dünya nüfusunun yeteri kadar beslenebilmesi açısından en önemli sektörlerden biri olarak bulunmaktadır. Dünyada açlık sorunu, küresel bir felaket haline gelmektedir. Dolayısıyla artan besin ihtiyacının karşılanması için tarımsal üretimde hem verimin hem de kalitenin yükseltilmesi gerekmektedir. Bu açıdan tarım ürünlerine ortak çıkan ve ürünlerin büyük kayıplarına neden olan tarım zararlılarıyla mücadelede, son elli yılda kimyasal mücadele kesin bir çözüm olarak kullanılmaktadır.

İnsektisitlerin bilinçsiz kullanımının dezavantajlarından bazıları, insanlar için kanserojen etki yapması, mutajen ve teratojen olması, ağır hastalıklara yol açması, bitki ve hayvan türlerini yok etmesi ve yer altı sularına karışarak çevre kirlenmesi ve hedef alınmayan diğer organizmaları etkilemesi gibi sorunlar sayılabilir (Topuz 2005).

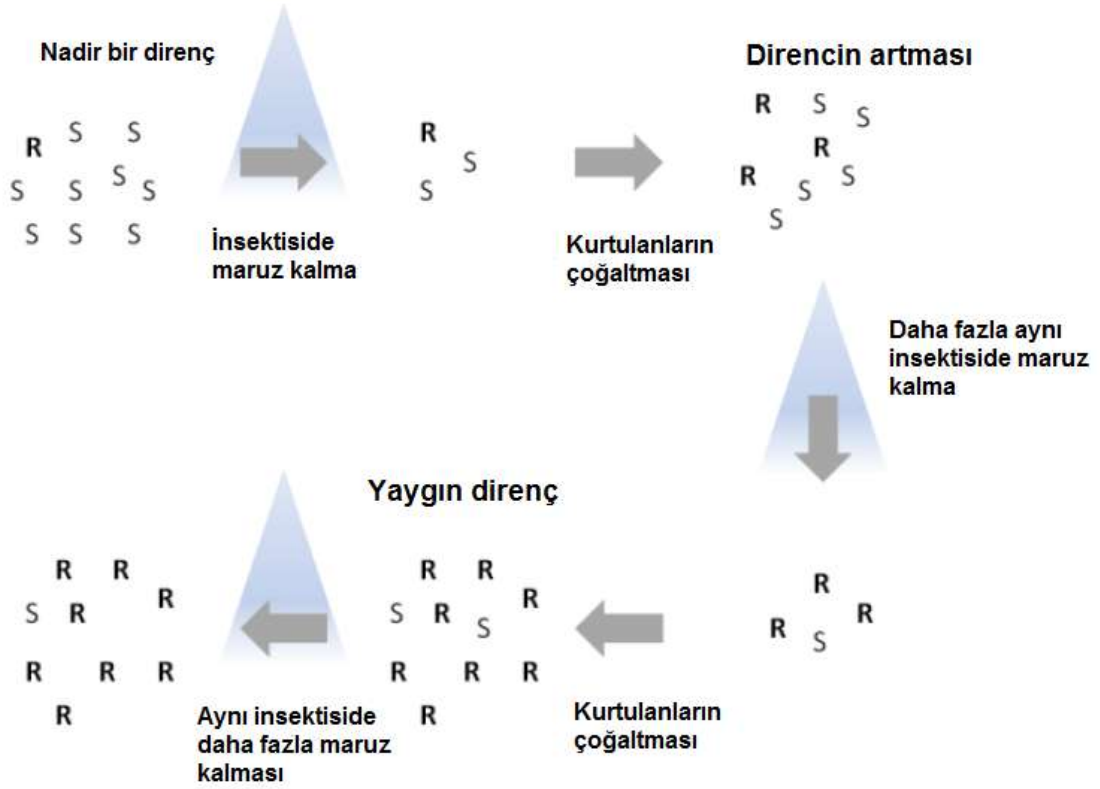
1.2.1 Pamuk yaprak kurdu *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae)

Spodoptera littoralis (Boisd) polifag bir zararlıdır (Brown vd. 1975). *S. littoralis* ekonomik açıdan önem taşıyan 87 konukçuya sahiptir (Salama vd. 1970). *S. littoralis* tropikal ve subtropikal bölgelerde lepidopterler arasında tarım ürünlerine zarar verme açısından en önemlilerinden biridir. Tüm yıl boyunca ekonomik açıdan önemli olan birçok bitki üzerinde ciddi hasarlar yapabilmektedir. Pamukta yapraklarda, tohumlarda, çiçek tomurcuklarında ve bazen kozalarda ciddi zarar yapabilir. Yer fıstığına bulaşma olduğunda, larvalar beslenmek için öncelikle bitkinin genç yapraklarını seçmektedir. Ancak, yoğun popülasyonlarda, her büyüklükteki yaprağı besin olarak tüketebilmektedirler. Bazen toprakta olgunlaşmaya yeni başlamış tohumlara dahi yiyebilmektedir. Domates bitkisinde, larvalar meyve içine delik açarak girer ve böylece tüketim için uygun olmayan meyve haline gelir. Özellikle larvalar daha birçok bitkinin yaprakları ile beslenir (Anonymous 2013c).

1.3 Direnç ve Tipleri

Pestisitler kullanılarak yapılan kimyasal mücadele yönteminin avantajların yanında, bitkisel ürünlerde kalıntı bırakmaları, hedef organizmalarda pestisite karşı dayanıklılık oluşması, istenmeyen organizmaları da hedef alması, çevre ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilerinin bulunması bu mücadele yönteminin dezavantajları arasında yer almaktadır. Pestisit direnci, bir zararlıya karşı bir pestisidin çok tekrarlı olarak kullanılmasıyla ortaya çıkan ve aynı doz daha önce etkiliyken, daha sonra etkisini göstermeyerek duyarlılıktaki azalma ile açıklanabilir. Pestisit direncinin gelişmesi, zararlı popülasyonunda, canlı kalan bireyler (doğal seleksiyon) ile ifade edebilir. Diğer bir deyişle, pestisit direncinin gelişmesiyle zararlının hayatta kalması ve bu özelliğin genetik olarak nesilden nesile geçmesidir (Anonymous 2013d).

Belirli pestisitlerin çok tekrarlı olarak kullanılması, zararlı organizmalarda seleksiyon baskısı sonucunda dirençli popülasyonların oluşmasına neden olmaktadır (Şekil 1.5). Genellikle kısa yaşam döngülü ve yıllık döl sayıları fazla olan zararlı türlerde çok kısa sürede direnç gelişmesi olasılığı yüksektir. Dirençli popülasyonlar tarım üreticilerinin daha sık aralıklarla ve daha yüksek dozda ilaçlama yapmalarına neden olmaktadır. Bu davranış direnç probleminin artışına neden olurken, çevre kirliliğine de neden olmaktadır. Aynı zamanda yoğun ve fazla pestisit kullanımı, kısa sürede ekosistemdeki doğal baskı unsurlarına zarar vermekte ve bunun sonucu olarak o güne kadar bazı zararlı popülasyonları ekonomik oranda zarar oluşturmazken bazı zararlı popülasyonların artışına yol açabilmektedir (Yıldız vd. 2000).



Şekil 1.5 Direnç gelişimini etkileyen ana faktörler (Anonymous 2013e)

Pestisit üreten firmalar, ürünlerindeki başarısızlıkları saha (tarla) direnci olarak adlandırmayı daha çok tercih etmektedirler. Örnek olarak, İnsektisit Direnç Çalışma Komitesi (IRAC), insektisit direncini, bir zararlı popülasyonunda, kalıtsal duyarlılık

değişmesi olarak adlandırmaktadır. Bir zararlı tür için etiketin üzerinde yazan kullanım miktarı uygulandığında, zararlı popülasyonu ekonomik zarar eşiğine ulaştığında tekrar yapılan ilaçlamanın başarısız olduğu görülmektedir. Arthropodların ve özellikle böceklerin insektisitlere karşı direnç ile ilgili ilk bilimsel rapor, San Jose kabuklubiti'ye karşı sıklıkça kullanılmakta olan kükürt-kireç karışımından eskisi kadar etkili olmadığının bildirilmektedir (Melander 1914).

1914 ile 1946 yılları arasında, organik madde olmayan insektisitlere karşı toplam 11 dirençli tür daha kaydedilmiştir. DDT gibi organik insektisitler, insektisit direnci sorununa kesin çözüm olarak umut olmuştur. Ancak ne yazık ki, karasinek üzerinde 1947 yılına kadar DDT ile yapılan çalışmalar sonucunda bu sineğin DDT'ye karşı duyarsızlık kazandığı saptanmıştır. Her yeni çıkan insektisit sınıfının (cyclodienler, karbamatlar, formamidinler, organik fosforlu, piretroitler) 20 yıl içinde çeşitli organizmalar üzerinde direnç oluşturduğu ortaya çıkmıştır (Anonymous 2013f).

Kimyasal savaşta pestisitlerin ve özellikle insektisitlerin yoğun, gereksiz ve bilinçsiz kullanımı, doğal dengenin bozulması, çevre kirlenmesi ve birçok böcek ve akarların hızlı bir şekilde direnç kazanmasının sorumlusudur (Stumpf ve Nauen 2001). Bir popülasyonda, duyarlı olan böcekler, insektisitler tarafından ortadan kalkılır ve dirençli böceklerin oranı artmaya başlar. Nitekim dirençli böceklerin sayısı, hassas bireylere göre artar ve insektisit artık etkisiz hale gelir (Giray 1977). İnsektisitlere karşı görülen direncin gelişmesi; biyolojik, genetik ve işlevsel faktörler gibi üç ana gruba ayrılabilir. Üreme hızı, biyolojik göç, yılda verilen döl sayısı ve her dölde oluşturan birey sayısı gibi faktörler, biyolojik faktör olarak sayılabilir. Genetik faktörler, direnç genlerinin frekansı ve baskınlığı, dirençli bireylerin başarısı, farklı direnç alellerinin başarısı şeklinde ifade edilebilir. İşlevsel faktörlerde ise insanlar tarafından insektisitlerin uygulanması ve ilacın etken maddesi sayılabilir (Koçak 1998).

1.3.1 Davranışsal direnç

Bazı böceklerin, toksinin varlığının farkına varması ve ondan kaçmasıdır. Bu direnç

mekanizması çeşitli insektisitlere karşı tespit edilmiştir (Organoklorinler, Organofosfatlar, Karbamatlar ve Piretroitler). Böyle durumlarda böceklerde beslenmenin durması veya böceğin ilaçlanan bölgeden kaçması gibi hareketler görülmektedir (Anonymous 2012).

Bir böceğin hayatta kalma şansını artırması için kaçınma gibi davranışları direnç olarak tanımlanabilir. Örneğin, yumurtlamak için, *Plutella xylostella* (L.) erginleri pestisitlere karşı davranış değişikliklerinden biri, kaçınma davranışı olarak gözlenmiştir. *P. xylostella*'nin, yumurtalarını bırakmak için insektiside maruz bırakılan bitkiler üzerinde bir seçim yapması gerektiğinde dişilerin yumurtalarını sap ve yapraklar yerine bitkinin toprağa yakın bölgelerine bırakmayı tercih ettikleri görülmüştür (Sarfraz vd. 2005).

1.3.2 Morfolojik direnç

Dayanıklı böcekler, toksin maddesini hassas böceklere göre daha yavaş bünyelerine almaktadır. Örneğin derileri sık kıllı olan böceklerde ilaç böceğin vücudun temas edemez ve duyarsızlık ortaya çıkar. Bu dirençte, en dışta olan kütikül tabakası gelişmekte ve böylece kimyasal maddelerin geçirmesini yavaşlatmaktadır (Ay ve Sökeli 2005).

1.3.3 Metabolik direnç

Dayanıklı böceklerde toksini vücutta yok etme hızı daha yüksek olmakta ve böcek bu şekilde toksin moleküllerinden kurtulabilmektedir. Metabolik direnç, en yaygın ve en çok meydana gelen duyarsızlığın nedeni olmaktadır. Kalıtsaldır ve böcekler insektisitleri parçalamak için enzimatik sistemlerini kullanarak, bazen geniş spektrumlu aktiviteye sahip olup, çeşitli ilaçlardan kurtulabilmektedirler (çapraz direnç) (Anonymous 2013g). Bazen böcekte toksin maddenin bağlandığı bölge, insektisitlerin etkisini düşürme amacıyla değişip başkalaşıyorsa hedef yeri değiştirilmiş direnç söz konusu demektir. Bu mekanizma, direnç mekanizmaları arasında ikinci sırada önem taşımaktadır (Anonymous 2013g).

1.3.4 Çapraz direnç

Çoğu durumda, etkili dozun artması ile ilgili direnç sadece özel bir seçici ilaç grubuna karşı oluşmamaktadır. Aynı zamanda diğer ilgili kimyasal bileşiklere karşı, çapraz direncin sebebi de olabilmektedir. Belirli bir kimyasal (ilaç) grubu olan bileşikler, genellikle zararlı içinde ortak bir hedef bölgeyi hedef alan ve böylece ortak bir etki mekanizmasını paylaşabilmektedir. Genetik değişiklikte hedef yerinde böyle bir direnç gelişmesi çok yaygındır. Bu durumda, hedef yeri ile selektif ilacın etkileşimi zayıflamakta ve bileşik, pestisit etkinliğini kaybetmektedir. Kimyasal alt gruptaki ortak bir etki mekanizmaya sahip olan tüm bileşiklerinden ortaya çıkan dirençler, aynı alt gruptakinden olan tüm bileşiklere karşı çapraz direnç risk olasılığını da yükseltmektedir (Anonymous 2013h).

Duyarsızlık, doğrudan ilaç ile etkileşimde olan hedef molekül(ler)de bir değişiklik olması durumunda hedef yeri duyarsız hale gelip, böcekte hedef olan toksik maddenin etkisini kaybetmesi demektir. Bu da genetiğe bağlı olan kalıtsal bir yeteneği olarak, nesilden nesile geçebilmektedir (Pittendrigh vd. 2008).

1.4 İnsektisitlerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırmaları

IRAK (Insecticide Resistance Action Committee) tarafından sınıflandırılmış olan insektisit grupları:

- **Sinir ve kas hedefleri**

Günümüzde çoğu insektisitler sinir ve kaslar üzerinde etkilidir (piretroitler). Bu insektisidler genelde hızlı etki gösterir.

- **Asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleri**

Karbamatlar ve organofosfatlar gibi bazı insektisitler, AChE'yi engellemek (inhibe etmek) durumunda, aşırı uyarımı yol açmaktadır. AChE sinapslarda sinir uyarıcı nörotransmitter asetilkolin faaliyetini sonlandıran enzimdir.

- **GABA (Gamma-Aminobütirik Asit) klorid kanal kapıları antagonistleri**

GABA-aktivesi klorür kanalı bloke ettiği takdirde, aşırı uyarılma ve kısılmalar neden olmaktadır. GABA böceklerde en önemli önleyici nörotransmitterdir (örneğin

cyclodiene ve organoklorlar).

- **Sodyum kanalı modölatörleri**

Sodyum kanallarının açık tutulmasını aşırı uyarıya neden olup ve bazı durumlarda, sinir bloğu ortaya çıkmaktadır. Sodyum kanalları sinir aksonları boyunca aksiyon potansiyellerinin yayılması rol oynamaktadır (piretroitler, piretrinler ve DDT).

- **Nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR) agonistleri**

nAChR'lerde asetilkolin agonist eylemini taklit ederek aşırı uyarıya neden olmaktadır. Asetilkolin böceğin merkezi sinir sisteminde ana uyarıcı nörotransmitterdir (neonicotinoidler).

- **Nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR) allosterik modölatörleri**

nAChR'lerin allosterik aktive göstermesi sinir sisteminin aşırı uyarımına neden olabilmektedir (Spinisinler).

- **Klorür kanalı aktivatörleri**

Aktivitesi değiştirilmiş glutamat-kapılı klorid kanalları (GluCl) felce neden olabilmektedir. Glutamat böceklerde önemli bir nörotransmitter önleyicisidir (avermektinler, milbemisiner).

- **Seçici Hemiptera besleme inhibitörü**

Eksik tanımlanan MoA, yaprak biti ve beyazsineklerde besleme seçici inhibisyonuna neden olmaktadır (pimetrozin, flonikamid).

- **Nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR) kanal inhibitörü**

nAChR iyon kanalı bloke olması, sinir sisteminin bloke olmasına ve felce neden olmaktadır (Nereistoksin analogları).

- **Oktopamin reseptörü agonistleri**

Oktopamine reseptörlerin aktive edilmesinde aşırı uyarılmaya yol açmaktadır. Oktupamin böceğin adrenal hormonuna eşdeğer olarak, kavga ya da uçuş nörohormonudur (amitraz).

- **Gerilime bağlı sodyum kanalı inhibitörü**

Sodyum kanallarının bloke edilmesi, felce neden olmaktadır. Sodyum kanalları sinir aksonları boyunca aksiyon potansiyellerinin yayılmasını sağlar (indoxacarb, metaflumizone).

- **Riyanodin reseptör modölatörleri**

Kas riyanodin reseptörlerinin aktive olması ile kasılma ve felç görülebilmektedir.

Riyanodin reseptörleri, kalsiyumun hücre içi depolarından, sitoplazmaya salgılanmasını sağlamaktadır (Diamidler).

Böcek gelişimi, iki temel hormon olan juvenil hormon ve ekdison hormonu dengesi tarafından kontrol edilir. Böcek büyüme düzenleyicileri, bu hormonların birisini taklit etmektedir veya doğrudan kütikül oluşumu / çökmesini ya da lipid biyosentezini bozmaktadırlar. Bu sistemle tek hedef üzerinde etkili insektisitler, yavaş etki göstermektedir.

- **Jüvenil hormonu taklit edenler**

Başkalaşım döneminde uygulanan bu bileşikler, başkalaşımı bozmakta veya önlemektedir (Juvenil hormon analogları, Fenoxycarb, Pyriproxyfen).

- **Akar büyümesi inhibitörleri**

Etki şekli (MoA) akar büyümesini önlemektedir (Clofentezine, Hexythiazox, Diflovidazin).

- **Kitin biyosentezi önleyicileri**

Kısaca tanımlanan MoA, kitin biyosentezini engellemektedir (Benzoylureas).

- **Deri değiştirmesini bozan önleyiciler**

Kısaca tanımlanan MoA, deri değiştirme mekanizmasını bozmaktadır (Buprofezin).

- **Ekdison reseptörü agonistleri**

Deri değiştirme hormonunu (ekdison) taklit ederek, erken gelişmeye neden olmaktadır (Diacylhydrazines).

- **Asetil CoA karboksilaz önleyicileri**

Lipid biyosentezinin birinci aşamasının bir parçası olan asetil koenzim A, karboksilaz'ı inhibe ederek böceğin ölümüne neden olmaktadır (Tetronic).

- **Solunum Sistemi Hedefler**

Mitokondriyal solunum sonucu, tüm önemli hücresel işlemlerinde kullanılan enerji molekülü (ATP) üretilmektedir. Mitokondride, elektron taşıma zinciri, ATP sentezinde kullanılan, oksidasyon yolu ile yayımlanan enerjiyi, proton molekülü şeklinde depolamaktadır. İsektisitlerin çoğu mitokondriyal solunum üzerinde, elektron taşıma ve / veya oksidatif fosforilasyon inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu sistemle bireysel hedefler üzerinde etkili olan insektisitler genellikle hızlı ile orta hızlı arası etki yapmaktadır.

- **Mitokondrial ATP sentezlenme inhibitörleri**

ATP'yi sentezleyen enzimi inhibe etmektedir (Diafenthiuron, Tetradifon).

- **Proton gradyanının bozulması ile eşleşmeyen oksidatif fosforilasyon**

Protonoforler mitokondriyal proton gradyanını kısa devreye sokarak ATP sentezini önlemektedir (Chlorfenapyr, DNOC, Sulfluramid).

- **Mitokondriyal kompleksi elektron transportu inhibitörleri**

Elektron taşıma kompleksini inhibe ederek hücreler tarafından enerjinin kullanılmasını önlemektedir (Rotenone).

- **Ortabağırsak Hedefler**

Lepidopterlere spesifik olarak geliştirilen çeşitli transgenik mahsullerde bulunan veya püskürtülmüş mikrobiyal toksinlerdir.

- **Böceğin karın zarının mikrobiyal bozucuları**

Orta bağırsak zarı üzerindeki reseptörlere bağlanan ve bu bölgede gözenek oluşturarak iyonik dengesizlik ve kan zehirlenmesi (septicemia) ortaya çıkaran toksik bir proteindir (*B.t.*) (Anonymous 2013i).

1.5 Direncin Saptanması

Duyarlılıklarla ilişkili karboksilesteraz (CarE), sitokrom P450 monooksijenaz (P450), asetilkolinesteraz (AchE) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri değerlendirilmektedir. Ayrıca, her bir ilacın bir sublethal ayırıcı dozu (~LD50) ile sinerjist maddeler olan S,S,S-tributilfosforotrithioate (DEF), piperonil butoksit (PBO) ve dietil maleyat (DEM) ile karıştırılarak muhtemel fizyolojik tolerans mekanizmaları test edilmektedir (Hepözlı ve Kumral 2012). S,S,S-tributilfosforotrithioate (DEF) esteraz enzimlerinin inhibitörü; piperonil butoksit (PBO), sitokrom P-450 monooksijenaz inhibitörü ve dietil maleyat (DEM) ise glutatyon S-transferaz enziminin inhibitörü olarak tanımlanmaktadır (Van Leeuwen v.d. 2004). Böylece insektisitler bu sinerjistler ile birlikte kullanıldığında her sinerjist farklı bir detoksifikasyon enzim grubunu inhibe etmektedir ve bu şekilde hangi enzim veya enzimlerin dirençte etkili oldukları ortaya çıkmaktadır.

Direnç saptama analizleri genelde şu şekilde de değerlendirilmektedir:

1.5.1 Geleneksel biyoanalizler

Teşhis doz deneyleri ve log-doz probit (LDP) deneyleri, tespit, izleme ve direnç saptanmasında en sık kullanılan iki yöntemlerdir (Tsagkarakou vd., 2009).

1.5.2 Biyokimyasal analizler

Zararlı türlerde pestisit direncini belirlenmesi bazı biyokimyasal yöntemler ile yapılabilmektedir. Bu yöntemler ile farklı substratlar kullanarak, çeşitli enzimlerin miktarları ölçmektedir. Örneğin *Myzus persicae* (Suzler)'de α -naftil asetatı hidrolize eden esteraaz aktivitesi ile ilişkisidir. Nitekim karbamatlılara ve organofosfatlılara karşı görülen dirençlerde, karboksilesteraazın artan aktivitesi, α -naftil asetat'ı hidrolize ederek direnç oluşmaktadır. Böylelikle pestisitlerin hedefe ulaşmadan önce bu enzimin tarafından tutulmakta ve - sinirsel hedef AChE enzimi normal biyolojik fonksiyonuna devam etmektedir (Devonshire 1975).

1.5.3 Moleküler analizler

Moleküler analizler, özellikle dayanıklı allel (allel) mutasyonları veya dayanıklı alleller ile bağlantılı olan DNA fragmanları ile değerlendirilmektedir.

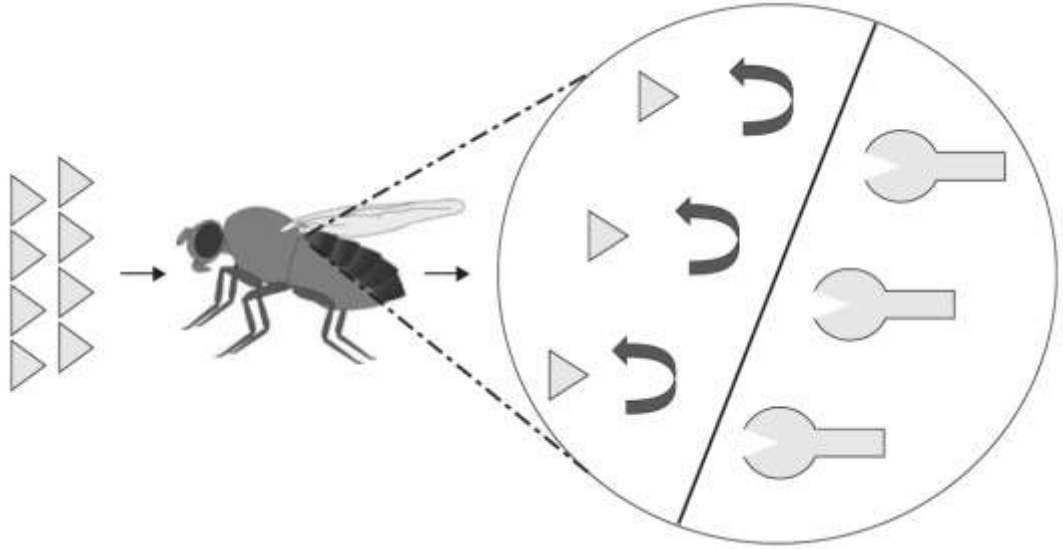
1.5.4 Bağışıklık testleri

Bağışıklık testleri (Immunoassayler), genellikle böceklerde, önemli bir biyokimyasal moleküle karşı, insektisit direnci kazandıran, antikorlarla dayanmaktadır (Kranthi 2005).

Bu tez kapsamında, çok geniş konukçu dizinine sahip olan zararlılardan biri olan *Spodoptera littoralis* (Boisduval,1833)'in çeşitli pestisitlere mağruz bırakıldığında bu pestisitlere karşı direnç gelişip gelişmediği ve bunun yanı sıra detoksifikasyon düzenlerindeki değişimler incelenmiştir.

1.6 Detoksifikasyon

Böcekler yaşam döngüleri boyunca insanlar tarafından yapay olarak üretilen pestisitler (organik fosforlar, karbamatlılar, piretroitler vb.) veya bitkiler tarafından doğal olarak üretilen allelokimyasallar gibi toksinlere (xenobiotik) maruz kalmaktadırlar. Sitokrom P-450 monooksijenaz, GST ve hidrolaz gibi bazı enzimler, insektisitlerin böcek vücuduna girmesi durumunda bu kimyasalların zehirliliğinin giderilmesini sağlamaktadırlar (Tsagkarakou vd. 2009), (Şekil 1.6 - 1.7).

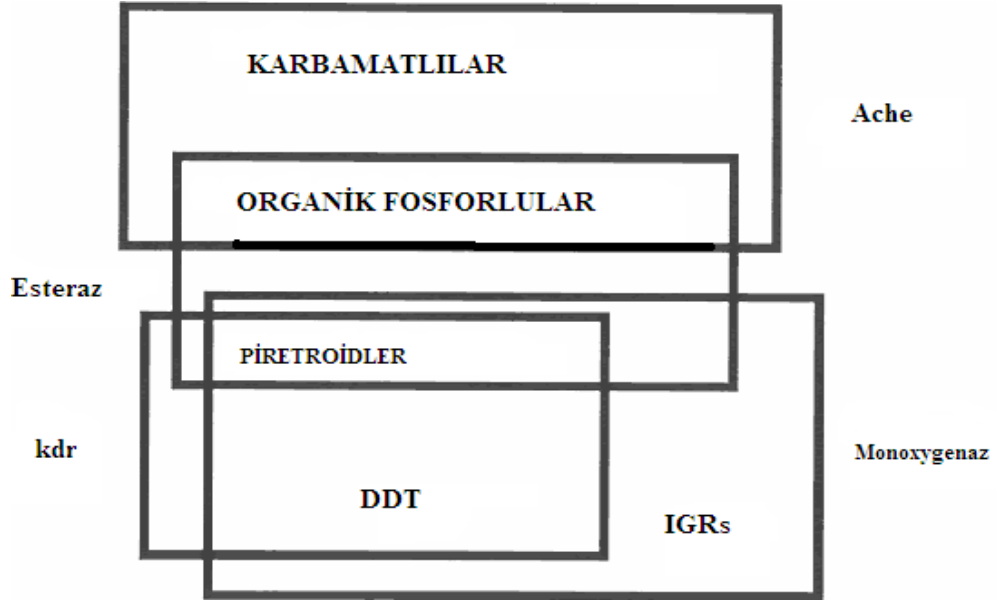


Şekil 1.6 Detoksifikasyonun genel biyokimyasal mekanizması (Pittendrigh vd. 2014)

Faz I oksidasyon, hidroliz ve indirgenme aşamalarını içermektedir. Faz I reaksiyonunda apolar yapıdaki zehirli moleküller bazı fonksiyonel grupların eklenmesi ile zehirliliği daha az olan ara maddelere dönüştürülmektedir. Bu fonksiyonel gruplar 2 kısma ayrılmaktadır:

a) Elektrofilik maddeler: Epoksidaz fonksiyonları ve α , β karbonil grupları elektrofilik karbonlu yapılardır. Bazı insektisitler böcek vücuduna girdikten sonra elektrofilik fonksiyonel gruplar sayesinde aktif olmayan maddelere dönüştürülmektedir.

b) Nükleofilik maddeler: Alkolik ya da fenolik hidroksil grupları, amino ve karboksil grupları nükleofilik maddelerdir. Nükleofilik maddeler sayesinde apolar yapıdaki insektisitler daha az zehirliliğe sahip maddelere dönüşmektedirler (Soderlund 1997).



Şekil 1.7 İsektisit kimyasal sınıflarının detoksifikasyonuna etkili fizyolojik mekanizmalar (Yorulmaz ve Ay 2010)

Pestisit direnci önemli bir konu olmasının ötesinde, böceklerin dış iskelet ve sindirim sistemleri ile zararlı bileşiklerinin (ilaçların) nüfuzu azaltmanın moleküler mekanizmaları ve uzlaşma yeteneğinin anlaması gibi yeni stratejiler geliştirmekte ve yeni fırsatlar sağlayabilmektedir. Örneğin, böceklerin peritrofik matriksi (PM, peritrofik membran); proteinler, glikoaminoglikanlar ve kitinden oluşan karmaşık bir sindirim sistemi dokusudur. Peritrofik matriks sadece bakteri, virüs ve zararlı mekaniksel materyallere karşıda bir bariyer olarak bir yapı değildir. Aynı zamanda, özel dokusu ile kontrollü bir enzimatik fonksiyona sahip olan, alınan gıdaların emiliminde ve zararlı maddelere karşı bozunma görevi yapmaktadır (Lehane 1997).

Ayrırma (sekestrasyon): Enzimler veya proteinler, böceğin vücuduna giren toksin maddelere bağlanarak bu molekülleri hedef yerleri olmayan, yağ dokularına veya hemolimf gibi farklı organellerde depolanmasını sağlamaktadırlar (Pittendrigh vd. 2014).

Böceklerin bazı türlerinde, çeşitli bitkilerde bulunan birçok zehirli maddelerini ayırma (sekestrasyon) yeteneği bulunmaktadır. Bunun için bazı böcekler, bu özel bitkilerden beslenen ve alınan zehirli maddeleri vücudunda başka maddelere dönüştürerek, doğal düşmanlara karşı korunma yeteneği bulunmaktadır. *Danaus plexippus* (Danainae; Lepidoptera) ile zehirli ipek otu bitkisi (*Asclepias spp.*) (milkweed plants) ilişkisi, iyi bir örnek olabilmektedir. İpek otu bitkileri zararlı kardenolit (kardiyak glikozitler) moleküller üretmektedir. İpek otu bitkisi ile beslenen *Danaus plexippus* larvaları, bu molekülleri sindirebilmekte ve sonucunda, böcek tatsız ve lezzetsiz hale gelmektedir. Bu durumda, bitkilerden beslenen (herbivore) bir böcek, aynı zamanda hem bir zehiri parçalama yeteneğini hem de avlanmaya karşı savunma mekanizmalarını geliştirmektedir (Nishida 2002).

Birçok dayanıklı böceklerde, insektisitlerin atılımında, esteraz enzimleri önemli rol oynamaktadır. Esteraz-esaslı direnç iki tipe ayrılabilir: (i) esterazların miktarı yüksek seviyede olan dirençli bir böcekte insektisitlere hızlı bağlama yolu ile sekestrasyona uğrayarak parçalanıp, geniş spektrumlu bir direnç ortaya çıkmakta ve (ii) insektisit ve esteraz arasında ortak bir ester bağı oluşturarak, toksin maddeleri metabolize etmekte, daha az toksik etkiye sahip olan bir maddeye dönüşmekte ve dar spektrumlu bir direnç oluşturmaktadır. Genelde, bu ikinci tip direnç, nokta mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır (Pittendrigh vd. 2014).

1.6.1 Detokifikasyon enzimleri

Bugüne kadar direnç üzerinde çalışmaların çoğu sitokrom P450, GST veya esterazlar üzerine metabolik dirençte rol oynayan faktörlere odaklanmıştır.

1.6.1.1 Sitokrom P450 monooksijenaz

Sitokrom P450'ler bakteriler, bitkiler, mantarlar, böcekler ve memeliler de dahil olmak üzere pek çok organizmalarda bulunan bir enzimlerin sınıfıdır. Sitokrom P450 monooksijenazların süper familyasından olan, organik maddelerin oksidasyonu katalize eden büyük ve çeşitli bir enzim grubudur. P450'ler, N-, O- ve S-alkil, hidroksilasyon, aromatik hidroksilasyon, alifatik hidroksilasyon ve ekspoksidasyon, esteri oksidasyon,

tiöeter ve azot oksidasyon yolları ile pestisitleri metabolize etmektedir (Pittendrigh vd. 2014).

1.6.1.2 GST (Glutasyon S-Transferaz)

Dirençte etkili olduğu düşünölen diğer bir enzim grubu da GST'lerdir. Glutathion-S-transferazlar (GST) bütün metazoanlar ve bitkilerde bulunan bir izoenzim ailesidir ve temel detoksifikasyon sistemlerinden birisidir. Böceklerde bu enzim ailesi insektisitlerin toksik etkilerine karşı temel bir savunma olarak bilinmektedir. Örneğin *Musca domestica*'da organikfosfatlı (OP) insektisitlerine karşı dirençli mutantlarının GST'nin yüksek seviyelerine sahip olduğu bulunmuştur (Sun vd. 2001).

GST'ler hücrede pestisitler, kanserojen ve uyuşturucular gibi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda çeşitli biyolojik rollere sahip olan bir enzim familyasıdır. Tüm ökaryotik türlerde sitosolik ve membran GST'leri bulunmaktadır. Bazı durumlarda, belirli GST enzimlerinin ifade seviyeleri doğrudan organizmanın toksik kimyasallara karşı tolerans göstermesi ile ilgilidir (Hayes ve Pulford 1995). GST'ler organikfosfatlılar, organoklorlar, DDT ve piretroitlere karşı direnç oluşturulmasında önemli rol oynamaktadır (Rossiter vd. 2001).

1.6.1.3 Esterazlar

Esteraz enzimleri; feromon ve hormon metabolizması, sindirim sistemi ve sinir iletimi, üreme davranışı ve insektisitlere karşı direnç oluşması gibi birçok mekanizmada rol oynamaktadır. Organofosfatlar, esterazların inhibitörleri olarak bilinmektedir. Esteraz enzimlerinin, asetil esterazlar, aril esterazlar, karboksil esterazlar ve kolin esterazlar olmak üzere 4 sınıfı vardır. Bunlardan asetil esteraz enzimleri hiçbir inhibitörle etkileşmezler ve genellikle alifatik substratları tercih ederler. Aril esterazlar, yalnızca sülfidril ayraçlarınca inhibe edilir ve genellikle aromatik substratları tercih ederler. Karboksil esterazlar, yalnız organofosfatlarca inhibe edilirler. Genellikle asetik asitten daha uzun alifatik esterleri tercih ederler. Kolin esterazlar, organofosfatlarca ve eserin sülfatlarca inhibe edilirler ve diğer alifatik ve aromatik esterler dışında kolinesterleri tercih ederler. Bu esteraz gruplarından karboksil ve kolin esterazlar organofosfat

inhibisyonunda önemlidir. Karboksil/kolin esterazlar, aynı zamanda α/β hidrolazların da üyeleridir ve α/β ünitelerinde organize olmuş β tabakasından köken almışlardır. Karboksil/kolin esteraz enzimleri organofosfat insektisitlerince tersinmez olarak inhibe edilir. Organofosfatlı insektisitlerin aktive olmuş oxon formları bu enzimlerle tepkime gösterirler. Bu nedenle organofosfatlı insektisitler esteraz inhibitörleri olarak tanımlanmaktadır (Oakeshott vd. 1993).

Bir esteraz, örneğin, asetilkolinesteraz (AChE), pestisitlere ester bağları ile bağlanan ve bir asit ve bir alkol oluşacak şekilde molekülü parçalayan bir hidrolazdır. Substrat özgünlüğü, protein yapısı ve biyolojik fonksiyonu farklı olan birçok esteraz çeşidi bulunmaktadır. Esterazlar, organik fosforlu, karbamatlar ve piretroitlere karşı, böceklerin direnci ile ilişkilidir (Li vd. 2007).

İnsekta sınıfında, hatta *Drosophila melanogaster* ve *Anofel gambiae* gibi nispeten yakın ilişkili olan türler arasında, Sitokrom P450 ve GST arasında önemli evrimsel dizi (sekans) farklılığı bulunmaktadır (Ranson vd. 2002).

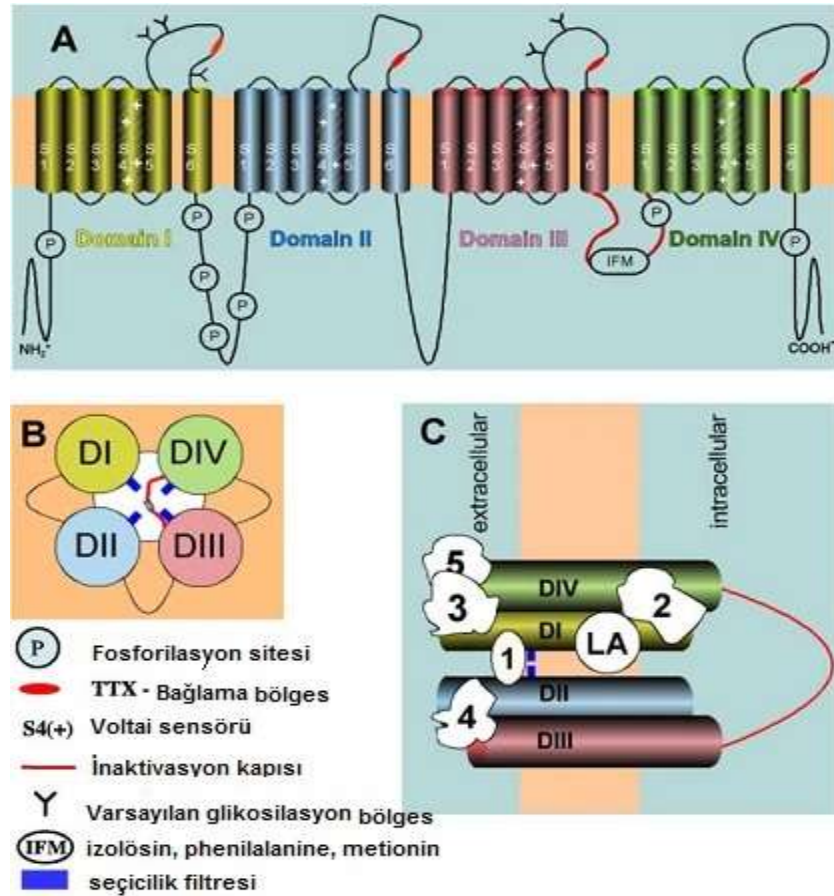
Metabolik pestisit direnci üzerine bugüne kadar birçok moleküler araştırma yapılmış olup bu çalışmalar daha çok P450, GST ve esteraz enzimine odaklanmış olsa da diğer genlerde pestisit direnci için kritik ve önemlidir. Örneğin, DDT' ye maruz kalan deniz mikroorganizmalarda, böceklerde (örneği *D. melanogaster*) ve memeliler gibi çeşitli organizmalarda, bu enzimlerin değişikliği, ortaya çıkmış ve metabolik direnç ile ilişkileri saptanmıştır (Pittendrigh vd. 2008).

1.7 Sentetik Piretroitlere Karşı Görülen Direnç

Piretroit grubuna ait olan insektisitler, birinci nesil piretroitler (permetrin, pyrethrinler vb.) ve ikinci nesil piretroitler (cypermetrin, deltametrin vb.) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Birinci nesil piretroitler gurubundan olan insektisitler, ikinci gurubuna göre memelilere daha az zehirlidir ancak hava ve ışığa karşı daha az dayanıklı olmaktadır (Metcalf 2002, Soderlund vd. 2002).

Tip I piretroidler, DDT' ye benzer biçimde insektisidal etki oluşturmaktadır. Tip II

piretroidler ise ısı ile orantılı olarak öldürücü ve sinirsel iletimi engelleyici yönde etki yapmaktadır (Çakır ve Yamanel 2005). Voltaj kapılı sodyum kanalı (Şekil 1.8) hedef yeri olan piretroitlere karşı duyarsızlık birçok böcekte görülmüştür. Piretroitler için önemli bir hedef yeri, voltaja duyarlı sodyum kanalının (VSSC) α -altbirimi olduğu düşünülmektedir. Piretroitlerin, VSSC kanalının uzun süreli açık kalmasına sebep olduğu düşünülmektedir. VSSC'deki aminoasit değişikliğinin piretroit direncinde etkili olduğu çeşitli böcek türlerinde gösterilmiştir (Pittendrigh vd. 2008). Örneğin, voltaj-kapılı sodyum kanalının 1014 pozisyonunda bir lösin-fenilalanin değişiminin *Anopheles gambiae*'de dahil olmak üzere pek çok böcek türünde, piretroit ve DDT direnci ile ilişki olduğu ortaya çıkmıştır. Başka araştırmalarda ise *Heliothis virescens* türünde lösin-histidinin aminoasit değişikliğinin piretroitlere karşı ve *Culex pipens* türünde leucine-serinein aminoasit değişikliğinin ise DDT'ye karşı olan direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ranson vd. 2000).



Şekil 1.8 Voltaj kapalı sodyum kanalı (Denac vd. 2000)

Şekil 1.8’de voltaj kapılı sodyum kanalı (VGSC) gösterilmektedir. A: 4 homolog alan (domain)’dan oluşan VGSC’nin α -subünitesidir (DI-DIV). Her birisi 6 transmembran segmentten oluşmaktadır; B: Kanal gözenek etrafında α -alt biriminin DI-DIV alanların transmembran düzeni; C: VGSC ligand bağlanma yerleri (1-5) (Denac vd. 2000).

Örneğin, yapılan bir araştırmada, Gamma-cyhalothrin insektisidi sentetik piretroit olarak uygulanmıştır. Bu ilaç sistemik olmayan, temas ve/veya ilacın yenmesi yolu ile etkili olmaktadır. Gamma-Cyhalothrin insektisidi sodyum kanal modülatörüdür ve sinir fonksiyonlarını bozmaktadır (Anonymous 2014b). Başka bir çalışmada Peng vd. (2009), lambda-cyhalothrin ile *S. litura* popülasyonu 30 kere selekte ederek dirençli bireyler elde etmişlerdir. Biyokimyasal analizlerin sonuçları, dirençli bireylerde, esterazlar, glutatyon S-transferaz ve mikrozomal esteras enzimlerin aktiviteleri, hassas bireylere göre daha yüksek seviyede olduğu rapor edilmiştir (Peng vd. 2009).

1.8 İmidakloprid’e Karşı Görülen Direnç

İmidakloprid; neonicotinoid insektisit sınıfının (chloronicotiny) bir üyesi olan ve bilinen bir nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR) agonistidir. Asetilkolin (Ach) endojen bir agonist, aynı zamanda kolinerjik sinir sistemi uyarıcı olarak bir nörotransmitter olarak tanımlanmaktadır (Pittendrigh vd. 2008). Ancak diğer araştırmalarda farklı nedenlerden dolayı İmidakloprid’e karşı oluşan direnç nedenleri ortaya çıkmıştır. Örnek olarak, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) üzerinde bu ilacın direnç nedeni araştırılmış ve artan sitokrom P450 monooksijenaz aktivitesinin önemli bir direnç mekanizması olduğu belirlenmiştir (Puinean vd. 2010). Başka bir çalışmada *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) üzerinde imidakloprid insektidi 16 jenerasyondan sonra direnç oluşmuştur. Bu dirençte rol oynayan detoksifikasyon enzimleri ölçüldüğünde AChE enzimi hassas popülasyona göre anlamlı şekilde daha yüksek çıkmıştır (Ky vd. 2002).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Abdallah vd. (1979), *Spodoptera littoralis* üzerinde farklı aktivite ve hedef bölgeye sahip olan DDT ve Du-Ter (bir besleme önleyici) olmak üzere iki farklı ilaç uygulanmıştır. Sadece DDT'ye maruz kalanlarda 17. nesilden sonra 43 kat ve DDT+Du-Ter uygulanan seleksiyonda ise direnç oranı 11,5 kata kadar arttığı görülmüştür.

Ditirich vd. (1979), *S. littoralis* üzerinde monokrotofos ve profenofos gibi iki farklı etki mekanizmasına sahip olan organofosfat insektisiti farklı tarla ve laboratuvar böcekleri (dirençli ve hassas) üzerinde incelenmiştir. Monokrotofos ilacı sinergistler ile dirençli ve hassas popülasyonlar üzerinde direncin nedeni ortaya çıkartması amacıyla uygulanmıştır. Oksidatif metabolizmadan kaynaklanmayan nedenini ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, asetilkolinesterazın organofosfatlar'la etkileşime girmesi, direnç faktörü olarak kabul edilmiştir.

Klein vd. (1982), İsrail'de yaptıkları bir araştırmaya göre, *S. littoralis*'in yumurta, larva ve erginlerine clorpyrifos, metomil, profenofos, metyl paration ve etyl paration olmak üzere beş farklı insektisitle bioassay denemeleri kurmuşlardır. İkinci larva döneminde olanlar için hassas popülasyonun LD₉₀ değerleri; 8,5 – 35 – 280 - 1300 ve 3400 g a.i./1000 m²deyken 5. nesilden sonra clorpyrifos, metomil, metyl paration ve profenofos'da sırasıyla 16, 32, 1700 ve 6100 g a.i./1000 m² ye varmıştır. Sonuçlara göre clorpyrifos ve metomil hemen hemen eski dozlar henüz etkili oldukları ortaya çıkmıştır. Yumurta üzerinde uygulanan azinfos-metylin eski dozu tamamen etkisini kaybetmiştir.

Delorme vd. (1988), Fransa'da toksikolojik ve direnç araştırmalarında, *S. exigua* üzerinde piretroit insektisidi olan Deltametrin uygulayarak, tarladan toplan dirençli suşunu, laboratuvarında bulunan ırkı ile karşılaştırmıştır. LC₄₀ seviyelerine göre 100 kat daha dirençli olduğunu bulmuşlardır. Direnç mekanizmaları, morfolojik direnci olarak gecikmeli penetrasyon ve metabolik direnci olarak ester bağlantısı, deltametrin'in parçalanmasında asıl rol oynadığı bulunmuştur. Böylelikle deltametrin'in parçalanması dirençli ırkta, hassas ırkının oranına göre 17 kat daha fazladır. Bu çalışmada DEF ve paraoxon iki esteraz inhibitörü, sinerjist olarak kullanılarak, metabolizmanın asıl faktörü

olarak artan esteraz aktiviteye sahip olduğunu bulunmuştur ve deltamethrin'in hidroliz yönünde aktiviteleri ile ilgili olması olduğunu belirtmiştir.

Riskallah (1983), Mısır'da dirençli ve hassas *S. littoralis* popülasyonlarında sentetik piretroitlere karşı esteraz enzimleri araştırılmıştır. α -naftil asetat (α -NA), β -naftil asetat (β -NA) ve ρ -naftil asetat(ρ -NA) substratlarına karşı aktivitelerini ölçerek, DEF sinerjisti de bu substratların inhibitörü olarak kullanmıştır. Direnç arttıkça bu sinerjistin esterazların tümünü inhibe ettiğini ama en fazla ρ -NA'yı inhibe ettiğini bulmuştur.

Ramakrishnan vd. (1984), tarla araştırmalarında, *S. litura* üzerinde yıllarca uygulanmış olan organofosfat (malathion), organoklorin (lindane) ve piretroid (pyrethrin) üç farklı ilacı, 1961 ve 1971 yıllarında etkili dozlarına göre kıyas edilip incelenmişlerdir. Sırasıyla; 5,73 - 14,73 - 16,25 ve 85,91 kat daha dirençli böcekler ortaya çıkmalarını rapor etmişlerdir.

Ishaa Ya ve Klein (1990), Teflubenzuron bir kitin sentezleme inhibitörü, bir gösterge olarak, tarlada uygulanan organofosfatlar ve piretroitler'e karşı laboratuardaki hassas popülasyona göre oluşmuş direncini bioassay denemelerle incelenerek, clorpyrifos ve cypermethrin gibi iki farklı gruptan olan insektisitlere karşı direnci tespit etmişlerdir. Sırasıyla 120 ve 102 kat LC₅₀ miktarında artış bulunmuştur. Aynı anda Teflubenzuron'a karşı da hafif bir direnç (5kat) ortaya çıkmıştır. Bu bioassaylerin sonucunda; S,S,S-tributylphosphorotrithioate (DEF), esteraz inhibitörü olarak test edilip, direnç kazanmış böceklerde, Teflubenzuron ile beraber uygulandığında, dirençli bireylerin tekrar hassas hale döndüğünü rapor etmişlerdir.

Lagadic vd. (1993), imidacloprid ve cyfluthrin insektisitleri, *Heliopsis virescens* ve *Spodoptera littoralis* iki farklı böcek üzerinde topikal aplikasyon ve ağız yolu (oral) olmak üzere iki farklı uygulama yöntemi ile hassas popülasyon (laboratuarda yetiştirilmiş popülasyon) üzerinde uygulamışlardır. İmidakloprid, topikal aplikasyon yöntemi ile uygulandığında, 48 saat sonra *Heliopsis virescens* ve *Spodoptera littoralis* LD₅₀ değeri, sırasıyla 7,7 ve 36,7 $\mu\text{g larva}^{-1}$ ve oral yöntemini kullanım şeklinde ise, *H. virescens* ve *S. littoralis* 4. dönem larvaları, LC₅₀ değerleri sırasıyla 821,0 ve 17,7 $\mu\text{g (g food)}^{-1}$ göstermektedir. Sonuçta, imidakloprid, cyfluthrin ilacına göre iki böcek

üzerinde her iki farklı uygulama şelinde de, daha az etkili olduğunu belirtmişlerdir. Ancak imidakloprid oral şekliyle iki böcekte daha hızlı etkisini göstermektedir. Aynı zamanda da yemeye karıştırıldığında, imidakloprid cyfluthrin'e göre caydırıcı besleme etkisinin pek olmadığı ortaya çıkmıştır.

Lagadic vd. (1993), *S. littoralis* hassas ve dirençli olan bireyelerine lindane insektisidin sub-lethal dozunu topikal aplikasyon yöntemi ile uygulanmış ve canlı kalan bireyelerin sitosolik GST enzimin aktivitesi hem CDNB hem de DCNB substratlar kullanarak ölçülmüştür. GST aktivitesi CDNB substratı kullanıldığında GST aktivitesi dirençli bireyelerde ikikat daha yüksek çıkarken, CDNB substratı ile yapılan denemesinde anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Bu araştırmada, elde ettikleri enzimleri % 50-70 oranında saflaştırarak CDNB ve azaltılmış glutatyon (GSH) maddeyi kullanarak karakterize etmişlerdir. Elde edilen K_m ve V_{max} değerlerinin hassas ve dirençli bireyeler arasında belilgin bir farklılık gösterilmişlerdir. Sonuçlara göre, lindane uygulamasının hassas bireyelerdeki gutatyon S-transferaz'ın CDNB ve GSH'a karşı K_m değerini etkilendiğini rapor etmişlerdir.

Gunning vd. (1995), *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)'nın üzerinde, esfenvalerate metabolizmasını bir sentetik piretroidi olarak, piretroitlere dayanıklı ve hassas olan böceklerde *in vivo* ve *in vitro* metodlarla araştırmışlardır. İki metodun sonucu, çok düşük esfenvalerate metabolizmasını kanıtlanmıştır. Dirençli bireyelerde ise, dışkı ve iç kesirler birkaç işaretlenmiş ve işaretlenmemiş metabolitleri izleriyle esfenvalerate metabolizmasını sadece biraz artması ve piperonyl butoxide (PBO) bu metabolizmanın inhibe etmemesini belirtmişler. Ancak dirençli böceklerde, esfenvalerate penetrasyonu kolaylaştırır ve muhtemelen, mevcut iç dozu artarak ilacın etkisini yükseltmektedir. Bu şekilde dirençli ırkta, esfenvalerate azaltılmış penetrasyonu, önemli bir direnç mekanizması olduğu ortaya çıkartmışlardır.

Gunning vd. (1996), *Helicoverpa armigera*'da esfenvalerate'ye karşı esterazları direnç mekanizmasında önemli bir faktörü olup olmadığını araştırmışlardır. Dirençli bireyelerde esteraz aktivitesi hassas bireyelere göre yaklaşık 50 kat daha fazla çıkmıştır. Aynı zamanda dirençli popülasyonda, hassas bireyelerde bulunmayan ek esteraz bağlantılar tespit edilmiştir. Artan esteraz, 1-naftil asetat hidrolizi ve esfenvalerate'ye karşı direnç

faktörü olarak saptanmıştır. Esterazlar bu çalışmada, kolayca esfenvalerate kimyasal maddesine bağlanmasını ve ardından dirençli bireylerin homojenatlarında hidrolize olmuş esfenvalerate bulunmuştur ve bunun detoksifikasyon ve insektisidin hacizinde anlamlı bir nedeni olarak saptanmışlardır.

Nauen vd. (1996), imidakloprid, nikotine ve kartap insektisitlere acetylcholine reseptörleri olarak ve pirimikarb ve oxydemeton-methyl, acetylcholinesterase (AChE) üzerinde etkili olanları seçip afitlere uygulanmışlar. Hassas ve dirençli böceklerde imidakloprid için bioassayler kurmuşlar ve sonuçta 4-7 kat direnç artışı saptanmıştır. Poliakrilamid jel elektroforez analizinde, esterase FE4 karboksilesteraz'ın en önemli faktörü olup bu insektisidin uygulanmasının ardından miktar ve aktivitesi yüksek seviyede çıktığı görülmüştür.

Charalambous ve Lordanou (1997), *Spodoptera littoralis* zararlıya karşı uygulanan genelleksel insektisitlere karşı tepkileri ve gelişen direncini araştırmışlar. Bu amaçla 6 pyrethroid (decamethrin, cypermethin, esfenvalerate, fenpropathrin, cyfluthrin, and permethin), 2 Carbamate (carbaryl and methomyl), iki organophosphate (chlorpyrifos ve methamidophos) ve bir organochlorine (D.D.T.) üçüncü dönem larvalar üzerinde kullanmışlar. İlaçlar 1µL topikal aplikasyon (Hamilton) yolu ile bioassay denemelerde öldürücü dozu (LD₅₀) belirtmesi için laboratuarda yetiştirilen hassas popülasyonu ve patates tarlalarından toplanan dirençli bireyler üzerinde uygulanmışlar. Direnç seviyeleri dekametrim (6083 kat), sipermethrin (407 kat) Esfenvalerat (313 kat) ve carbaril (367 kat) için, çok yüksek; Fenpropatrin (213 kat), DDT (150 kat) ve metamidofos (217 kat) için direnç seviyesi ve cyfluthrin (45 kat), permetrin (40 kat) düşük direnç; metomil (14 kat) ve chlorpyrifos (6 kat) için ise düşük direnç oranı, diğer direnç oranlara göre bulunmuştur. Bu biyoanalizlerin sonuçları, *S. littoralis* birden fazla (multiple) direnç gelişmesini ortaya çıkarttı. Bu direnç, karışık işlevler yapan oksidazlar, hidrolazlar ve hedef bölgede (kdr) faktörü azaltılmış duyarlılık gibi önemli faktörler, böceklerde direncin gelişmesinde sorumlu oldukları belirtmişler. Dirençli bireylerde pyrethroitlere karşı yüksek seviye direnç ve DDT' ye karşı çapraz direnç gösterilmesinin nedeni piretroit direnç faktörü olarak kdr tipi direnç varlığını göstermiştir.

Yongyun vd. (1998), *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) ya tarla uygulamalarında farklı gruplardan olan insektisitleri devamlı olarak uygulanmış ve direnç arttırılmıştır. Bu çalışmada piretroitler (cypermethrin, deltamethrin, ethofenprox, ethofenprox+PAP ve fenvalerate), organofosfatlar insektisiler (clorpyrifos, clorpyrifos-methyl ve EPN) ve karbamatlar (carbaryl ve methomyl) incelenmiştir. Buna göre bioassaylerde LD₅₀ değerleri sırasıyla 100 - 2,700 kat piretroitlerde, 2 - 32 kat organofosfatlarda ve 4 - 80 kat karbamatlarda, normal popülasyonun LD₅₀ değerlerine göre direnç belirlenmiştir. Tarla popülasyonlarında detoksifikasyon enzim deneylerine göre, esteraz ve glutatyon S-transferaz aktiviteleri 2 ile 6 kat daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda, geniş spektrumlu insektisitlere karşı oluşmuş direnç mekanizmalarının nedeni, artmış detoksifikasyon enzimlerin miktarları ve duyarlı asetilkolinesteraz olduğu ispatlanmıştır.

Lorini vd. (2000), *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) Ekin Kambur Biti zararlısı PBO ve DEF sinerjistlerin hassas ve deltamethrin insektisidi ile 5 generasyon selekte olup ve bu ilaca karşı direnç kazanan popülasyonlarda etkilerini araştırmışlar. Bu çalışmada Deltamethrin ve sinerjistler emdirilmiş filtre kağıdı yöntemi uygulanmıştır. Her iki sinerjistler deltamethrin'in detoksifiyesinde rol alan enzimlerin bloke etmeleri ortaya çıkmıştır. PBO dirençli bireylerde hassas bireylere göre 27 kat daha öldürücü olduğunu belirtmişler. DEF daha az etkili olmuş olup ilacın etkisini 5 kata kadar yükseltmiştir.

Ky vd. (2002), *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) zararlıının sentetik piretroitlere karşı oluşan direnci 16 kere seleksiyona ve neonikotinoidlere karşı 12 seleksiyona maruz kaldıktan sonra biyokimyasal analizlerle incelenmişler. Bu çalışmada fenvalerate ve imidaklopid insektisitler kullanılmıştır. Elde edilen dirençli ırklar hassas popülasyon ile karşılaştırarak fenvalerate'ye karşı direnç oranı >29,000-kat ve imidaklopid'e karşı direnç oranı 8,1 kat bulunmuştur. Enzimatik analiz sonuçları ise AChE ve α -naftil asetat esteraz enzimlerin miktarları anlamlı miktarda ($p<0,05$) yüksek çıkmıştır.

Ahmad vd. (2007), *S. litura* tarla popülasyonlarının (G1 jenerasyonunda) deltamethrin, cypermethrin, profenofos, chlorpyrifos ve triazonofos ilaçlarına karşı LC50 değerlerini

tespit edip hassas popülasyonun değerleri ile karşılaştırmışlardır. Bunun sonucunda sırasıyla 9, 5, 41, 52 ve 49 oranlarını tespit etmişlerdir. Popülasyonun bir kısmını deltamethrin ile selekte ettikten sonra G4 jenerasyonunun deltamethrine karşı gösterdiği LC50 değerlerini hassas ve selekte edilmeyen popülasyonların LC50 değerlerine oranladıklarında 63 ve 7 oranlarını elde etmişlerdir. Sinerjistlerle yaptıkları denemelerde ise deltamethrin direncinin mikrozomal oksidaz ve muhtemelen esteraz enzimleri ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Selekte edilen popülasyon ile hassas popülasyon arasında gerçekleştirilen resiprokal çaprazlamalar, deltamethrin direncinin otozomal ve eksik baskın özellik gösteren ve birden fazla lokus tarafından kontrol edilen bir özellik olduğunu tespit etmişlerdir.

Hadim (2008), çeşitli gruplardan olan insektisitleri, *S. littoralis* (Boisd.)'e karşı seleksiyon baskısı ile oluşan duyarsızlığı, biyokimyasal ve moleküler yöntemler ile bir doktora tezi kapsamında araştırmıştır. Bu çalışmada organik fosforlu (chlorpyrifos), karbamatlı (carbamate) ve sentetik piretroitli (deltamethrin) insektisitlere karşı ilaç tepkileri denenmiştir. Dirençli popülasyonun oluşturması için, İsrail'den getirilen popülasyonu, insektisitler ile 6 jenerasyona kadar seleksiyon yapılmıştır. LC50 değerlere göre karbamat insektiside karşı en yüksek duyarsızlığı ve clorpyrifos'e karşı en düşük direnç oluşumu rapor etmiştir. Aynı zamanda ise biyokimyasal analizler sonucunda artan direnç oranıyla doğru orantılı olarak karboksilesteraz, sitokrom P450 monooksijenaz ve glutatyon S-transferaz enzim aktivitelerinin de arttığını rapor etmiştir.

Ahmad (2009), insektisit sinerjisi etkileri, profenofos, methomyl, thiodicarb, cypermethrin, λ -cyhalothrin, bifenthrin, indoxacarb ve spinosad 4 farklı ilaçla piperonyl butoxide (PBO) ve tribufos (DEF) sinerjistlerle birlikte Pakistan'da *S.litura* üzerinde yaprak daldırma Biyoassay yöntemi ile araştırmıştır. Sonuçta bu iki inhibitörler methomyl (karbamatlar) ve thiodicarb'ı etkilemiş ancak organofosfat (profenofos) üzerinde etkisiz olmuştur. Bu inhibitörler sinerjisi oranı, cypermethrin ile kullandığında artmıştır ama bifenthrin'e etkilenmemiştir. PBO ve DEF, λ -cyhalothrin ve indoxacarb ile uygulandığında toksik etkisini (toxicity) artmışlar. Spinosad DEF ile sinerjist olup ancak PBO etkisizdir.

Farnsworth vd. (2010), heliothin ve spodopteran zararlılarda esteraz esaslı metabolik direncini incelenmesinde, *Heliothis* ve *Spodoptera* cinslerin çeşitli türlerine organofosfaslar, piretroitler ve karbamatlara karşı oluşan direncinde enzimatik ve moleküler yöntemlerle yapmışlardır. Esterazların aktivitesi ve özellikle karboksilesteraz aktivitesi bu üç gruba karşı oluşmuş dirençlerde yüksek seviyede oldukları kaydedilmiştir. *S. littoralis*'in ırkları organofosfaslar, piretroitler ve karbamatlara karşı oluşan dirençli popülasyonlarda DEF sinerjisti ile araştırılmış çalışmalarda esteraz aktivitesi *in vitro*'da yüksek seviyede olduğu ortaya çıkmıştır.

Ghoneim vd. (2012), *S. littoralis*'in piretroitler, organofosfatlar, karbamatlar ve gelişim düzenleyicilere (growth regulators) maruz kalan ve bu insektisitlere karşı oluşan dirençli tarla popülasyonları, laboratuvar popülasyonları ile karşılaştırılarak, biyoassay yöntemler ile yumurta ve 4. Dönem larvalarda, LC₅₀ değerini hesaplanarak incelenmişler. Sonuçta hem yumurtada hem de 4. dönem larvadan elde edilen LC₅₀ değerleri, hassas popülasyona göre daha dirençli olduğunu bulunmuştur. Örnek olarak es-fenvalerate bir sentetik piretroide karşı oluşan dirençte, LC₅₀ değerlerine göre dirençli larvalarda hassas popülasyona göre 168,1 kat daha dirençli olduğu bulmuşlar.

Shad vd. (2012), zirai alanlarda hava şartlarına göre 8 farklı bölgeden *S. litura* zararlıları toplanmış ve laboratuvardaki hassas popülasyonla karşılaştırarak, karbamatlar, Organofosfatlar ve piretroidlere karşı direnç oluşumu araştırmışlar. Toplanmış tüm popülasyonlar, hassas popülasyona göre bu üç insektiside karşı direnç göstermektedir. Piretroitlere karşı en az gösterilen direnç bifentrin'e ve en büyük direnç oranı esfenvalerat'a karşı görülmüştür.

Tong vd. (2013), Çin'de ülkenin 5 farklı eyaletinden toplanan *S. litura*, organofosfatlar, piretroitler, karbamatlar ve 4 yeni kimyasal insektisite yaprak daldırma yöntemi ile maruz kalan popülasyonları, direnç oluşması amacıyla denenmiştir. Organofosfatlar ve piretroitler için dirençli popülasyonlarda hassas popülasyona göre elde edilen direnç oranı (RR) sırasıyla 229 kat ve 227 kat olmuştur. Karbamatlara karşı oluşan direnç organofosfatlar ve piretroitlerde anlamlı olarak daha çok direnç oranını göstermişler (1,069 kat).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Adana'dan toplanmış ve 2008 yılından itibaren laboratuvar koşullarında (Nem: % 65 ± 5 ve sıcaklık: 27°C ± 2) yetiştirilmekte olan Pamuk yaprak kurdu *Spodoptera littoralis* (Boisd.), popülasyonu bu çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur.

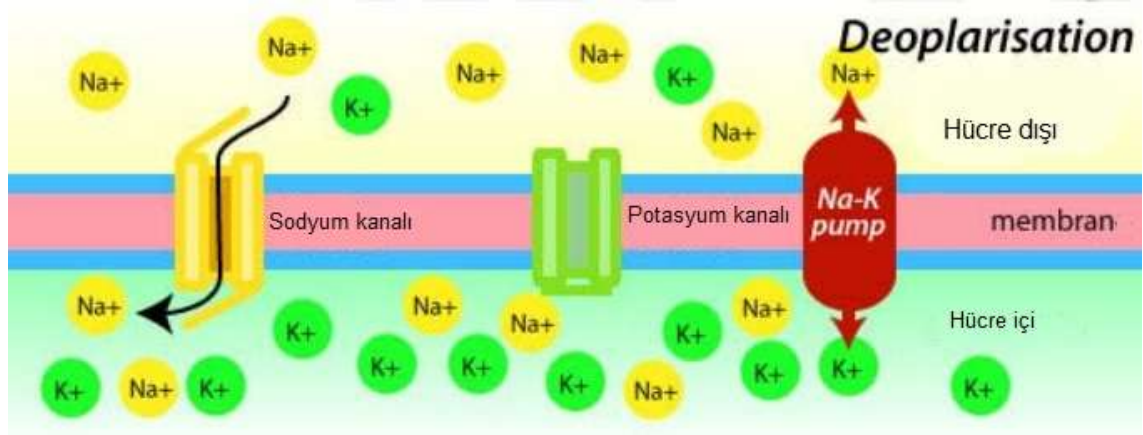
Spodoptera littoralis insecta sınıfı, Lepidoptera takımı, Noctuidae familyasına ait olan bir zararlıdır. *Spodoptera litura* ile allopatrik bir türdür. Bazı yazarlar tarafından aynı şekilde ele alınmasına rağmen farklı türlerdir. *Spodoptera littoralis* ergini, gri-kahverenginde, ön kanatları 30-38 mm uzunluğunda ve karışık şekilde sarı renkli çizgilerle süslü görünümündedir. Yumurtaları 0,6 mm çapında yuvarlak, açık turuncu-kahverengi veya beyaz-sarı renktedir. Yumurtadan yeni çıkan larva 1-1,5 mm uzunluğunda olup yeşil renklidir. Olgun larva 4-5 cm boyunda, gri-kahve veya siyahımtırak renkli olabilir. Pupaları 15-20 mm uzunluğunda, oval parlak kırmızı-kahverengi görünümündedir (Anonim 2014i).

Biyoassay çalışmalarında, sentetik piretroitli pestisit olarak gamma-cyhalothrin etken maddeli VANTEX (60 CS, 60 g/l), ve neonikotenoidli pestisit olarak imidakloprid etken maddeli Confidor (350 SC) olmak üzere iki farklı pestisit kullanılmıştır.

Gamma-Cyhalothrin, kimyasal adı (S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-[(Z)-2-chloro- ,3,3-trifluoropropenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate veya (S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1R)-cis-3-[(Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoropropenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (C₂₃H₁₉ClF₃NO₃, MA; 449.9 g/mol) olan piretroit bir ester insektisittir. Suda çözünürlüğü: 2.1 × 10⁻⁶ mg/l (20 °C)sulu süspansiyonu ve kontakt bir insektisittir (Anonymous 2014b ve Anonymous 2014c).

Her sinirsel iletişimde sodyum kanalları da önemli rol oynamaktadır. Hücre zarının iç tarafı kuvvetli negatif yüklü olduğu zaman (istirahat halindeki hücre) sodyum kanalının dışında bulunan kapı sıkıca kapanır (Şekil 3.1). Gamma-cyhalothrin sodyum kanalı bir

modülatörü olarak sinir hücrelerindeki sodyum kapıları açık tutuyor ve böylece böceklere karşı etki ederek böceği felçe ve ölüme götürmektedir (Anonymous 2014d).



Şekil 3.1 Sinir hücresinde bulunan sodyum ve potasyum iyon kanalları (Anonymous 2014d)

İmidakloprid temas veya ağızdan yeme yolu ile etkilidir. Bu ilaç sistemik bir insektisit olarak, bitki üzerine uygulandıktan sonra hızla dokulara nüfuz etmektedir. İmidakloprid sinir sisteminde post-sinaptik nikotinik asetilkolin reseptörleri üzerinde çeşitli etkiler yapmaktadır. Böceklerde bu reseptörler sadece merkezi sinir sisteminin içinde yer almaktadır. Nikotinik reseptöre bağlanmanın ardından, önce sinir uyarıları kendi kendine deşarj olur, ardından herhangi bir sinyal yolunda nöron yetmezliği ortaya çıkar. Reseptörün sürekli aktivasyonu, asetilkolinesteraz pestisidi bozmadığından dolayı ortaya çıkmaktadır. Bu bağlanma geri dönüşümsüz bir bağlanmadır (Anonymous 2014e).

Biyoassay çalışmalarında, her bir kuyucuğu 5 cm x 3 cm ebatlarında 16 kuyucuklu plastik deneme kapları, 10, 100 ve 1000 μL 'lik mikropipetler, 10, 100, 1000 mL'lik pipetler, 50 ve 100 mL'lik cam şişeler, 25, 50, 100, 1000 mL'lik dereceli silindirler, 9 cm çaplı plastik petri kapları, parafilm, yumuşak uçlu pens, sinerjistik çalışmalarda PBO (piperonil butoksit), DEM (diethyl maleate) ve DEF (S,S,S-tributilfosforotrithioate), dişi ve erkek pupaları seçmek için stereomikroskop ve çeker ocak kullanılmıştır. Kimyasal olarak da pestisitlerden başka aseton (Merck) ve triton X-100 (Sigma) kullanılmıştır. Biyokimyasal çalışmalarda ise, mikrosantrifüj tüpü,

homojenizatör makinesi, tek ve çok kanallı mikropipetler, steril kapalı tüpler (50ml ve 10ml), soğutmalı santrifüj, filtre kağıdı (Whatman 1 nolu), manyetik karıştırıcı, 96 kuyulu ve düz tabanlı mikrolaklar, vortex, -80 °C'lük derin dondurucu, VERSAmax Kinetik Microplate Reader (Kinetik mikrolaka okuyucu) (Molecular Devices), hassas terazi (Sartorius) ve Hamilton enjektörü kullanılmıştır.

Kimyasal malzeme olarak, α -naphtil asetat, fast blue RR, tris-base, trishidroklorik asit (HCl), Glutathione (GSH), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 1,2- dichloro-4-nitrobenzene (DCNB), 5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid) (DTNB), potasyumklorür (KCl), etilendiamin tetraasetikasit (EDTA), p-nitroanisole (PNOD), sükröz, triton X-100, glisin, riboflavin, n-butanol, Bradford Reagent, sodyum dihidrojenfosfat dihidrat (NaH₂.PO₄.2H₂O), disodyum hidrojen ortofosfat (Na₂HPO₂.12H₂O), potasyum dihidrojenfosfat dihidrat (KH₂PO₄.2H₂O) ve asetik asit kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

Bu çalışma kapsamında LC₅₀, LC₇₅ ve LC₉₀ değerlerinin belirlendiği biyoassay çalışmaları, seleksiyon çalışmaları, sinerjistik çalışmalar, dirençle ilişkili olan 3 enzim grubuna ait biyokimyasal çalışmalar yapılmıştır.

3.2.1 *Spodoptera littoralis* popülasyonları

Çalışmalarda, Adana'dan toplanmış ve 2008 yılından itibaren Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Entomoloji Anabilimdalı laboratuvarlarında yetiştirilmekte olan bireyler kullanılmıştır. Bütün popülasyonlardan toplanan örnekler, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere biyokimyasal çalışmalar için -80 °C'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

Spodoptera littoralis popülasyonları, 27±2 °C sıcaklık, % 65 ± 5 orantılı nem ve 16:8 saat aydınlık: karanlık koşullarında 3. dönem larva oluncaya kadar kapaklarının orta bölümü yuvarlak şekilde kesilerek yerine metal tül yapıştırılmış petri kapları içinde yetiştirilmiştir. 3. dönem larvalar şeffaf plastik küçük yuvarlak silindir şeklinde olan ve kapakları orta kısımları aynı şekilde kesilmiş ve tül yapıştırılmış kaplar (30ml'lik

kaplar) içinde 3'er tane olacak şekilde yetiştirilmiştir (Şekil 3.2). Larvaların beslenmesi için yapay besin kullanılmıştır (EK 1). Erginlerin beslenmesi için de ergin besini kullanılmıştır (EK 2). Böceklere günlük bakım uygulanmıştır. Boşalmış kutular bir sonraki kullanımda herhangi bir enfeksiyon olasılığını en aza indirmek için çamaşır suyu ile yıkanarak durulanmıştır.



Şekil 3.2 *Spodoptera littoralis* popülasyonları yetiştirme kapları

3.2.2 Biyoassay ve seleksiyon çalışmaları

Biyoassay çalışmalarında, herhangi bir ilaç veya kimyasal baskısına maruz bırakılmadan yetiştirilmekte olan böcek popülasyonu kullanılmıştır. Bu popülasyonun gamma-cyhalothrin ve imidakloprid insektisitlerine karşı tepkileri, LC₅₀, LC₇₅ ve LC₉₀ değerleri PoloPlus® bilgisayar programıyla hesaplanarak belirlenmiştir. Biyoassay çalışmalarında, 3. dönem larvalar, 1'i kontrol olmak üzere en az 5 farklı ilaç konsantrasyonunda ve en az 3 tekrarlı olarak popülasyonun LC₅₀ ve LC₇₅ değerleri hesaplanmıştır. Bunun için öncelikle ilaç konsantrasyonları ve marul yaprağından diskler (9cm çapında) kesilerek hazırlanmıştır. Denemeye başlamadan önce kullanılacak sayıda 3. dönem larva seçilerek petri kaplarına alınmış ve 2 saat aç bırakılmıştır. Her bir yaprak diski, farklı ilaç konsantrasyonlarına yaklaşık 10 sn daldırılmış ve sonra kurutma kâğıtları üzerinde (Şekil 3.4), çeker ocak altında kurumaya bırakılmıştır. Deneme kaplarının (plastik petri kapları; 9cm) altına marul yaprağının nemini fazla kaybetmesini

önlemek için kurutma kağıdı konulmuş (Şekil 3.3) ve distile su ile ıslatılmıştır. Plastik kabın üst tarafına hava almayı sağlayacak küçük delikler açılmış ve kapların üzerine dozlar ve tekrar sayıları yazılarak kaplar hazırlanmıştır. Kurutulmuş yaprak diskleri, deneme kaplarının içine yerleştirilerek her birinin üzerine 12 adet 3. dönem larva bırakılmış ve kutuların kapakları kapatılarak böcek yetiştirme odalarında tutulmuştur. Her bir doz için ilaçlamadan 24 ve 48 saat sonra ölü birey sayıları belirlenerek istatistiksel analizler yapılmıştır. Biyoassay çalışmalarında her bir doz için 3 tekrar ve her tekrarda en az 12 birey olmak üzere toplam 36 birey kullanılmıştır. Solusyonları hazırlarken % 1,6 Triton X-100 kullanılmıştır.



Şekil 3.3 Deneme kapların hazırlaması



Şekil 3.4 İlaçlı yaprak disklerin kurutması

3.2.3 Sinerjistik çalışmalar

Bu aşamada, kullanılan insektisitlere karşı elde edilen direncin, ilgili enzimlerin insektisitleri detoksifiye etmesi sonucu olup olmadığı incelenmiştir. Bunun için karboksilesteraz grubu enzimleri inhibe eden S,S,S-tributilfosforotritioat (DEF), Sitokrom P450 monooksijenazve karboksilesteraz enzimlerini inhibe eden piperonyl butoxide (PBO); glutation-S-transferaz (GST) enzimini inhibe eden diethyl maleate (DEM) aseton içinde çözündürülerek (1000 µg/mL) solüsyon hazırlanmıştır (Van Leeuwen vd. 2004).

Dirençli ve hassas popülasyonlardan üçüncü dönem larvaların protoraks bölgelerinin üzerine hazırlanmış sinerjistler Hamilton enjektör yardımıyla 1 µL olacak şekilde konulmuştur. Kontrol gurubunda ise sadece aseton kullanılmıştır. Bu işlemden 2 saat sonra larvalar, belirli dozlarla ilaçlanmış yapraklar üzerinde, biyoassay denemesi gibi petri kapların içinde bırakılıp, 24 ve 48 saat sonra ölüm sayılar, istatistiksel analizler ve LC₅₀ analizleri için sayılmıştır.

3.2.4 Biyokimyasal çalışmalar

Biyokimyasal çalışmalarda böceklerde insektisitlere karşı dirençte önemli rolleri olan asetilkolinesteraz enzimi ile detoksifikasyon enzimleri olan karboksilesteraz ve glutatyon S-transferaz enzimlerinin biyokimyasal aktiviteleri incelenmiştir. Popülasyonlar, bu enzimlerin biyokimyasal aktivitelerindeki farklılıklar bakımından da değerlendirilmiştir.

3.2.4.1 Protein miktarının ölçümü

Her seleksiyonda popülasyonun son larva döneminde olan bireyler toplanmıştır ve -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. Bu larvalar, biyokimyasal analizler ile enzim kinetiklerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Enzim kinetiği sonuçlarını standardize etmek ve bireysel farklılıkları ortadan kaldırmak için hazırlanan homojenatlarda öncelikle protein miktarı ölçülmüştür. Protein miktarı Bradford (1976)'un orijinal

prosedürüne uygun olarak ve standart protein olarak bovine serum albumin (BSA) kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için 1 mg/mL oranında BSA'lı tampon hazırlanarak mikrolakanın ilk kolon ilk sırasına 0'dan başlayıp 2'şer μL aralıklarla artırarak kolon boyunca her kuyucuğa BSA konulmuştur (son satırdaki kuyucukta 14 μL konulmuştur). Homojenatlardan 1'er μL alınarak mikrolakadaki kuyucuklara uygun sıralarda eklenmiştir. Bütün kuyucukların üzerine toplam hacim 250 μL olacak şekilde Bradford çözeltisi konulmuştur. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 10 dakika beklenmiştir. Mikrolaka okuyucuya (VERSAmax) yerleştirilmiştir (Şekil 3.5). Mikrolaka okuyucu 25 °C'de 620 nm dalga boyunda tek okuma (end point) yapacak şekilde programlanmış ve okuma yapılmıştır. Protein miktarı, ölçüm sonucu elde edilen konsantrasyonlar ve standart eğriye göre değerlendirilerek mg olarak hesaplanmıştır (Bradford 1976, Hadim 2008, Anonymous 2014k). Sonuçlar SOFTmax 4.8 yazılım programı ile değerlendirilerek kaydedilmiştir.



Şekil 3.5 Biyoassaylerde kullanılan Spectrophotometer (VERSAmax Kinetik Mikroplaka okuyucu)

3.2.4.2 Toplam karboksilesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi

-80 °C'de saklanmış son dönem *S. littoralis* larvalarının her biri bir cam tüp içine alınmıştır. Üzerlerine 1500'er µL, 0,1 M sodyum fosfat tamponu (15,179 g Na₂HPO₄.12H₂O + 1,014 g NaH₂PO₄.2H₂O + 500 mL distile su, pH 7,6) ilave edilerek homojenizatör aracılığıyla iyice ezilmiştir. Solübilizasyon için 15 dakika beklenmiştir. Homojenat 14000 rpm'de, 4 °C'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra ependorfların üst kısmında kalan sıvı (süpernatant) enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Mikroplakanın kuyucuklarına süpernatanttan 50'şer µL konulmuştur. Her bir kuyucuğun üzerine 200 µL substrat solüsyonu eklenmiştir. Substrat solüsyonu hazırlamak için; 50 mL (0,2 M, pH 6,0) fosfat tampon (31,158 g Na₂HPO₄.12H₂O + 2,028 g NaH₂PO₄.2H₂O + 500 mL distile su) üzerine 30 mg Fast Blue RR tuzu eklenmiştir. İyice çalkalandıktan sonra filtre kağıdı (Whatman 1) ile süzölmüştür. Üzerine 500 µL 100 mM α-naftil asetat (1,86 g α-naftil asetat + 100 mL aseton) eklenmiştir (substrat solüsyonu, enzim kaynağının mikroplaka kuyucuklarına eklenmeden hemen önce hazırlanmıştır). Esteraz enzim aktivitesi, 450 nm dalga boyunda, 25 °C sıcaklıkta mikroplaka okuyucuda okunmuştur. Kinetik okuma toplam 20 dk süresince 10 sn aralıklarla yapılmıştır. Kinetik okuma sonucunda elde edilen optik yoğunluk (O.D.) değerleri daha önce elde edilmiş olan protein miktarına (Bradford) oranlanarak popülasyonun toplam karboksilesteraz enzim aktivitesi mOD/min/µg protein olarak elde edilmiştir (Kranthi 2005, Anonymous 2006, Hadim 2008).

3.2.4.3 Asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Birer adet -80 °C'de saklanmış olan, son dönem larvalar cam tüplere alınmıştır. Üzerlerine 1500'er µL sodyum fosfat triton tamponu (3,58 g Na₂HPO₄ + 1,36 g KH₂PO₄ + 1 g Triton X-100 + 1 L distile su, pH 7,3) eklenerek homojenizatör ile homojenize edilmiştir. Solübilizasyon için 15 dakika bekletilmiştir. Sonra 4 °C'de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Mikroplaka kuyucuklarının her birine elde edilen süpernatanttan 50'şer µL konularak üzerlerine 100 µL DTNB (15 mg DTNB, 25 mL fosfat tamponu içinde çözdürölmüş, bu solüsyondan 2,5 mL alınıp fosfat tamponu ile 50 mL'ye tamamlanmıştır) ve 100 µL Acetylthiocholin iodide (22 mg ATChI + 50 mL PBT) eklenmiştir. Mikroplaka, daha sonra 405 nm dalgaboyunda 25 °C'de, toplam

20 dakika süresince 10 saniye aralıklarla mikropilaka okuyucuda okunarak enzim aktivitesi belirlenmiştir. Kinetik okuma sonucunda elde edilen optik yoğunluk değerleri, daha önce Bradford denemesinden elde edilmiş olan protein miktarına oranlanarak popülasyonun asetilkolinesteraz enzim aktivitesi mOD/min/μg protein olarak elde edilmiştir (Hadim 2008).

3.2.4.4 Glutatyon S-transferaz (GST) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Birer adet -80 °C'de saklanmış son dönem larvalar cam tüplere alınmıştır. Üzerlerine 1500 μL 0,1 M Tris-HCl tamponu (3,175 g Tris-HCl + 0,5 g Tris-Base + 500 mL distile su, pH 7,5) eklenerek homojenizatör ile homojenize edilmiştir. Solubilizasyon için 10-15 dakika bekledikten sonra 4 °C'de, 14000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra elde edilen supernatant, enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzim kaynağından mikropilaka kuyucuklarına 50'şer μL konularak üzerine 100 μL 4 mM GSH (0,0368 g GSH + 10 mL Tris-HCl) (pH 7,5) çözeltisi ve 100 μL 0,4 mM CDNB (0,292g CDNB + 10 mL ETOH çözeltisinden 10 μL + 990 μL 0,1 M Tris-HCl tampon) çözeltisi eklenmiştir. Mikropilaka daha sonra Mikropilaka okuyucu'da 340 nm'de 25 °C'de, toplam 20 dakika süresince ve 10 saniye aralıklarla okunarak enzim aktivitesi belirlenmiştir. Kinetik okuma sonucunda elde edilen optik yoğunluk değerleri daha önce elde edilmiş olan protein miktarına oranlanarak popülasyonun glutatyon S-transferaz enzim aktivitesi mOD/min/μg protein olarak elde edilmiştir (Hadim 2008).

3.2.5 İstatistiksel değerlendirme

Her iki ilaç denemelerinden 48 saat sonra elde edilen sonuçlar (ölüm sayıları) POLO PLUS bilgisayar programı (LeOra Software 1994) kullanılarak istatistiksel analizler yapılmıştır. Her bir jenerasyon için selekte edilen LC₅₀, LC₇₅ ve LC₉₀ değerlerinin, hassas popülasyona göre oranlanması ile her popülasyon için direnç oranları belirlenmiştir ve LC₇₅ dozu seleksiyon deneylerinde her jenerasyonda uygulanmıştır. Sinerjizm oranları belirlenmesinde, sinerjist ile kullanılan ilaçların LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri, sinerjist kullanılmayan denemelerde elde edilen LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri ile oranlanarak hesaplanmıştır. Elde edilmiş enzimlerin değerleri, ANOVA analizi, Tukey testi ile p<0,01 ve p<0,05 güven aralıklarında taranmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma (A.Ü.Z.F) Bölümünde Entomoloji Anabilim Dalı'nda 2010-2013 yıllarında yapılmıştır. *Spodoptera littoralis* zararlısı dünyada çeşitli bitkiler üzerinde çok önemli zarar yapan lepidopterlerden biridir. Popülasyon, 2008 yılında Adana'dan toplanmıştır ve o tarihten itibaren hiçbir pestisit veya kimyasal madde baskısına maruz bırakılmadan yetiştirilmektedir. *Spodoptera littoralis*, biokimyasal çalışmalarda ana materyal olarak kullanılmıştır. Biyokimyasal çalışmalarda, başlangıçta popülasyon iki farklı grup olan imidacloprid ve gamma-cyhalothrin insektisit baskısına maruz bırakılmıştır. Bunlarla beraber normal (hassas) popülasyon yani hiçbir ilaç baskısına maruz bırakılmamış bireyler, sonuçlarda kontrol olarak kullanılmak amacıyla aynı koşullarda yetiştirilmiştir. Böcekler her jenerasyonunda 3.larva dönemindeyken öncelikle LC₇₅ değerini biyoassay yöntemler ile belirlenerek, seleksiyon dozu olarak için kullanılmıştır. Çalışmanın amacı, pestisit ve özellikle insektisitlerin doğada yoğun bir şekilde kullanılmasından dolayı bu ilaçlara karşı dirençli zararlı popülasyonlar gelişmektedir. Bu araştırmada, zirai mücadelede başarısızlığın önlenmesi ve ekonomik açıdan daha başarılı olmak amacıyla direnç mekanizmaları ve bunu etikleyen faktörler incelenmiştir.

Piretroidler, çok sayıda zararlı üzerinde etkili olması ve memeliler ile kuşlara toksisiteyi düşük olması ve çevrede kalıcılığı az olduğundan dolayı son yıllarda geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Işığa karşı dayanıklı (fotostabil) Permethrin, ilk sentezlenmiş piretroidlerden birisi, zararlı yönetiminde hızlı bir şekilde gelişmiştir ve uygulanmaktadır. Günümüzde major ve önemli zararlılara karşı çok çeşitli bileşiklere sahip olan piretroidler kullanılmaktadır. Ancak geniş spektrumlu olduklarından dolayı, hedef olmayan böcekler ve balıklar gibi suda yaşayan canlılar üzerinde de çok zehirli ve etkili oldukları ortaya çıkmıştır. Piretroidlere karşı gelişen direnç çoğu zaman, bu grup insektisidin hedef bölgesi olan sodyum kanallarından ortaya çıkmaktadır (Schleier ve Peterson 2011). Bu ilaçların diğer başka özellikleri, böceğin ölmesi için çok düşük dozlar gerektirmesi (eklembacaklılara yüksek toksisite), hızlı etki göstermesi, çiğneyici ağız parçasına sahip böcekler için özellikle etkili olmasıdır (Anonymous 2014f).

İmidaklopid, böceklerin nöron reseptörlerine, memelilerin nöron reseptörlerine göre daha çok güçlü bir biçimde bağlandığı için, bu insektisit böceklere karşı memelilere göre seçici ve daha toksiktir. İmidaklopid sinir sisteminde çeşitli post-sinaptik nikotinik asetilkolin reseptörlerinin üzerinde etkilidir ve bunun için ortaya çıkan dirençler ACh veya AChE gibi bu hedef bölgesini etkileyen veya değiştiren faktörler olabilmektedir (Anonymous 2014g).

4.1 Biyoassay ve Seleksiyon Çalışmalarının Sonuçları

Spodoptera littoralis üzerinde imidaklopid ve gamma-cyhalothrin insektisitleri ile yapılan biyoassay denemelerinin sonuçları ve bu ilaçlara karşı tepkiler, çizelge 4.1 (gamma-cyhalothrin) ve çizelge 4.2 (imidaklopid)'de 0,95 güven aralığıyla LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri, populasyonların direnç oranları, karşı tepkiler ve ölüm oranları verilmektedir. Şekil 4.1 - 4.2'de seleksiyondan maruz kalan döllерinin gamma-cyhalothrin'e karşı ve şekil 4.3 - 4.4'te ise imidaklopid'e karşı elde edilmiş olan LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri hassas popülasyonla grafiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.1 *Spodoptera littoralis* popülasyonlarının gamma-cyhalothrin'e karşı gösterdikleri LC değerleri ve direnç oranları

Gamma-cyhalothrin	Sel.	n	χ^2 (df)	h	Eğim ±SE	LC ₅₀ ppm (Güven aralığı 0.95)	LC ₉₀ ppm (Güven aralığı 0.95)	RR LC ₅₀	RR LC ₉₀
	F0	216	14,82 (21)	2,70	4,49 ±0,61	804,1 (441,1 - 734,6)	1551,5 (1315,2 - 2010,7)	1	1
	F1	216	14,52 (11)	1,32	3,80 ±0,59	604,6 (441,1 - 734,6)	1313 (1063,6 - 1917,7)	0,86	1,1
	F2	216	12,95 (12)	1,07	2,71 ±0,45	651,1 (486,6 - 799,5)	1629,2 (1443,4 - 3415,4)	1,01	1,01
	F3	216	27 (12)	2,25	2,75 ±0,47	517,8 (269,2 - 703,3)	1510,6 (1059 - 4017,6)	1,03	1,17
	F4	216	10,83 (12)	1,90	4,96 ±0,63	597,9 (515,8 - 675,3)	1083,9 (944,5 - 1312,6)	1,27	1,08
	F5	216	32,48 (12)	2,70	3,01 ±0,47	957,6 (685,5 - 1395,2)	2549 (1640,4 - 10571)	2,4	2,8
	F6	216	29,27 (12)	1,43	7,98 ±0,98	1264,4 (1096,3 - 1438,4)	1830 (1581,1 - 2443,1)	2,34	1,56
	F7	216	8,71 (13)	0,71	11,81 ±1,60	1169,8 (1118,9 - 1229,2)	1501,7 (1397,9 - 1684,5)	2,28	1,35
	F8	216	7,49 (18)	0,44	4,925 ±0,68	2410,9 (2179,8 - 2768,2)	4389,1 (3603,4 - 6115,6)	5,58	4,22
	F9	216	5,6 (12)	0,41	5,23 ±0,12	2746,1 (2451,7 - 3037,9)	4826,6 (4038,1 - 7263,1)	6,82	4,36
	F10	216	2,41 (15)	0,26	3,24 ±1	6278,1 (4789,7 - 8230)	15318 (11796 - 23892)	10,1	11,75
	F11	216	3,94 (15)	0,26	3,43 ±0,49	6483,4 (5669,8 - 7673,5)	15598 (8534,9-19803,4)	11,01	12,53
F12	216	3,31 (13)	0,24	3,79 ±0,88	11194 (9341,2 - 16705)	24340 (16427 - 47492)	16,85	18,82	

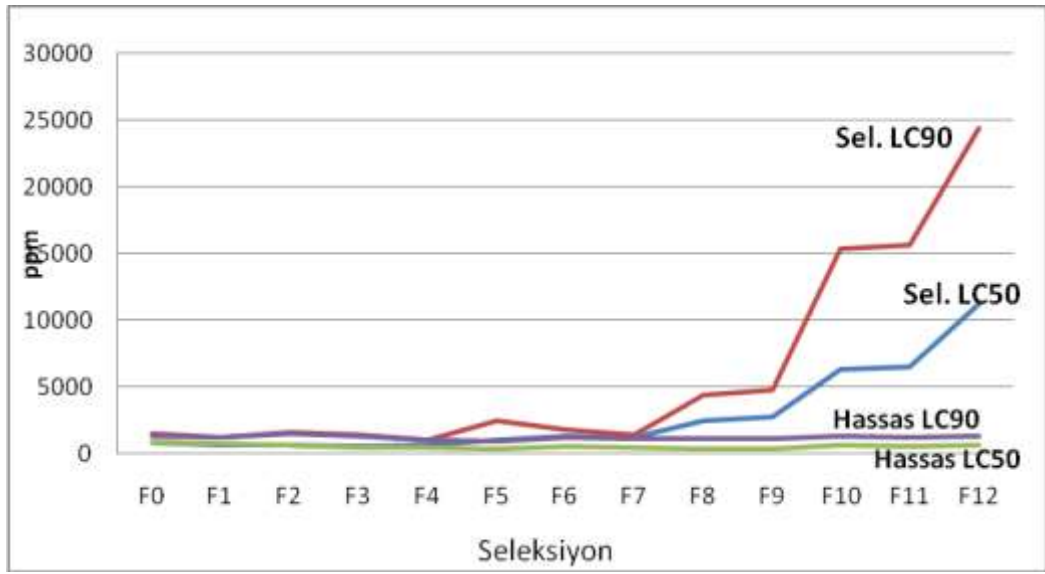
n=Kullanılan larva sayısı,

h=Heterojenlik değeri

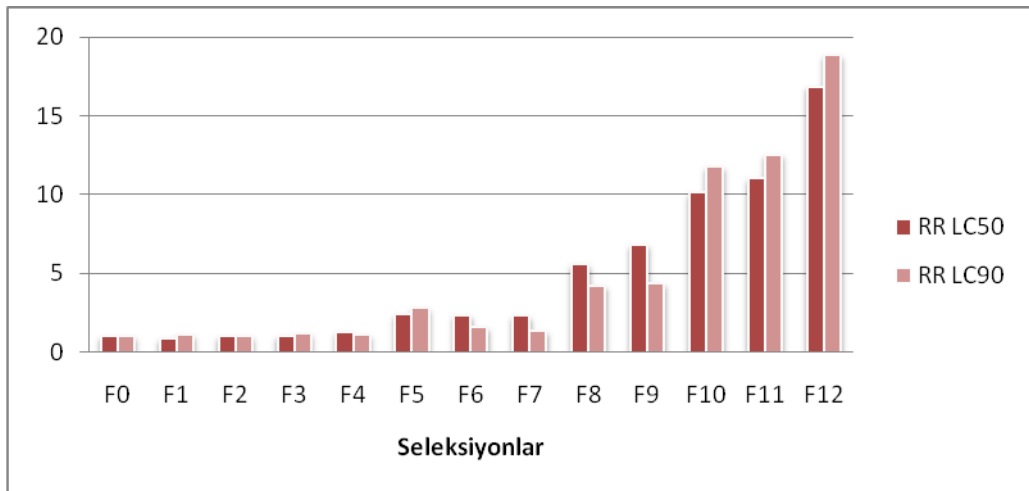
RR= Direnç oranı (Dirençli popülasyonun LC₅₀ veya LC₇₅ değeri / Hassas popülasyonun LC₅₀ veya LC₇₅ değeri)

Çizelge 4.1 incelendiğinde, başlangıçta gamma-cyhalothrin insektisine karşı LC₅₀ değeri F0'da 804,1 iken, F7'ye kadar yavaş yavaş bir artış gösterdikten sonra, F8'den itibaren bu artış hız kazanarak F12 seleksiyonunda 13,9 katına yani 11194 ppm rakamına ulaşmıştır. LC₉₀ değeri ise aynı şekilde F7 seleksiyona kadar az bir artış

göstermiş ve sonrasında hızlı bir şekilde, F0'da 1551,5 ppm'deyken F12 jenerasyonda 24340 ppm'e (15,7 kat artış) ulaşmıştır. Böylece direnç oranı (RR) LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri, F8 seleksiyonundan itibaren birden hızlı artış göstererek en son F12 popülasyonunda sırasıyla 16,85 ve 18,82 rakamına ulaşmıştır. Sonuç olarak bu bulgular, *S. littoralis* popülasyonunda bu insektisite karşı gittikçe hassasiyetin azaldığını ve direnç kazandığını göstermektedir. Heterojenlik oranı ise başlangıçta h=2,70'iken F12'de h=0,24 değeri bulunmuştur.



Şekil 4.1 *Spodoptera littoralis* popülasyonlarının gamma-cyhalothrin'e karşı gösterdikleri LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerin eğrileri



Şekil 4.2 Seleksiyon popülasyonlarının LC₅₀ ve LC₉₀'a göre direnç oranı

Şekil 4.1 - 4.2’de ise, gamma-cyhalothrin insektisitine karşı gösterilen tepkiler sırasıyla LC₅₀ ve LC₉₀ değer eğrileri ve direnç oranın grafiği bulunmaktadır. Şekil 4.1’de F9’dan itibaren LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerinde hızlı bir yükseliş gözlemlenmesi, popülasyonda F9 dan itibaren bu insektisite karşı azalmış bir hassasiyet yani direnç kazandığını göstermektedir.

Çizelge 4.2 *Spodoptera littoralis* popülasyonların imidakloprid’e karşı gösterdikleri LC değerleri ve direnç oranları

Sel.	n	χ^2 (df)	h	Eğim ±SE	LC ₅₀ ppm	LC ₉₀ ppm	RR LC ₅₀	RR LC ₉₀
					(Güven aralığı 0.95)	(Güven aralığı 0.95)		
F0	216	29,46 (22)	1,34	3,10 ±0,35	369,1 (306,7 - 451)	955,2 (722,5 - 1494)	1	1
F1	216	14,03 (21)	0,66	2,26 ±0,28	921,1 (766,5 - 1142,5)	3386,9 (2388,9 - 5889,1)	2,25	3,23
F2	216	20,18 (21)	0,96	3,30 ±0,31	2215,8 (1928,7 - 2550,8)	5416,6 (4466,6 - 7016,7)	5,65	5,91
F3	216	5,71 (12)	0,65	3,34 ±0,54	3050,6 (2626 - 3708,4)	7056,4 (5881,5 - 9701,7)	7,27	6,38
F4	216	9,81 (15)	0,47	4,32 ±0,57	3624,5 (3250,9 - 4088,4)	7166,1 (5951,6 - 9653,2)	7,75	6,68
F5	216	2,42 (13)	0,18	4,06 ±0,64	3715,1 (2996,5 - 3925,3)	7371 (5504,1 - 12570)	9,64	8,11
F6	216	2,2 (16)	0,13	4,09 ±0,59	3772,3 (3199,7 - 4418,1)	7548,8 (5885,4 - 11536)	9,76	8,68

n=Kullanılan larva sayısı,

h=Heterojenlik değeri

RR= Direnç oranı (Dirençli popülasyonun LC50 veya LC75 değeri / Hassas popülasyonun LC50 veya LC75 değeri)

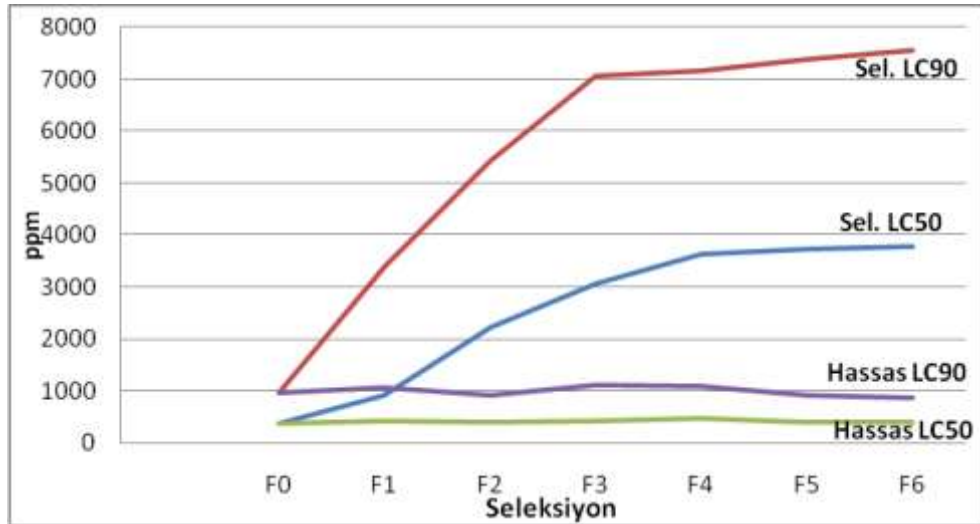
Çizelge 4.2’de popülasyonda imidakloprid insektisitine karşı görülen tepkiler gösterilmiştir. LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri düzenli bir artış ile sırasıyla F0’da 369,1 ve 955,2 ppm değerlerinden, F6 seleksiyonunda 3772,3 ve 7548,8 ppm değerlerine ulaşmıştır. Bu artış, LC₅₀’de 10,22 kat ve LC₉₀’da 7,9 kat ilaca karşı daha az hassasiyetini gösteriyor. Seleksiyon dozları her jenerasyonun LC₇₅ değeri ile yapılmıştır. Ancak F6

jenerasyondan elde edilmiş LC₇₅ değeri ve daha yüksek dozları uygulandığında, böceklerin çoğu gelişme sorunları (prepupa evreden pupaya geçemiyorlardı) gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).

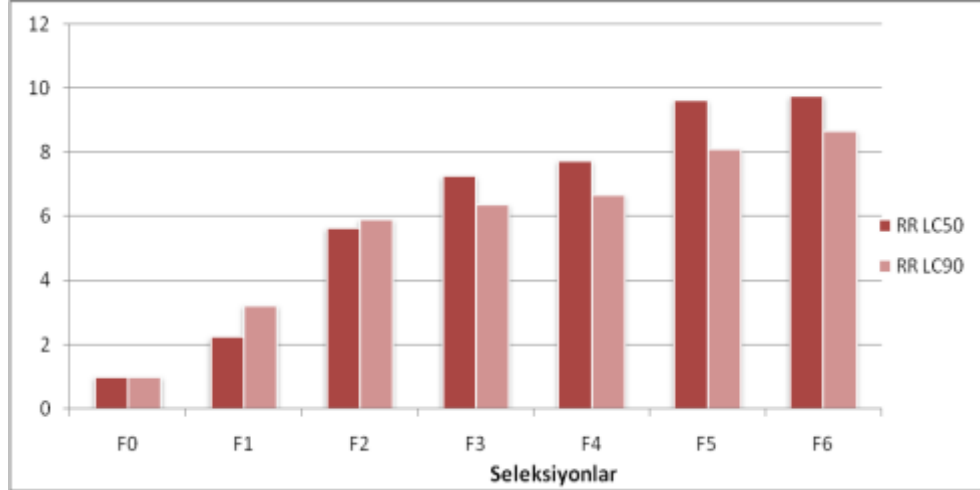


Şekil 4.3 Ölmüş prepupa döneminde olan *Spodoptera littoralis*

Diğer yandan, heterojenlik (h) değeri popülasyonda F0 nesilde 1,34 rakamından düzenli bir azalışla F6 seleksiyonda 0,13 değerine. Direnç oranı (RR) ise düzenli bir artış gösterirken F6 nesilde LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerine göre sırasıyla 9,76 ve 8,68 değerlerine çıkmıştır.



Şekil 4.4 *Spodoptera littoralis* popülasyonlarının imidakloprid'e karşı gösterdikleri logaritmik ppb doz LC₅₀ ve LC₉₀ eğrileri



Şekil 4.5 *Spodoptera littoralis* popülasyonlarının imidakloprid'e karşı gösterdikleri LC₅₀ ve LC₉₀'a göre direnç oranları

Şekil 4.4 - 4.5'te selekte edilen popülasyonun LC₅₀ ve LC₉₀ ppm değerleri probitik olarak, hassas popülasyona karşı, eğrileri ve direnç oranların grafikleri bulunmaktadır. Bu iki ilacı karşılaştırdığında, *S.littoralis*, imidakloprid, gamma-cyhalothrin'e göre direnç oluşumu, daha hızlı bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Heterojenlik değeri (h) gamma-cyhalothrin seleksiyonda 12 jenerasyondan sonra 0,24 ve imidakloprid seleksiyonda 6 jenerasyonun sonu 0,13 rakamı göstermiştir.

Piretroitlere karşı gelişen direnç genellikle, hedef yeri olan sodyum kanallarında duyarsızlıklardan oluşmaktadır. Bu gruptaki olan insektisitler, genelde sodyum kanallarına belli yerlerden bağlanarak iyon depolarizasyonuna neden olur ve böylece sinirsel hücreye devamlı sodyum iyonlarının geçişini sağlayarak sinirsel iletişimi bloke eder (Schleier ve Peterson 2011).

Neonikotinoid insektisitlerin direnç gelişimi yavaş olmasına rağmen bazı zararlı böcek türlerinde sorun olmasıyla tanımlanmaktadır (Liu vd. 2006). Daha önce imidakloprid ve başka neonikotinoidlere karşı hedef yeri direnç gelişimi rapor edilmiştir. Direnç mekanizmaları örneğin, esteraz enzimleri, knockdown direnç ve asetilkolinesteraz neonikotinoidleri etkilememektedir (Margartopoulos vd. 2007).

İmidakloprid sinir sisteminde çeşitli post-sinaptik nikotinic asetilkolin reseptörlerinin üzerinde etkilidir ve bunun için ortaya çıkan dirençler, ACh veya AChE gibi bu hedef bölgesinde etkili olduğu içindir (Anonymous 2014h).

Her zararlının hangi dönem veya dönemlerde ekonomik açıdan daha çok önemli olduğunun bilinmesi önem taşımaktadır. Her böcek farklı dönemlerinde fizyolojik ve morfolojik açıdan farklı özelliklere sahip olduğundan dolayı, bu durum o zararlıya karşı uygulanan mücadele yöntemlerinde doğru seçilmesini etkiliyor. *S. littoralis* ile mücadelede öncelikle bu zararlının polifag, larva döneminde zarar yapan ve yapraklarda beslendiğini göz önünde bulundurulmalıdır ve buna yönelik yöntemler belirlenmelidir. Bu nedenle biyoassay ve enzimatik çalışmalarda 3.dönem larvalar seçilmiştir. Ayrıca nem, sıcaklık, aydınlık-karanlık periyotları gibi çevre faktörlerinin böcek ve deneme sonuçları üzerinde etkili olduğu ispatlanmıştır. Bunun için tüm aşamalarda, denemeler ve yetiştirmeler aynı koşullarda uygulanmalıdır. Diğer yandan yöntem olarak, ilaçların doğada uygulanması ve özellikle bu zararlının üzerinde etki gösterme şeklinin benzemesinden dolayı yaprak daldırma yöntemi seçilmiştir. Sinerjistik çalışmalarda ise, topikal aplikasyon, yaprak daldırma yöntemi ile aynı anda kullanılabilirdiği için tercih edilmiştir.

4.2 Sinerjistik Çalışmaların Sonuçları

Sinerjistler yaygın olarak metabolizma-esaslı direncin engellenmesinde ve bu maddeler pestisitlerin etkinliğinin artırılmasında onlarla birlikte kombine halde kullanılmaktadır. Ayrıca, laboratuvar araştırmalarında spesifik direnç mekanizmalarının varlığını analiz etmede, sinerjistlerin belirli metabolik yolları inhibe etme yeteneklerinden faydalanılır. Bu nedenle PBO (piperonyl butoxide), DEF (S,S,S-tributyl phosphorotrithioate) ve DEM (diethyl maleate) biyoassay deneylerinde sinerjist olarak insektisitler ile uygulanmaktadır. Direnci etkileyen faktör veya faktörlerin bulunması için, sitokrom P450 monooksijenazlar, esterazlar ve glutatyon S-transferazlar(GST) gibi enzimleri sırasıyla inhibe eden PBO, DEF ve DEM sinerjistler ile yapılmaktadır (Pasay vd. 2009).

Çizelge 4.3 PBO, DEM ve DEF'in hassas ve dirençli (F12) *Spodoptera littoralis* popülasyonlarında gamma-cyhalothrin'e karşı sinerjistik etkileri

		n	χ^2 (df)	h	Eğim \pm SE	LC ₅₀ ppm (Güven aralığı 0.95)	LC ₉₀ ppm (Güven aralığı 0.95)	RR LC ₅₀	RR LC ₉₀	SR LC ₅₀	SR LC ₉₀
Kontrol	F12	216	3,31 (13)	0,25	3,79 \pm 0,88	11194 (9341,2-16705)	24340 (16427-47492)	16,85	18,82		
	Hassas	216	4,52 (11)	0,92	4,93 \pm 0,86	664,1 (558,13-791,94)	1105 (912,04-1458,05)	1	1		
PBO	F12	216	8,13 (13)	0,62	2,99 \pm 0,46	5248,6 (4444,86-6150,8)	14062 (10848-22080)	11,5	13,92	2,1	1,7
	Hassas	216	5,37 (12)	0,44	3,32 \pm 0,42	456,1 (382,6-535,7)	1010,2 (897,7-1318,8)	1	1	1,4	1,1
DEM	F12	216	8,34 (18)	0,46	4,26 \pm 0,59	3092,1 (2649,4-3663,04)	6177,8 (4966-8733,5)	6,58	6	3,6	3,9
	Hassas	216	8,98 (12)	0,75	3,76 \pm 0,46	469,9 (400,2-545,2)	1028,9 (851,3-1350,6)	1	1	1,4	1,1
DEF	F12	216	2,84 (13)	0,21	2,42 \pm 0,42	3553,9 (2677,49-4322,9)	12029 (9061,5-20279)	7,19	11,51	3,1	2
	Hassas	216	5,74 (12)	0,48	3,19 \pm 0,41	494,1 (414,2-582,6)	1045,1 (994,9 - 1442,9)	1	1	1,3	1,1

n=Kullanılan larva sayısı

h=Heterojenlik değeri

RR= Direnç oranı (Dirençli popülasyonun LC₅₀ veya LC₉₀ değeri / Hassas popülasyonun LC₅₀ veya LC₉₀ değeri)

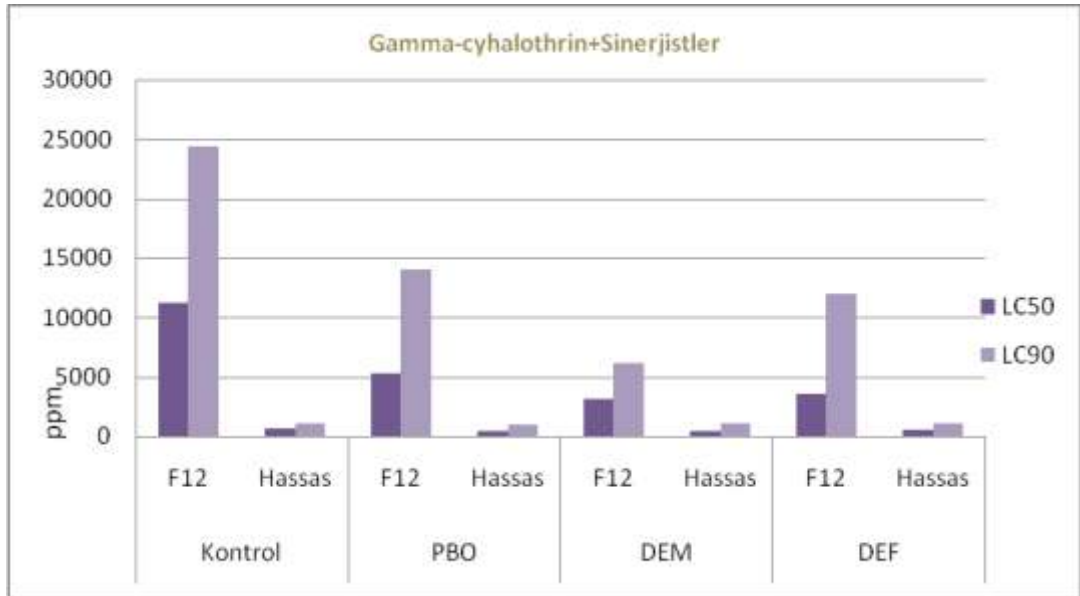
SR= Sinerjizim oranı (Popülasyonun LC₅₀ veya LC₉₀ değeri / Popülasyonun sinerjistik ile elde edilen LC₅₀ veya LC₉₀ değeri)

Bu aşamada, dirençli popülasyonu hassas popülasyonu ile karşılaştırarak, gamma-cyhalothrin sinerjistikler ile birlikte denenmiştir. *In vitro*'da, DEF, DEM ve PBO sinerjistikler sırasıyla esterazlar, GST ve sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri inhibe etmekte ve aktivitelerini azaltmaktadır. Böylece, direncin metabolik nedeni olan faktör veya faktörler bulunmaktadır (Pasay vd. 2009). Her üç sinerjistik (PBO, DEM ve DEF) gamma-cyhalothrin ile beraber dirençli *S. littoralis* bireyler üzerinde kullanıldığında, ilacın etkisini artmaktadır. Buna göre inhibe edilen farklı detoksifikasyon enzimleri, özellikle karboksilesteraz, AChE ve GST enzimlerin, seleksiyonlarla elde edilen dirençte etkili olma olasılığı yüksek olduğu düşünülmektedir. Ancak DEM sinerjisti, başka sinerjistiklere göre en yüksek sinerjizim oranını (SR) sahip olmaktadır (Şekil 4.6) Bu bulgu gamma-cyhalothrin insektiside karşı dirençde, glutatyon S-trasferaz enziminin en önemli rolü oynadığına dair bir ipuçtu olabilir. En yüksek SR orana sahip olan DEM sinerjisti, gamma-cyhalothrin ilacı ile kullandığımızda, LC₉₀ değerleri, 3,9 kat

azaltmaktadır. Aynı zamanda hassas popülasyonda uygulanan sinerjistlerle beraber gamma-cyhalothrinin etkisinde, pek fazla bir değişim görülmemiştir.

Bir çalışmada, lambda-cyhalothrin ile uygulanan DEF ve PBO sinerjistlerinin, etkili oldukları bulunmuştur. Aynı zamanda bunun nedenini sinir hassasiyetin artışı ve / veya kütüküler penetrasyonun artışı ile ilgili oldukları belirtilmiştir (Ahmad 2009).

Piretroitler bir aksonik exotoksin maddesi olarak, toksik etkileri ile aksonal zarlarında, voltaj kapılı sodyum kanallarının kapatma önlenmesi yoluyla etki göstermektedir (Delorme vd. 1988). Gamma-cyhalothrin, oksadiazin insektisitler grubuna ait olan bir voltaj-bağımlı sodyum kanalı bloke edici olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda, sentetik piretroidlere karşı görülen dirençlerde, sitokrom P-450 monooksijenaz enzimin miktarında veya aktivitesinde artış görülebilmektedir. Ancak bazen, karboksilesteraz grubu enzimlerin de bu tip dirençlerde, etkili oldukları bulunmaktadır (Ahmad vd. 2007).



Şekil 4.6 Gamma-cyhalothrin'in farklı sinerjistler ile kullanılarak elde edilmiş, dirençli ve hassas popülasyonda sinerjizim oranlarının (SR LC_{50/90}) grafiği

Şekil 4.6’da, hassas ve dirençli popülasyonlarda Gamma-cyhalothrin ile sinerjistlerin ortak etkileri, sonucu ortaya çıkan sinerjizim oranları, direncin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Sırasıyla DEM, DEF ve PBO detoksifikasyon enzimlerini inhibe ederek Gamma-cyhalothrin’in etkisini artmıştır.

Çizelge 4.4 PBO, DEM ve DEF’in hassas ve dirençli (F6) *Spodoptera littoralis* popülasyonlarında imidakloprid’e karşı sinerjistik etkileri

		n	χ^2 (df)	h	Eğim ±SE	LC ₅₀ ppm (Güven aralığı 0.95)	LC ₉₀ ppm (Güven aralığı 0.95)	RR LC ₅₀	RR LC ₉₀	SR LC ₅₀	SR LC ₉₀
Kontrol	F6	216	2,42 (16)	0,15	3,81 ±0,57	3854,4 (3318,8-4757,9)	8359,2 (6323,8-13640)	9,21	9,1		
	Hassas	216	4,63 (12)	0,38	3,76 ±0,54	418,3 (354,2-504,1)	918,1 (716,3-1374,6)	1	1		
PBO	F6	216	5,1 (15)	0,34	2,73 ±0,43	3078,7 (2561,4-4016,4)	8056,3 (6199,2- 12131)	8,49	9,06	1,25	1,04
	Hassas	216	8,63 (12)	0,72	3,67 ±0,51	362,7 (306,3-434,1)	809 (634-1192,2)	1	1	1,1	1,1
DEM	F6	216	11,19 (15)	0,74	3,71 ±0,46	1862,8 (1634,1-2138,2)	4121,9 (3361,3-5630)	6,16	4,99	2,07	2,03
	Hassas	216	9,3 (12)	0,77	2,93 ±0,38	302,4 (258,3-358,6)	825,8 (620,5-1283,7)	1	1	1,4	1,1
DEF	F6	216	8,5 (12)	1,38	3,66 ±0,64	2287,7 (1874,3-3268,5)	5114,2 (3490,4-13202)	7,73	6,99	1,7	1,6
	Hassas	216	8,77 (12)	0,73	3,27 ±0,42	296,1 (248,8-358,9)	730,9 (565,7-1082)	1	1	1,4	1,3

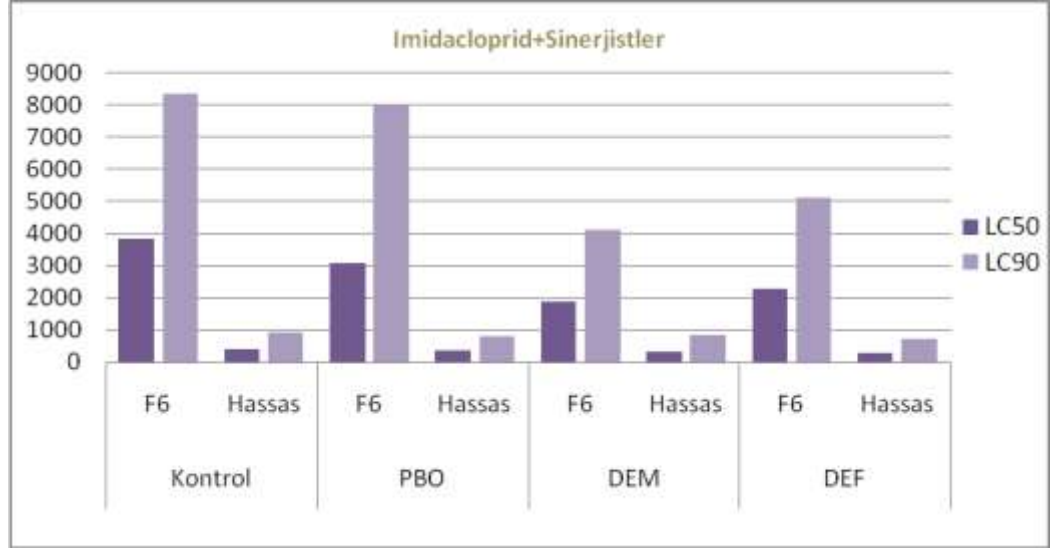
n=Kullanılan larva sayısı

h=Heterojenlik değeri

RR= Direnç oranı (Dirençli popülasyonun LC₅₀ veya LC₉₀ değeri / Hassas popülasyonun LC₅₀ veya LC₉₀ değeri)

SR= Sinerjizim oranı (Popülasyonun LC₅₀ veya LC₉₀ değeri / Popülasyonun sinerjist ile elde edilen LC₅₀ veya LC₉₀ değeri)

Çizelge 4.4’de DEM, DEF ve PBO gibi üç farklı sinerjistler *S. littoralis*’in imidakloprid’e karşı dirençli ve hassas popülasyonları üzerinde uygulanmıştır. Sonuç olarak, PBO imidaklopridin etkisini en az (SR LC₅₀ ve 90= 1,25 ve 1,04) ve DEM sinerjisti en yüksek seviyede (SR LC₅₀ve90= 2,07 ve 2,03) arttırmıştır. İmidakloprid’in etki mekanizması AChE inhibitörü olarak bulunmuştur (Gervais vd. 2010).



Şekil 4.7 İmidakloprid'in farklı sinerjistler kullanılarak elde edilmiş dirençli ve hassas populasyonunda sinerjizim oranlarının (SR LC₅₀ ve 90) grafiği

Şekil 4.7'de hassas ve dirençli popülasyonlarda imidakloprid+sinerjistlerin etkileri ve sinerjizim oranı direncin bir göstergesi olarak görülmektedir. DEM, DEF ve PBO sırasıyla imidakloprid'in etkisini artırmıştır.

Genellikle, imidakloprid insektisidinin tekrarlı kullanımının sonucunda görülen dirençte AChE enzimi önemli rol oynamaktadır (Ky vd. 2002); aynı zamanda, bir diğer araştırmaya göre, bazı durumlarda, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae) zararlısında, imidakloprid'e karşı görülen dirençte, sitokrom P-450 monooksijenaz enzim aktivitesinin artması, direnç mekanizmasında en önemli faktördür (Puinean vd. 2010). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, DEM sinerjisti, en yüksek sinerjizim oranını yaratarak, etki göstermektedir. DEM sinerjisti GST enzimini inhibe ettiğine göre, GST enzimi, P-450 monooksijenaz enzimi ve karboksilesteraz enzimi ile kıyaslandığında, imidakloprid'e karşı *S. littoralis*'te görülen dirençte, en önemli rolü oynadığına dair bulgular ortaya çıkmaktadır.

4.3 Biyokimyasal Sonuçlar

Biyokimyasal çalışmalarda karboksilesteraz, asetilkolinesteraz ve glutatyon *S*-transferaz enzimlerinin aktiviteleri uygun metotlarla dirençli ve hassas popülasyonlarda saptanmıştır.

4.3.1 Karboksilesteraz enzim aktivitesinin ölçüm sonuçları

Karboksilesterazlar, aralarında piretroitliler ve neonikotinoidlerin de bulunduğu birçok pestisidin detoksifikasyonunda görev alırlar (Konno vd. 1990). Sentetik piretroitlere karşı oluşan direnç çoğu zaman karboksilesteraz enzimine bağlıdır (Farnsworth vd. 2010). Daha nceki çalışmalara göre, *Aedes aegypti* sentetik piretroitlere ve DDT'ye karşı dirençli 4.dönem larvalarında karboksilesteraz enzim aktivitesi, hassas popülasyona göre, daha yüksek seviyede olduğu bulunmuştur (Bregues vd. 2003). Başka bir çalışmada *Helicoverpa armigera* (Hb.) (Lepidoptera: Noctuidae) zerinde biyokimyasal çalışmalara göre, sentetik piretroitlere karşı görülen dirençte, esterazların rlnn çok önemli olduğunu ortaya çıkmıştır (Young vd. 2004).

İki ilaçla selekte edilen popülasyonların karboksilesteraz aktiviteleri α -naftil asetat (α -NA) substratı kullanılarak mOD/min/ μ g protein cinsinden ölçülmüştür (izelge 4.5). Karboksilesteraz aktivitesi, biyokimyasal denemelerin sonuçlarına göre gamma-cyhalothrin ile maruz kalan 12 jenerasyondan sonra hassas popülasyonun ile oranlanılarak, 6,13 kat artış göstermiştir (şekil 4.8).

Çizelge 4.6, 4.9, 4.12, 4.15, 4.18 ve 4.20'de ANOVA testleri, MİNİTAB 15 bilgisayar programında, Tukey testinde analiz sonuçları, karboksilesteraz, AChE ve GST enzimlerin miktarları, gamma-cyhalothrin ve imidakloprid insektisidi ile selekte edilmiş popülasyonların enzim değerleri ve gruplanmış jenerasyonlar bulunmaktadır.

Çizelge 4.5 Gamma-cyhalothrin ilacı ile selekte edilen populasyonların karboksilesteraz enzim aktiviteleri

Seleksiyon jenerasyonları	karboksilesteraz enzimin ortalaması (mOD/min/ μ g protein)
Sel. 0	0,0097
Sel. 1	0,0093
Sel. 2	0,0091
Sel. 3	0,0092
Sel. 4	0,0116
Sel. 5	0,0084
Sel. 6	0,0119
Sel. 7	0,0138
Sel. 8	0,0221
Sel. 9	0,0125
Sel. 10	0,0213
Sel. 11	0,0239
Sel. 12	0,0533

Çizelge 4.6 Gamma-cyhalothrin insektisidi ile selekte edilen karboksilesteraz enzimin farklı döllerde verilerin istatistiksel analizleri

Source	SD	KT	KO	F	P
f	12	0,0053701	0,0004475	14,87	0,000
Error	23	0,0006924	0,0000301		
Total	35	0,0060625			

Bireysel güven aralığı = % 99,87

SD: Serbestlik derecesi

KT: Kareler Toplamı

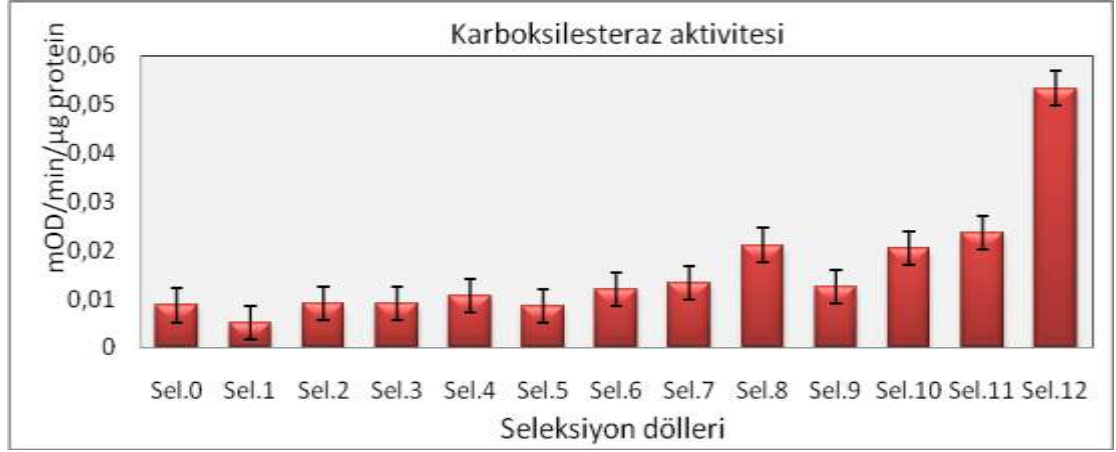
KO: Kareler Ortalaması

Çizelge 4.6'da $p < 0,01$ olasılığında anlamlı farklılık göstermektedir ($p = 0,000$). İstatistiksel sonucuna göre karboksilesteraz enzim değerlerinde anlamlı bir fark bulunmaktadır.

Çizelge 4.7 Gamma-cyhalothrin insektisidi ile selekte edilen gruplanmış karboksilesteraz enzim değreleri

Sel.	N (Tekerrür)	Ortalama (mOD/min/ μ g protein)	Gruplar
f0	3	0,0097	A
f1	3	0,0093	A
f2	3	0,009	A
f3	3	0,0092	A
f4	3	0,0116	A
f5	3	0,0084	A
f6	3	0,0119	A
f7	3	0,0138	A
f8	3	0,0221	AB
f9	3	0,0125	AB
f10	3	0,0213	B
f11	3	0,0239	B
F12	3	0,0533	C

Çizelge 4.7’de döllerin arasında enzim aktivitelerin miktarları kıyaslanarak alfabetik harfler ile belirtilmektedir. Aynı harflardan oluşan gruplar arasında, anlamlı bir fark göstermemektedir. Karboksilesteraz mOD/min/ μ g protein değrelerine göre, f0 ile f9 jenerasyonlar, aynı grupta yer alıp, arasında anlamlı bir fark görünmemektedir. f10 ve f11 daha yüksek bir seviyede olup B grubu oluşturmaktadır. f12 ise C grubu oluşturarak en yüksek seviyede olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8 Gamma-cyhalothrin ile selekte edilen populasyonun karboksilesteraz enzim aktivitesi grafiği

İmidakloprid ile selekte edilen bireylerin karboksilesteraz aktivitesi mOD/min/μg protein değerine göre 6 jenerasyondan sonra hassas popülasyona oranlanmasında 1,52 katına bulunmaktadır (Çizelge 4.8, Şekil 4.9).

Li vd. (2012) karasinekte imidakloprid'e karşı görülen direnci incelenerek, sitokrom P-450, GST ve karboksilesteraz aktivitelerini, dirençli popülasyonlarda, hassas popülasyona göre, daha yüksek seviyede olduğunu rapor edilmişlerdir. Bu tez kapsamında da yapılan çalışmaların sonucu, karboksilesteraz anlamlı bir şekilde, hassas popülasyona göre daha yüksek aktivite göstermektedir ve bu dirençte karboksilesteraz enziminin direnç mekanizmasında ilgili olduğunu anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.8 İmidakloprid ilacı ile selekte edilen populasyonların karboksilesteraz enzim aktiviteleri

Seleksiyon jenerasyonları	Karboksilesteraz enzimin ortalaması (mOD/min/μg protein)
Sel. 0	0,005282
Sel. 1	0,006999
Sel. 2	0,012769
Sel. 3	0,007437
Sel. 4	0,009920
Sel. 5	0,012542
Sel. 6	0,016528

Çizelge 4.9 İmidaklopid insektisidi ile selekte edilen karboksilesteraz enzimin farklı döllerde verilerin istatistiksel analizleri

Source	SD	KT	KO	F	P
f	6	0,0002124	0,0000354	3,90	0,029
Error	10	0,0000907	0,0000091		
Total	16	0,0003031			

Bireysel güven aralığı = % 99,53

SD: Serbestlik derecesi

KT: Kareler Toplamı

KO: Kareler Ortalaması

Çizelge 4.9 verilere göre $p < 0,05$ olasılıkla, bireyler arası enzim miktarlar anlamlı bir fark göstermektedir ($p = 0,029$).

Çizelge 4.10 İmidaklopid insektisidi ile selekte edilen gruplanmış karboksilesteraz enzim değerleri

Sel.	N (Tekerrür)	Ortalama (mOD/min/ μ g protein)	Gruplar
f0	3	0,005282	A
f1	3	0,006999	B
f2	3	0,012769	B
f3	3	0,007437	B
f4	3	0,009920	B
f5	3	0,012542	BC
f6	3	0,016528	C

Çizelge 4.10 imidaklopid ile selekte edilmiş gruplar arasında enzim miktarları gruplanarak gösterilmektedir. f0 en küçük, f1-f4 aynı gruptan (B grubu), f5 BC ve f6 C gubu oluşturarak en yüksek değerlerini göstermektedir.



Şekil 4.9 İmidakloprid ile selekte edilen populasyonun karboksilesteraz enzim aktivitesi

4.3.2 Asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesinin ölçüm sonuçları

Asetilkolinesteraz, böceklerdeki merkezi sinir sisteminin kolinerjik sinapsisinde nörotransmitter asetilkolini hidrolize etmektedir. Asetilkolin, Asetilkolin esteraz (AChE) enzimi tarafından kolin ve asetik asite dönüştürülür. Bazı ilaçlar (örneğin imidakloprid) ACh'in analogu olarak çalışırlar (benzer yapısal formüle sahiptirler ve böylece reseptör ile aynı yerlerden bağ yapabilirler). AChE'in aktif bölgesine bağlanırlar. Fakat asetilkolin hidrolize olmasına rağmen, insektisitler enzim-substrat kompleksi olarak sabit kalırlar. Bu insektisitler, asetilkolinesteraz inhibisyonuyla sinir impulslarının transmisyonunu bloke eder ve asetilkolin reseptörlerinin uyuşmasına neden olurlar. Sinapsislerdeki asetilkolinin artan konsantrasyonu daha fazla uyarılmış merkezi sinir sistemi ölüme yol açabilmektedir. Fakat böceklerde de bu etkiyi azaltıcı ve hatta yok edici direnç mekanizmaları gelişmiştir (Chen vd. 2001).

Şekil 4.10 ve Çizelge 4.11'de, direnç arttıkça AChE aktivitesinin de arttığı, hassas populasyonun AChE aktivitesinin 0,015 mOD/min/µg protein iken Sel12 populasyonunun AChE aktivitesinin 0,14 mOD/min/µg protein olduğu (9,33 kat arttığı) görülmektedir.

Çizelge 4.11 Gamma-cyhalothrin ilacı ile selekte edilen popülasyonların asetilkolinesteraz enzim aktiviteleri

Seleksiyon jenerasyonları	AChE enziminin aktivitesi (mOD/min/ μ g protein)
Sel. 0	0,0158
Sel. 1	0,0203
Sel. 2	0,0389
Sel. 3	0,0254
Sel. 4	0,0387
Sel. 5	0,0436
Sel. 6	0,0384
Sel. 7	0,0382
Sel. 8	0,0404
Sel. 9	0,0846
Sel. 10	0,0467
Sel. 11	0,0735
Sel. 12	0,1477

Çizelge 4.12 Gamma-cyhalothrin insektisidi ile selekte edilen popülasyonların farklı döllerde AChE enzimi miktarlarının istatistiksel analizi

Source	SD	KT	KO	F	P
f	12	0,046691	0,003891	22,15	0,000
Error	26	0,004567	0,000176		
Total	38	0,051258			

Bireysel güven aralığı = % 99,47

SD: Serbestlik derecesi

KT: Kareler Toplamı

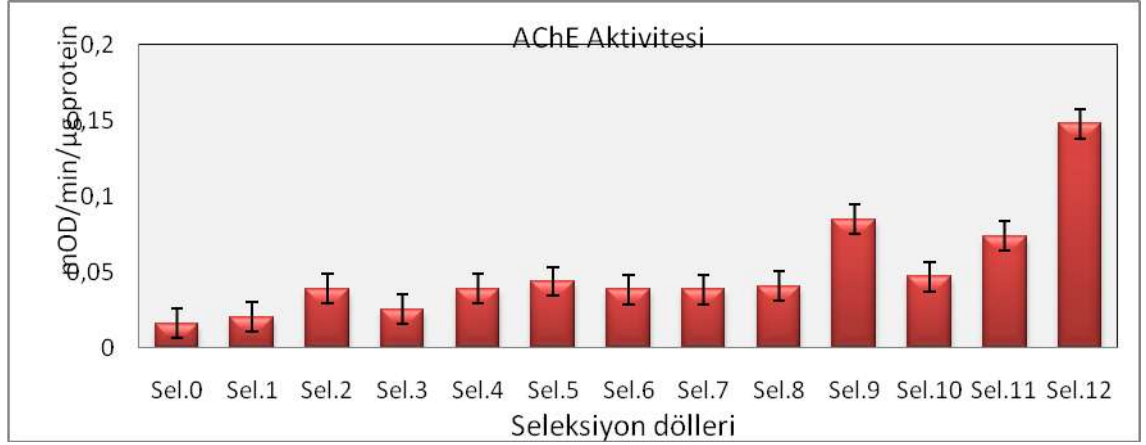
KO: Kareler Ortalaması

Asetilkolinesteraz enzim aktivite değerleri çizelge 4.12’de istatistik değerleri göstermektedir. $p < 0,01$ ’de değerler arası anlamlı fark bulunmaktadır ($p = 0,000$).

Çizelge 4.13 Gamma-cyhalothrin insektisidi ile selekte edilen gruplanmış AChE enzim değerleri

Sel.	N (Tekerrür)	Ortalama (mOD/min/ μ g protein)	Gruplar
f0	3	0,0158	A
f1	3	0,0203	B
f2	3	0,0389	B
f3	3	0,0254	B
f4	3	0,0387	B
f5	3	0,0436	B
f6	3	0,0384	B
f7	3	0,0382	B
f8	3	0,0404	BC
f9	3	0,0846	C
f10	3	0,0467	C
f11	3	0,0735	C
f12	3	0,1477	D

Çizelge 4.13'te döllerin arasında AChE enzim aktivitelrin miktarları kıyaslanarak alfabetik harfler ile belirtilmektedir. AChE mOD/min/ μ g protein değerlerine göre, f0 A guruba, f1 ile f8 jenerasyonlar aynı grupta, f9-f11 C grupta ve f12 en yüksek değerini göstererek D grupta yer almaktadır. İstatistik olarak, jenerasyonlarda gittikçe enzim aktiviteleri de anlamlı bir artışı göstermektedir.



Şekil 4.10 Gamma-cyhalothrin ile selekte edilen popülasyonların AChE enzim aktiviteleri

Çizelge 4.14'ten, imidaklopride karşı görülen direnç arttıkça, AChE aktivitesinin de arttığı (Şekil 4.11), hassas popülasyonun AChE aktivitesi 0,0099 mOD/min/µg protein iken Sel6 popülasyonunun AChE aktivitesinin 0,0598 mOD/min/µg protein olduğu (6,04 kat arttığı) görülmektedir.

Çizelge 4.14 İmidaklopridile selekte edilen popülasyonların asetilkolinesteraz enzim aktiviteleri

Seleksiyon jenerasyonları	AChE enziminin aktivitesi (mOD/min/µg protein)
Sel. 0	0,0099
Sel. 1	0,0089
Sel. 2	0,0123
Sel. 3	0,0168
Sel. 4	0,0248
Sel. 5	0,0478
Sel. 6	0,0598

Çizelge 4.15 İmidakloprid insektisiti ile selekte edilen AChE enzimin farklı döllerde verilerin istatistiksel analizleri

Source	SD	KT	KO	F	P
f	6	0,0071960	0,0011993	114,48	0,000
Error	14	0,0001467	0,0000105		
Total	20	0,0073426			

Bireysel güven aralığı = % 99,58

SD: Serbestlik derecesi

KT: Kareler Toplamı

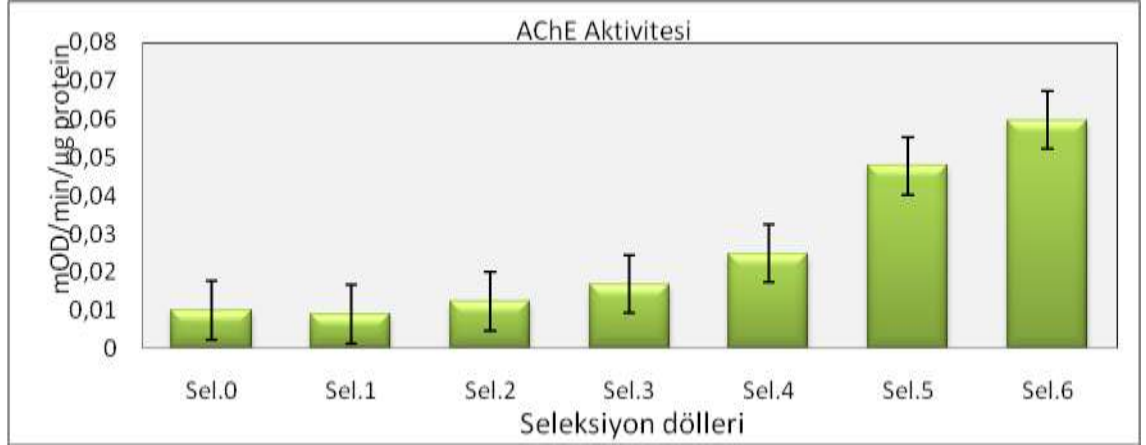
KO: Kareler Ortalaması

Elde edilmiş istatistik verilere göre (Çizelge 4.15), jenerasyonlar arasında, enzim aktivitelerinde $p < 0,01$ olasılığında, anlamlı fark bulunmaktadır.

Çizelge 4.16 İmidakloprid insektisidi ile selekte edilen gruplanmış AChE enzim değerleri

Sel.	N (Tekerrür)	Ortalama (mOD/min/ μ g protein)	Gruplar
f0	3	0,0099	A
f1	3	0,0089	A
f2	3	0,0123	A
f3	3	0,0168	AB
f4	3	0,0248	B
f5	3	0,0478	C
f6	3	0,0598	D

Çizelge 4.16 imidakloprid ile selekte edilmiş gruplar arasında, AChE enzim miktarları gruplanarak göstermektedir. f0-f3 aynı gruptan (B grubu), f4, f5 ve f6 sırasıyla B, C ve D gurupları oluşturmaktadır. İstatistik verileri göre imidakloprid ile selekte edilmiş AchE enzim miktarları arasında 4 gruba olmak üzere anlamlı farklar belirtmektedir.



Şekil 4.11 İmidakloprid ile selekte edilen popülasyonun AChE enzim aktivitesi grafiği

4.3.3 Glutasyon S-Transferaz (GST) enzim aktivitesinin ölçüm sonuçları

Dirençte etkili olduğu düşünülen diğer bir enzim grubu da GST enzimleridir. Glutathion-S-Transferazlar (GST) bütün metazoanlar ve bitkilerde bulunan bir izoenzim ailesidir ve temel detoksifikasyon sistemlerinden birisidir. Böceklerde bu enzim ailesi insektisitlerin toksik etkilerine karşı temel bir savunma olarak bilinir. Örneğin *Musca domestica*'da organofosfat insektisitlere dirençli mutantların GST'nin yüksek seviyelerine sahip olduğu bulunmuştur (Kence 1992).

Gamma-cyhalothrin'e dirençli *S. littoralis* popülasyonlarında (Sel.12) hassas popülasyona göre 23,5 kat daha yüksek GST aktivitesi ölçmüştür (Çizelge 4.17, Şekil 4.12).

Çizelge 4.17 Gamma-cyhalothrin ilacı ile selekte edilmiş popülasyonların GST enzim aktiviteleri

Seleksiyon jenerasyonları	GST enzimin aktivitesi (mOD/min/µg protein)
Sel. 0	0,0072
Sel. 1	0,0072
Sel. 2	0,0286
Sel. 3	0,0392
Sel. 4	0,0189
Sel. 5	0,0159
Sel. 6	0,0191
Sel. 7	0,0378
Sel. 8	0,1234
Sel. 9	0,1679
Sel. 10	0,1265
Sel. 11	0,1488
Sel. 12	0,1694

Çizelge 4.18 Gamma-cyhalothrin insektisiti ile selekte edilen GST enzimin farklı döllerde verilerin istatistiksel analizleri

Source	SD	KT	KO	F	P
f	12	1,1831	0,0986	1,09	0,417
Error	21	1,9022	0,0906		
Total	33	3,0853			

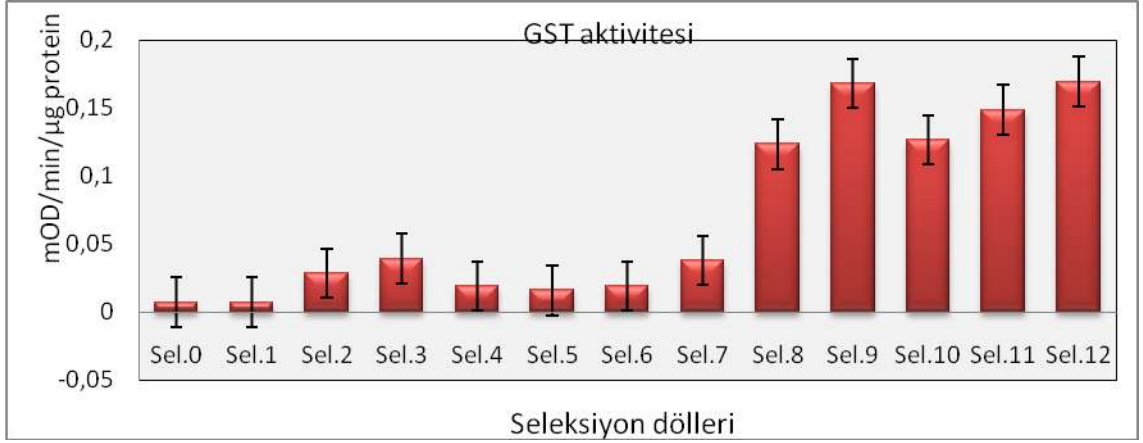
Bireysel güven aralığı = % 99,87

SD: Serbestlik derecesi

KT: Kareler Toplamı

KO: Kareler Ortalaması

ANOVA analizinde elde edilmiş istatistiksel verilere göre (Çizelge 4.18), jenerasyonlar ilerlenince, enzim değerleri artışına rağmen, $p < 0,05$ olasılığında, anlamlı bir fark bulunmamaktadır. AChE enzim değerlerinin güven aralıkları birbirine kapsayarak, aynı grubu oluşturmaktadır.



Şekil 4.12 Gamma-cyhalothrin ile selekte edilen popülasyonun GST enzim aktivitesi grafiği

Çizelge 4.19'dan, direnç arttıkça GST aktivitesinin de arttığı, hassas popülasyonun GST aktivitesinin 0,0087 mOD/min/μg protein iken Sel.6 popülasyonunun GST aktivitesinin 0,0127 mOD/min/μg protein olduğu (1,46 kat arttığı) görülmüştür (Çizelge 4.19, Şekil 4.13).

Çizelge 4.19 İmidakloprid ilacı ile selekte edilen popülasyonların GST enzim değerleri

Seleksiyon jenerasyonları	GST enzimin aktivitesi (mOD/min/μg protein)
Sel. 0	0,0087
Sel. 1	0,0076
Sel. 2	0,0074
Sel. 3	0,0101
Sel. 4	0,0131
Sel. 5	0,0126
Sel. 6	0,0127

Çizelge 4.20 İmidakloprid insektisiti ile selekte edilen GST enzimin farklı döllerde verilerin istatistiksel analizleri

Source	SD	KT	KO	F	P
f	5	0,0001225	0,0000245	9,87	0,001
Error	10	0,0000248	0,0000025		
Total	15	0,0001473			

Bireysel güven aralığı = % 99,40

SD: Serbestlik derecesi

KT: Kareler Toplamı

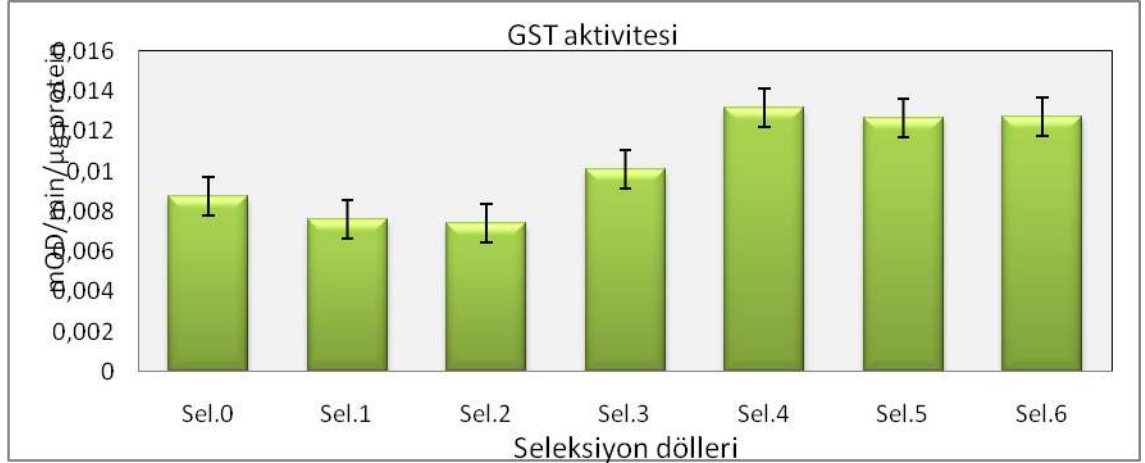
KO: Kareler Ortalaması

Çizelge 4.20 GST enzim aktivitesi, imidakloprid ile selekte edilmiş jenerasyonlar arasında istatistik verileri, $p < 0,01$ olasılıkla, anlamlı fark görünmektedir.

Çizelge 4.21 İmidakloprid insektisidi ile selekte edilen gruplanmış AChE enzim değerleri

Sel.	N (Tekerrür)	Ortalama (mOD/min/ μ g protein)	Gruplar
f0	3	0,0087	AB
f1	3	0,0076	A
f2	3	0,0074	A
f3	3	0,0101	B
f4	3	0,0131	BC
f5	3	0,0126	C
f6	3	0,0127	C

Çizelge 4.21 imidakloprid ile selekte edilmiş jenerasyonlar arasında, AChE enzim miktarları gruplanarak göstermektedir. Tüm jenerasyonlar toplam 3 grubu oluşturarak, seleksiyon sayıları arttıkça enzim miktarlarında ise anlamlı bir farklılıkla artış göstermektedir.



Şekil 4.13 İmidakloprid ile selekte edilen populasyonların GST enzim aktivitesi grafiği

Çizelge 4.22 Gamma-cyhalothrin (VANTEX) ve imidakloprid (Confidor) ile selekte edilmiş en son jenerasyonları ve hassas popülasyonu karşılaştırılması

	RR LC ₅₀	RR LC ₉₀	PBO SR LC ₅₀	DEM SR LC ₅₀	DEF SR LC ₅₀	Karboksileste raz (mOD/min/µg protein)	AChE (mOD/mi n/µg protein)	GST (mOD/mi n/µg protein)
VANTEX® F12	16,85	18,82	2,1	3,6	3,1	0,0533	0,1477	0,1694
Hassas	1	1	1,4	1,4	1,3	0,0087	0,0158	0,0072
Confidor® F6	9,76	8,68	1,25	2,07	1,7	0,0146	0,0598	0,0127
Hassas	1	1	1,1	1,4	1,4	0,0096	0,0099	0,0087

Çizelge 4.22’de hassas popülasyon ve gamma-cyhalothrin (VANTEX) ve imidakloprid (Confidor) ile selekte edilmiş popülasyonları bir çizelge karşılaştırılmaktadır. RR LC₅₀₋₉₀ direnç oranı olarak her iki seleksiyonun hassas popülasyona göre göstermektedir. Biyokimyasal karakterizasyonun doğrultusunda direnç oranı (RR), direnç oluşumun bir faktörü olarak sayılabilir (Anonymous 2014i). VANTEX seleksiyonun LC₅₀ ve LC₉₀ direnç oranı (RR), sırasıyla 16,85, 18,82 göstermekte ve bu değerler imidakloprid ile ilgili rakamlar 9,76 ve 8,68 bulunmaktadır.

Sinerjizim oranı, PBO, DEM ve DEF, her üç sinerjistin değerleri, her iki seleksiyonda, enzim inhibe açısından etkili oldukları elde edilmiştir.

Ölçülmüş her üç enzimin değerinin artış bulunmaktadır. Bu artışlar gamma-cyhalothrin seleksiyonunda hassas popülasyonun oranında, en fazla GST'ye ayıttır. Sonuç olarak gamma-cyhalothrin seleksiyonunda, dirençli popülasyonun oluşması ve bu direncin biyokimyasal karakterizasyonunda, araştırılmış enzimlerin her üçü de etkili olabilirler.

İmidakloprid seleksiyonunda ise, en düşük sinerjizim oranı PBO sinerjisti için bulunmuştur. Enzimlerin değer artışları da aynı ifadeyi belirterek en düşük miktarı GST enzimini gösteriyor. GST enzimi PBO sinerjisti ile inhibe edilmesinden dolayı (Pasay vd. 2009), veriler mantıklı olarak sayılabilir.

4.4 Öneriler

Günümüzde direnç izleme ve kontrolü, entomoloji dalında, en önemli ve hassas bilgi alanların biridir ve her tarım alanında, hedef böceklerle göre, uygun pestisitler ve özellikle insektisitler seçilmektedir. Son yıllarda, aynı gruptan veya aynı etki mekanizmaya sahip olan insektisitleri devamlı kullanıldığında, farklı böceklerde, penetrasyon, biyokimyasal veya moleküler düzeyde nedenlerle ortaya çıkan direnç olaylarına rastlanmaktadır.

Direnç oluşmaması için en önemli strateji, ilacın doğru yöntemle doğru zamanda uygulanmasıdır. Genelde direnç gelişiminin tahmini zor olduğu için, önemli bazı prensiplerin dikkate alınması gerekmektedir.

Bir pestisidin faydalı ömrünü arttırılması ve bir zararlıya karşı duyarsız hale gelmemesi için bir ilacın uygulamasında, zaman aralığının arttırılması, tavsiye edilen en önemli stratejilerden biri olmaktadır.

Direncin önlenmesi veya ertelenmesi için diğer önemli prensipleri:

- Zararlı biyolojisini iyi tanımak ve ona göre uygun pestisitler seçilmesi
- Direnç dinamikleri
- Pestisitleri ard arda kullanılmaması
- Ekonomik zarar eşiklerine uyumlu olarak ilaçların kullanılması
- Her zaman uygun uygulama aletleri ve önerilen miktarda ilaç kullanması
- İnsektisitlerin uygun münavebe ile kullanması
- Spesifik olmayan ilaçların örneğin, yağlar ve sabunların kullanımının arttırılması
- Tarımsal ve kimyasal uygulamalar ile birlikte fiziksel ve biyolojik yöntemlerin de kullanması
- Dirençli olmayan zararlılara karşı, farklı etki mekanizmalara sahip olan insektisitleri karışım halinde kullanılması (Kunz ve Kemp 1994)

Direncin iyi tanımlanması için biyokimyasal yöntemlerin yanında, direnç genetiğinin anlaşılması gerekmektedir. Bu hedefe ulaşması için, uygulama ve tasarlama yeteneği de artmaktadır. İnsektisit direnç kalıtım bilgilerinin ortaya çıkması ile izlemesi, risk değerlendirme ve direnç yönetimini modelleri geliştirilmektedir (Wang vd. 2009).

Sinerjistler, yaklaşık 50 yıldır insektisitlerin etkinliğini arttırmak için, özellikle direnç problemlerin ortaya çıktığı durumlarda, ticari olarak üretilip önemli ölçüde kullanılmaktadır. Direnç yönetiminde, sinerjistlerin rolü, bir enzim inhibitörü olarak kabul edilip insektisitler ile beraber kullanımında, dirençli bir zararlıya karşı, insektisidi daha düşük dozlarla uygulama imkanı yaratmaktadır. Aksi takdirde, direnç oluşumunda, insektisit daha yüksek düzeylerde kullanılmaktadır. Bu nedenle sinerjistler, metabolik direncinde basit bir araç olarak kabul edilmekte ve aynı zamanda direnç oluşumu geciktirebilmektedir (Bernard ve Philogène 1993). Direncin yönetiminde, her şeyden evvel, mevcut olan yöntemler ile direncin gelişiminde, etken metabolik faktörleri bulmaktır. Örneğin, *S. littoralis* zararlıının methoxyfenozide ilacı ile 13 kere selekte edilip ve dirençli popülasyon elde edilmiş bir araştırmada, enzimlerin ölçüm sonucunda, monooksijenaz aktivitesi yüksek çıktığı için, PBO sinerjisti ile direncin yenilmesi, rapor edilmiştir (Mosallanejad ve Smagghe 2009).

KAYNAKLAR

- Abdallah, M. D., El Attal, Z. M. and Omayma, M. K. 1979. Development of resistance of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) to Du-Ter. Journal of Agricultural Science, 93, 257-261.
- Ahmad, M. 2009. Sinergism of insecticides by enzyme inhibitors in the resistance population of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Acta Entomologica Sinica, 52(6), 631-639.
- Ahmad, M., Sayyed, A. H., Crickmore, N. and Saleem, M. A., 2007. Genetics and mechanism of resistance to deltamethrin in a field population of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Management Science, 63,1002–1010.
- Anonymous. 2013a. Web Sitesi: <https://en.wikipedia.org/wiki/Insecticide>, Erişim Tarihi: 15.12.2013.
- Anonymous. 2013b. Web Sitesi: <http://www.epa.gov/pesticides/>, Erişim Tarihi: 15.12.2013.
- Anonymous. 2013c. Web Sitesi: EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation). http://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/Spodoptera_litura/PRODLI_ds.pdf <http://www.epa.gov/pesticides/>, Erişim Tarihi: 16.12.2013.
- Anonymous. 2013d. Web Sitesi: http://www.pbs.org/wgbh/evolution/library/10/1/1_101_02.html, Erişim Tarihi: 16.12.2013.
- Anonymous. 2013e. Web Sitesi: http://www.irc-online.org/content/uploads/VM-Layout-v2.6_LR.pdf, Erişim Tarihi: 17.12.2013.
- Anonymous. 2013f. Web Sitesi: <http://www.irc-online.org/about/resistance/>, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonymous. 2013g. Web Sitesi: http://www.eppo.int/PPPRODUCTS/resistance/FAO_RMG_Sept_12.pdf, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonymous. 2013h. Web Sitesi: <http://www.irc-online.org/documents/moa-classification/?ext=pdf>, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonymous. 2013i. Web Sitesi: <http://www.irc-online.org/documents/moa-classification/?ext=pdf>, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonymous. 2012. Web Sitesi: EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation). http://www.eppo.int/PPPRODUCTS/resistance/FAO_RMG_Sept_12.pdf, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonymous. 2014a. Web Sitesi: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/369.htm>, Erişim Tarihi: 20.12.2013.

- Anonymous. 2014b. Web Sitesi: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:GammaCyhalothrin.png>, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonymous. 2014c. Web Sitesi: <http://www.alanwood.net/pesticides/gamma-cyhalothrin.html>, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonymous. 2014d. Web Sitesi: http://utahpests.usu.edu/IPM/files/uploads/UNLA_TURF_Ramirez_10_19_11.pdf, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonymous. 2014e. Web Sitesi: <http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonymous. 2014f. Web Sitesi: <http://citybugs.tamu.edu/factsheets/ipm/ent-6003/>, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonymous. 2014g. Web Sitesi: <http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonymous. 2014h. Web Sitesi: <http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonim. 2014i. Web Sitesi: http://forum.saraytarim.gov.tr/?part=forum&gorev=oku&id=4936&cat=18&title=PAMUK_KDA%20PAMUK%20YAPRAKKURDU%20Z%DDRA%DD%20M%DCCADELE%20TEKN%DDK%20TAL%DDMATI, Erişim Tarihi: 20.12.2013.
- Anonymous. 2014j. Web Sitesi: http://whqlibdoc.who.int/temp/WHO_VBC_81.806_cor.1.pdf, Erişim Tarihi: 20.11.2013.
- Anonymous. 2014k. Web Sitesi: <http://bitesizebio.com/10178/how-to-measure-protein-concentration-more-accurately/>, Erişim Tarihi: 10.10.2013.
- Ay, R. ve Sökeli, E. 2005. Böceklerde direnç yönetimi. Süleyman Demirel Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9, 1-4.
- Bernard, C.B. and Philogène, B. J. 1993. Insecticide synergists: role, importance and perspectives. J. Toxicol Environ. Health, 38(2),199-223
- 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.
- Bregues, C., Hawkes, N.J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., Manguin, S., Morgan, J. C. and Hemingway, J. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutation in the voltage-gated sodium channel gene. Medical and Veterinary Entomology, 17, 87-94.
- Brown, E.S. and Dewhurst, C.F. 1975. The genus *Spodoptera* in Africa and the Near East. Bulletin of Entomological Research, 65; 221-262.

- Cahill, M., Gorman, K., Day, S., Denholm, I., Elbert, A. and Nauen, R. 1996. Baseline determination and detection of resistance to Imidacloprid in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Bull Entomol. Res. 86; 343-349.
- Canik, F., Yürekli, A. ve Yüksel N. 2012. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü (TEPGE), 4; 3-4.
- Charalambous, P. and Lordanou, N. 1997. Response of susceptible and resistant strains of *Spodoptera littoralis* to conventional insecticides in cyprus. Agricultural Research Institute Ministry Of Agriculture, Natural Resources And The Environment, 179, 1-7.
- Chen, Z., Newcomb, R., Forbes, E., McKenzie, J. and Batterham, P. 2001. The Acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 31, 805-810.
- Cluster, N. 1993. Summary of conclusions and recommendations from a meeting on 'control of vectors of animal diseases in Eastern, Central and Southern Africa'. Nairobi Cluster Bulletin, 9, 1-2.
- Çakır, Ş. ve Yamanel, Ş. 2005. Böceklerde insektisidlere direnç. Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi, 6(1), 21-29.
- Delen N., Durmuşoğlu, E., Günçan, A., Güngör, N., Turgut C. ve Burçak, A. 2002. Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları., Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, 3-4.
- Delen, N. 2008. Fungisitler. Nobel Yayın Dağıtım. Nobel Yayın No: 1360, Ankara.
- Delorme, R., Chaufaux, D.F.J., Cuany, A., Bride, J.M., Auge, D. and Berge, J.B. 1988. Esterase metabolism and reduced penetration are causes of resistance to deltamethrin in *Spodoptera exigua* Hub. (Noctuidea: Lepidoptera). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 32(3), 240-246.
- Denac, H., Mevissen, M. and Scholtysik, G. 2000. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol., 362, 453-479.
- Devonshire, L. 1975. Studies of the carboxylesterases of *Myzus persicae* resistant and susceptible to organo phosphorus insecticides. Proceedings 8th British Insecticide and Fungicide Conference, 1975, 67-73.
- Dewhurst, C.F. 1975. The genus *Spodoptera* in Africa and the Near East. Bulletin of Entomological Research, 65, 221-262.

- Ditirich, V., Luetkemeier, N. and Voss, G. 1979. Monocrotophos and profenofos: Two organophosphates with a different mechanism of action in resistant races of *Spodoptera littoralis*. Journal of Economic Entomology, 72(3), 380-384.
- Dreher-Lesnick, S.M., Mulenga, A., Mulenga, A., Simser, J.A. ve Azad, A.F. 2006. Differential expression of two glutathione S-transferases identified from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. Insect Mol. Biol., 15; 445-453.
- Elbert, A., Hass, M., Springer, B., Thielert, W. and Nauen, R. 2008. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. Pest Manag. Sci., 64; 1099-1105.
- Farnsworth, C.A., Teese, M.G., Yuan, G., Li Y., Scott, C., Zhang, X., Wu Y., Russell, R.J. and Oakeshott, J.G. 2010. Esterase-based metabolic resistance to insecticides in heliothine and spodopteran pests. Journal of Pesticide Science, 35, 275-289.
- Gervais, J.A., Luukinen, B., Buhl, K. and Stone, D. 2010. "Imidacloprid Technical Fact Sheet". National Pesticide Information Center, <http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>
- Ghoneim, Y.F., Singab, M., Abou-Yousef, H.A. and Abd-El-Hai, N.S. 2012. Efficacy of certain insecticides and their mixtures with the tested IGRs against a field strain of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) under laboratory conditions. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 6(6), 300-304.
- Giray, H. 1977. Böceklerin İnsektisitlere Karşı Dayanıklılığı. Türkiye Bitki Koruma Dergisi, 1(1), 29-38.
- Gunning, R.V., Devonshire, A.L. and Moores, G.D. 1995. Metabolism of Esfenvalerate by Pyrethroid-Susceptible and Resistant Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 51, 205-213.
- Gunning, R.V., Moores, G.D. and Devonshire, A.L. 1996. Esterases and Esfenvalerate Resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) Lepidoptera: Noctuidae. Pesticide Biochemistry and Physiology, 54, 12-23.
- Hadim, N. 2008. Pamuk yaprak kurdu *Spodoptera littoralis* (boisduval) (Lepidoptera: noctuidae)'te insektisitlere karşı oluşan direncin biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 146, Ankara.
- Hayes, J.D. and Pulford, D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 30, 445-600.
- Hephızlı, P. ve Kumral, N. A. 2012. Farklı *Stethorus gilvifrons* (Muls.) (Coleoptera: Coccinellidae) popülasyonlarının bazı insektisit ve akarisitlere duyarlılıkları ve enzimatik özelliklerinin saptanması, Türk. entomol. derg., , 36 (4), 571-584.

- Ishaa Ya, I. and Klein, M. 1990. Response of susceptible laboratory and resistant field strains of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) to teflubenzuron. Journal of Economic Entomology, 83(4), 59-62.
- Jeyaratnam, J. 1990. Acute pesticide poisoning: a major global health problem, world Health Statistics Quarterly, 43, 139-44.
- Kence, M. and Kence, A. 1992, Genetic consequences of linkage between malathion resistance and autosomal male-determining factor in housefly (Diptera: Muscidae). Journal of Economical Entomology, 85, 1566.
- Kızılaslan, N. ve Yaşa, Ö. 2011. Türkiye'deki tarımsal mücadele üretim tüketim ve dış ticaretinin avrupa birliği uyum sürecinde gelişim seyri. GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi, 28(2), 103-116.
- Klein, M., Levski, Sh. and Keren, S. 1982. Comparative toxicity of several insecticides to eggs, larvae and adults of the Egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis*, in laboratory trials. Phytoparasitica, 10, 13-20.
- Konno, T., Kasai, Y., Rose, R.L., Hodgson, E. and Dauterman, W.C. 1990. Purification and characterization of a phosphotriester hydrolase from methyl parathionresistant *Heliothis virescens*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 36 (1), 1-13.
- Koçak, Ö. 1998. Zararlı Savaşımı. Hacettepe Üniversitesi Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, İnektisid Test Üretim Birimi, Ankara.
- 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. 91, 2483-2487.
- Kranthi, K.R. 2005. Insecticide resistance monitoring, mechanisms and management manual. Central Institute for Cotton Research (Indian council of Cotton Research), 155, Nagpur.
- Kunz, S.E. and Kemp, D.H. 1994. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 13 (4), 1249-1286
- Ky, W., Tx, L., Ch, Y., Xy, J. and Mq, Y. 2002. Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to fenvalerate and imidacloprid and activities of detoxification enzymes on cotton and cucumber. Journal of Economical Entomology, 95(2), 407-13.
- Lehane, M. 1997. Peritrophic Matrix structure and function. Annual Review Entomology, 42; 525-550.

- Lagadic, L., Bernard, L. and Leicht, W. 1993. Topical and oral activities of imidacloprid and cyfluthrin against susceptible laboratory strains of *Heliothis virescens* and *Spodoptera littoralis*. *Pesticide Science*, 38, 323–328.
- Lagadic, L., Cuany, A., Bergé, J. B. and Echaubard, M. 1993. Purification and partial characterization of glutathione *S*-transferases from insecticide-resistant and lindane-induced susceptible *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23, 467–474.
- Li, X.C., Schuler, M.A. and Berenbaum, M.R. 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52, 231–253.
- Li, J., Wanga, Q., Zhangb, L. and Gao, W. 2012. Characterization of imidacloprid resistance in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102(2), 109–114.
- Lorini, I. and Galley, D. J. 2000. Effect of the synergists piperonyl butoxide and DEF in deltamethrin resistance on strains of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29, 749-755.
- Margaritopoulos, J.T., Solouras, P.J., Nikolaidou, P., Malonikaki, J., Marista, K., Tsamandani, K., Kanavaki, O.M., Bacandritsos, N., Zarpas, K.D. and Tsitsipis, J.A. 2007. Insecticide resistance status of *Myzus persicae* population from peach and tobacco in mainland Greece. *Pest Manag. Sci.*, 63, 821-829.
- Melander, A.L. 1914. Can insects become resistant to sprays?. *Journal of Economic Entomology*, 7, 164-166.
- Metcalf, R.L. 2002. Insect Control. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Wiley-VCH, Weinheim, 14, 260-263.
- Mosallanejad, H. and Smagghe, G. 2009. Biochemical mechanisms of methoxyfenozide resistance in the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Pest Manag. Sci.*, 65(7), 732-736.
- Nauena, R., Strobela, J., Tietjena, K., Otsua, Y., Erdelena Ch. and Elbert, A. 1996. Aphicidal activity of imidacloprid against a tobacco feeding strain of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) from Japan closely related to *Myzus nicotianae* and highly resistant to carbamates and organophosphates. *Bulletin of Entomological Research*, 86, 165-171.
- Nishida, R. 2002. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*. 47, 57–92.
- Oakeshott, J.G., Van Papenrecht, E.A., Boyce, T.M, Healy, M.J. and Russell, R.J. 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*, 90(2-3), 239-68.

- Özel, R. 2004. Şanlıurfa ilinde zirai ilaç bayilerinin pazarlama yapısı, sorunları ve çözüm önerileri. HR. Ü.Z.F.Dergisi, 8 (1), 41-49.
- Pasay, C., Arlian, L., Morgan, M., Gunning, R., Rossiter, L., Holt, D., Walton, Sh., Beckham, S. and McCarthy, J. 2009. The effect of insecticide synergists on the response of scabies mites to pyrethroid acaricides. PLOS Neglected Tropical Diseases, 11, 204-215.
- Peng, X., Jin, H., Yong-Jie, L., Xiu-Cui, Q. and Yan-Yan, J. 2009. The relation of resistance to lambda-cyhalothrin with detoxification enzyme activity in *Spodoptera litura* (Fab.) (Lep.: Noctuidae). Acta Entomology of Sinica, 52(10), 1097-1102.
- Pittendrigh, B.R., L. Sun, P. Gaffney, and Huesing, J. 2008. “Negative Cross Resistance”, in Insect Resistance Management. Ed. David Onstad, 4, 108-124.
- Pittendrigh, B.R., Margam, V.M., Walters, K. R., Steele, L.D., Olds, B.P., Sun L., Huesing, J., Lee, S.H., and Clark, J.M. 2014. Understanding resistance and induced responses of insects to xenobiotics and insecticides in the age of “omics” and systems biology, in: Insect Resistance Management: Biology, Economics and Prediction. Onstad D. W. (eds), Academic Press is an imprint of Elsevier, 56-78, USA.
- Puinean, A.M., Denholm, I., Millar, N.S., Nauen, R. and Williamson, M.S. 2010. Characterisation of imidacloprid resistance mechanisms in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae) Pesticide Biochemistry and Physiology, 97, 129–132.
- Ramankrishna, N., Sexena, V.S., and Dhingra, S. 1984. Insecticide resistance in the population of *Spodoptera litura* in Andhra Pradesh. Pesticides, 18(9), 22-27.
- 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(5), 491–497.
- Ranson, H., Rossiter, L., Orтели, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C. W., Collins, F.H., and Hemingway, J. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochemistry Journal. 359, 295–304.
- Ranson, H., Claudianos, Ch., Federica Orтели, F., Abgrall, Ch., Hemingway, J., Sharakhova M.V., Unger, M. F., Collins, F. H. and Feyereisen, R. 2002. Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. Science, 298, 179-181.
- Riskallah, M.R. 1983. Esterases and resistance to synthetic pyrethroids in the Egyptian cotton leafworm. Pesticide Biochemistry and Physiology, 19, 184–189.

- Rossiter, L.C., Conyers, C.M., MacNicoll, A.D. and Rose, H.A. 2001. Two qualitatively different B-esterases from two organophosphate resistant strains of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) and their roles in fenitrothion and chlorpyrifos-methyl resistance. *Pesticide Biochemical Physiology* 69, 118-130.
- Salama, H.S., Dimetry, N.Z. and Salem, S.A. 1970. On the host preference and biology of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. *Zeitung für Angewandte Entomologie*, 67, 261-266.
- Sarfraz, M., Dossdall, L.M. and Keddie, B.A. 2005. Evidence for behavioural resistance by the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Journal of Applied Entomology*, 129, 340-341.
- Schleier, J. J. ve Peterson, R. K. D. 2011. Pyrethrins and pyrethroid insecticides. *Royal Society of Chemistry*, 9, 95-121.
- Shad, S. A., Sayyed, A. H., Fazal, S., Saleem, M. A, Zaka, S. M. and Ali, M. 2012. Field evolved resistance to carbamates, organophosphates, pyrethroids, and new chemistry insecticides in *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science*, 85(1), 153-162.
- Soderlund, D.M. 1997. Molecular mechanisms of insecticide resistance. (Molecular mechanisms of resistance to agrochemicals, *Chemistry of Plant Protection*, Ed: Ebing, 13, 21-73.
- Stumpf, N. and Nauen, R. 2001. Cross-resistance, inheritance and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal Economy Entomology*, 94(6), 1577-1583.
- Sun, C.N., Huang, S.Y., Hu, N.T. and Chung, W.Y. 2001. Glutathione S-Transferases and insect resistance to insecticides. *Biochemical sites of insecticide action and resistance*. Springer berlin heidelberg, 87, 239-254.
- Tiryaki, O., Canhilal, R. ve Horuz, S. 2010. Tarım ilaçları kullanımını ve riskleri, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 26(2), 154-169.
- Tong, H., Su Q., Zhou, X. and Bai, L. 2013. Field resistance of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) to organophosphates, pyrethroids, carbamates and four newer chemistry insecticides in Hunan, China. *J. Pest Sci.*, 86, 599-609.
- Topuz, E. 2005. Tarımsal zararlılarla mücadelede kimyasal pestisitlere alternatif bazı yöntemler. *Derim*, 22(2), 53-59.
- Tsagkarakou, A., Leeuwen, T.V., Khajehalit, A., Grispou, M., Williamsons, M. S., Tirry, I. and Vontas, J. 2009. Identification of pyrethroid resistance associated mutations in the para sodium channel of the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Insect Molecular Biology*, 18(5), 583-593.

- Van 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.
- Wang, Z., Yao, M. and Wu, Y. 2009. Cross resistance, inheritance and biochemical mechanisms of Imidacloprid resistance in B-biotype *Bemisia tabaci*. *Pest Manage. Sci.*, 65, 1189-1194.
- Yeşil, S. ve Ögür, E. 2011. Zirai mücadelede pestisit kullanımının türkiye ve konya ölçeğinde değerlendirilmesi ve pestisit kullanımının olası sakıncaları. I. Sempozyumu. 26-27 Kasım 2011. Konya.
- Yıldız, M., Gürkan, M. O., Turgut, C., Kaya, Ü. ve Ünal, G. 2000. Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları. ZMO, http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/dd7a04804967197_ek.pdf
- Yonggyun, K., Choa, J. R., Lee, J. Kang, S., Han, S. C., Hongb, K. J., Kima, H. S., Yoob J. K. and Lee, J. O. 1998. Insecticide Resistance in the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 1(1), 115–122.
- Yorulmaz, S. ve Ay, R. 2010. Akar ve böceklerde pestisitlerin detoksifikasyonunda rol oynayan enzimler. *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24(2), 137-148.
- Young, S. J., Gunning, R. V. and Moores, G. D. 2005. The effect of piperonyl butoxide on pyrethroid-resistance-associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci.*, 61(4),397-401.
- Zülküf, B. 2010. Adana ili turunçgil yetirticiliği ve insektisit kullanımının değerlendirilmesi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. 80 sayfa.

EKLER

EK 1 Yapay Besin Hazırlama Prosedürü

EK 2 Ergin Besini Hazırlama Prosedürü

EK 1 Yapay Besin Hazırlama Prosedürü

Büyük bir beher içinde 14 gr agar 400 mL distile suya karıştırılarak mikrodalga fırında kaynayana kadar 15 dkısıtılmıştır. Aynı zamanda aşağıdaki bulunan malzemeleri (agar hariç), karıştırıcı makinesi ile karıştırılmıştır. Kaynatılmış agar, 60°C sıcaklığa düştükten sonra, karımın üzerinde, karıştırıcı vasıtası ile 1-2 dk karıştırılarak, temiz bir kabın içinde boşaltılır. Karışım, sertleşmesine bekledikten sonra kapağını kapatılarak, kullanım zamanına kadar (1-2 ay) +4°C'de saklanabilir.

Asitaskorbik	4 gr
Asitsorbik	1,25 gr
Methyl-4 hydroxybenzoate	2,5 gr
Yeast	35 gr
Agar	14 gr
Fasulye	266,5 gr
Kolestrol	0,1gr
Vitamin B12	0,5mL
Su	800 ml

EK 2 Ergin Besini Hazırlama Prosedürü

20 gr bal 200 mL distile suda karıştırılır. İçinde bir tablet B vitamini kompleksi ve bir ampül B12 vitamini eklenir. Bu sıvıyı, petri kabında pamuğa emdirilerek ergin kutulara konulur. Her gün pamukların değiştirmesi gerekmektedir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Abdollah DINI POUR
Doğum Yeri: Bandar Anzali / İran
Doğum Tarihi: 06.08.1980
Medeni Hali: Evli
Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ferdosi Lisesi, Anzali, İran, 1998
Lisans : Shahed Üniversitesi, Ziraat Fak. Biki Koruma bölümü, Tahran, İran, 2000-2004
Yüksek Lisans : Arak Azad Üniversitesi, Ziraat Fak., Bitki Koruma Böl., 2005-2007
Doktora : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı (Şubat 2010 – Mart 2014)

Yayımları (SCI ve diğer)

SCI Yayınlar

Pesic, V., Dinipour, A., Vafaei, R. and Saboori, A. 2007. The water mite (Acari: Hydrachnidia) fauna of running waters of Guilan Province (Northern Iran) Systematic & Applied Acarology, 12, 231-221.

Uluslararası Kongre

Özkan, C., Tunca, H., Baysoyu, D., Ceylan, S., Kılincer, N., Akci, N., Şahin, A., Kaya, C., Şahin, Y., M.M. Yassin, M., M., Dinipour, A. 2010. "Biological studies with an egg-larval parasitoid *Chelonus oculator*: advances, successes, and potential of use", 22-27 Ağustos 2010, Budapest Hungary. (Sözlü Sunum)

Ulusal Kongre

Gonca, E., Dinipour, A., Erdoğan, T., Güz, N., Gürkan, M. O. (2011) Characterization of Detoxification Enzymes of Tomato Leaf Miner (*Tuta absoluta*) (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). IV. Plant protection Congress, Kahramanmaraş, Turkey.

Hakemli Dergi

Akrami, M.A. & Dinipour, A. (2008) Report of the second species of aquatic oribatid mites (Acari, Oribatida, Hydrozetidae) from Iran. *Journal of Entomological Society of Iran*[In Persian with English summary], 28(2), 67-68.

Dinipour, A. and Gürkan, M. O. 2013. Effects of synthetic pyrethroids and neonicotinoids insecticides and synergists on population of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Entomological Research of Iran*, 5(3), 1-12.

Dinipour, A., Vafaei-Shoushtari, R., Saboori, A. and Pesic, V. 2013. Report of three species of aquatic mites (Acari: Hydrachnidia) from Iran (Short Articles in Persian). *Journal of Entomological Research of Iran*, 5(3), 190-197.