

# Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

## Comparison of nicotinic acetylcholine receptor genes in *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) populations

*Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) popülasyonlarında nikotinik asetilkolin reseptör genlerinin karşılaştırılması

Gül SATAR<sup>a\*</sup>, M. Rifat ULUSOY<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Çukurova University, Biotechnology Research and Application Center, Balcalı, Adana, Turkey

<sup>b</sup>Çukurova University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Balcalı, Adana, Turkey

### ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.704856](https://doi.org/10.16955/bitkorb.704856)

Received : 16.03.2020

Accepted : 14.05.2020

Keywords:

nAChR, neonicotinoid, phylogenetic analyses, whitefly

\* Corresponding author: Gül SATAR

✉ [satarg@cu.edu.tr](mailto:satarg@cu.edu.tr)

### ABSTRACT

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) mediate fast cholinergic synaptic transmission in the insect nervous system. Neonicotinoid group insecticides target these receptors, causing mortality at the insects. Phylogenetic relationship was revealed comparing nAChR  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ , and  $\alpha 4$  genes for the some *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) populations belonging to East Mediterranean Region. Five *B. tabaci* populations collected from Karataş-*Gossypium hirsutum* (Adana), Aydınçık-*Solanum lycopersicum*, Erdemli-*S. lycopersicum*, (Mersin), Samandag-*Cucumis sativus* (Hatay), and Kumluca-*Capsicum annum* (Antalya) were used for the experiment. When nAChR  $\alpha 1$ , 3, and 4 genes were compared for all populations, no differences were determined for the  $\alpha 1$  gene. However, V147I, A227T, and T534I unique amino acid changes in all populations according to the reference gene (full  $\alpha 3$ ) in the  $\alpha 3$  gene, S401G in Aydınçık, and G198E in all populations according to a reference gene (full  $\alpha 4$ ) were determined. Phylogenetic tree results indicate that each novel isolates were clustered its own gene group of representative isolates deposited from NCBI. The obtained results could shed light on the projects that can be carried out in the future regarding the point mutation-based resistance to the neonicotinoid group insecticides.

### GİRİŞ

Pamuk beyazsineği, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) tarla ve sera ürünlerinde zarar yapan en önemli zararlılardan biridir (Bayhan et al. 2006, Karut 2007, Van Lenteren and Noldus 1990). Zararlı, bitkilere emgi yaparak ve fumajine neden olarak zarar verirken, virüslere vektörlük ederek de önemli zararlara neden olur (Brown et al. 1995, Byrne and Bellows 1991).

*B. tabaci* mücadelesinde en sık kullanılan insektisit gruplarından biri neonikotinoidlerdir. Bu yoğun kullanım 2018 yılında Avrupa'da imidacloprid, clothianidin ve thiamethoxamın bal arılarına ve çevreye olumsuz etkilerinden dolayı sera dışındaki alanlarda yasaklanmasına neden olmuştur (Jactel et al. 2019). Türkiye'de de acetamiprid hariç bu grup insektisitlere aynı yıl sınırlama getirilmiştir (TAB

2018). Yoğun insektisit kullanımının çevresel birçok olumsuz etkilerinin yanında, zararlıya karşı kullanılan etken maddeye karşı oluşan direnç da önemli bir sorundur. *B. tabaci*'de İsrail, Çin, İspanya ve Türkiye'de neonikotinoid grubu insektisitlere yüksek düzeylerde direnç belirlenmiştir (Satar et al. 2018, Wang et al. 2018). Neonikotinoid grubu insektisitlerin direnç mekanizmasının monooksijenaz enzimi ile ilgili olduğu belirlenmiştir (Karunker et al. 2008, Nauen et al. 2013, Roditakis et al. 2011). Bu enzimin yanı sıra farklı zararlılarda nikotinik asetil kolin reseptör (nAChR) genlerindeki nokta mutasyonlardan dolayı da neonikotinoid grubu insektisitlere direnç olabileceği ortaya çıkarılmıştır (Bass et al. 2011, Tan et al. 2003, Zewen et al. 2003).

Tüm neonikotinoidler, postsinaptik nikotinik asetilkolin reseptörlerinin agonisti olarak böcek sinir sistemi üzerinde etkili olurlar (Nauen and Denholm 2005). Nikotinik asetil kolin reseptörleri farklı kombinasyonlarda 5 alt ünitelerden oluşmaktadır (Bass et al. 2011). Bu kombinasyonlar içerisinde reseptörlerde beş alt ünite sadece aynı alpha alt ünitesinden oluşabileceği gibi (homomerik), beta ve alpha üniteleri karışık olarak da (heteromerik) bulunabilir (Boffi et al. 2007). Bu alt üniteler sistein (C) ile başlayıp C ile biten 15 aminoasitlik bir bölge, benzer alt ünite dizilimi, 6 adet reseptör bağlanmasında etkin loop (loop A-F), aminoasit dizilerinde benzerlik, dört transmembran bölge (TM1-TM4), fosforilasyon bölgeleri gibi yapısal özelliklere sahiptirler (Jones and Sattelle 2010).

Böceklerde nAChR merkezi sinir sisteminin neuropil bölgelerinde geniş bir şekilde ve yoğun olarak dağılmışlardır (Tomizawa and Casida 2003). Neonikotinoidler bu reseptörlere bağlanarak, sinir sisteminin uyarıcı sinir taşıyıcısı asetil kolinin bu reseptörlere bağlanmasını önler, sinirsel iletim kesilir ve böceklerin ölmesine neden olurlar (Abbink 1991, Stenersen 2004). Bu güne kadar  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$  ve  $\beta 1$  nAChR alt üniteleri *B. tabaci*'de de tespit edilmiştir (NCBI 2020). Ayrıca tüm alt üniteler rna-seq yöntemiyle protein düzeyinde ortaya konmuştur (Ilias et al. 2015).

Böceklerde insektisitlere direnç mekanizmalarının ortaya çıkarılması hedef etken maddenin yönetimi için önemlidir. Bu çalışma da farklı *B. tabaci* popülasyonlarında nAChR  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  ve  $\alpha 4$  genleri arasındaki ilişkiler ve farklılıklar ortaya konmaya çalışılmıştır. Böylece daha sonra yapılacak gen ekspresyonu ya da bu alt ünitelerde neonikotinoid dayanıklılığı ile ilgili nokta mutasyon taramalarına ışık tutmak amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### *Bemisia tabaci* popülasyonlarının toplanması

*B. tabaci* popülasyonlarını toplamak için ülkemizde en yoğun ilaçmanın gerçekleştiği alanlardan biri olan Akdeniz Bölgesi seçilmiştir. Örnekler *Solanum lycopersicum*

L. (Solanaceae) üzerinden Aydıncık ve Erdemli (Mersin), *Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae) üzerinden Karataş (Adana), *Capsicum annum* L. (Solanaceae) üzerinden Kumluca (Antalya) ve *Cucumis sativus* L. (Cucurbitaceae) üzerinden Samandağ (Hatay) ilçelerinden toplanmıştır (Şekil 1). Bitkiler üzerinden toplanan *B. tabaci* popülasyonlarına ait ergin bireyler emgi şişeleriyle toplanarak Ependorf tüplere alındıktan sonra buz kutuları içerisinde laboratuvara getirilmiş ve -80 °C'de moleküler çalışmalarda kullanılabilecek kadar muhafaza edilmişlerdir. Alınan örneklerin yerleri, alım tarihleri, örneğin alındığı bitki kaydedilmiştir. Moleküler çalışmalarla bu popülasyonların hepsinin B biyotip olduğu ortaya konmuştur (Satar and Ulusoy 2016).



Şekil 1. *Bemisia tabaci* popülasyonlarının toplandığı lokasyonlar

### Moleküler çalışmalar

#### Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

*B. tabaci* erginlerinden (20 mg) Trizol reagent (Invitrogen, USA)'in prosedürü kullanılarak total RNA izole edilmiştir. Konsantrasyonlar spektrofotometrede (Multiscan GO\_ Thermo, USA) ölçülerek diğer aşamalarda kullanılabilecek kadar küçük miktarlarda Ependorf tüplerde -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Reverse transcriptaz reaksiyonu aşamasında Oligo (dT)12-18 Primer (Invitrogen, USA) cDNA sentezi için kullanılmıştır. Bu amaçla PtoScript M-MuLV first Strand cDNA synthesis Kiti (NEB, USA) cDNA sentezi için kullanılmış ve cDNA'lar kullanılacakları zamana kadar -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

#### Farklı popülasyonlardan nAChR $\alpha 1$ , $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ genlerinin elde edilmesi

Denemelerde nikotinik asetil kolin reseptör (nAChR)  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  ve  $\alpha 4$  genlerini elde etmek için Dr. Martin Williamson tarafından sağlanan primerler kullanılarak (Çizelge 1) PCR ve Nested PCR reaksiyonları OneTaq HF (NEB, USA) enzimi kullanılarak kurulmuş, thermal cyclerde (Applied biosystem, Veriti, Singapore) reaksiyon bu enzimin protokolüne göre yürütülmüştür. Bu amaçla 5  $\mu$ l buffer, 0.5  $\mu$ l dNTP, 0.5  $\mu$ l primer, 0.125  $\mu$ l enzim, 1  $\mu$ l cDNA karıştırılmış ve reaksiyon saf suyla 25  $\mu$ l'ye tamamlanmıştır. Thermal cycler cihazında reaksiyon; ayrılma 94 °C'de 0.30 dk, bağlanma 50 °C'de 0.45 dk, uzama 68 °C'de 2 dk 35

döngü ve son uzama 68 °C'de 5 dk olarak yürütülmüştür. Elde edilen PCR ürünlerini görüntülemek için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Örnekler gen dizilemesi için ilgili ticari firmaya gönderilmiştir. Elde edilen diziler birbirleriyle ve Dr. Martin Williamson'dan sağlanan referans genlere ait tüm sekanslarla karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 1.** *Bemisia tabaci*'nin farklı popülasyonlardan nAChR  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  ve  $\alpha 4$  genlerinin elde edilmesi için kullanılan primerler

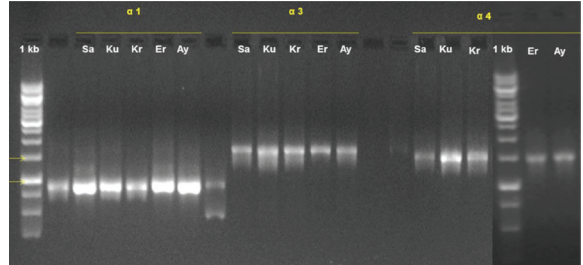
Primerler	Baz dizileri (5' - 3')
Bt $\alpha 1F1a$	ATGCTGGGCGTGGTTAGAATGG
Bt $\alpha 1F2a$	GGTCGCTGTGGTAGCTGGAAATCC
Bt $\alpha 1R1a$	GCCTAGGAGAGGGACGTTGAGGG
Bt $\alpha 1R2a$	TACGATGATAGTCACGACGACGG
Bt $\alpha 3F1a$	ATGAGGATAATTTACTGGATAATCG
Bt $\alpha 3F2a$	GACTGCGTATGCAATCCAGACGC
Bt $\alpha 3R1a$	TTATAGAGTCGTGGTAGTAAC
Bt $\alpha 3R2a$	GGACGTTGTTCGAGGGCGATATCGG
Bt $\alpha 4F1a$	ATGATCTTCGTTTTTGCTTAATCC
Bt $\alpha 4F2a$	CAAATAGAATAACCCAGATGCA
Bt $\alpha 4R1a$	TTAAAGTGCATCTAAAATCTTGTC
Bt $\alpha 4R2a$	GTTGATAGCTGTCTATCGATTGG

#### Moleküler analizler

Denemeler sonucunda elde edilen nükleotid dizilimleri DNASTAR Lasergene 7 (DNASTAR Lasergene software, Madison, WI, USA) programının Edit alt programında aminoasite çevrilmiş ve başlangıç kodonları tespit edilmiş, daha sonra FASTA formatına dönüştürülerek diğer uygulamalarda kullanılmışlardır. Transmembran bölgeleri TMHMM Server v.2.0 (Center for Biological Sequence Analysis, The Technica University of Denmark) programı (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) ile belirlenmiştir (Krogh et al. 2001, Sonnhammer et al. 1998). N-glikosizasyon bölgeleri N linked Glycosylation Analyse programında (<http://www.hiv.lanl.gov/contentsequence/GLYCOSITE/glycosite.html>) (Zhang et al. 2004), fosforilasyon bölgeleri NetPhos 2.0 Server programında (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) (Blom et al. 1999) analiz edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm karşılaştırma genleri National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genbank'dan elde edilmiştir. Dizilerin hizalaması Clustal X (Thompson et al. 1997) ve homoloji gölgelemesi GeneDoc programı (Nicholas et al. 1997) ile yürütülmüştür. Filogenetik ilişkiler MEGA 6 programında çoklu hizalandırılmalı nükleotid ve aminoasit sekanslarına göre belirlenmiştir (Tamura et al. 2013). Maximum Likelihood metodu ile Bootstrap analizi (1000) kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Felsenstein 1985, Saitou and Nei 1987). MEGA 6'da nükleotid ve aminoasit dizilerine en uygun modeller sırasıyla Kimura 2 parametre ve Jones-Taylor-Thornton (JTT) filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılmıştır (Jones et al. 1992, Kimura 1980).

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Aydıncık, Erdemli, Karataş, Kumluca ve Samandağ popülasyonlarında yaklaşık 1000 bp'lik nAChR  $\alpha 1$  gen bölgesi, 1500 bp'lik nAChR  $\alpha 3$  ve  $\alpha 4$  gen bölgeleri elde edilmiş (Şekil 2) ve dizileme analizinden sonra baz dizilimleri amino aside çevrilerek karşılaştırılmıştır. Elde edilen genler NCBI gen bankasına MT137065 (Kumluca\_  $\alpha 1$ ), MT137066 (Aydıncık\_  $\alpha 3$ ), MT137067 (Erdemli\_  $\alpha 3$ ), MT137068 (Karataş\_  $\alpha 3$ ), MT137069 (Kumluca\_  $\alpha 3$ ), MT137070 (Aydıncık\_  $\alpha 4$ ), MT137071 (Erdemli\_  $\alpha 4$ ), MT137072 (Karataş\_  $\alpha 4$ ), MT137073 (Kumluca\_  $\alpha 4$ ) ve MT137074 (Samandağ\_  $\alpha 4$ ) kodları ile kaydedilmiştir.



**Şekil 2.** *Bemisia tabaci* farklı popülasyonlarında nAChR  $\alpha 1$ , 3 ve 4 genlerinin jel görüntüsü (Sa: Samandağ, Ku: Kumluca, Kr: Karataş, Er: Erdemli, Ay: Aydıncık)

Aydıncık popülasyonunda 251 aa (aminoasit), Erdemli'de 265 aa, Karataş'ta 272 aa, Kumluca'da 275 aa ve Samandağ'da 266 aa'lık nAChR  $\alpha 1$  gen bölgesi, Aydıncık ve Karataş popülasyonlarından 525 aa, Erdemli ve Samandağ'dan 523 aa ve Kumluca'da 514 aa'lık nAChR  $\alpha 3$  gen bölgesi, Aydıncık'ta 466 aa, Erdemli'de 465 aa, Karataş'ta 463 aa, Kumluca'da 463 aa ve Samandağ'da 461 aa nAChR  $\alpha 4$  gen bölgesi elde edilmiştir. Popülasyonlar kendi içlerinde karşılaştırıldığında nAChR  $\alpha 1$  ve  $\alpha 3$  genleri bakımından farklılık belirlenmemiştir. Ancak, referans gene göre toplanan tüm popülasyonlarda  $\alpha 3$  genleri için 147. aa'te valin amino asidi izolösine (V147I), 227. aa'te alanin amino asidi Treonine (A227T) ve 534. aa'te treonin amino asidi izolösine (T534I) amino asidine dönüştüğü tespit edilmiştir (Çizelge 2). nAChR  $\alpha 4$  geninde ise referans gene göre toplanan tüm popülasyonlarda 198. aa'te glisin, glutamic aside (G198E)

**Çizelge 2.** *Bemisia tabaci*'de nikotinik asetilkolin reseptör  $\alpha 3$  ve  $\alpha 4$  alt ünitesinde popülasyonlar arasındaki aminoasit değişimleri

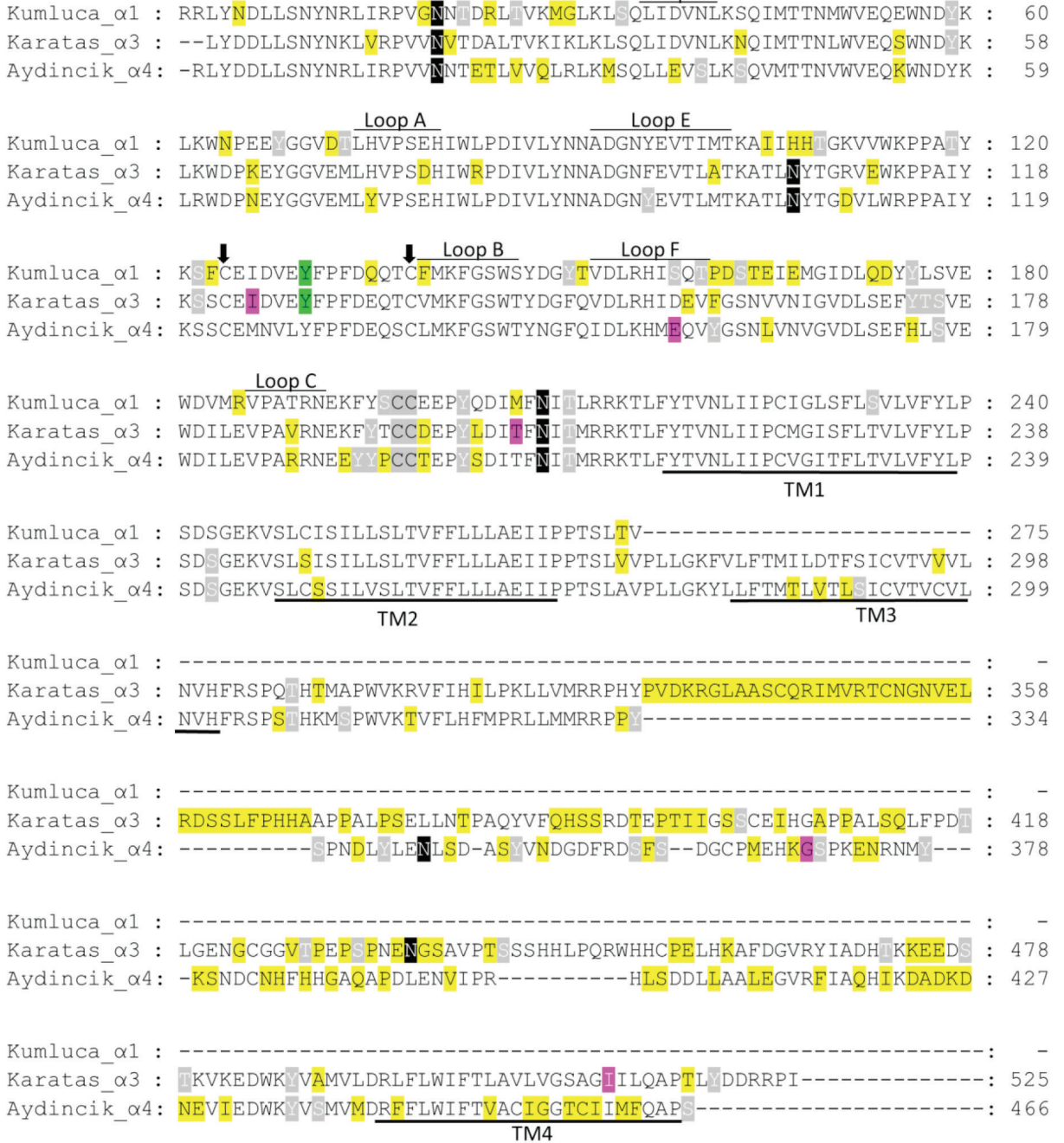
Popülasyonlar	nAChR_ $\alpha 3$ (.aa*)			nAChR_ $\alpha 4$ (.aa*)	
	147	227	534	198	401
Aydıncık	I	T	I	E	G
Erdemli	I	T	I	E	S
Karataş	I	T	I	E	S
Kumluca	I	T	I	E	S
Samandağ	I	T	I	E	S
Referans	VA	T	G	S	S

\*valin (V), izolösine (I), alanin (A), treonine (T), glisin (G), glutamic aside (E), serin (S) 370

dönüştürmüştür. Ayrıca, Aydıncık popülasyonunda 401. aa'te serinden glisine (S401G) bir değişim olmuştur (Şekil 3, Çizelge 2).

Bugüne kadar ekonomik olarak önemli birçok zararlının nikotinik asetil kolin reseptör genleri örneğin *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) (Tomizawa and Casida 2001), *Nilaparvata lugens* (Stal) (Hemiptera:

Delphacidae) (Liu et al. 2005), *Ctenocephalides felis* (Bouché) (Siphonaptera: Pulicidae) (Bass et al. 2006), *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) (Gao et al. 2007), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (Zhao et al. 2009), *B. tabaci* (Satar et al. 2014, Yao et al. 2008a), *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) (Guo et al. 2018)'da belirlenmiştir. Moleküler çalışmalarla bu tip genlerin ortaya konulması ve karşılaştırılması kompleks

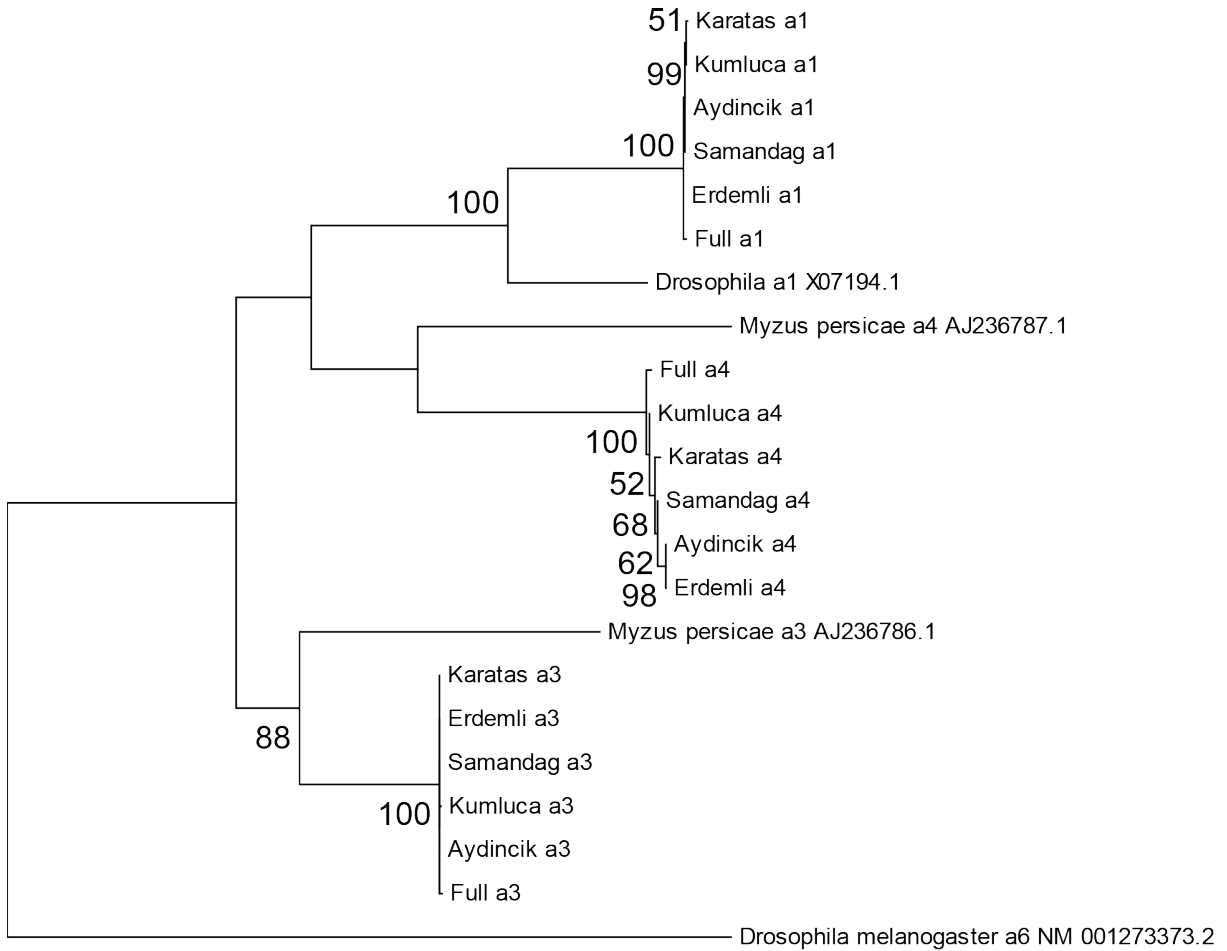


Şekil 3. Bemisia tabaci nAChR α1, 3 ve 4 genlerinin karşılaştırılması. Siyah, yazısı beyaz bölgeler N-bağlı glikozilasyon bölgesi; gri bölgeler dubleks sistein bölgesi (CC); gri yazısı beyaz bölgeler fosforilasyon bölgeleri; disülfid bağlı loop; sarı bölgeler aminoasitlerdeki değişimler; pembe bölgeler her bir alt ünite için popülasyonlar arasındaki farklılıkların saptandığı aminoasitler; yeşil bölgeler Nilaparvata lugens'te neonikotinoid dayanıklılığından sorumlu mutasyon noktaları

gen familyalarıyla ilgili yeni bakış açılarının geliştirmesine yardımcı olacağı gibi omurgasız fizyolojisi ile ilgili yeni soruların sorulmasına neden olur (Sattelle 2009). Bu tür çalışmalar neonikotinoid, spinosad gibi önemli insektisitlerin direnç mekanizmasını belirlemek için önemlidir. Örneğin, nAChR alpha alt ünitelerinde loop B üzerinde farklı aminoasit değişimlerinin imidacloprid dayanıklılığına etkisi olduğu saptanmıştır (Liu et al. 2005, Meng et al. 2015). Beta alt ünitelerinde ise loop D, E ve F üzerindeki aminoasit değişimlerinin neonikotinoidlere dayanıklı fenotiplere yol açabileceği belirlenirken, bu durumun nedeninin de bu bölgelerdeki değişimlerin asetilkolin (ACh) üzerine etkilerinin minimum olmasına bağlı olduğu vurgulanmıştır (Yao et al. 2008b). Neonikotinoid grubu insektisitlerin alt düzey toksisiteye neden olduğu *N. lugens*'in önemli bir doğal düşmanı olan *Pardosa pseudoannulata* (Bösenberg & Strand) (Araneae: Lycosidae)'nın  $\alpha 1$  ve  $\alpha 8$  genlerinde elektrofizyolojik çalışmalar sonucunda, önemli aminoasit değişimlerinin

saptandığı 170–181., 199–206., 208–214. aminoasit aralıklarının neonikotinoid duyarlılığıyla doğrudan etkisi olduğu saptanmıştır (Meng et al. 2015). Bu çalışmada saptanan  $\alpha 4$  alt ünitesinde ki G198E değişimi loop F (Şekil 3) üzerinde bulunmaktadır. Ancak, yukarıda da açıklandığı gibi bu loop üzerindeki değişimler  $\beta$  alt ünitesi ve neonikotinoid dayanıklılığı ile ilişkilendirilmektedir. Saptanan diğer aminoasit değişimleri loop bölgelerinin (loop A-F) dışında yer almaktadır (Şekil 3). Bu aminoasit değişimlerinin dirençle ilişkisi olup olmadığı ileriki çalışmalarla ortaya konulmalıdır.

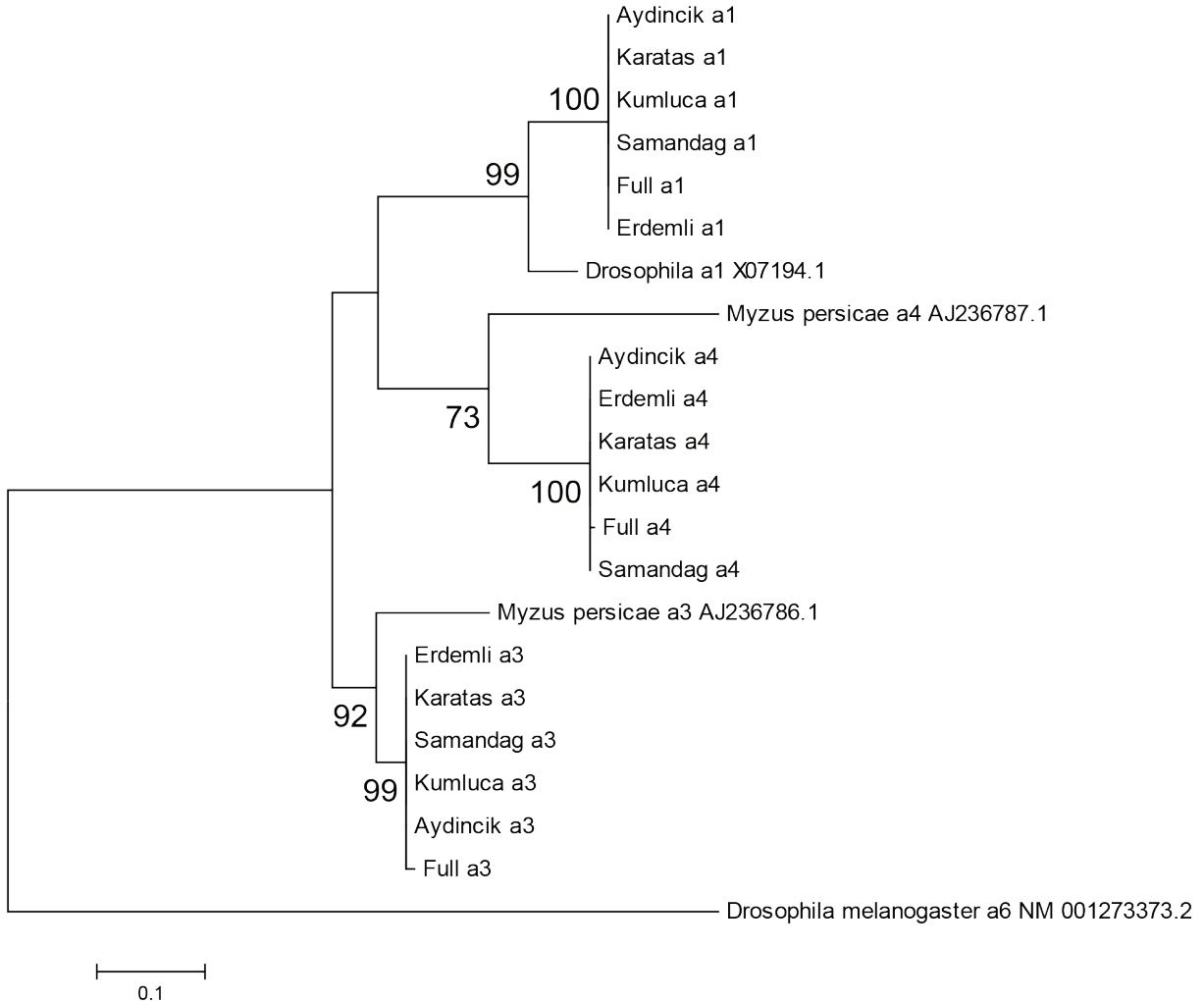
*B. tabaci*'de nAChR ait üç gen bölgesi aralarındaki farklılıkları ortaya koymak için karşılaştırılmıştır. nAChR reseptörlerinde yapısal olarak 15 rezidüel bir sisten (C) grubu, 6 adet reseptör bağlanmasında etkin loop (loop A-F), dört transmembran bölgesi, benzer alt ünite dizilimi gibi özelliklere sahiptirler (Jones and Sattelle 2010). Şekil 3'e bakıldığında her bir alt ünite için seçilen Kumluca  $\alpha 1$  (275 aa), Karataş  $\alpha 3$  (525 aa) ve Aydıncık  $\alpha 4$  (466 aa) popülasyonlarına ait alt üniteler arasında



Şekil 4. *Bemisia tabaci* popülasyonları ile *Drosophila melanogaster* ve *Myzus persicae* nAChR  $\alpha 1$ , 3, 4 genlerinin nükleotid dizileriyle Maximum Likelihood metoduna göre Kimura 2 parametre modeli kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç

pek çok aminoasit farklılığının olduğu görülmektedir. Tüm sekanslarda nAChR  $\alpha$  genlerinin karakteristik özelliği olan, uzun bir N terminal ucu, bu bölgede 6 adet reseptör bağlanmasında etkin loop bulunmaktadır. Ayrıca yine tüm popülasyonlarda korunmuş 15 aa'ten oluşan sisteinle (C) başlayıp biten disülfid bağlı loop bulunmaktadır.  $\alpha$  ve  $\beta$  genleri arasındaki en önemli fark olan bitişik sistein (CC) yapısı tüm  $\alpha$  genlerinde ortaktır.  $\alpha 3$  ve  $\alpha 4$  genlerinde 4 adet, tüm gen bölgesi elde edilememiş olan  $\alpha 1$  geninde ise 2 adet hidrofobik transmembran yapısı belirlenmiştir. Ayrıca, dizilerde farklı yerlerde nAChR genlerinin düzenlenmesinde rol oynayan bol miktarda fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır (Şekil 3). Liu et al. (2005), *N. lugens* nAChR  $\alpha 1$  ve  $\alpha 3$  genlerinde hassas popülasyona göre loop B'deki Y151S pozisyonunda aminoasit değişimi zararlıda nAChR genlerinde neonikotinoid dayanıklılığında sorumlu olan bir mutasyon olduğunu belirlemişlerdir. Bu noktada farklılık bu çalışmada *B. tabaci* popülasyonlarında saptanmamıştır (Şekil 3).

Nikotinik asetilkolin reseptör genlerinin filogenetik ilişkisini ortaya koymak için yapılan analizlerde dış grup olarak kullanılan *Drosophila melanogaster* nAChR  $\alpha 6$  geni diğer alt ünitelerden ayrı dallanmıştır. Ağaçlar üzerinde her bir gen ailesi kendi içerisinde grup oluşturmuştur. Yao et al. (2008a), *B. tabaci*'nin nAChR'de  $\alpha 4$ , Tang et al. (2009) *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae)'de  $\alpha 1$  ve  $\alpha 8$  genlerinin, Guo et al. (2018) *C. pomonella*'da sekiz alt ünite geninin diğer genlerle filogenetik ilişkisini ortaya koymuş ve oluşturulan ağaçlarda her alt ünite yüksek bootstrap değeriyle kendi gen ailesi içerisinde gruplaşmıştır. Çalışmada hem nükleotid düzeyinde (Şekil 4) hem de aminoasit düzeyinde (Şekil 5) yapılan karşılaştırmalarda ağaç iki ana dala ayrılmıştır. nAChR  $\alpha 1$  ve 4 genleri aynı dal üzerinde gruplanırken,  $\alpha 3$  bu iki alt üniteden ayrılmıştır. *Drosophila* ve *M. persicae*'ye ait referans genler kendi alt üniteleri içerisinde *B. tabaci*'ye ait genlerden yüksek bootstrap değeriyle ayrılmışlardır. Nükleotid dizilerindeki farklılıklardan dolayı



Şekil 5. *Bemisia tabaci* popülasyonları ile *Drosophila melanogaster* ve *Myzus persicae* nAChR  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  genlerinin aminoasit dizileriyle Maximum Likelihood metoduna göre Jones-Taylor-Thornton modeli kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç

popülasyonlar arasındaki yüksek bootstrap değerleriyle ayrımlar görülmüştür (Şekil 4). Bu nükleotid değişimleri aminoasitlerin diziliminde farklılığa neden olmadığı için Şekil 5'teki filogenetik ağaçta popülasyonlar arasında farklılık belirlenmemiştir.

Bu çalışmayla Türkiye *B. tabaci* popülasyonlarında farklı popülasyonlarda nAChR genlerinin moleküler karakterizasyonu yapılmış, nAChR  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  ve  $\alpha 4$  genleri aralarındaki ilişkiler ortaya konmuştur. Yapılan analizler sonucunda referans gene göre ve popülasyonlar içerisinde bazı aminoasit değişimleri saptanmıştır. Bu noktaları hedefleyen çalışmaların yürütülmesi neonikotinoid direnç mekanizmasıyla ilgili önemli ipuçları olup, diğer araştırmacılar içinde referans noktasıdır. Elde edilen değişimlerin neonikotinoid direnciyle ilişkisinin ortaya konabilmesi için gen ekspresyonu çalışmaları yapılmalıdır.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi'nde yürütülmüş olan "Doğu Akdeniz Bölgesi Sebze Alanlarında *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)'nin Neonikotinoid Grubu İnsektisitlere Dayanıklılığının Belirlenmesi" isimli doktora tez çalışmasının sonuçlarını içermekte olup, desteklerinden dolayı Çukurova Üniversitesi BAP Birimine (D3BAP2012) teşekkür ederiz. Ayrıca *Bemisia tabaci* nAChR  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  ve  $\alpha 4$  genlerine ait gen ve primer bilgisini bizimle paylaşan Dr. Martin Williamson (Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire AL5 2JQ, United Kingdom)'a sonsuz şükranlarımızı sunarız.

### ÖZET

Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChRs) böcek sinir sisteminde hızlı kolinerjik sinaptik taşınmada görevlidirler. Neonikotinoid grubu insektisitler de bu reseptörleri hedef alarak böceklerin ölmesine neden olurlar. Bu çalışmada, Doğu Akdeniz Bölgesi'nden toplanan bazı *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) popülasyonlarında nAChR  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  ve  $\alpha 4$  genleri karşılaştırılarak filogenetik ilişkiler ortaya konulmuştur. Denemede *Karataş-Gossypium hirsutum* (Adana), *Aydıncık-Solanum lycopersicum*, Erdemli-S. *lycopersicum*, Samandağ-*Cucumis sativus* (Hatay) ve Kumluca-*Capsicum annum* (Antalya)'dan toplanan beş örnekle çalışmalar yürütülmüştür. nAChR  $\alpha 1$ , 3 ve 4 genleri tüm popülasyonlar için karşılaştırıldığında  $\alpha 1$  genleri arasında bir farklılık belirlenmezken;  $\alpha 3$  geninde referans gene (full  $\alpha 3$ ) göre tüm popülasyonlarda V147I, A227T ve T534I aminoasitlerinde ve  $\alpha 4$  geninde *Aydıncık'ta* S401G ve referans gene (full  $\alpha 4$ ) göre tüm popülasyonlarda G198E spesifik aminoasit değişimleri belirlenmiştir. NCBI'dan seçilen aynı gen bölgeleriyle yapılan filogenetik analizlerde bu çalışmada çalışılan her

gen kendi gen ailesi içerisinde yer almıştır. Elde edilen bu verilerin neonikotinoid grubu insektisitler nokta mutasyona dayalı dirençle ilgili ileride yürütülebilecek çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: nAChR, neonikotinoid, phylogenetic analyses, whitefly

### KAYNAKLAR

- Abbink J., 1991. The biochemistry of imidacloprid. Pflanzenschutz-NACH. Richten Bayer, 44, 198-195.
- Bass C., Lansdell S.J., Millar N.S., Schroeder I., Turberg A., Fielda L.M., Williamson M.S., 2006. Molecular characterisation of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36, 86-96.
- Bass C., Puinean A.M., Andrews M., Cutler P., Daniels M., Elias J., Paul V.L., Crosswaite A.J., Denholm I., Field L.M., Foster S.P., Lind R., Williamson M.S., Slater R., 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$  subunit is associated with resistance to neonikotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. BMC Neuroscience, 12, 51.
- Bayhan E., Ulusoy M.R., Brown J.K., 2006. Host range, distribution, and natural enemies of *Bemisia tabaci* 'B biotype' (Hemiptera: Aleyrodidae) in Turkey. Journal of Pest Science, 79 (4), 233-240.
- Boffi J.C., Marcovich I., Gill-Thind J.K., Corradi J., Collins T., Lipovsek M.M., Moglie M., Plazas P.V., Craig P.O., Millar N.S., Bouzat C., Elgoyhen A.B., 2017. Differential contribution of subunit interfaces to  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptor function. Molecular Pharmacology, 91 (3), 250-262.
- Blom N., Gammeltoft S., Brunak S., 1999. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. Journal of Molecular Biology, 294 (5), 1351-1362.
- Brown J.K., Frohlich D.E., Rosell R.C., 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? Annual Review of Entomology, 40 (1), 511-534.
- Byrne D.N., Bellows Jr T.S., 1991. Whitefly biology. Annual Review of Entomology, 36 (1), 431-457.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39 (4), 783-791.
- Gao J.R., Deacutis J.M., Scott J.G., 2007. The nicotinic acetylcholine receptor subunits Mda5 and Mdb3 on autosome 1 of *Musca domestica* are not involved in spinosad resistance. Insect Molecular Biology, 16 (6), 691-701.

- Guo J-M., Luo J., Feng L., Li F., Lin K., Wang G., 2018. Cloning and bioinformatics analysis of eight nicotinic acetylcholine receptor genes in *Cydia pomonella*. *Journal of Environmental Entomology*, 40 (3), 624-632.
- Ilias A., Lagnel J., Kapantaidaki D., Roditakis E., Tsigenopoulos C.S., Vontas J., Tsagkarakou A., 2015. Transcription analysis of neonicotinoid resistance in Mediterranean (MED) populations of *B. tabaci* reveal novel cytochrome P450s, but no nAChR mutations associated with the phenotype. *BMC genomics*, 16 (1), 939.
- Jactel H., Verheggen F., Thiéry D., Escobar-Gutiérrez A.J., Gachet E., Desneux N., Neonicotinoids Working Group., 2019. Alternatives to neonicotinoids. *Environment International*, 129, 423-429.
- Jones A.K., Sattelle D.B., 2010. Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. In: *Insect nicotinic acetylcholine receptors*. Thany, S.H. (Ed.). Springer, New York, NY, 25-43 p.
- Jones D.T., Taylor W.R., Thornton J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8 (3), 275-282.
- Karunker I., Juergen B., Bettina L., Tanja P., Nauen R., Emmanouil R., John V., Kevin G., Ian D., Shai M., 2008. Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (6), 634-44.
- Karut K., 2007. Host instar suitability of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hom.: Aleyrodidae) for the parasitoid *Eretmocerus mundus* (Hym.: Aphelinidae). *Journal of Pest Science*, 80 (2), 93-97.
- Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G., Sonnhammer E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305 (3), 567-580.
- Liu Z., Williamson M.S., Lansdell S.J., Denholm I., Han Z., Millar N.S., 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (Brown planthopper). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (24), 8420-8425.
- Meng X., Zhang Y., Guo B., Sun H., Liu C., Liu Z., 2015. Identification of key amino acid differences contributing to neonicotinoid sensitivity between two nAChR  $\alpha$  subunits from *Pardosa pseudoannulata*. *Neuroscience Letters*, 584, 123-128.
- Nauen R., Denholm I., 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 58 (4), 200-215.
- Nauen R., Vontas J., Kausmann M., Wolfel K., 2013. Pymetrozine is hydroxylated by CYP6CM1, a cytochrome P450 conferring neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science*, 69 (4), 457-61.
- NCBI, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Bemisia+tabaci+Nicotinic+acetylcholine> (Erişim tarihi: 12.02.2019).
- Nicholas K.B., Nicholas H.B.J., Deerfield D.W., 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>, EMBNEW. NEWS, 4, 14.
- Roditakis E., Morou E., Tsagkarakou A., Riga M., Nauen R., Paine M., Vontas J., 2011. Assessment of the *Bemisia tabaci* CYP6CM1vQ transcript and protein levels in laboratory and field-derived imidacloprid-resistant insects and cross-metabolism potential of the recombinant enzyme. *Insect Science*, 18 (1), 23-29.
- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4), 406-425.
- Sonnhammer E.L., von Heijne G., Krogh A.A., 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 6, 175-182.
- Satar G., Ulusoy M.R., 2016. Akdeniz Bölgesi'nden toplanan *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) popülasyonlarının biyotiplerinin belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 6 (3), 205-212.
- Satar G., Ulusoy M.R., Dong K., 2014. *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)'de iki yeni nikotinik asetil kolin reseptör geninin (nAChR) moleküler karakterizasyonu. *Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi*, 3-5 Şubat 2014, Antalya, 35 s.
- Satar G., Ulusoy M.R., Nauen R., Dong K., 2018. Neonicotinoid insecticide resistance among populations of *Bemisia tabaci* in the Mediterranean region of Turkey. *Bulletin of Insectology*, 71 (2), 171-177.
- Sattelle D.B., 2009. Invertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Pesticide Science*, 34 (4), 233-240.
- Stenersen J., 2004. *Nicotinoids and neonicotinoids chemical pesticides. Mode of Action and Toxicology*, CRC Press, USA, 296 p.



- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis, version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12), 2725-2729.
- Tan J., Salgado V.L., Hollingworth R.W., 2008. Neural actions of imidacloprid and their involvement in resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pest Management Science*, 64 (1), 37-47.
- Tang P.A., Jiang H.B., Xu Y.Q., An F.M., Wang J.J., 2009. Molecular characterization of two nicotinic acetylcholine receptor subunits from *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 72 (1), 34-47.
- TAB, 2018. Neonicotinoid grubu aktif maddelerin yasaklanması ve kısıtlanması kararı. TC Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Karar Yazısı, Sayı: 81466379-320.04.02-E.3768012, Tarih: 19.12.2018. <http://www.tab.org.tr/dergi/tab-dergi-2/files/basic-html/page36.html>. *TAB Arıcılık Dergisi*, 2, 32-36.
- Tomizawa M., Casida J.E., 2001. Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Management Science*, 57 (10), 914-922.
- Tomizawa M., Casida J.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, 48, 339-364.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25 (24), 4876-4882.
- Van Lenteren J.C.V., Noldus L.P.J.J., 1990. Whitefly-plant relationships: behavioural and ecological aspects. In: Whitefly: their bionomics, pest status and management. Gerling, D., (Ed.). Intercept, Andover, 47-89 p.
- Wang R., Fang Y., Mu C., Qu C., Li F., Wang Z., Luo C., 2018. Baseline susceptibility and cross-resistance of cycloxyprid, a novel cis-nitromethylene neonicotinoid insecticide, in *Bemisia tabaci* MED from China. *Crop Protection*, 110, 283-287.
- Yao M.D., Yang Y.H., Wu S.W., Wu Y.D. 2008a. Cloning and sequence analysis of a  $\alpha$ -subunit gene of nicotinic acetylcholine receptor from *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2. 41 (2), 293-301.
- Yao X., Song F., Chen F., Zhang Y., Gu J., Liu S., Liu Z., 2008b. Aminoacids within loops D, E and F of insect nicotinic acetylcholine receptor b subunits influence neonicotinoid selectivity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (9), 834-840.
- Zhang M., Gaschen B., Blay W., Foley B., Haigwood N., Kuiken C., Korber B., 2004. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*, 14 (12), 1229-1246.
- Zhao Y., Yang Y.H., Wu S.W., Wu Y.D., 2009. Cloning, sequence analysis and developmental expression of a cDNA encoding nicotinic acetylcholine receptor a subunit from *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52 (1), 17-26.
- Zewen L., Zhaojun H., Yinchang W., Lingchun Z., Hongwei Z., Chengjun L., 2003. Selection for imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: cross-resistance patterns and possible mechanisms. *Pest Management Science*, 59 (12), 1355-1359.
- Cite this article: Satar, G, Ulusoy, M. (2020). Comparison of nicotinic acetylcholine receptor genes in *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) populations. *Plant Protection Bulletin*, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.704856
- Atif için: Satar, G, Ulusoy, M. (2020). *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) popülasyonlarında nikotinik asetilkolin reseptör genlerinin karşılaştırılması. *Bitki Koruma Bülteni*, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.704856