



## Pamuklarda Zarar Yapan *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) Populasyonlarının Biyokimyasal Yöntemlerle Direnç Mekanizmalarının Belirlenmesi\*

A.Sibel VELİOĞLU<sup>1</sup> Cem ERDOĞAN<sup>1</sup> M.Oktay GÜRKAN<sup>2</sup> Graham D. MOORES<sup>3</sup>

Geliş Tarihi: 24.09.2007

Kabul Tarihi: 08.02.2008

**Öz:** Bu araştırma, Akdeniz Bölgesi pamuk ekiliş alanlarından toplanan değişik *Aphis gossypii* populasyonlarında, insektisitlere direnç ile ilişkili olabilen mekanizmaların biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi amacıyla 2000-2003 yılları arasında yürütülmüştür. Denemelerde, Adana'nın dört pamuk alanı ile Antalya'dan toplanan *Aphis gossypii* populasyonları ve yurtdışından getirilen standart populasyonlar kullanılmıştır. Direnç ile ilişkili olabilen toplam esterez aktivitesi kinetik mikroplate assay yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Populasyonların esterez bant dizilişleri poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bunlara ilaveten, asetilkolinesteraz (AChE) duyarısızlaşması sonucunda ortaya çıkan insektisitlere direnç durumu mikroplate assay yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar, toplanan populasyonlardan dördünün yüksek düzeyde esterez aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Elektroforez ile ülkemiz populasyonlarının esterez bant dizilişleri belirlenmiş olup, bu populasyonların dirençli 1081K populasyonu ile benzer bant dizilişinde olduğu tespit edilmiştir. Modifiye AChE çalışmasında, inhibitör olarak pirimicarb ile demeton-S-metil kullanılarak populasyonların hedef alan duyarlılıkları incelenmiştir. Populasyonların pirimicarb ve demeton-S-metil'e değişen oranlarda duyarısız asetilkolinesteraz aktivitesi sergiledikleri belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Aphis gossypii*, insektisit direnci, esterez, asetilkolinesteraz

## Determination of the Insecticide Resistance Mechanisms Using Biochemical Methods in the *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) Populations Damaging on Cotton in Turkey

**Abstract:** This research was performed between 2000 and 2003, to explore the role of the mechanisms in conferring insecticide resistance of *Aphis gossypii* populations collected from the cotton areas of the Mediterranean region of Turkey using biochemical methods. These populations collected from Antalya and four different fields of Adana and standard *A. gossypii* populations were used throughout the studies. Total esterase activity associated with insecticide resistance was detected using kinetic microplate assay. All populations were characterized using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) to determine the esterase banding pattern. In addition, insecticide resistance resulted from insensitivity of acetylcholinesterase was investigated using microplate assay. According to results from the biochemical assays, four cotton aphid populations were found to have high esterase activity. Esterase banding patterns were determined with electrophoresis. This demonstrated that all Turkish cotton aphids collected were the same banding pattern as the standard resistant 1081K population in the PAGE. In modified AChE study, target site sensitivities of the populations were investigated using pirimicarb and demeton-S-methyl as inhibitors. All of these populations were identified with differing levels of sensitivity to these chemicals.

**Key Words:** *Aphis gossypii*, insecticide resistance, esterase, acetylcholinesterase

### Giriş

Pamuk, ülkemizde yaklaşık olarak yılda 637.329 ha ekiliş alanı ve 2.345.734 ton üretim miktarıyla en önemli agroekosistemlerden birisidir (Anonim 2005). Özellikle sulu tarıma geçişle birlikte, pamuk alanlarında

zararlı böcek populasyonları hızla artış göstermiştir. Zararlı populasyonlarındaki artış, beraberinde yoğun kimyasal mücadele uygulamalarını getirmiş ve dolayısıyla pamuk agroekosisteminde ruhsat alan

\* Bu araştırma TÜBİTAK tarafından desteklenmiş olup, TOGTAG-1899 nolu projenin bir bölümüdür.

1 T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü-Ankara

2 Ankara Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü -Ankara

3 Rothamsted Research, Harpenden / İngiltere

tarım ilacı çeşitliliği de artmıştır. Akdeniz bölgesi pamuk agroekosistemi, tarım ilacı kullanımının en yoğun olduğu bölgemizdir. Bu durum agroekosistemde varolan dengeleri tamamiyle bozmuş, dolayısıyla ilaçlamalardan beklenen fayda sağlanamamaya başlamıştır. Ülkemizde özellikle pamuk agroekosistemi, diğer bütün ülkelerde olduğu gibi insektisit direnci problemi ile karşı karşıyadır (Tomlin 1997).

Insektisitlere karşı görülen direnç, günümüz modern tarımının yüz yüze kaldığı önemli sorunlardan bir tanesidir. Günümüzde 553 türün en azından bir insektisit veya akarite karşı direnç kazanmış durumda olduğu kaydedilmektedir (Anonymous 2007).

Böceklerle savaşmada kullanılan organikfosforlu ve karbamatlı insektisitler böceklerin sinir sistemi üzerine etkili olmaktadır. Bu sistemde asetilkolinesteraz (AChE), sinir uyarılarını sinapsis adı verilen sinirsel ağlarla özel kısımlara ulaştıran kimyasal bir iletili olan asetilkolin (ACh)'in hidrolizinden sorumlu bir enzimdir. Bu hidrolizasyon olmazsa, ACh tarafından başlatılan sinirsel iletim nedeni ile sinirlerin tekrarlayan hareketi meydana gelmekte ve böcek ölmektedir. Sentetik piretroitli ilaçlarda ise, kimyasal uyarıcılar tarafından uyarılan sinir sistemi bu uyarıları elektriksel olarak hücrelere iletmektedir. İletilen bu uyarılara böcekler tepki verirler. Böceklerin sinirsel iletiminde yer alan sodyum kanalları içerisindeki sodyum iyonları, bu iletişimde önemli rol oynamaktadır. Piretroitli insektisitler, bu iletişimi engelleyerek sodyum kanallarını bloke etmekte ve böceklerde ölüme neden olmaktadır.

Etki şekli ne olursa olsun, bir insektisit etkili olabilmesi için, hem hedef alınan organizmada belirli bir yere ulaşması ve hem de biyolojik işlemleri etkilemek için yeterli bir konsantrasyonda olması gerekmektedir. İnsektisit etki alanına ulaşması sırasında meydana gelen fiziksel veya kimyasal herhangi bir engelleme, böceğin bu toksik maddeye direnç kazanmasına neden olabilir.

Böceklerde insektisitlere karşı oluşan direncin mekanizmalarının belirlenmesinde son yıllarda biyokimyasal yöntemler oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bu sayede direnç daha erken dönemde belirlenerek gerekli önlemler alınabilmektedir. Bu çalışma, Akdeniz Bölgesi pamuk ekiliş alanlarından toplanan değişik *A. gossypii* populasyonlarında direnç mekanizmalarının biyokimyasal karakteristiklerinin belirlenebilmesi amacıyla yapılmıştır.

## Materyal ve Yöntem

Denemelerin ana materyalini, Akdeniz Bölgesi'nde yoğun insektisit kullanılan pamuk alanlarından toplanan *A. gossypii* populasyonları ile karşılaştırma amacıyla kullanılan ve yurtdışından getirilen standart populasyonlar oluşturmuştur (Çizelge 1). Denemelerde ayrıca dikey elektroforez sistemi, mikroplaka okuyucu, çoklu homojenizer ve soğutmalı inkübatör gibi malzemeler kullanılmıştır. Modifiye asetilkolinesteraz (AChE) çalışmalarında inhibitör olarak pirimicarb ve demeton-S-metil'in aktif maddeleri kullanılmıştır.

Denemelerde, Rothamsted Research (İngiltere) den getirilen "171B" kodlu *A. gossypii* populasyonu hassas populasyon, elektroforez çalışmalarında ise "1081K" kodlu pirimicarb'a dirençli *A. gossypii* populasyonu standart populasyon olarak kullanılmıştır.

**Yaprakbiti kültürlerinin yetiştirilmesi:** *A. gossypii* ile bulaşık pamuk yaprakları toplanarak, buz kutusu içerisinde Ankara'ya getirilmiş ve laboratuvarında kültüre alınmışlardır. Kültürleri yetiştirmek için konukçu bitki olarak kabak ve pamuk bitkileri kullanılmıştır. Kültürler 25±3°C sıcaklık, % 40–50 orantılı nem ve floresan lambalarla 16 saat ışıklandırma, 8 saat karanlık koşulların sağlandığı iklim odasında yetiştirilmiştir.

**Toplam esteraz aktivitesinin belirlenmesi:** Toplam esteraz aktivitesi kinetik yöntemle ve kinetik mikroplaka okuyucu kullanılarak Han ve ark. (1998)'a göre belirlenmiştir. Bazı populasyonlarda esteraz aktiviteleri çok fazla olduğundan tek tek bireylerin homojenatlarından yapılan analizlerde dahi sonuç alınması mümkün olamamıştır. Bu nedenle Han ve ark. (1998)'in yönteminin hassasiyetini arttırmak amacıyla ile yaprakbitleri tek tek homojenize edildikten sonra 1/5 oranında bu homojenattan alınarak esteraz aktivitesine bakılmıştır.

Çizelge 1. Çalışmalarda kullanılan *Aphis gossypii* populasyonlarının toplandığı yer ve yıllar

Populasyonlar	Toplandığı Yer	Toplandığı Yıl
171B	İngiltere	1981
1081K	Zimbabve	1992
Küskün	Yemişli köyü-Adana	2000
Kahveci	Yemişli köyü-Adana	2000
Doğankent	Doğankent-Adana	2001
Karataş	Karataş-Adana	2001
Boztepe	Aksu-Antalya	2001

Mikroplakada 50 µL fosfat buffer (0.02 M, pH: 7.0, % 0.1 Triton X-100 içeren) içinde yaprakbitleri tek tek homojenize edilmişlerdir. Homojenizasyon için mikroplakaya uyan çoklu homojenizer (Burkard) (French-Constant ve Devonshire, 1987) kullanılmıştır. 1.5 mM Fast Blue RR salt içeren fosfat buffer (pH: 6.0) filtre edilmiş ve aseton içinde hazırlanmış olan 1-naftil asetat (100 mM)'tan ilave edilerek, son substrat konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde bir çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden her homojenata 200 µL verilmiş ve çoklu homojenizer ile hızlı bir şekilde karıştırılarak, 450 nm dalga boyunda 5 dakika süre ile 10 saniyede bir yapılan okumalarla reaksiyonlar izlenmiştir.

**Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) ile esterazın incelenmesi:** *A. gossypii* populasyonlarının esteraz bant dizilişlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen elektroforez çalışmalarında Williams ve Reisfeld (1964)'in jel ve barbiton buffer sistemi kullanılmıştır. Yaprakbiti homojenatlarının hazırlanması ve jel koşturma işlemleri Devonshire ve Moores (1982)'a göre yapılmıştır. Jeller, Han ve ark. (1998)'a göre boyanmış ve saklanmıştır.

Yaprakbitleri 1 mL %1.6 Triton X-100, 100 mg sakkaroz ve 1-2 parça bromocresol purple karışımından oluşan homojenizasyon sıvısında homojenize edilmişlerdir. Bu amaçla hazırlanan homojenizasyon sıvısından 10'ar µL alınarak mikroplaka hücrelerine ayrı ayrı konulmuş ve her hücreye 1 adet yaprakbiti bireyi aktarılmıştır. Daha sonra çoklu homojenizer ile yaprakbitleri homojenize edilmiş ve üzerlerine aynı homojenizasyon sıvısından 20'şer µL daha eklenmiştir. Tekrar karıştırılan homojenat 10 dakika bekletilmiştir.

Jelin her bir hücresine 10'ar µL homojenat yüklenmiştir. Jel, 250 V'da 1,5 saat süreyle 4°C'de koşturulmuştur. Daha sonra jel çıkarılmış ve 50 mL fosfat buffer (0.2 M, pH: 6.0), 100 mg Fast Blue RR ve 1 mL 1-naftil asetat (30 mM) karışımından oluşan boya içine alınarak karanlıkta boyanmıştır. Jeller %7'lik asetik asit içinde fikse edilmiş, fotoğraflandıktan sonra aynı asit içinde saklanmıştır.

**Modifiye asetilkolinesterazın belirlenmesi:** *A. gossypii* populasyonlarında AChE'in duyarsızlaşması sonucunda ortaya çıkan direnç durumunun incelenmesi için yürütülen çalışmada Moores ve ark. (1996a)'ın yöntemi değiştirilerek kullanılmıştır. Değişim ile reaksiyon kinetik mikroplaka okuyucuda 20 dakika yerine 1 saat süresince izlenmiştir.

Mikroplaka hücresine konulmuş 50 µL fosfat buffer (pH: 7.5, % 0.1 Triton X-100 içeren) içerisinde yaprakbitleri tek tek çoklu homojenizer ile homojenize edilmişlerdir. Daha sonra aynı bufferdan 200 µL eklenmiş ve 30 dakika 4°C'de AChE'in çözünmesi için beklenmiştir. Aynı yaprakbitine ait homojenattan 3 kez 50'şer µL alınarak yeni bir mikroplakanın kuyucuklarına yan yana konulmuştur. Daha sonra her birinin üzerine 50 µL buffer ve boya olarak 100 µL DTNB (45 mM) [dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] eklenmiştir. Reaksiyon, hazırlanan bu karışıma inhibitörlerin diagnostik konsantrasyonunu içeren veya içermeyen substrat [ATChI (1,5 mM) (acetylthiocholine iodide)] ilave edilmesiyle başlamaktadır. Buna göre; 1. homojenata 100 µL ATChI çözeltisi, 2. homojenata 100 µL ATChI + pirimicarb çözeltisi, 3. homojenata 100 µL ATChI + demeton-S-metil çözeltisi verilmiştir. Son substrat konsantrasyonu 0.5 mM, son DTNB konsantrasyonu 15 µM'dir. İnhibitörler son hacimde 1.5 x10<sup>-1</sup> mM pirimicarb veya 600 µM demeton-S-metil olacak şekilde kullanılmıştır.

Reaksiyonlar, kinetik mikroplaka okuyucu ile 405 nm'de 120 saniyede bir, 1 saat süresince yapılan okumalarla ölçülmüştür. Elde edilen verilerden engellenme oranları, inhibitör uygulandığındaki AChE aktivitesinin aynı yaprakbitinde inhibitör yokluğundaki AChE aktivitesine oranlanması ile yüzde olarak ifade edilmiştir.

## Bulgular ve Tartışma

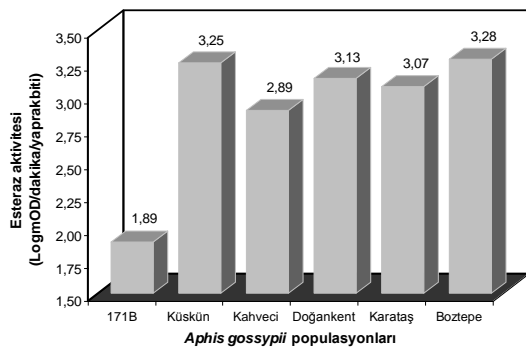
*A. gossypii*'de biyokimyasal çalışmalar kapsamında böceklerde insektisitlere karşı görülen dirençle ilişkili olabilen esteraz ve asetilkolinesteraz enzimleri incelenmiştir. Bu çalışmalara ilaveten, esteraz enzimi bant dizilişleri PAGE ile belirlenmiştir.

**Toplam esteraz aktivitesinin belirlenmesi:** Toplam esteraz aktivitesine ait veriler populasyonlara göre düzenlenerek Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde toplam esteraz aktivitesinin hassas 171B populasyonunda 78 mOD/dakika/yaprakbiti olduğu, buna karşılık ülkemizden toplanan Küskün, Kahveci, Doğankent, Karataş ve Boztepe populasyonlarında ise bu değerler sırasıyla 1776, 771, 1338, 1176 ve 1896 mOD/dakika/yaprakbiti olduğu görülmektedir. Han ve ark. (1998)'nin tüm dünyadan toplanan 21 *A. gossypii* populasyonunu incelediği araştırmada, toplam esteraz aktivitesine göre yaprakbitleri 3 sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflandırma esas alınarak denenen populasyonların toplam esteraz aktivitesine göre değerlendirilmesi yapıldığında

Çizelge 2. *Aphis gossypii* populasyonlarının toplam esteraz aktivitesine göre sınıflandırılması

Populasyonlar	Toplam esteraz aktivitesi (mOD/dakika/yaprakbiti)	Sınıfı*
171B	78	düşük
Küskün	1776	yüksek
Kahveci	771	orta
Doğankent	1338	yüksek
Karataş	1176	yüksek
Boztepe	1896	yüksek

\* Han ve ark. (1998)'a göre

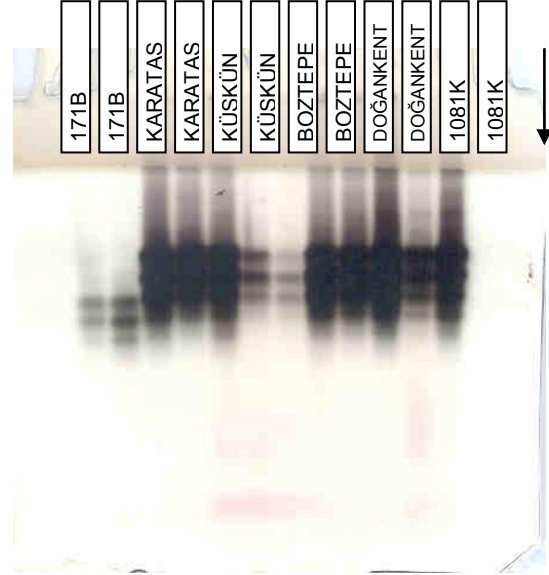


Şekil 1. *Aphis gossypii* populasyonlarında ortalama esteraz aktivitesi.

(Çizelge 2), hassas 171B populasyonu, "düşük" sınıfta yer almıştır. Kahveci populasyonu "orta" sınıfta yer alırken, diğer populasyonlar "yüksek" düzeyde toplam esteraz aktivitesine sahip bulunmuşlardır.

Şekil 1'de denemelerden elde edilen esteraz aktivitesi populasyonlara göre ayrı ayrı verilmektedir. Şeklin incelenmesiyle de anlaşılacağı gibi ülkemizden toplanan *A. gossypii* populasyonları, hassas 171B populasyonu ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek düzeyde esteraz aktivitesine sahip durumdadır.

**Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) ile esterazın incelenmesi:** Ülkemizden toplanan *A. gossypii* populasyonları ile standart populasyonlar olarak kullanılan 171B ve 1081K populasyonlarına ait elektroforez bant dizilişleri Şekil 2'de görülmektedir. Elektroforez çalışmaları sırasında Kahveci populasyonuna ait kültür elden çıktığı için, bu populasyona ait veriler fotoğrafta yer almamıştır. Denemede kullanılan 1081K adlı standart populasyon pirimicarb'a dirençli ancak organikfosforlara en fazla 4 kat dirençli olan bir populasyondur. Şekil incelendiğinde, 1081K populasyonu ile ülkemiz populasyonlarının farklı yoğunluklarda ancak benzer bant dizilişlerine sahip oldukları görülmektedir. Hassas 171B populasyonu ise 1081K ve ülkemiz populasyonlarından farklı ve daha hızlı yürüyen bant dizilişine sahip bulunmuştur.



Şekil 2. *Aphis gossypii* populasyonlarının poliakrilamid jel elektroforez ile belirlenen esteraz bant dizilişleri.

Dünyadaki çalışmalara bakıldığında, *A. gossypii*'de, esteraz aktivitesi, esteraz bant dizilişi ve insektisitlere direnç arasında ilişki olup olmadığına dair pek çok çalışma yapıldığı görülmektedir. Yapılan araştırmalarla, ABD (O'Brien ve ark. 1992), Çin (Moores ve ark. 1996b, Han ve ark. 1998), Japonya (Suzuki ve ark. 1993, Saito ve Hama 2000), Avustralya (Herron ve ark. 2001), Afrika'nın (Deguine 1996) ve Avrupa'nın bir kısmında (Furk ve Hines 1993, Delorme ve ark. 1997) organikfosforlara direnç durumu belirlenmiştir. Birçok araştırmacı organikfosforlara direnç ile esteraz aktivitesi arasında pozitif korelasyonda bir ilişki olduğunu belirtmektedir (Takada ve Murakami 1988, O'Brien ve Graves 1992, Suzuki ve ark. 1993, Saito ve Hama 2000). Bu konu ile ilgili olarak Suzuki ve ark. (1993), fenitrothion'un etkisizlik göstermesinden esterazların fazla miktarda üretiminin doğrudan rol oynadığını belirtmektedirler. Buna ilave olarak hassas ve dirençli yaprakbitlerinin esterazları elektroforetik jellerde farklı bant dizilişleri sergilemektedir (Furk ve ark. 1980, Takada ve Murakami 1988, O'Brien ve ark. 1992, O'Brien ve Graves 1992). Delorme ve ark. (1997), bu farklılığın enzimin farklı elektroforetik mobiliteye sahip olmasından kaynaklandığını belirtmektedirler. Furk ve Hines (1993)'in araştırmasında hassas olan *A. gossypii* populasyonu, denenen diğer populasyonlara göre daha hızlı yürüyen bantlara sahip bulunmuştur. Diğer populasyonların elektroforetik bant dizilişlerindeki artan esteraz aktivitesine bağlı olarak diazinon'un LC<sub>50</sub> değerinin de arttığını, dolayısıyla organikfosforlu insektisitlere direnç ile esteraz arasında pozitif bir ilişki olabileceğini belirtmektedirler.

Saito (1993), organikfosforlara dirençli yaprakbitlerinde toplam esteraz aktivitesinin hassas yaprakbitlerinden önemli düzeyde yüksek olduğunu belirlemiş ve isoelektrik fokus'ta hassas yaprakbitinin dirençli yaprakbitinde pl 5.8'de görülen en büyük banttan yoksun olduğunu tespit etmiştir.

Bu belirli esteraz bant dizilişleri ve aktiviteleri, yüksek düzeyde toplam enzim aktivitesi ve orta düzeyde organikfosforlu insektisit direnci ile yakından ilişkili bulunmuştur (O'Brien ve ark. 1992, Saito ve Hama 2000). O'Brien ve ark. (1992), chlorpyrifos'a 4 kat direnç tespit ettiği populasyonların esteraz aktivitesinin hassas populasyonunkinden önemli derecede yüksek olduğunu belirtmektedirler.

*A. gossypii*'de organikfosforlara direnç ile esteraz aktivitesi arasında bir ilişki bulunsa bile bu ilişki *Myzus persicae*'deki dirençten çok farklı durumdadır. *M. persicae*'de tek bir izozim (E4)'in artması dirence sebep olurken (Devonshire ve Sawicki 1979), *A. gossypii*'de toplam esteraz aktivitesi söz konusudur (Saito ve Hama 2000).

Organikfosforlara direnç ile artan esteraz aktivitesi arasında ilişki olduğunu belirten araştırmacılar olmasına karşın böyle bir bağlantıyı bulamayan araştırmacılar da bulunmaktadır. Han ve ark. (1998)'in araştırmasında demeton-S-metil'e hassas olan populasyonların düşük veya orta düzeyde esteraz aktivitelerine sahip oldukları görülmüştür. Bu durumda araştırmacılar artan esteraz aktivitesi ile organikfosforlu direnci arasında var olduğu belirtilen pozitif ilişkiye şüpheli yaklaşmaktadırlar. Sun ve ark. (2005) organik fosforlara dirençli bir *A. gossypii* populasyonunu laboratuvarında omethoate uygulayarak selekte etmiştir. Bu ırk, organik fosforlara dirençli olan *A. gossypii* populasyonundan daha dirençli bulunmuştur. Ancak, dirençli olan populasyonda alfa naftil asetat ve alfa naftil butirat kullanıldığında esteraz aktivitesi hassas populasyona oranla önemli düzeyde düşük bulunmuş olup, aynı eğilim PAGE'de de belirlenmiştir.

Takada ve Murakami (1988)'nin çalışmasında, organikfosforlardan malathion'a direnç ile artan esteraz aktivitesi arasında pozitif korelasyon belirlenmesine rağmen, karbamatlılardan pirimicarb için böyle bir ilişki bulunmamıştır. Suzuki ve ark. (1993), karbamatlı insektisitlere direnç ile esteraz aktivitesi arasında bir korelasyon bulunmadığını belirtmektedirler. Delorme ve ark. (1997), oksidaz ve esteraz inhibitörleri kullanarak yaptığı araştırmasında, bu enzim gruplarının hiçbirinin karbamat direncine neden olmadığını göstermişlerdir.

Ülkemiz pamuk ekili alanlarından 1993 yılında toplanan bir *A. gossypii* populasyonunda orta düzeyde esteraz aktivitesi belirlenmiştir (Han ve ark. 1998).

Araştırmamızda ise ülkemiz populasyonlarından sadece biri orta düzeyde esteraz aktivitesine sahip bulunmuş, diğerleri ise yüksek düzeyde esteraz sınıfında değerlendirilmiştir. Yaptığımız araştırmada, dünyadaki çalışmalara benzer olarak düşük esteraz aktivitesine sahip olan hassas 171B populasyonunun diğer tüm populasyonlardan farklı ve hızlı yürüyen bant dizilişinde olduğu görülmektedir. Orta veya yüksek düzeyde esteraz aktivitelerine sahip bulunan ülkemiz populasyonları ise 1081K populasyonu ile benzer bant dizilişindedir. Dolayısıyla ülkemiz populasyonlarının hassas populasyondan farklı bant dizilişi sergilemesi, bunların özellikle organikfosforular açısından değerlendirildiğinde daha dirençli olabilecekleri şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca, Kahveci dışındaki populasyonların toplam esteraz aktivitelerinin yüksek olması da bu yorumu desteklemektedir.

#### **Modifiye asetilkolinesterazın belirlenmesi:**

Direnç mekanizmalarından birisi olan hedef alanın duyarlılığı, organikfosforlu ve karbamatlı insektisitlere direncin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. AChE'in duyarısızlaşması, ilk kez Smissaert (1964) tarafından *Tetranychus urticae*'de yapılan bir araştırma sonucunda belirlenmiştir (Metcalfe 1989). Daha sonraki araştırmalar sonucunda, laboratuvarında yaprakbiti bireylerinden tek tek bu mekanizmanın belirlenmesi mümkün olmuştur (Moore ve ark. 1988).

Pirimicarb ile demeton-S-metil uygulanmış ve uygulanmamış, dolayısıyla AChE'i engellenmiş ve engellenmemiş mikroplate kuyularından elde edilen ortalama AChE değerlerinin birbirlerine oranlanması ile bulunan "kalan aktivite" değerleri kullanılarak populasyonlara göre ayrı ayrı çizilen dağılım grafikleri Şekil 3'de görülmektedir.

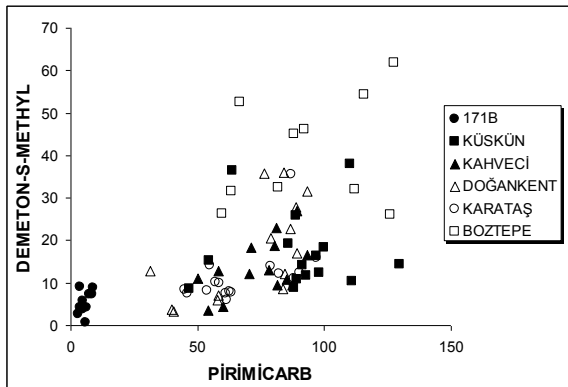
Şekilde, hassas 171B populasyonuna ait bireylerin, pirimicarb ve demeton-S-metil uygulandığında kalan AChE aktivitelerinin oldukça düşük olduğu dolayısıyla AChE'in engellendiği anlaşılmaktadır. Yani bu insektisitlerin 171B populasyonuna ait bireyleri öldürme kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Ülkemiz populasyonlarına ait bireylerde ise pirimicarb uygulandığında kalan aktivite değerlerinin 171B'ye göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu duruma göre, pirimicarb'ın AChE'yi tamamen engellemediği anlaşılmaktadır.

Demeton-S-metil uygulandığında ise ülkemiz populasyonlarının tepkileri heterojenlik göstermiştir. Her populasyon içinde 171B'ye benzer aktiviteye sahip bireylerin yanında, AChE'in daha duyarlı olduğunu gösteren yüksek kalan aktiviteye sahip bireyler de bulunmaktadır. Örneğin, Boztepe populasyonuna ait tüm bireylerin demeton-S-metil uygulandığında bile yüksek AChE aktivitesine sahip olduğu görülmektedir.

Buna karşın Kahveci ve Karataş populasyonları, çoğunlukla 171B populasyonuna benzer aktiviteye sahip bireylerden oluşmaktadır. Ancak bu populasyonlarda daha yüksek AChE aktivitesine sahip bireyler de bulunmaktadır.

Selektif bir afisit olan pirimicarb'a direnç durumu, 1970'li yıllarda ortaya çıkmaya başlamıştır. Predatör akarlar düşük toksisitesi nedeniyle entegre zararlı mücadelesi programlarının çoğunda yaygın olarak kullanılması bu bileşiğin problem haline gelmesine neden olmuş (Furk ve ark. 1980) ve dolayısıyla direnç mekanizmasının belirlenebilmesi için pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan araştırmalar, pirimicarb'a direncin modifiye AChE varlığıyla ilişkili olduğunu göstermektedir (Silver 1984: Devonshire 1989'dan, Moores ve ark. 1988, 1996a, 1996b, Delorme ve ark. 1997, Han ve ark. 1998). Moores ve ark. (1988)'in insektisitlere dirençli *Musca domestica*, *Bemisia tabaci* ve *A. gossypii* populasyonlarında yaptıkları incelemelerde, bu populasyonların duyarısız AChE'a sahip oldukları tespit edilmiştir. Moores ve ark. (1996a), pirimicarb ile belirli organikfosforlara farklı spektrumda direnç sergileyen insektisite duyarısız iki AChE tipi belirlemişlerdir. Her iki tip de pirimicarb'a en azından 300 katlık duyarısızlığa sahiptir.

Han ve ark. (1998)'in araştırmasında Çin, İngiltere, İspanya, Pakistan, Peru, Türkiye, Yunanistan ve Zimbabve'den toplanan populasyonlar incelenmiş ve bazı populasyonlarda modifiye AChE nedeniyle pirimicarb'a direnç durumu belirlenmiştir. Araştırma, pirimicarb'a direncin primer mekanizmasının AChE duyarısızlığı olduğu fikrini desteklemektedir. Silver ve ark. (1995), dirençli yaprakbitlerinde pirimicarb'a AChE'in yüksek düzeyde duyarısızlık göstermesi durumunda, güçlü bir direnç için başka bir mekanizmanın bulunmasına gerek olmadığını belirtmektedirler.



Şekil 3. *Aphis gossypii* populasyonlarının pirimicarb ve demeton-S-metil ile AChE'lerinin engellenmesi sırasında kalan aktivite yüzdeleri.

*A. gossypii* ve *M. persicae*'de AChE benzeri proteinleri kodlayan ace1 ve ace2 adlı iki gen bulunmuştur. Dirençli ve hassas *A. gossypii* ve *M. persicae* populasyonlarında ace1 ve ace2 gen zincirlerinin karşılaştırması sonucu, ace1'de dirençli fenotip ile ilişkili olan iki nokta mutasyonu belirlemişlerdir (Andrews ve ark. 2004, Li ve Han 2004, Javed ve ark. 2003). Bunlardan biri S431F (Torpedo F331) pirimicarb gibi dimetilkarbamatlara yüksek selektif direnç ile ilişkilidir. Diğer mutasyon A302S (Torpedo A201) ise *A. gossypii*'de S431F ile birlikte bulunmuştur ve daha genel organikfosforlu ve karbamatlı direnci ile ilişkili görülmektedir (Dong ve ark. 2005). Toda ve ark. (2004) ise ace2 geninde belirledikleri S431P ve A302S mutasyonunun ace1'de bulunmadığını belirtmektedirler. Araştırmacılar bu mutasyonların pirimicarb ve organik fosforlara direnç ile ilişkili olabileceğini belirtmektedirler.

Benting ve Nauen (2004), S431F mutasyonu taşıyan *A. gossypii*'den alınan ve rekombinant olarak çoğaltılan AChE1'in pirimicarb ve omethoate'e duyarısızlık ancak demeton-S-metil'e duyarlılık, carbufuran'a ise aşırı duyarlılıkta rol oynadığını belirlemişlerdir. Ayrıca, *A. gossypii*'de AChE1'in karbamatlılar ve organik fosforular için hedef bölge olduğu sonucuna varmışlardır.

Han ve ark. (1998)'in araştırmasında, ülkemizden 1993 yılında pamuktan toplanan *A. gossypii* populasyonunda modifiye AChE'a rastlanmamış ve duyarlı fenotipte olduğu belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, bu çalışma kapsamında ülkemizden toplanan yaprakbiti populasyonlarının modifiye AChE nedeniyle pirimicarb'a karşı değişik oranlarda direnç gösterdikleri tespit edilmiştir.

Organikfosforulara direnç ile artan esteraz aktivitesi arasında ilişki bulunmakla beraber, aynı zamanda modifiye AChE da bu gruptan belirli insektisitlere direnç mekanizmalarından birisidir (Moores ve ark. 1996a). Modifiye AChE ile artan esteraz aktivitesi arasındaki interaksyonun ilk kez çalışıldığı araştırmada, pirimicarb'a karşı kuvvetli şekilde duyarısız olan AChE'in, aynı zamanda demeton-S-metil'e de önemli düzeyde direnç oluşturduğu belirtilmektedir. Ancak bu durum artan esteraz aktivitesi ile birlikte görülmektedir (Han ve ark. 1998). Moores ve ark. (1996a, 1996b)'in belirlediği iki AChE tipi, pirimicarb'a karşı 300 katlık direnç verirken, demeton-S-metil'e biri 76 diğeri ise en fazla 4 katlık direnç göstermektedir.

Han ve ark. (1998)'in araştırmasında ülkemizdeki pamuklardan toplanan *A. gossypii* populasyonunun orta düzeyde esteraz aktivitesine sahip olduğu ve demeton-S-metil'e hassas olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada, ülkemiz populasyonları 1081K standart populasyonu ile benzer bant dizilişine sahip bulunmuştur. 1081K populasyonu Han ve ark. (1998) tarafından MACE<sub>A</sub> (Modified AcetylCholinEsterase A) olarak ifade edilen ve pirimicarb'a 300 kat, demeton-S-metil'e ise en fazla 4 katlık direnç gösteren bir ırktır. Ancak bu ırkın esteraz aktivitesi "düşük" düzeydedir. Ülkemiz populasyonlarının ise Kahveci haricindekileri "yüksek" düzeyde esteraz aktivitesine sahip durumdadır. Bu nedenle bire bir 1081K populasyonu ile karşılaştırma yapmak uygun olmayacaktır. Çünkü artan esteraz aktivitesi de organikfosforlu direncinden sorumlu olmaktadır.

### Sonuç

Yaptığımız araştırma sonuçlarına göre, *A. gossypii* populasyonlarından biri (Kahveci) haricindekiler, yüksek düzeyde esteraz aktivitesine sahip bulunmuşlardır. Ayrıca, yapılan elektroforez (PAGE) çalışmalarında ülkemiz populasyonları, hassas 171B populasyonundan farklı ancak, pirimicarb'a dirençli olan 1081K populasyonu ile aynı bant dizilişi sergilemişlerdir. Hem artan esteraz aktivitesi, hem de hassas 171B'den farklı bant dizilişi göstermesi toplanan populasyonların özellikle organikfosforlara dirençli olma olasılığını arttırmaktadır. Nitekim dünyadaki çalışmalarda da organikfosforlara direnç ile esteraz aktivitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu pek çok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Takada ve Murakami 1988, O'Brien ve Graves 1992, Suzuki ve ark. 1993, Saito ve Hama 2000). Aynı zamanda dirençli yaprakbitlerinin esterazlarının, PAGE'te hassas yaprakbitlerinden farklı bant dizilişleri sergiledikleri de bilinmektedir (Furk ve ark. 1980, Takada ve Murakami 1988, O'Brien ve ark. 1992, O'Brien ve Graves 1992).

Sonuç olarak, *Aphis gossypii*'nin beş farklı populasyonu ile yapılan biyokimyasal çalışmalar ışığında, hem yüksek esteraz aktivitesine, hem de dirençli olan 1081K populasyonu ile aynı bant dizilişine sahip olmaları yanında pirimicarb ve demeton-S-metil'e değişen oranlarda duyarsız asetilkolinesteraz aktivitesi sergilemelerinden dolayı, bu populasyonların karbamatlılara ve organikfosforlara karşı değişik seviyelerde direnç göstermesi beklenmektedir.

Yapılan bu çalışma ile, ülkemiz *A. gossypii* populasyonlarının insektisitlere karşı göstermiş olduğu direncin biyokimyasal karakteristikleri ortaya konulmuştur. Elde edilen veriler, direncin erken dönemde belirlenebilmesi ve uygun direnç yönetim stratejilerinin geliştirilmesine yönelik yeni çalışmalara temel oluşturabilecek niteliktedir.

### Kaynaklar

- Andrews, M.C., A. Callaghan, L.M. Field, M.S. Williamson and G.D. Moores. 2004. Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AchE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Mol. Biol.*, 13 (5): 555-561.
- Anonim 2005. Tarımsal Yapı (Üretim, fiyat, değer) 2003. DİE Matbaası. Ankara. 546s.
- Anonymous 2007. Arthropod Pesticide Resistance Database. <http://www.pesticideresistance.org/search/1/>
- Benting, J. and R. Nauen. 2004. Biochemical evidence that an S431F mutation in acetylcholinesterase-1 of *Aphis gossypii* mediates resistance to pirimicarb and omethoate. *Pest Manag. Sci.* 60: 1051-1055.
- Deguine, J.P. 1996. The evolution of insecticide resistance in *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) in Cameroon, *Resistant Pest Management News Letter* 8 (1): 13-14.
- Delorme, R., D. Augé, M. Béthenod and F. Villate. 1997. Insecticide resistance in a strain of *Aphis gossypii* from southern France, *Pestic. Sci.*, 49, 90-96.
- Devonshire, A.L. and R.M. Sawicki. 1979. Insecticide - resistant *Myzus persicae* as an example of evolution by gene duplication. *Nature* 280: 140-141.
- Devonshire, A.L. and G.D. Moores. 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*), *Pestic. Biochem. Physiol.*, 18: 235-246.
- Devonshire, A.L. 1989. Resistance of aphids to insecticides, In: *Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control*, eds: Minks, A. K. and Harrewijn, P., Volume C, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 123-139.
- Dong, S.J., M.C. Andrews, F. Li, G.D. Moores, Z.J. Han and M.S. Williamson. 2005. Acetylcholinesterase genes and insecticide resistance in aphids. *Chem. Biol. Interact.*, 157-158: 373-374.
- Ffrench-Constant, R. H. and A. L. Devonshire. 1987. A multiple homogenizer for rapid sample preparation in immunoassays and electrophoresis. *Biochem. Genet.*, 25: 493- 499.
- Furk, C., D. F. Powell and S. Heyd. 1980. Pirimicarb resistance in the melon and cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, *Plant Pathol.*, 29: 191-196.
- Furk, C. and C.M. Hines. 1993. Aspects of insecticide resistance in the melon and cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), *Ann. appl. Biol.*, 123: 9-17.
- Han, Z., G.D. Moores, I. Denholm and A.L. Devonshire. 1998. Association between biochemical markers and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 62: 164-171.

- Herron, G.A., K. Powis and J. Rophail. 2001. Insecticide resistance in *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae), a serious threat to Australian cotton, Aust. J. Entomol., 40: 85-91.
- Javed, N., R. Viner, M.S. Williamson, L.M. Field, A.L. Devonshire and G.D. Moores. 2003. Characterization of acetylcholinesterases, and their genes, from the hemipteran species *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* (Glover), *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Insect Mol. Biol., 12 (6): 613-620.
- Li, F. and Z. Han. 2004. Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. Insect Biochem. Mol. Biol., 34: 397-405.
- Metcalf, R. L. 1989. Insect resistance to insecticides, Pestic. Sci., 26, 333-358.
- Moores, G. D., I. Denholm, F. J. Byrne, A. L. Kennedy and A. L. Devonshire. 1988. Characterising acetylcholinesterase genotypes in resistant insect populations, Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases, 451-456.
- Moores, G. D., X. Gao, I. Denholm and A. L. Devonshire. 1996a. Characterisation of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae), Pestic. Biochem. Physiol., 56: 102-110.
- Moores, G. D., Z. J. Han, I. Denholm and A. L. Devonshire. 1996b. Two forms of insecticide insensitive acetylcholinesterase in *Aphis gossypii*, Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases, 745-750.
- O'Brien, P.J. and J.B. Graves. 1992. Insecticide resistance and reproductive biology of *Aphis gossypii* Glover, Southwest. Entomol., 17 (2): 115-122.
- O'Brien, P.J., Y.A. Abdel-Aal, J.A. Ottea and J.B. Graves. 1992. Relationship of insecticide resistance to carboxylesterases in *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) from midsouth cotton, J. Econ. Entomol., 85 (3): 651-657.
- Saito, T. 1993. Insecticide resistance of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) VI. Qualitative variations of aliesterase activity, Appl. Entomol. Zool., 28 (2): 263-265.
- Saito, T. and H. Hama. 2000. Carboxylesterase isozymes responsible for organophosphate resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae), Appl. Entomol. Zool., 35 (1): 171-175.
- Silver, A.R.J., H.F. van Emden and M. Battersby. 1995. Biochemical nature of pirimicarb resistance in two glasshouse clones of *Aphis gossypii*. Pestic. Sci. 43 (1): 21-29.
- Sun, L., X. Zhou, J. Zhang and X. Gao. 2005. Polymorphisms in a Carboxylesterase Gene Between Organophosphate-Resistant and -Susceptible *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). J. Econ. Entomol. 98 (4): 1325-1332.
- Suzuki, K., H. Hama, and Y. Konno. 1993. Carboxylesterase of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae), responsible for fenitrothion resistance as a sequestering protein, Appl. Entomol. Zool., 28 (4): 439-450.
- Takada, H. and Y. Murakami. 1988. Esterase variation and insecticide resistance in Japanese *Aphis gossypii*, Entomol. Exp. Appl., 48: 37-41.
- Toda, S., S. Komazaki, T. Tomida and Y. Kono. 2004. Two aminoacid substitutions in acetylcholinesterase associated with pirimicarb and organophosphorous insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). Insect Mol. Biol., 13 (5): 549-553.
- Tomlin, C. D. S. (ed.) 1997. The Pesticide Manual. 11<sup>th</sup> edition, The British Crop Protection Council, BCPC Publications, 1606 p., UK.
- Williams, D. E. and R. A. Reisfeld. 1964. Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: extension to new conditions of pH and buffer, Ann. NY. Acad. Sci., 121: 373-381.

---

**İletişim Adresi:**

A. Sibel VELİOĞLU  
T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı  
Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü  
Gayret Mah. Fatih Sultan Mehmet Bulvarı  
68/A 06172 Yenimahalle- Ankara  
Tel: 0-312-3445994  
E-posta: sibel\_velioglu@zmmae.gov.tr