

Orijinal araştırma (Original article)

**Manisa ili bağ alanlarında Salkım güvesi
[*Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae)]
popülasyonlarının insektisit direncinin belirlenmesi¹**

Determination of insecticide resistance of European grapevine moth [*Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae)] populations in vineyards of Manisa province

Ahmet HATİPOĞLU^{2*}

Enver DURMUŞOĞLU²

M.Oktay GÜRKAN³

Summary

This study was carried out to determine the resistance to insecticides of European Grapevine Moth, the main pest of vineyards between 2011-2014. Using the diet method, Lethal Concentration (LC) values of four different insecticides were determined in 10 different European Grapevine Moth populations and then the resistance coefficients were calculated comparing these values with susceptible population. LC₅₀ values were about 6 fold for chlorpyrifos-ethyl in Sarıgöl-2 population, about 5 fold for deltamethrin in Salihli population, about 6 fold for indoxacarb in Ahmetli population, about 6.5 fold for spinosad in Sarıbey population. These results suggest that these populations have developed resistance against the used insecticides. Enzyme activities of AChE, EST and GST were determined in 10 populations. No significant difference was detected in GST enzyme activities of the populations. In Sarıgöl-2 population, AChE enzyme activity was 5 fold while EST enzyme activity was 1.5 fold higher than the susceptible population.

Key words: European Grapevine Moth, insecticide resistance, bioassay, enzyme

Özet

Bu çalışmada 2011-2014 yılları arasında bağın ana zararlısı olan Salkım güvesinin yaygın kullanılan insektisitlere karşı direnç durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Besine karıştırma yöntemi kullanılarak iklim odalarında kültürü geliştirilebilen 10 farklı Salkım güvesi popülasyonunda dört farklı insektisit öldürücü konsantrasyon (LC) değerleri belirlenmiş ve bu değerler hassas popülasyonla kıyaslanarak popülasyonların direnç katsayıları hesaplanmıştır. Biyoassay çalışmalar sonucunda hesaplanan LC₅₀ değerleri hassas popülasyona göre chlorpyrifos-ethyl için Sarıgöl-2 popülasyonunda yaklaşık 6 kat, deltamethrin için Salihli popülasyonunda yaklaşık 5 kat, indoxacarb için Ahmetli popülasyonunda yaklaşık 6 kat, spinosad için Sarıbey popülasyonunda yaklaşık 6.5 kat daha fazla bulunmuş ve söz konusu popülasyonların bahsi geçen ilaçlara karşı direnç geliştirmeye başladığı tespit edilmiştir. Biyokimyasal testler sonucunda ise 10 popülasyondaki AChE, EST ve GST enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Popülasyonların GST enzim aktivitelerinde önemli bir farklılık görülmemiştir. Sarıgöl-2 popülasyonunda, AChE enzim aktivitesi hassas popülasyona göre yaklaşık 5 kat, EST enzim aktivitesi ise yaklaşık 1.5 kat oranla fazla bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Salkım güvesi, insektisit direnci, biyoassay, enzim

¹ Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG tarafından desteklenen 110O637 nolu, EBİLTEM tarafından desteklenen 2011-BİL-031 nolu projeler ile birinci yazarın doktora tezinin bir kısmını içermektedir.

² Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 35100, İzmir

³ Ankara İleri Teknoloji Yatırımları A.Ş., Ankara Teknoloji Geliştirme Bölgesi, Ankara

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: ahmet.hatipoglu@ege.edu.tr

Alınış (Received): 02.10.2014

Kabul edilmiş (Accepted): 21.01.2015

Giriş

Dünyada 7,5 milyon ha gibi geniş bir alanda yetiştirilen ve ekonomik olarak önemli meyvelerin başında gelen üzüm birçok şekilde tüketilmektedir. Taze meyve, kuru üzüm, şarap, meyve suyu, reçel, konsantre ve tohum yağları bunların başında gelmektedir. Dünya toplam üretim miktarı yılda yaklaşık 69 milyon ton olan üzümün 4 milyon tondan fazla üretimi Türkiye'deki bağ alanlarında gerçekleştirilmektedir. Çin dünya üzüm üretiminde ilk sırada yer alırken, 6. sırada yer alan Türkiye dünya üzüm üretimini % 6'sını karşılamaktadır (FAOSTAT, 2013).

Türkiye'de yoğun olarak Ege bölgesinde yetiştirilen üzümde, Salkım güvesi [*Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae)], Avrupa ülkelerinde olduğu gibi bağın ana zararlısı konumundadır. Salkım güvesi; ürünü, kalite ve kantite yönünden etkilerken, yaş üzüm ambalajlanmasında ve şarap kalitesinde sebep olduğu sorunlar neticesinde mücadelesi kaçınılmaz olan bir zararlı konumundadır.

Avrupa, Afrika, Güney Amerika ve son yıllarda Amerika'da da bulunduğu tespit edilen bu zararlı, mücadele edilmediği takdirde önemli zarar seviyelerine ulaşmaktadır. Türkiye'de de birçok üzüm yetiştiricisi ülkede olduğu gibi *L. botrana* mücadelesi geniş spektrumlu insektisitler, böcek büyüme düzenleyicileri ve biyolojik mücadele ajanları ile yapılmaktadır (Boselli & Scannavini, 2001; Marchesini & Dalla Monta, 2004; Ioriatti et al., 2008). Ekonomik olarak önemli olan bu üründe üreticiler, çoğu zaman ürünü kaybetme korkusu nedeniyle, bilinçsiz ve kontrolsüz ya da gereğinden fazla sayıda kimyasal uygulamaları yoğun bir şekilde yapmaktadırlar (Delen et al., 2004).

Salkım güvesi ile yapılan kimyasal mücadelede, Salkım güvesi ve diğer lepidopterlere karşı etkili olan birçok insektisit karşımıza çıkmaktadır. Birden fazla etkili madde ile planlanan ilaçlama programları *L. botrana* kontrolünde direnç gelişimini önlemeye yardımcı olabilmektedir. Direnç, pestisit önerildiği zararlıların popülasyonlarının baskı altına alınmasında yanlış depolama, hatalı uygulama ve uygun olmayan çevre koşulları gibi problemler dışında bir hassasiyet azalması olarak tanımlanmaktadır (Ünal & Gürkan, 2001). Farklı bir ifade şekli ise şöyledir; bir zararlıya karşı aynı pestisit veya etki mekanizması aynı olan pestisitlerin ard arda uzun süre kullanılması sonucunda, bu zararlı popülasyonunda pestisit(ler)e karşı önce hassasiyet azalışı görülür sonra da hassasiyeti az olan bireylerin popülasyonda artışı ile dayanıklı bireyler çoğalır. Daha sonra bu pestisitlere karşı dayanıklı ırk meydana gelir (Öncüler & Durmuşoğlu, 2008). Böceklerde inekisitlere karşı görülen direnç problemi, tarımsal üretimde verimliliği etkileyen önemli sorunların başlarında gelmektedir. Günümüzde 600'e yakın böcek ve akar türünün çeşitli ilaçlara karşı direnç geliştirmiş olduğu kaydedilmektedir (IRAC, 2014).

Salkım güvesi mücadelesinde her yıl yaygın ve sıkça kullanılan insektisitlere karşı direnç durumu bilinmediğinden, hem yeterli etki alınamamakta, hem de gereksiz ilaçlama yapılmaktadır. Bu da önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Diğer yandan bu ilaçlamaların neden olduğu kalıntı sorunu ihracatımız açısından da sıkıntılara neden olmaktadır. İşte bu nedenlerle, bu çalışmada, Türkiye'nin en önemli bağ alanlarına sahip Manisa ilinde, bağın ana zararlısı olan Salkım güvesi popülasyonlarının yaygın kullanılan insektisitlere karşı direnç durumu biyoassay yöntemlerle araştırılmış, direnç ile ilişkili mekanizmalar biyokimyasal yöntemlerle incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Salkım güvesi popülasyonları Manisa ilinin çeşitli ilçelerinden 2011-2012 yıllarında toplanmıştır. Denemelere başlamadan önce popülasyonların istenen birey sayısına ulaşması için üretim çalışmaları yapılmıştır. Denemelerde toplam 10 popülasyon kullanılmış ve Merkez 1 popülasyonu ilaçlama yapılmayan bir ev bahçesinden toplandığı için hassas popülasyon olarak değerlendirilmiş ve isimlendirilmiştir (Çizelge 1)

Çizelge 1. Manisa ili bağ alanlarından toplanan popülasyonlar ve kısaltma isimleri

Bağ bölgesi	Popülasyona verilen isim
Merkez1 (Hassas)	HAS
Merkez 2	MER
Ahmetli	AHM
Alaşehir	ALS
Saruhanlı	SAR
Salihli	SLH
Sarıbey	SRBY
Sarıgöl 1	SAR 1
Sarıgöl 2	SAR 2
Yeşilyurt	YY

Denemelerde kullanılan insektisit etken maddeleri olarak Chlorpyrifos ethyl (CE) (Dow AgroSciences Türkiye), Deltamethrin (DLT) (Bayer CropScience, Türkiye), Indoxacarb (INDX) (Hektaş, Türkiye) ve Spinosad (SPN) (Dow AgroSciences, Türkiye) seçilmiştir. Denemelerde söz konusu insektisitlerin teknik maddeleri üretici firmalarından temin edilerek kullanılmıştır.

Denemede kullanılan insektisit dozları

Denemelerde daha önce kullanılan dozlar dikkate alınarak %10 - %90 arasında ölüm sağlayacağı öngörülen aşağıdaki dozlar belirlenmiştir. (Çizelge 2).

Çizelge 2 Biyoassay çalışmalarda kullanılan etkili madde dozları

Etkili madde	Dozlar (ppm)					
	1	3	6	10	30	60
CE	1	3	6	10	30	60
SPN	0,1	0,3	0,6	1	3	6
INDX	0,1	0,5	1	5	10	50
DLT	0,5	1	5	10	50	100

Biyoassay testler

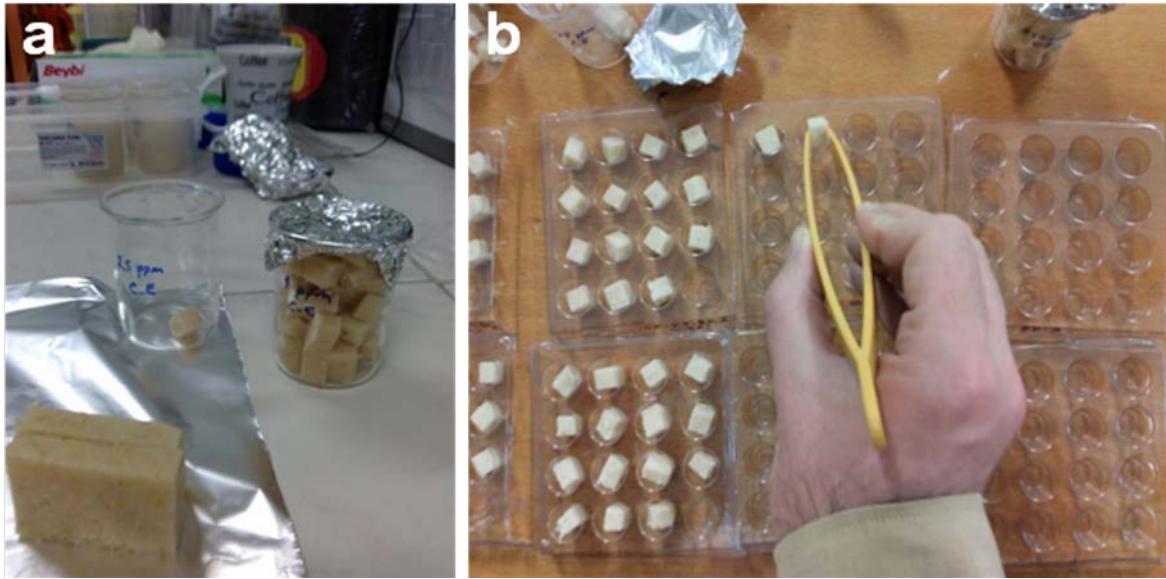
Üretimde ve denemelerde kullanılan hazır besin, Rapagnani et al. (1990)'ye göre hazırlanmıştır. Yapay besin hazırlamak için 1 lt suya agar ve mısır irmiği eklenmiştir. Daha sonra 120 °C'de 20 dk otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Otoklavdan çıkan agar - mısır irmiği - su içeren şişe karıştırıcı alete boşaltılmış, karışımın sıcaklığı 70 °C'ye düştükten sonra buğday özü ve bira mayası, sıcaklığın 60°C'ye düşmesinden sonra ise askorbik asit ve nipagin karışıma eklenmiştir. İyice karışması sağlandıktan sonra elde edilen 1 lt yapay besin donması için oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü iklim odasında üretimi yapılan toplam 10 popülasyonda “ilacı besine karıştırma yöntemi” kullanılarak biyoassay çalışmaları yürütülmüştür.

İlacın besine karıştırılması yönteminde Salkım güvesi larvalarının ilaçla homojen şekilde karışmış besinle beslendiğinde doz-ölüm ilişkisi araştırılmıştır. Besin tamamen hazır olmadan, yani hem sterilizasyon işleminden ilacın etkilenmemesi hem de ilacın besine homojen olarak karıştırılabilmesi için besin donmadan kısa bir süre önce yani besin kaplara dökülmeden önce, ilacın bozunmayacağı ve besinin akıcılığını da kaybetmeyeceği en düşük sıcaklık olan 40 °C uygun bir sıcaklık olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklığa kadar besin devamlı karıştırılmış ve uygun miktarda hazırlanan ilaçlı suyun behere eklenerek karıştırılmasıyla ilaçlı besinler elde edilmiştir.

Bu uygulama denemeden 24 saat önce yapılmış ve besinin istenen olgunluğa ulaşması için gerekli süre elde edilmiştir. Bu şekilde tüm dozlar için bu işlem ayrı beherler ve karıştırıcılar yardımıyla yapılmış, üzerlerine ilacın adı ve dozu yazılarak ilaçlı besinler hazırlanmıştır. Kontrol için ise aynı oranda distile su karıştırılmıştır.

Deneme mutlaka ilaçlı besinin hazırlanmasından 24 saat sonra yapılmıştır. Bunun için beherlerden çıkarılan besin ~1 cm³ lük besin parçalarına ayrılmış ve 16 hücreli deneme kaplarından 2 tanesine 30 adet olacak şekilde, yerleştirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. a-İlaç karıştırılmış besin, b- Besinlerin deneme hücrelerine aktarımı.

Daha sonra iklim odasından 9 gün yaşında olan larvaları içinde bulunduran besinlerden çıkarılan larvalar deneme kaplarındaki hücrelere tek tek yerleştirilerek ağız hava alabilen yapışkan kapaklarla kapatılmıştır.

Denemenin değerlendirilmesi

Denemelerde günlük gözlemler yapılmış olup, değerlendirmede sadece 72 saat sonundaki veriler kullanılmıştır. Canlı larvaların gelişimi açısından gözlemlere pupa oluncaya kadar devam edilmiştir.

LC₅₀-LC₉₀ değerlerinin ve direnç katsayılarının hesaplanması

Biyoassay test sonuçlarında elde edilen değerler PoloPlus (Leora Software, 1987) programı kullanılarak LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri hesaplanmıştır. Direnç katsayısının hesaplanması için her etkili madde için popülasyonların LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri hassas popülasyondan elde edilenler ile kıyaslanmıştır.

Biyokimyasal testler

Tüm popülasyonlar için yapılan biyoassay çalışmaları esnasında kullanılan larvalardan biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere her popülasyondan en az 20 adet 9 gün yaşında larva -20°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Biyokimyasal testler enzim analizlerine yönelik olduğu ve enzim kaynağının sıcakta bozunmaması için çalışmalar klimalı bir ortamda ve 18 °C'de ve örnekler daima buz üzerinde bekletilerek çalışılmıştır.

Salkım güvesi ile daha önce yapılmış biyokimyasal test çalışması bulunmadığı için Salkım güvesi ile aynı familyada (Tortricidae) yer alan Elma iç kurdu (*Cydia pomonella* L.) ile yapılan çalışmalardan faydalanılmıştır (Reyes et al., 2007; Qian et al., 2008; Rodríguez et al., 2011a.; 2011b). O çalışmalardan hareketle, biyokimyasal testlerde 4 farklı enzim analizi için 4 farklı yöntemden yararlanılmıştır. Esteraz (EST), Glutathion S-transferaz (GST) ve P450 enzimleri ile Asetilkolinesteraz (AChE) testi için 2 enzim kaynağı kullanılmıştır.

EST, GST ve P450 enzim preparasyonu ve aktivitelerinin belirlenmesi

Enzim kaynağı hazırlanması

Salkım güvesi'nin detoksifikasyon enzimlerinin ölçülmesinde Qian et al. (2008)'den alınan enzim preparasyon yöntemi uyarlanarak kullanılmıştır. Buna göre, Salkım güvesi'nin 9 günlük 3 larvası 1 ml homojenasyon tamponu [0,1 M sodium phosphate buffer, pH 7,6 ve 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM 1,4-dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethyl sulfonylfluoride (PMSF) ve 1 mM phenylthiourea (PTU) içeren] içerisinde homojenize edilmiştir. Önce 21.380 rcf'de 20 dk +4°C'de santrifüj yapıldıktan sonra üstte kalan kısım alınıp daha sonra 30.790 rcf'de 20 dk daha +4°C'de santrifüj yapılmıştır. Üstte kalan temiz kısım alınarak 1.5 ml tüp içine konmuş ve hemen buz üzerine konularak esteraz, P 450 ve GST analizi için enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

EST analizi

EST enzim aktivitesinin belirlenmesi için Han et al. (1998) metodundan yararlanılmıştır. Buna göre, mikroplaka hücrelerinin herbirine substrat olarak 90 µl 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,6) ve 200 µl solüsyon karışımı (10 mM 1-naphthyl asetat ve 4 mM fast blue RR salt) konulmuştur. Reaksiyon, stok solüsyondan 10 µl enzim kaynağı ilave edilerek başlatılmıştır. EST enzim aktivitesi, "Versamaxmikroplaka okuyucu" (Molecular Devices, USA)'da 27 °C ve 450 nm dalga boyunda 10 s aralıklarla 10 dk boyunca kinetik okuma yapılarak elde edilmiş ve optical density (OD) değerleri belirlenmiştir.

GST analizi

GST enzim aktivitesinin belirlenmesi için Oppenoorth (1979) metodundan yararlanılmıştır. Buna göre, substrat olarak hem 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) hem de 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) kullanılmıştır. Reaksiyon, CDNB ile yapılacağı durumda; mikroplakanın her bir hücresine stok solüsyondan 10 µl enzim kaynağı, 90 µl 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,6), 100 µl 6 mM CDNB ve 100 µl 6 mM glutathione (GSH) konmuş, DCNB ile reaksiyon başlatılmak istendiğinde ise mikroplakanın her bir hücresine stok solüsyondan 100 µl enzim kaynağı, 100 µl 1,2 mM DCNB ve 100 µl 6 mM GSH konulmuştur. GST enzim aktivitesinin ölçülmesi mikroplaka okuyucuda 27 °C ve 340 nm dalga boyunda 10 s aralıklarla 10 dk boyunca kinetik okuma yapılmış ve elde edilen OD değerleri belirlenmiştir.

P450 analizi

P450 enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Hansen & Hodgson (1971) metodundan yararlanılmıştır. Buna göre, mikroplaka hücrelerinin herbirine stok solüsyondan 90 µl enzim kaynağı, substrat olarak 100 µl 2mM p-nitroanisol (PNOD) karıştırılmıştır. 27 °C'de 2 dk inkübe ettikten sonra 10 µl 9,6 mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. P450 enzim aktivitesinin ölçülmesi mikroplaka okuyucuda 27 °C ve 405 nm dalga boyunda 10 s aralıklarla 10 dk boyunca kinetik okuma yapılarak elde edilmesi amaçlanmıştır.

AChE enzim preparasyonu ve aktivitesinin belirlenmesi

Enzim kaynağı hazırlanması

Asetilkolinesteraz aktivitesinin belirlenmesinde Stumpf et al. (2001) yöntemi uyarlanarak kullanılmıştır. Salkım güvesinin 9 günlük 3 adet larvası eppendorf tüp içinde bulunan % 0,1 Triton X-100 içeren 0,1 M fosfat tamponu (1ml, pH:7,5) içinde plastik ezici çubuklarla homojenize edilmiştir. Buz içinde 25 dakika dokuların çözülmesi beklendikten sonra, homojenat +4°C de 11.490 rcf'de, 25 dakika santrifüj edilerek elde edilen supernatant enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere yine buz içine alınmıştır.

AChE analizi

AChE aktivitesini ölçmek için mikroplaka hücrelerine 100 µl Acetylthiocholine iodide (ATChI), 100 µl 5.5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ve 50 µl fosfat buffer ve 50 µl enzim solüsyonu konulmuştur. 300 µl'lik final konsantrasyonunda herbir maddenin miktarı 0,5 mM olmuştur. AChE aktivitesi mikroplaka okuyucuda 23 °C ve 405 nm' de 20 dakika okunmuştur.

Enzimlerin toplam protein miktarı içindeki oranının tespiti

Tüm enzim analizleri sonucunda, herbir enzim kaynağı BSA'nın standart olarak kullanıldığı Bradford (1976) yöntemi kullanılarak, popülasyonlardaki EST, GST, P450 ve AChE enzim aktivitelerinin toplam protein miktarları içindeki oranı tespit edilmiştir.

Araştırma Bulguları

Biyosay test sonuçları

Manisa ili bağ alanlarından toplanan farklı Salkım güvesi popülasyonlarında 4 etkili madde kullanılarak besine karıştırma yöntemi ile yapılan biyosay test sonucunda hesaplanan LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri etkili maddelere göre Çizelge 3, 4, 5 ve 6'da verilmiştir.

Chlorpyrifos ethyl ile yapılan biyosay çalışmalar sonucunda hassas popülasyona göre belirlenen direnç katsayısı ve popülasyonların LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri Çizelge 3'te görülmektedir.

Çizelge 3. Farklı salkım güvesi popülasyonlarında chlorpyrifos ethyl ile besine karıştırma yöntemiyle yapılan biyosay testlerinden elde edilen LC, heterojenite, eğim ve chi kare değerleri ile direnç katsayıları

P ¹	N ²	LC50(ppm) 0.95 Güven Aralığı	LC90(ppm) 0.95 Güven Aralığı	H ³	Eğim±sh ⁴	χ ² ⁵	Direnç Katsayısı LC50	Direnç Katsayısı LC90
HAS	180	3,014 (2,384-3,673)	7,164 (5,671-10,209)	0,32	3,408±0,501	1,289	1,00	1,00
AHM	180	5,607 (3,497-8,966)	17,232 (10,370-58,149)	1,73	2,628±0,353	6,904	1,86	2,41
ALŞ	180	9,758 (7,566-12,741)	39,321 (27,094-69,137)	0,89	2,117±0,266	3,567	3,24	5,49
MER	180	4,044 (3,093-5,152)	14,311 (10,400-23,367)	0,90	2,335±0,320	3,588	1,34	2,00
SAR	180	8,620 (5,012-15,687)	33,465 (17,742-156,657)	2,00	2,175±0,271	7,993	2,86	4,67
SLH	180	8,056 (6,308-10,076)	19,259 (14,474-32,546)	0,69	3,385±0,622	2,753	2,67	2,69
SRBY	180	12,397 (6,771-25,314)	69,594 (31,709-508,630)	1,86	1,710±0,222	7,432	4,11	9,71
SRG1	180	10,953 (8,552-14,008)	33,466 (24,363-54,417)	0,62	2,642±0,359	2,464	3,63	4,67
SRG2	180	17,963 (10,992-30,660)	40,500 (25,162-141,258)	2,27	3,630±0,483	9,075	5,96	5,65
YY	180	16,277 (12,589-21,627)	65,145 (43,939-119,241)	0,52	2,128±0,270	2,081	5,40	9,09

¹ Popülasyon

² Larva sayısı

³ Heterojenite

⁴ Standart hata

⁵ chi kare

Hassas popülasyon için LC₅₀ değeri 3,014 ppm iken en yakın değer MER popülasyonunda 4,044 ppm, en yüksek değer de SRG2 popülasyonunda 17,963 ppm olarak bulunmuştur. Hassas popülasyon dışındaki popülasyonların Chlorpyrifos ethyl için elde edilen LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerinin hassas popülasyondaki değerlerle oranlanması sonucu ortaya çıkan direnç katsayılarına göre duyarlılık kayıpları en yüksek 3 popülasyon; LC₅₀ değerlerine göre sırasıyla SRG2 5,96; YY 5,40; SRBY 4,11 kat; LC₉₀ değerleri için ise SRBY 9,71; YY 9,09; SRG2 5,65 kat olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre Chlorpyrifos ethyl'e karşı en fazla hassasiyet azalması (LC₅₀ değerlerine göre) yaklaşık 6 kat ile SRG2 popülasyonunda görülmüştür (Çizelge 3)

Deltamethrin ile yapılan biyoassay çalışmalar sonucunda hassas popülasyona göre belirlenen direnç katsayısı ve popülasyonların LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri Çizelge 4'de görülmektedir.

Çizelge 4 Farklı salkım güvesi popülasyonlarında deltamethrin ile besine karıştırma yöntemiyle yapılan biyoassay testlerinden elde edilen LC, heterojenite, eğim ve chi kare değerleri ile direnç katsayıları

P	n	LC50(ppm) 0.95 Güven Aralığı	LC90(ppm) 0.95 Güven Aralığı	H	Eğim±sh	χ ²	Direnç Katsayısı LC50	Direnç Katsayısı LC90
HAS	180	4,278 (3,040-5,992)	23,073 (14,873-43,816)	0,26	1,751±0,215	1,028	1,00	1,00
AHM	180	16,172 (8,843-32,669)	157,527 (66,015-848,806)	1,10	1,296±0,164	4,391	3,78	6,83
ALŞ	180	11,347 (6,561-18,629)	49,993 (28,361-146,086)	1,06	1,99±0,277	4,227	2,65	2,17
MER	180	6,593 (4,567-9,490)	45,768 (28,135-92,736)	0,25	1,523±0,181	1,002	1,54	1,98
SAR	180	18,067 (11,596-28,683)	68,847 (40,591-181,083)	1,03	2,206±0,288	4,134	4,22	2,98
SLH	180	21,071 (13,287-36,697)	321,040 (141,736-1227,683)	0,95	1,083±0,150	3,799	4,93	13,91
SRBY	180	16,979 (8,067-39,668)	103,099 (43,057-887,645)	1,97	1,636±0,208	7,881	3,97	4,47
SRG1	180	19,139 (5,380-155,757)	201,945 (47,100±204155,079)	3,68	1,252±0,166	14,70	4,47	8,75
SRG2	180	14,062 (9,651-21,027)	111,220 (63,647-257,184)	0,39	1,427±0,175	1,566	3,29	4,82
YY	180	12,002 (8,340-17,539)	84,459 (50,475-180,201)	0,41	1,512±0,181	1,653	2,81	3,66

Hassas popülasyon dışındaki popülasyonların deltamethrin için elde edilen LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerinin hassas popülasyondaki değerlerle oranlanması sonucu ortaya çıkan direnç katsayılarına göre duyarlılık kayıpları en yüksek 3 popülasyon; LC₅₀ değerlerine göre sırasıyla SLH 4,93; SAR 4,22; SRG1 4,47 kat; LC₉₀ değerleri için ise SLH 13,91; SRG1 8,75; AHM 6,83 kat olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre deltamethrine karşı en fazla hassasiyet azalması (LC₅₀ değerlerine göre) yaklaşık 5 kat ile SLH popülasyonunda görülmüştür (Çizelge 4).

Indoxacarb ile yapılan biyoassay çalışmalar sonucunda hassas popülasyona göre belirlenen direnç katsayısı ve popülasyonların LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri Çizelge 5'da görülmektedir.

Çizelge 5. Farklı Salkım güvesi popülasyonlarında indoxacarb ile besine karıştırma yöntemiyle yapılan biyoassay testlerinden elde edilen LC, heterojenite, eğim ve chi kare değerleri ile direnç katsayıları

P	n	LC50(ppm) 0.95 Güven Aralığı	LC90(ppm) 0.95 Güven Aralığı	H	Eğim±sh	χ ²	Direnç Katsayısı LC50	Direnç Katsayısı LC90
HAS	180	2,269 (0,999-5,076)	14,077 (6,015-112,571)	2,07	1,617±0,204	8,264	1,00	1,00
AHM	180	13,495 (9,382-21,012)	77,494 (43,071-208,088)	0,64	1,688±0,250	2,579	5,95	5,51
ALŞ	180	7,768 (3,641-21,720)	38,629 (15,705-633,848)	2,25	1,840±0,257	8,982	3,42	2,74
MER	180	2,815 (1,272-6,746)	21,220 (8,346-186,630)	1,94	1,461±0,178	7,779	1,24	1,51
SAR	180	2,298 (1,566-3,221)	9,303 (6,214-17,376)	0,85	2,110±0,318	3,393	1,01	0,66
SLH	180	2,471 (1,291-4,816)	14,065 (6,698-65,306)	1,55	1,697±0,209	6,210	1,09	1,00
SRBY	180	6,767 (3,271-17,551)	42,264 (16,610-507,547)	1,90	1,611±0,217	7,606	2,98	3,00
SRG1	180	5,684 (2,980-11,917)	23,313 (11,305-153,569)	1,86	2,091±0,289	7,426	2,51	1,66
SRG2	180	2,594 (0,783-9,556)	28,040 (8,115-2025,002)	2,87	1,240±0,163	11,494	1,14	1,99
YY	180	2,400 (1,002-5,909)	25,477 (9,144-308,823)	1,81	1,249±0,162	7,241	1,06	1,81

Hassas popülasyon dışındaki popülasyonların Indoxacarb için elde edilen LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerinin hassas popülasyondaki değerlerle oranlanması sonucu ortaya çıkan direnç katsayılarına göre duyarlılık kayıpları en yüksek 3 popülasyon; LC₅₀ değerlerine göre sırasıyla AHM 5,95; ALŞ 3,42; SRBY 2,98 kat; LC₉₀ değerleri için ise AHM 5,51; SRBY 3,00; ALŞ 2,74 kat olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre Indoxacarb'a karşı en fazla hassasiyet azalması (LC₅₀ değerlerine göre) yaklaşık 6 kat ile AHM popülasyonunda görülmüştür (Çizelge 5).

Spinosad ile yapılan biyoassay çalışmaları sonucunda hassas popülasyona göre belirlenen direnç katsayısı ve popülasyonların LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri Çizelge 6'de görülmektedir.

Çizelge 6. Farklı Salkım güvesi popülasyonlarında spinosad ile besine karıştırma yöntemiyle yapılan biyoassay testlerinden elde edilen LC, heterojenite, eğim ve chi kare değerleri ile direnç katsayıları

P	n	LC50(ppm) 0.95 Güven Aralığı	LC90(ppm) 0.95 Güven Aralığı	H	Eğim±sh	χ ²	Direnç Katsayısı LC50	Direnç Katsayısı LC90
HAS	180	0,589 (0,470-0,735)	1,740 (1,295-2,2743)	0,48	2,723±0,368	1,908	1,00	1,00
AHM	180	1,665 (0,972-3,327)	5,721 (2,977-34,057)	2,24	2,391±0,306	8,963	2,83	3,29
ALŞ	180	0,796 (0,469-1,417)	2,806 (1,539-12,298)	2,04	2,342±0,294	8,146	1,35	1,61
MER	180	0,797 (0,654-0,988)	2,030 (1,524-3,237)	0,96	3,157±0,457	3,853	1,35	1,17
SAR	180	1,693 (1,287-2,301)	7,850 (5,063-15,689)	0,81	1,924±0,255	3,221	2,87	4,51
SLH	180	0,868 (0,707-1,079)	2,303 (1,722-3,642)	0,59	3,023±0,417	2,374	1,47	1,32
SRBY	180	3,773 (3,082-4,569)	7,368 (5,785-12,085)	0,83	4,409±0,913	3,325	6,41	4,23
SRG1	180	0,665 (0,527-0,838)	2,123 (1,552-3,429)	0,46	2,541±0,335	1,847	1,13	1,22
SRG2	180	0,812 (0,392-1,659)	4,065 (1,903-36,585)	2,35	1,832±0,240	9,401	1,38	2,34
YY	180	0,727 (0,410-1,277)	4,004 (2,032-18,278)	1,55	1,730±0,224	6,181	1,23	2,30

Hassas popülasyon dışındaki popülasyonların spinosad için elde edilen LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerinin hassas popülasyondaki değerlerle oranlanması sonucu ortaya çıkan direnç katsayılarına göre duyarlılık kayıpları en yüksek 3 popülasyon; LC₅₀ değerlerine göre sırasıyla SRBY 6,41, SAR 2,87, AHM 2,83 kat; LC₉₀ değerleri için ise SAR 4,51, SRBY 4,23, AHM 3,29 kat olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre Spinosada karşı en fazla hassasiyet azalması (LC₅₀ değerlerine göre) yaklaşık 7 kat ile SRBY popülasyonunda görülmüştür (Çizelge 6).

Bu çalışma sonucunda direnç katsayıları hassas popülasyon olarak seçilen HAS popülasyonundan elde edilen değerler ile kıyaslanarak elde edilmiş ve test edilen popülasyonların direnç düzeyleri çok yüksek olmadığı saptanmıştır. Bu durumun hassas popülasyon olarak seçilen Merkez 1 den kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Gelecekte yapılacak yeni çalışmalarda hassas popülasyon olarak uzun süredir ilaçsız ortamda laboratuvarında üretimi yapılan ve hassasiyeti bilinen bir popülasyon kullanılması durumunda direnç katsayılarında daha yüksek rakamların tespit edilmesinin yüksek ihtimal olduğu düşünülmektedir. Örneğin, Charmillot et al. (2003) İsviçre Cenevre Gölü yakınlarından topladıkları Salkım güvesi popülasyonlarında indoxacarb için LC₅₀ değerini 0.3 ppm olarak, yani bu projedeki hassas popülasyonun LC₅₀ değerinden yaklaşık 8 kat daha düşük bulmuştur. Bu durum kullanılan hassas popülasyonun hassasiyet durumu hakkında bize bazı fikirler vermektedir. Bizim çalışmamızda kullanılan besine karıştırma yöntemi ile İtalya'da yapılan başka bir çalışmada elde edilen sonuçlar ise bu konuda daha iyi fikir vermektedir. Civolani et al. (2014) İtalya'da bulunan uzun yıllardır üretimi devam eden bir hassas popülasyonda indoxacarb için LC₅₀ değerini 0.177 ppm olarak, yani bu projedeki hassas popülasyonun LC₅₀ değerinden yaklaşık 13 kat daha düşük bulmuştur.

Biyokimyasal test sonuçları

Biyokimyasal testlerin 3 tanesinde olumlu sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen P450 enzim kaynağının tespitinde yapılan birçok teste rağmen değerlendirilebilecek hiçbir bir sonuç elde edilememiştir. Ayrıca GST analizinde DCNB substrat olarak kullanıldığında hiçbir sonuç alınamamıştır. GST analizleri CDNB kullanılarak yapılmıştır. P450 dışında diğer 3 enzim ölçümlerinde elde edilen sonuçlar ve elde edilen enzim aktivitesi sonuçları hassas popülasyona göre oranlanarak katsayı değerleri de Çizelge 7'de verilmiştir. Popülasyonların enzim aktiviteleri değerleri ile hassas popülasyondan elde edilen değerler arasında kayda değer bir farklılık görülmemiştir. Hassas popülasyona göre diğer popülasyonların enzim değerlerinin oranlanmasıyla elde edilen veriler bu durumu açıklamaktadır (Çizelge 7).

Çizelge 7. Farklı Salkım güvesi popülasyonlarında AChE, GST ve EST enzim aktiviteleri ile bunların hassas popülasyona göre katsayıları

Popülasyon	AChE		GST		EST	
	mOD/min/mg	Katsayı	mOD/min/mg	Katsayı	mOD/min/mg	Katsayı
HASSAS	0,054	1,00	23,284	1,00	7,138	1,00
AHM	0,094	1,73	21,170	0,91	7,872	1,10
ALS	0,120	2,21	16,825	0,72	7,708	1,08
MER	0,130	2,40	25,000	1,07	10,044	1,41
SAR	0,112	2,05	24,971	1,07	8,683	1,22
SLH	0,098	1,80	20,413	0,88	7,301	1,02
SRBY	0,133	2,44	23,012	0,99	7,187	1,01
SRG1	0,125	2,30	20,224	0,87	7,023	0,98
SRG2	0,264	4,85	23,285	1,00	10,729	1,50
YY	0,174	3,19	23,600	1,01	10,101	1,41

Çizelge 7'de görülmektedir ki en dikkat çekici farklılıklar AChE enzim katsayılarında görülmektedir. SRG2 ve YY popülasyonları hassas popülasyona göre sırasıyla 4,85 ve 3,19 kat daha fazla AChE enzim aktivitesi göstermiştir. Diğer popülasyonlardan elde edilen AChE enzim aktivitesi değerleri ise hassas popülasyona göre 1,73 kat ile 2,44 kat arasında değişen değerler almıştır. En düşük AChE enzim aktivitesi değeri hassas popülasyonda görülmüştür.

EST enzim aktivitesi açısından ise, SRG1 ve hassas popülasyonun en düşük değerleri gösterdiğini söylemek mümkündür. En yüksek değerler ise hassas popülasyona göre 1,50 ve 1,41 kat ile sırasıyla SRG2 ve YY popülasyonlarında görülmüştür.

SRG2 ve YY popülasyonlarının hem AChE enzim değerleri açısından hem de EST enzim değerleri açısından en yüksek ilk 2 popülasyon olması ve diğer popülasyonlardan yüksek direnç katsayılarına sahip olması ile dikkat çekicidir.

Çizelge 3'te chlorpyrifos-ethyl için elde edilen LC₅₀ değerlerine bakıldığında ise AChE enzim aktivitesi değerleri ile paralellik gösterdiği görülmektedir. Hassas popülasyon ile oranlandığında yaklaşık 6 kat daha fazla LC₅₀ değerine sahip olan SRG2 ve YY popülasyonları, Çizelge 8'de görüldüğü gibi, AChE enzim aktivitesi değerlerinde de hassas popülasyona göre sırasıyla 4,85 ve 3,19 kat daha fazla enzim aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. AChE enzim aktivitesi ile chlorpyrifos-ethyl için elde edilen LC₅₀ değerlerinin korelasyon analizi sonucunda r=0,85 rakamı elde edilmiştir ki bu rakam da enzim miktarı ile LC₅₀ değerleri arasında kuvvetli bir pozitif ilişki olduğunu göstermektedir. Diğer yandan EST enzim aktivitesi sonuçlarında da; biyoassay test sonuçlarında chlorpyrifos-ethyl için elde edilen LC₅₀ değerleri ile paralellik görülmektedir. En yüksek değeri alan iki popülasyon olarak yine karşımıza SRG2 ve YY popülasyonları çıkmaktadır. Hassas popülasyona göre katsayı oranları 1,5 kat civarında olmasına rağmen diğer popülasyonlardan, değerlerine bakıldığında farklılık göstermeleri sonucunda ayrılmaktadırlar (Çizelge 7).

Literatürde, Salkım güvesi ile yapılmış enzim aktivitesi tespiti çalışması olmamasına rağmen aynı familyadan olan Elma içkurdu ile yapılmış çalışmalar enzimler ve direnç ilişkileri hakkında fikir vermektedir.

Rodríguez et al. (2011a) İspanya elma bahçelerinden topladığı Elma iç kurdu popülasyonlarında insektisitlere karşı direnç gelişimini araştırdığı çalışmada; insektisitlerin etkinliğinin enzim aktivitesine önemli ölçüde bağlı olduğunu bildirmiş ve İspanya'dan toplanan popülasyonlarda yapılan çalışmalar sonucunda bölgede en çok kullanılan üç insektisit için (azinphos-methyl, fenoxycarb ve fosalon) EST ve GST aktivitesine bağlı olarak insektisit direncine sahip popülasyonların olduğu sonucuna varmışlardır.

Ayrıca yapılan diğer iki çalışmada da İspanya'da Elma iç kurdu popülasyonlarında tespit edilen yüksek AChE seviyesinin organikfosforlu ve karbamatlı insektisitlere karşı böceklerde duyarlılığı azalttığını bildirilmiştir (Reyes et al., 2007;. Reyes & Sauphanor, 2008).

Elma içkurdu için yapılan diğer çalışmalarda da insektisitlerin, detoksifikasyon enzimi olan EST aktivitesi ile yakından ilgili olduğu görülmektedir. Arjantin'de (Solenio et al., 2003, 2004, 2008) ve İspanya'da (Rodriguez et al., 2011b) yapılan çalışmalarda elde edilen yüksek seviyelerdeki EST enzim aktivitesinin organikfosforlara karşı direnç ile ilgili olduğunu bildirilmiştir.

GST enzim aktivitesi sonuçlarına bakıldığında ise en düşük değer ALS popülasyonunda görülmüştür. Bunun dışında 4 popülasyonda da hassas popülasyona göre daha düşük değerler görülürken diğer 4 popülasyonun da hemen hemen hassas popülasyon ile aynı değere sahip oldukları görülmektedir (Çizelge 7). GST enzim analizleri sonuç olarak herhangi bir katsayı ile dikkat çekmemektedir.

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen direnç oranlarının çok yüksek düzeyde olmadığı tespit edilmiştir. Ancak biyoassay test sonuçlarında ve biyokimyasal test sonuçlarında elde edilen verilerin paralellik göstermesi önemli bir bulgu olmuştur. Hassas popülasyonun seçimi ile değişebilecek sonuçlar elde edilmiş olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak Manisa İli bağ alanlarında salkım güvesi popülasyonlarında yaygın kullanılan insektisitlere karşı bir direnç gelişimi başladığını söylemek mümkündür.

Teşekkür

Bu çalışmayı, 110O637 nolu proje kapsamında maddi olarak destekleyen TÜBİTAK-TOVAG kurumuna ve 2011-BİL-031 nolu proje kapsamında destekleyen EBİLTEM'e teşekkür ederiz.

Yararlanılan Kaynaklar

- Boselli, M. & M. Scannavini, 2001. lotta alla tignoletta della vite in emilia romagna. *Informatore Agrario*, 19: 97–100.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Charmillot, P.J., D. Pasquier & S. Verneau, 2003. Effectiveness of different insecticides incorporated into artificial diets on larvae of the grapevine moth *Lobesia botrana* and the grape berry moth *Eupoecilia ambiguella*. *Integrated Protection and Production in Viticulture (Appendix) IOBC/wprs Bulletin*, 26 (8-1) 1-5.
- Civolani, S., M. Boselli, A. Butturini, M. Chicca, E.A. Fano & S. Cassanelli, 2014. Assessment of insecticide resistance of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) in Emilia-Romagna Region. *Journal of Economic Entomology*, 107 (3):1245-1249.
- Delen, N., C. Koplay, M. Yıldız, N. Güngör, P. Kınay, F. Yıldız & A. Çoşkuntuna, 2004. Sensitivity in *Botrytis cinerea* isolates to some fungicides with specific mode of action. XIII. Botrytis Symposium, 25-31 October 2004, Antalya. Abstracts, 131.
- FAOSTAT, 2013. Grape production of the world. (Web sayfası: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>) (Erişim tarihi: 18 Nisan 2013).
- Han, Z.J., G.D. Moores, A.L. Devonshire & I. Denholm, 1998. Association between biochemical markers and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 62: 164–171.
- Hansen, L. & G.E. Hodgson, 1971. Biochemical characteristics of insect microsomes N-and O-demethylation, *Biochemical Pharmacology*, 20: 1569–1573.
- Ioriatti, C., A. Lucchi, & B. Bagnoli, 2008. "Grape Areawide Pest Management in Italy, 208–225". In: *Areawide Pest Management: Theory and Implementation*, (Eds: O. Koul, G. Cuperus & N. Elliot) CABI, Wallingford, UK, 590p.
- IRAC, 2014. Resistance Definition, Background, Development. (Web sayfası: <http://www.irac-online.org/about/resistance/>) (Erişim tarihi: 14 Şubat, 2014)
- LeOra Software, 1987. POLO-PC Probit and logic analysis. LeOra, Berkeley, CA.
- Marchesini, E. & L. Dalla Montà, 2004. Nel veneto quattro generazioni di tignoletta della vite. *L'Informatore Agrario*, 60 (4): 75-78.

- Oppenoorth, F.J., 1979. Glutathione-S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of house fly and their influence on resistance, *Pesticide Biochemical Physiology*, 11: 176–178.
- ncer, C. & E. Durmuşoğlu, 2008. Tarımsal Zararlılarla Savař Yntemleri ve İlaçları. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, Aydın, No:28, 472 s.
- Qian, G.C., J. Song, Q. Yin, & Z. Han, 2008. Biochemical mechanisms conferring cross resistance between tebufenozide and abamectin in *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 91:175–179.
- Rapagnani, M. R., V. Cafferelli, M. Barlettoni & F. Mineli, 1990. Descrizione di un alleuamento in laboratorio, dele tignolotta dell'ura *Lobesia botrana* Den.-Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) su on nuova alimento semi-sintetica, *Bolletino dell Istituto di Entomologia 'Guido Grandi' dell Universito di Bologna*, XLIV: 57-64.
- Reyes, M., P. Frank, J.P. Charmillot, C. Ioriatti & J. Olivares, 2007. Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Management Science*, 63: 890–902.
- Reyes, M. & B. Sauphanor, 2008. Resistance monitoring in codling moth: a need for standardization. *Pest Management Science*, 64: 945–953.
- Rodriguez Garcia, M., T. Marques, A.D. Bosch Serra & J.T. Avilla Hernandez, 2011a. Assessment of insecticide resistance in eggs and neonate larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100 (2): 151-159.
- Rodríguez, M.A., D. Bosch & J. Avilla, 2011b. Resistance of Spanish codling moth (*Cydia pomonella*) populations to insecticides and activity of detoxifying enzymatic systems. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 138 (3): 184–192.
- Soleno, J., C. Montagna, L. Anguiano, L. Cicho'n, D. Fernandez & A. Pechen-D'Angelo, 2003. Toxicidad de esfenvalerato y metil azinfos en poblaciones de larvas post-diapausantes de *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) del alto valle de Río Negro y Neuque'n. Resu'menes XXV Congreso Nacional de Entomología, (November, 26–28), Chile, 60p.
- Soleno, J., L. Anguiano, A. Pechen-D'Angelo & C. Montagna, 2004. Tolerancia a metil azinfos en una poblacio'n de larvas postdiapausantes de *Cydia pomonella* en el alto valle de Río Negro y Neuque'n. Resu'menes XXVI Congreso Nacional de Entomología, Chile, (December, 1–3), p. 8
- Soleno, J., L. Anguiano, A. Pechen de D'Angelo, L. Chicho'n, D. Fernandez, & C. Montagna, 2008. Toxicological and biochemical response to azinphos-methyl in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) among orchards from the Argentinian Patagonia. *Pest Management Science*, 64: 964–970.
- Stumpf, N., C. Zebitz, W. Kraus, G.D. Moores & R. Nauen, 2001. Resistance to organophosphates and biochemical genotyping of acetylcholinesterases in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 69: 131-142.
- nal, G. & M.O. Gürkan, 2001. İnektisitler Kimyasal Yapıları, Toksikolojileri ve Ekotoksikolojileri, 1. Baskı, Ethemđlu Ofset Matbaacılık, Ankara, 159 s.