

**İçel’den toplanan *Myzus persicae* (Sulz.) (Hemiptera: Aphididae) popülasyonlarında insektisitlere direnç mekanizmalarının biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi<sup>1</sup>**

A. Sibel VELİOĞLU<sup>2</sup>

Graham D. MOORES<sup>3</sup>

Alan L. DEVONSHIRE<sup>4</sup>

Seval TOROS<sup>5</sup>

**SUMMARY**

**Determination of the insecticide resistance mechanisms by biochemical assays in *Myzus persicae* (Sulz.) (Hemiptera:Aphididae) populations collected from Icel-Turkey**

The carboxylesterase correlated with insecticide resistance in different *Myzus persicae* populations collected from Icel were analysed by using microplate reader and electrophoresis. Total carboxylesterase activities and carboxylesterase E4 band patterns of the populations were determined and the values were found as extremely high levels at all of Icel populations. Results of the detailed analyses from microplate assay, immunoassay and electrophoresis showed that Icel populations have very high levels and FE4 type of carboxylesterase.

Icel populations were also examined the case of insecticide resistance resulted from insensitivity of acetylcholinesterase (AChE). It was found that three Icel populations have insensitive AChE to pirimicarb. Icel populations showed “multiple resistance mechanism”, because of high carboxylesterase activities and also insensitive AChE.

**Key words:** Peach-potato aphid, insecticide resistance, carboxylesterase, acetylcholinesterase, immunoassay, PAGE

**ÖZET**

İçel’den toplanan farklı *Myzus persicae* popülasyonlarında insektisitlere direnç ile ilişkili olan karboksilesteraz enzimi mikropilaka okuyucu ve elektroforez

<sup>1</sup> Bu çalışma “Değişik Bölgelerden Toplanan *Myzus persicae* (Sulz.) Popülasyonlarının Farklı Grupları Bazı İsektisitlere Karşı Duyarlılık Farklarının Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar” isimli doktora tezinin bir bölümüdür.

<sup>2</sup> Ziraat Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü, 06172 Yenimahalle, Ankara

<sup>3</sup> Rothamsted Research, Harpenden, İngiltere

<sup>4</sup> Emekli (Rothamsted Research, Harpenden, İngiltere)

<sup>5</sup> Emekli (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü)

Yazının Yayın Kurulu’na geliş tarihi (Received): 13.03.2009

kullanılarak incelenmiştir. Popülasyonların toplam karboksilesteraz aktiviteleri, karboksilesteraz E4 bant kalınlıkları belirlenmiş ve bu değerler İçel'den toplanan üç popülasyonda da yüksek bulunmuştur. Spektrofotometrik, immunolojik ve elektroforetik yöntemlerle yapılan ayrıntılı analizler sonucu, İçel popülasyonlarının çok yüksek düzeyde ve FE4 tipinde karboksilesteraza sahip olduğu saptanmıştır.

İçel popülasyonlarında, asetilkolinesteraz (AChE)'in duyarsızlaşması sonucunda ortaya çıkan insektisitlere direnç durumu da araştırılmıştır. Tüm popülasyonlar pirimicarb'a karşı duyarsız AChE'a sahip bulunmuştur. Bu popülasyonlarda insektisitlere direnç hem karboksilesteraz aktivitesindeki artış ve hem de AChE'in duyarsızlaşması nedeniyle olduğundan, "oklu direnç mekanizması" söz konusudur.

**Anahtar kelimeler:** Yeşil şeftali yaprakbiti, insektisit direnci, karboksilesteraz, asetilkolinesteraz, immunoassay, PAGE

## GİRİŞ

Yeşil şeftali yaprakbiti [*Myzus persicae* (Sulz.)] polifag bir zararlı olup, sokup emerek beslenmesi sonucu taze sürgünlere ve yapraklara doğrudan zarar verdiği gibi, 120'den fazla bitki virüs hastalığını naklederek (Anonymous 2008) de bitkilere dolaylı olarak etkiye bulunmaktadır. Kısa sürede sonuç alındığından bu zararlının mücadelesinde insektisitler tercih edilmekte ve yılda çok sayıda uygulama yapılmaktadır. Bu güçlü seleksiyon baskısı ise farklı mekanizmalara sahip olabilen insektisitlere direnç durumuna neden olmaktadır.

1990'lı yıllara kadar bu türde sadece bir direnç mekanizması belirlenmiştir. Bu mekanizmaya göre, sinir sistemindeki hedef alanına ulaşmadan önce insektisidal esterleri ayıran veya degrade eden, birbirine çok benzer iki karboksilesterazdan birinin aşırı üretimi *M. persicae*'de dirence neden olmaktadır. Bu mekanizma, organikfosforlu ve pek çok karbamatlı insektisite güçlü, deltamethrin gibi sentetik piretroidli insektisitlere ise sınırlı direnç görülmesine neden olmaktadır (Devonshire and Moores 1982). *M. persicae*'de ikinci direnç mekanizması olarak, organikfosforlu ve karbamatlı insektisitlerin hedef yeri olan asetilkolinesterazın (AChE) duyarsızlaşması belirlenmiştir. Modifiye AChE, pirimicarb ve triazamate gibi dimethyl karbamatlı insektisitlere yüksek düzeyde direnç görülmesine neden olmaktadır (Moores *et al.* 1994a).

*M. persicae*'de karboksilesterazın aşırı üretimi ve modifiye AChE sonucu oluşan direnç günümüzde Avrupa'da oldukça yaygın olarak görülmektedir (Foster *et al.* 1998, Field and Foster 2002, Mazzoni and Cravedi 2002, Arnstead *et al.* 2004). Bu çalışma İçel ilindeki yoğun insektisit kullanımının olduğ u sebze seralarından toplanan *M. persicae* popülasyonlarında direnç mekanizmalarının biyokimyasal yöntemler kullanılarak belirlenebilmesi amacıyla 1998 yılında Rothamsted Research (İngiltere)'de yürütülmüştür.

## MATERYAL VE METOT

Denemenin materyalini, *M. persicae* popülasyonları, mikroplaka okuyucu, soğutmalı vertikal elektroforez sistemi, immunoglobulin G, hassas terazi, inkübatör, mikropipetler, çoklu homojenizer, değişik cam ve plastik malzemeler oluşturmuştur.

### *Myzus persicae* popülasyonları

İçel ilinde sebze seralarının yoğun olarak bulunduğu alanlardaki biber bitkileri üzerinden *M. persicae* popülasyonları toplanmıştır. Denemelerde kullanılan *M. persicae* popülasyonlarının toplandığı yerler Çizelge 1’de açıklanmaktadır. Çizelgede İçel-4 olarak yer alan *M. persicae* popülasyonu sadece karboksilesteraz E4 ve FE4 tipinin belirlendiği elektroforez çalışmasında kullanılmıştır.

Karşılaştırma amacı ile Çizelge 2’de açıklanan standart *M. persicae* popülasyonları da denemelerde kullanılmıştır.

Tüm popülasyonlar  $25\pm 1$  °C sıcaklık, % 60–70 orantılı nem, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullara sahip böcek yetiştirme odalarında yetiştirilmiştir. *M. persicae* popülasyonları yetiştirilirken 8 x 4.5 x 2 cm boyutlarındaki pleksiglas böcek yetiştirme kutuları ve Çin lahanası (*Brassica napus* var. *chinensis*) yaprakları kullanılmıştır.

**ÇİZELGE 1.** *Myzus persicae* popülasyonlarının toplandıkları yerler

Popülasyon	Toplandığı Yer
İçel-1	Adanalıoğlu köyü –İçel
İçel-2	Homurlu köyü –İçel
İçel-3	Kazanlı köyü –İçel
İçel-4	Homurlu köyü –İçel

**ÇİZELGE 2.** Standart olarak kullanılan *Myzus persicae* popülasyonlarının özellikleri ve orijinleri

Popülasyon	Orijini	Özelliği
US1L	İngiltere	Hassas (S)
405	İngiltere	Az dirençli (R1)
T1V	İngiltere	Orta düzeyde dirençli (R2)
794Jz	İngiltere	Çok dirençli (R3) ve E4 tipi karboksilesteraza sahip
800F	İtalya	Çok dirençli (R3) ve FE4 tipi karboksilesteraza sahip
1200Q	Arjantin	Homozigot duyarsız AChE’ a sahip

### **Mikroplaka assayı ile toplam karboksilesteraz aktivitesinin belirlenmesi**

Devonshire (1975)'in toplam karboksilesteraz aktivitesini belirlemek için geliştirdiği yöntem, Devonshire ve ark. (1992) tarafından 96 kuyulu mikroplakaya adapte edilerek yeniden düzenlenmiştir. Çok kanallı mikropipet ile mikroplakanın her bir kuyusuna 50 µL % 0.1 Triton X-100 (Boehringer Mannheim, especially purified) içeren 20 mM fosfat buffer (pH:7.0) konulmuştur. Denenecek popülasyonlara ait ergin yaprakbitleri, her kuyuya birer adet olacak şekilde fırça yardımıyla aktarılmıştır. Ffrench-Constant ve Devonshire (1987) tarafından geliştirilmiş olan çoklu homojenizer (Burkard Scientific) kullanılarak yaprakbitleri homojenize edilmiş ve dokuların iyice çözünmesi için 15 dakika beklenmiştir. 30 mg Fast Blue RR Salt tartılıp 50 mL'ye fosfat buffer (pH: 6.0) ile tamamlanmış ve Whatman 1 nolu filtreden süzöldükten sonra üzerine 500 µL 100 mM 1-naftil asetat çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan boya-substrat çözeltisinden 200 µL alınarak çok kanallı mikropipet ile tüm kuyulara konulmuştur. Moleculer Devices marka "Thermomax" mikroplaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda 10 saniyelik aralarla, toplam 5 dakika süreyle "kinetik" okuma yapılarak "optical density" (O. D.) değerleri elde edilmiştir. Bu değerlerin logaritması alındıktan sonra grafik haline getirilmiştir.

### **Elektroforez ile karboksilesterazın incelenmesi**

Tüm popülasyonların karboksilesteraz bantları % 7.5'lük poliakrilamid jel (Ornstein and Davis 1964) ve glisin buffer kullanılarak soğutmalı dikey elektroforez sisteminde incelenmiştir. Bu amaçla kanatsız ergin yaprakbitleri tek tek 25 µL homojenizasyon çözeltisi (0.1 g sakkaroz, 1 ml % 1.6 Triton X-100, % 0.001 bromocresolpurple) içinde homojenize edilmiş ve her bir jel kuyusuna 15'er µL homojenat yüklenmiştir. 250 voltta, 1.5 saat koşturulan jel, 1 mL 100 mM 1-naftil asetat içeren 50 mL Fast Blue RR salt çözeltisi [0.1 g Fast Blue RR salt, 50 mL 0.2 M fosfat buffer (pH: 6.0)] içine alınmıştır. Yaklaşık 15 dakika boyandıktan sonra, fiksasyon için jel %7'lik asetik asit içine konulmuştur. "Kodak Digital Science" adlı program kullanılarak, jelin bir gün sonra fotoğrafı çekilmiştir.

### **İmmunoassay ile karboksilesteraz E4 ve FE4 aktivitelerinin belirlenmesi**

*M. persicae*'nin insektisitlere direnci ile doğrudan ilişkili olan karboksilesteraz E4 ve FE4 aktivitesinin belirlenebilmesi için Devonshire ve ark. (1986) tarafından geliştirilen immunoassay yöntemi kullanılarak denemeler yürütölmüştür. Denemelerde, Rothamsted Research'de elde edilmiş olan immunoglobulin G (IgG) ile NUNC maxisorp II marka, 96 kuyulu düztabanlı mikroplakalar kullanılmıştır. Analiz için kullanılacak mikroplakalar ilk önce IgG ile kaplanmıştır.

Temiz bir mikroplakanın her bir kuyusuna 50'şer µL fosfat buffer-saline-Tween çözeltisi (pH: 7.4) (10 L destile su içinde 80 g NaCl, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 29 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, 2 g KCl, 5.5 g Tween 20) konulmuştur. Daha sonra

mikroplakanın üst sıradaki 12 kuyusuna standart olarak kullanılan popülasyonlara ait, altta kalan 84 kuyusuna ise denenecek popülasyonlara ait ergin yaprakbitleri, her kuyuya bir adet olacak şekilde aktarılmıştır. Çoklu homojenizer ile yaprakbitleri 1 dakika süreyle homojenize edilmiş ve üzerine çok kanallı mikropipet ile 200 µL %0.1 Triton X-100 içeren 20 mM fosfat buffer (pH:7.0) eklenmiştir. Daha sonra bir adet temiz ve bir adet IgG ile kaplanmış olmak üzere iki adet yeni mikrolakaya alınmıştır. Seyreltme amacıyla kullanılan temiz mikrolakaya 100'er µL, IgG'li mikrolakaya ise 225'er µL fosfat buffer-saline-Tween çözeltisi (pH:7.4) konulmuştur. Çok kanallı mikropipet ile homojenizasyon yapılan mikrolakadan 25 µL alınarak seyreltme mikrolakasına aktarılmış, karıştırıldıktan sonra tekrar 25 µL'si bu kez IgG'li mikrolakaya ilave edilmiştir. Dolayısıyla seyreltme sonucu 0.02 yaprakbiti üzerinden denemeye devam edilmiştir. Üzerine streç film kapatılan IgG'li mikrolakaya 30 °C'deki inkübatörde 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda içindeki sıvılar dökülerek mikrolakaya iki kez fosfat buffer-saline-Tween çözeltisi (pH: 7.4) ile yıkanmıştır. Mikrolakaya kurutulduktan sonra, 25 mL 20 mM fosfat buffer (pH: 7.0), 125 µL 100 mM 1-naftil butirat ile karıştırılarak hazırlanan substrat çözeltisinden 200'er µL alınarak tüm mikrolakaya kuyularına konulmuştur. Mikrolakaya 30 °C'de 30 dakika süreyle karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. 150 mg Fast Blue B Salt, 15 mL destile suda çözündürülüp 50 mL'ye %5'lik SDS ile tamamlanarak boya çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden mikrolakaya 50'şer µL aktarılmış, 20 dakika karanlıkta bekletildikten sonra "Thermomax" mikrolakaya okuyucuda 620 nm dalga boyunda okunarak O.D. değerleri belirlenmiştir.

Elde edilen O.D. değerleri Devine ve Devonshire (1994) tarafından belirlenmiş olan Çizelge 3'deki sınırlara göre değerlendirilmiş ve denenen popülasyonların direnç kategorileri tespit edilmiştir.

**ÇİZELGE 3.** İmmunoassay ile belirlenen direnç kategorileri (Devine and Devonshire 1994)

Direnç Kategorisi	Sınırlar (O.D.)
Duyarlı (S)	< 0.140
Az dirençli (R1)	0.140 - 0.600
Orta derecede dirençli (R2)	0.600 - 2.000
Çok dirençli (R3)	> 2.000

### **Modifiye asetilkolinesterazın belirlenmesi**

Herhangi bir insektisit kullanarak, bunun varlığı ve yokluğunda asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinde bir değişiklik olup olmadığını tespit etmeyi amaçlayan bu çalışmada Moores ve ark. (1994a)'nın yöntemi kullanılmıştır. Mikrolakaya 50 µL fosfat buffer-saline-Tween çözeltisi (pH:7.4) konulduktan sonra her kuyuya 1 ergin yaprakbiti aktarılmıştır. Standart olarak kullanılan

popülasyonlara ait yaprakbitleri yine üst sıradaki 12 kuyuya konulmuştur. Yaprakbitleri çoklu homojenizer ile homojenize edildikten sonra her kuyuya 200 µL %0.1 Triton X-100 içeren 20 mM fosfat buffer (pH:7.0) ilave edilmiştir. Denemede, aynı bireye ait homojenat iki kısma ayrılmakta, bunlardan birine insektisit verildikten sonra substrat ilave edilmektedir. Diğer homojenata ise insektisit verilmeden substrat eklenmektedir. Bu amaçla, çok kanallı mikropipet ile her homojenattan iki kez 80'er µL alınarak temiz bir mikropipetle aktarılmıştır. Aynı homojenata ait 80 µL'lik hacimlerin biri insektisitli, diğeri ise insektisitsiz deneme için kullanılmıştır. Mikroplakanın bütün kuyularına 100 µL 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) çözeltisi [5 mg DTNB, 250 mL %0.1 Triton X-100 içeren 20 mM fosfat buffer (pH:7.0)] aktarılmıştır. 22 mg acetylthiocholine iodide (ATChI) [22 mg ATChI, 50 mL %0.1 Triton X-100 içeren 20 mM fosfat buffer (pH:7.0)], 50 ml %0.1 Triton X-100 içeren 20 mM fosfat buffer (pH:7.0) ile karıştırılarak substrat hazırlanmıştır. 10 µL 10<sup>-1</sup> M pirimicarb alınıp, 5 mL ATChI ile karıştırılmıştır. Daha sonra tek rakamlı mikropipetle sıralarına 100'er µL ATChI, çift rakamlı mikropipetle sıralarına ise 100'er µL ATChI + pirimicarb çözeltisi ilave edilmiştir. "Thermomax" mikropipet okuyucuda 405 nm dalga boyunda 10 saniyede bir 10 dakika süreyle "kinetik" okuma yapılmıştır. Softmax programı ile zamana bağlı olarak okunan absorbans değerlerinin, linear regresyonları ile ortalama AChE aktiviteleri (O.D.) belirlenmiştir.

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

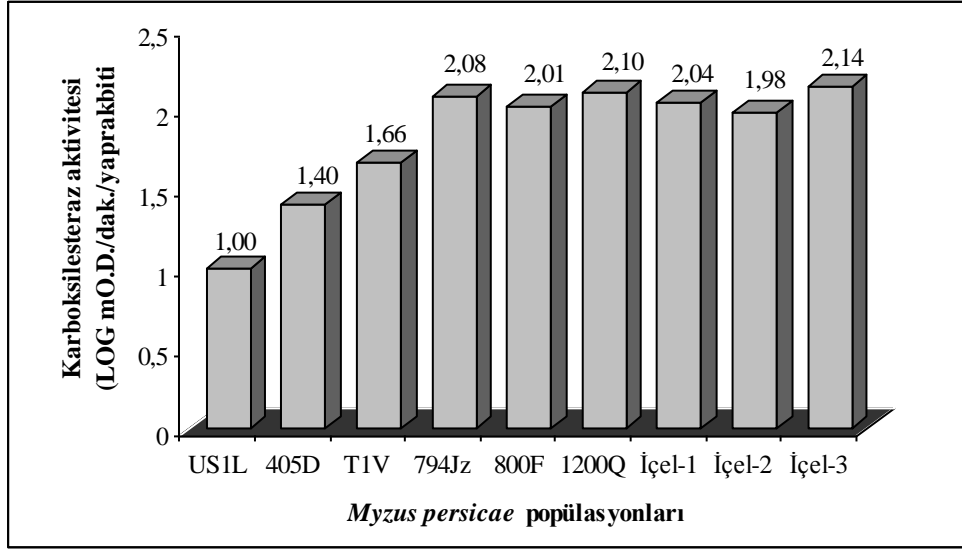
### Mikropipetle assay ile toplam karboksilesteraz aktivitesi

Deneme sonucu elde edilen toplam karboksilesteraz aktivitelerine ait veriler Şekil 1'de görülmektedir. Şekilde US1L, 405D, T1V, 794Jz, 800F ve 1200Q standart popülasyonlarının sırasıyla 1.00, 1.40, 1.66, 2.08, 2.01 ve 2.10 toplam karboksilesteraz aktivitesine sahip oldukları anlaşılmaktadır. Bu değerler, İçel-1, İçel-2 ve İçel-3 popülasyonlarında ise sırasıyla 2.04, 1.98 ve 2.14 olarak bulunmuştur.

Şekil 1'de İçel'den toplanan tüm popülasyonların, çok dirençli 794Jz, 800F ve 1200Q popülasyonlarına yakın düzeyde toplam karboksilesteraz aktivitelerine sahip oldukları görülmektedir. İçel-3 popülasyonu tüm standart popülasyonlardan daha yüksek aktiviteye sahip durumdadır.

### Elektroforez ile karboksilesteraz bulguları

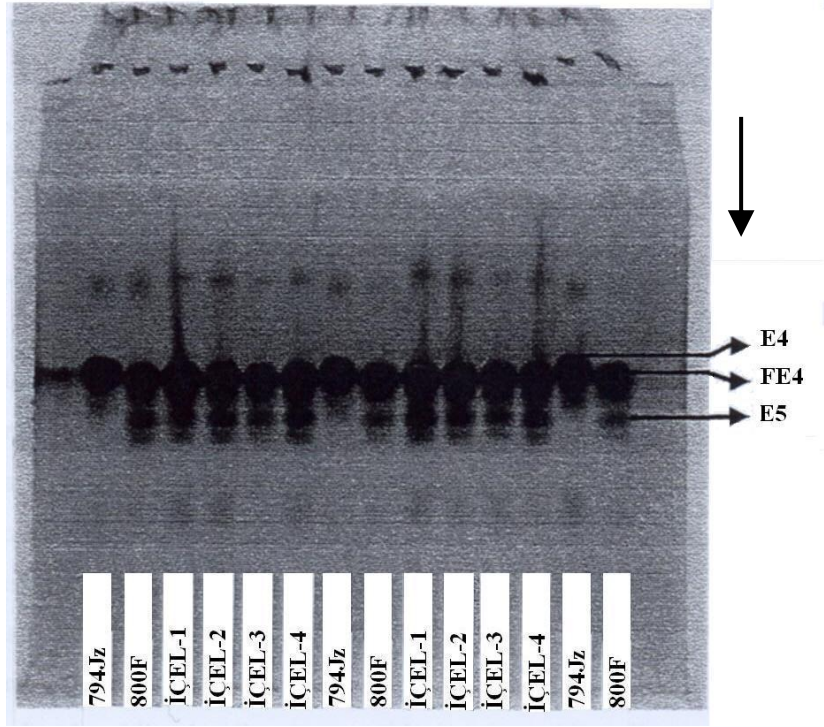
Direnç düzeyini belirlemede en çok kullanılan ikinci biyokimyasal yöntem, poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) 'dir (Devonshire 1975, Devonshire 1977). 1-naftil asetat'ın substrat olarak kullanıldığı bu yöntemde, direnç ile kantitatif ilişkisinin olduğu bilinen karboksilesteraz enzimi incelenmektedir. Elektroforez sonucu karboksilesteraz, jelde 7 bant oluşturmaktadır. Bu bantlardan, *M. persicae*'de insektisitlere direnç ile arasında ilişki olduğu belirlenen ve E4 adı verilen dördüncüsü ele alınmaktadır.



**ŞEKİL 1.** *Myzus persicae* popülasyonlarının mikroplaka assayı ile belirlenen toplam karboksilesteraz aktiviteleri.

*M. persicae* popülasyonlarının elektroforezdeki incelenmeleri sırasında dirençten birbirine çok yakın iki karboksilesterazdan birinin sorumlu olduğu belirlenmiştir. Buna göre karboksilesterazın, E4 ve FE4 adı verilen iki tipinden birinin aktivitesi, yaprakbitindeki dirençle ilişkilidir (Devonshire *et al.* 1983). Fazla miktarda üretilen bu karboksilesterazların tipi, yaprakbitinin karyotipine bağlı olarak değişmektedir. Normal karyotipte olanlar genellikle FE4'e sahipken, A1,3 translokasyonuna (autosome 1 ve 3 arasında kromozomal translokasyona) sahip olanlar daha çok E4 tipinde karboksilesteraza sahiptirler (Ffrench-Constant *et al.* 1988, Devonshire 1989a, Devonshire 1991). Dolayısıyla bu iki karboksilesteraz tipi aynı böcekte birlikte bulunmamaktadır. Bunların molekül kütleleri ve katalitik aktiviteleri çok az da olsa birbirlerinden farklılık göstermektedir. FE4 yaklaşık 66, E4 ise yaklaşık 65 kDa molekül külesine sahiptir (Field *et al.* 1993). E4, denature edilmemiş elektroforez jelinde FE4'den biraz daha yavaş hareket etmesi ile belli olmaktadır (Devonshire 1989b).

FE4 tipi karboksilesteraza sahip 800F ve E4 tipi karboksilesteraza sahip 794Jz standart popülasyonları kullanılarak, İçel popülasyonlarının karboksilesteraz tipini belirlemek için yapılan elektroforez çalışması sonucu elde edilen jelin fotoğrafı Şekil 2'de görülmektedir. Şekilde de görüleceği gibi, 794Jz popülasyonuna ait E4 bandı daha yavaş ilerlemiş, dolayısıyla daha önde bant oluşturmuştur. Buna karşılık, FE4 tipi karboksilesteraza sahip 800F popülasyonuna ait bant ise jelde daha hızlı ilerleyerek daha ilerde bant oluşturmuştur. Jel fotoğrafı dikkatle incelendiğinde, İçel popülasyonlarına ait 4. bantların, 800F popülasyonuna



**ŞEKİL 2.** 794Jz (E4) ve 800F (FE4) standart popülasyonları kullanılarak, İçel popülasyonlarının karboksilesteraz tipinin belirlendiği elektroforez jeli.

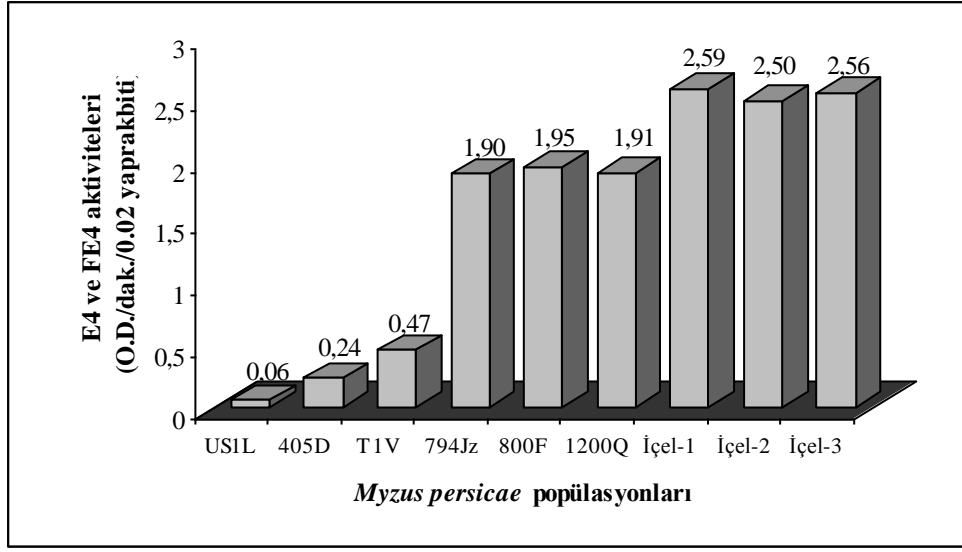
ait FE4 bandı ile aynı hatta olduğu görülmektedir. Bu durumda, İçel popülasyonlarının FE4 tipinde karboksilesteraza sahip olduğu anlaşılmaktadır. FE4 tipinde karboksilesteraza sahip olanlar ayrıca E5 bandına da sahip bulunmaktadır (Devonshire 1989b). Nitekim İçel popülasyonlarına ait bireylerin karboksilesteraz durumunu gösteren jelde, E5 bandı da açıkça görülmektedir. Bu da, karboksilesterazın FE4 tipinde olduğu açıklamasını desteklemektedir.

İlk kez İtalya'dan toplanan Ferrara ırkında tespit edilen FE4 tipindeki karboksilesteraza (Devonshire *et al.* 1983), daha sonraları Akdeniz ülkelerinden toplanan birçok yaprakbiti popülasyonunda da rastlanmıştır (Devonshire and Field 1991, Field and Devonshire 1992, Bizzaro *et al.* 2005). Akdeniz bölgesinde yer aldığından İçel'den toplanan popülasyonların FE4 tipinde karboksilesteraza sahip bulunması da bu çalışmaları destekler niteliktedir.

#### **İmmunoassay ile karboksilesteraz E4 ve FE4 aktiviteleri**

İmmunoassay yöntemi sonucu belirlenen E4/FE4 aktiviteleri Şekil 3'de verilmektedir. İçel-1, İçel-2 ve İçel-3 popülasyonlarının FE4 aktiviteleri sırasıyla 2.587, 2.495 ve 2.562 olarak bulunmuştur. Aynı denemede kullanılan US1L, 405D,





**ŞEKİL 3.** *Myzus persicae* popülasyonlarının immunoassay ile belirlenen karboksilesteraz E4 ve FE4 aktiviteleri.

T1V, 794Jz, 800F ve 1200Q standart ırklarında ise E4 veya FE4 aktiviteleri sırasıyla 0.056, 0.241, 0.465, 1.900, 1.953 ve 1.909 olarak belirlenmiştir.

İmmunoassay yönteminden elde edilen sonuçlar, Devine ve Devonshire (1994)'in sınıflandırmasına göre değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre, immunoassayde R2 için 0.600-2.000 arası, R3 için >2.000 şeklinde sınıflandırma yapılmasına rağmen, denememizde kullanılan standart R2 ırkı T1V 0.465, 794Jz ırkı ise 1.900 aktiviteye sahip bulunmuştur. Bu durum bazen IgG'nin etkin kaplama yapmamasından kaynaklanabilmektedir. Ancak bu koşullarda bile İçel popülasyonlarının 2.000 değerinin çok üzerinde aktivite göstermesi, bu popülasyonların çok dirençli olduğunu açıkça göstermektedir.

İmmunoassayde 0.02 yaprakbiti kullanılarak sadece E4/FE4 aktivitesi ölçüldüğünden, diğer yöntemlere göre dirençli varyantlar arasındaki farklılık çok daha kesin olarak anlaşılmaktadır. 0.08 yaprakbiti kullanıldığında ise sadece hassas ve dirençli varyantlar ayırt edilebilmektedir (Ffrench-Constant and Devonshire 1988). Bu durumda, 0.02 yaprakbiti kullanıldığından elde edilen sonuçlar, İçel popülasyonlarının çok yüksek direnç düzeyine sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Nitekim bu sonuçlar mikropilaka assayinden elde edilen sonuçlarla da desteklenmektedir.

E4 üzerindeki bu biyokimyasal denemeler, karboksilesteraz genlerinin moleküler genetik çalışmalarla incelenmesiyle desteklenmiştir. Karboksilesteraz E4'ün analizi sonucu, duyarlı ve dirençli yaprakbitilerindeki sıralanışın aynı olduğu, ancak bir amplifikasyon ile insektisitlere toleransta farklılık olduğu belirlenmiştir

(Field *et al.* 1993). İmmunoassay sonuçlarından elde edilen verilere göre, R3 yaprakbitlerinin gen kopya sayısının çok yüksek olması beklenirken, moleküler çalışmalardan bu sonuç alınamamıştır (Field and Devonshire 1997).

İmmunoassay, E4 veya FE4 içeriğine bağlı olarak yaprakbiti direncinin şüphe bırakmayacak şekilde sınıflandırılabilirdiği bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Devonshire and Moores 1984, Devonshire *et al.* 1986, Moores *et al.* 1989). Tarladaki dirençli bireylerin varlığını takip etmede (Ffrench-Constant and Devonshire 1988), hassas ve dirençli yaprakbitlerinden oluşan karışık popülasyonların değişik insektisit uygulamalarından sonraki durumlarını araştırmada (Ffrench-Constant *et al.* 1987) ve klonlar arasında direnç kaybının belirlenmesinde (Ffrench-Constant *et al.* 1988) bu yöntem kullanılmaktadır.

### **Modifiye asetilkolinesteraz bulguları**

İnsektisitlere direncin görülmesinde üç büyük mekanizmanın bulunduğu bilinmektedir. Bunlar, penetrasyonun azalması, insektisit metabolizması (detoksikasyon) ve hedef alanın duyarsızlığıdır. Böcekte bu mekanizmalardan bir tanesi bulunabilirdiği gibi birkaçının birlikte bulunması da söz konusu olmaktadır. Bu durumda direnç daha yüksek düzeyde olmakta ve “çoklu direnç” olarak nitelenmektedir.

Sinir sistemini etkileyen organikfosforlu ve karbamatlı insektisitler, hedef organizmaya uygulandıktan sonra vücut içine alınmakta ve sinir sistemine ulaştığında AChE enzimini etkisiz hale getirmektedir. AChE enziminin etkisiz hale gelmesi durumunda, asetilkolin tarafından başlatılan sinirsel iletim durdurulamamakta ve böcek ölmektedir. İnsektisit sinir sistemine ulaşamaması durumunda ise, AChE enzimi, ACh'i hidrolize ederek sinirsel iletimin durdurulmasını sağlamaktadır. Böylece sinirlerde dalgalar halinde tekrarlayan iletim olmakta ve böcek normal yaşamını sürdürebilmektedir (Moores 1995, Toutant 1989).

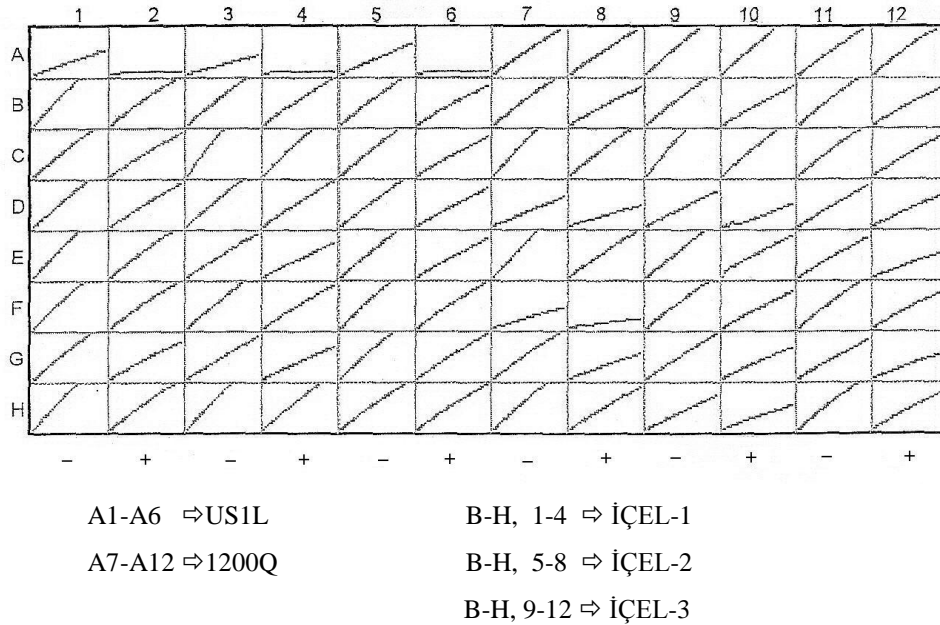
*M. persicae*'de ilk bulunan direnç mekanizmasına göre, artan karboksilesteraz E4/FE4 nedeniyle detoksikasyon oluşmakta ve bunun sonucunda böcek vücuduna alınan insektisit bir kısmı sinir sistemine ulaşmadan etkisiz hale getirilmektedir. Dolayısıyla AChE normal biyolojik fonksiyonuna devam etmekte ve böcek yaşamını sürdürmektedir. Buraya kadar anlatılan çalışmalarda *M. persicae*'de detoksikasyon sonucunda meydana gelen direnç durumu üzerinde durulmuştur.

İnsektisit, tüm engelleri aşarak sinir sistemine dolayısıyla AChE enzimine ulaşsa bile, enzimin asetilkolin molekülü ile normal reaksiyona girmesini engellemeyebilir. AChE enziminin duyarsızlaşması şeklinde adlandırılan bu direnç mekanizması, organikfosforlu ve karbamatlı insektisitlere direnç oluşmasına neden olmaktadır. AChE'nin duyarsızlaşması, ilk kez 1964 yılında Smisaert tarafından *Tetranychus urticae*'de yapılan bir araştırma sonucunda belirlenmiştir (Metcalf 1989).

Moore *et al.* (1988)'ın insektisitlere dirençli *Musca domestica*, *Bemisia tabaci* ve *A. gossypii* popülasyonlarında yaptıkları incelemelerde, bu popülasyonların duyarlı AChE'ye sahip oldukları tespit edilmiştir. *M. persicae*'nin insektisitlere dirençli bir çok popülasyonunun incelendiği aynı çalışmada ise modifiye AChE'ye rastlanamamıştır.

İçel popülasyonları ile AChE'yi pirimicarb'a duyarlı (US1L) ve duyarlı (1200Q) olan standart popülasyonlar kullanılarak yürütülen denemelerin Vmax adlı bilgisayar programından elde edilen absorbanz-zaman verilerinin lineer regresyonları Şekil 4'de verilmektedir. US1L popülasyonuna ait pirimicarb uygulanmamış mikropilaka kuyularında (A1, A3, A5) AChE'nin normal reaksiyonu görülmektedir. Yanındaki pirimicarb uygulanmış kuyularda (A2, A4, A6) ise insektisit AChE enzimini tamamen etkisiz hale getirdiğinden herhangi bir reaksiyon bulunmamaktadır. Moore ve ark. (1994a, 1994b) tarafından bu durum, "US1L popülasyonunun homozigot duyarlı formda AChE enzimine sahip olduğu" şeklinde değerlendirilmiştir.

Şekil 4'de 1200Q popülasyonunun pirimicarb uygulanmış (A8, A10, A12) ve uygulanmamış (A7, A9, A11) kuyularındaki grafiklerin birbirleriyle aynı eğime sahip oldukları görülmektedir. Pirimicarb uygulansa bile, AChE enzimi bu insektisite tamamen duyarlı hale geldiğinden, enzim etkisiz hale getirilememiş ve



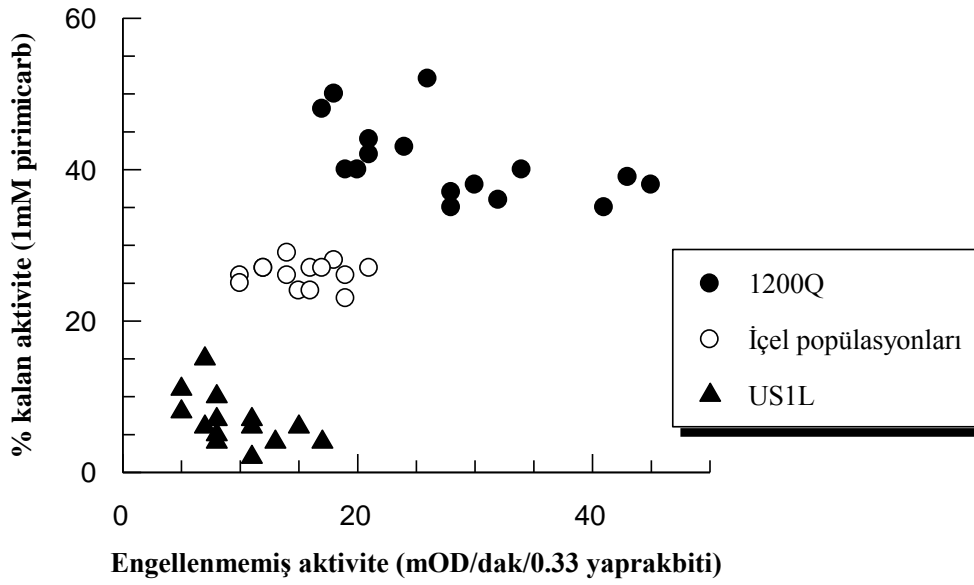
**ŞEKİL 4.** *Myzus persicae*'nin pirimicarb uygulanmış ve uygulanmamış homojenatlarının AChE aktiviteleri.

normal fonksiyonuna devam etmiştir. Pirimicarb uygulandığında ve uygulanmadığında elde edilen grafiklerin eğimlerinin, dolayısıyla ortalama AChE aktivitelerinin aynı olması, Moores *et al.* (1994b) tarafından “1200Q popülasyonunun homozigot duyarsız formda AChE’ a sahip olduğu” şeklinde değerlendirilmiştir.

İçel popülasyonlarına ait bireylerin AChE enziminin pirimicarb’a verdikleri reaksiyonlar Şekil 4’de görülmektedir. Pirimicarb uygulandığında (B-H2, B-H4, B-H6, B-H8, B-H10, B-H12) da, uygulanmadığında (B-H1, B-H3, B-H5, B-H7, B-H9, B-H11) da her üç İçel popülasyonunun AChE’lerinin reaksiyon verdikleri görülmektedir. Ancak 1200Q popülasyonundan farklı olarak, İçel popülasyonlarının pirimicarb uygulandığında elde edilen grafikleri, uygulanmamışlardan daha az eğime sahiptir. Bu durum, pirimicarb ile AChE enziminin bir miktar etkisiz hale getirildiğini göstermektedir. Ancak, yine de enzimin büyük bir kısmı etkisiz hale getirilemediğinden, AChE fonksiyonuna devam etmektedir. *M. persicae* ve *M. nicotianae* (Moores *et al.* 1994a, Moores *et al.* 1994b) ile *Aphis gossypii* (Moores *et al.* 1996a, Moores *et al.* 1996b)’de yapılan çalışmalarda bu denemedekine benzer reaksiyonu veren popülasyonlar “heterozigot duyarsız” olarak değerlendirilmiştir. Dolayısıyla İçel popülasyonlarının da heterozigot duyarsız AChE’ a sahip olduğu düşünülmektedir.

Pirimicarb uygulanmış ve uygulanmamış, dolayısıyla AChE’i engellenmiş ve engellenmemiş kuyulardan elde edilen ortalama AChE değerlerinin birbirlerine oranlanması ile bulunan “kalan aktivite” değerleri kullanılarak çizilen dağılım grafiği Şekil 5’de görülmektedir. Şekil incelendiğinde, homozigot duyarlı US1L popülasyonuna ait bireylerin, gerek engellenmemiş ve gerekse kalan AChE aktivitelerinin oldukça düşük olduğu anlaşılmaktadır. Homozigot duyarsız 1200Q popülasyonuna ait bireylerde ise bu değerler US1L’ye göre oldukça yüksektir. İçel popülasyonlarından elde edilen engellenmemiş ve kalan AChE aktivite değerleri, US1L ve 1200Q popülasyonlarının arasında değerlere sahiptir. Bu şekil, İçel popülasyonlarının heterozigot duyarsız AChE’ a sahip olabileceği fikrini desteklemektedir.

Artan karboksilesteraz nedeniyle dirençli olan yaprakbitlerinin mücadelesinde sıklıkla pirimicarb kullanılmaktadır. Yunanistan’ın bazı bölgelerinde, tütünlerdeki *Myzus* türlerinin mücadelesinde çok önemli problemler ortaya çıkmış ve bunların karboksilesteraz aktivitelerine bakıldığında R2 düzeyinde dirençli oldukları tespit edilmiştir. Bu düzeyde dirençli yaprakbitleri, genellikle pirimicarb ile kontrol altına alınmaktadır. Bu popülasyonların AChE’leri, kinetik mikrolpaka okuyucuda AChE assayı kullanılarak incelenmiş ve pirimicarb’a duyarsız oldukları tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, tüm dünyadan toplanan yaklaşık 70 örnek incelenmiş ve 3 Japon ile 4 Yunan örneğinin heterozigot formda modifiye AChE’ a sahip olduğu belirlenmiştir. Duyarsızlık faktörü pirimicarb için >100 kat ve triazamate için >10 kattır (Moores *et al.* 1994a, Moores *et al.* 1994b).



**ŞEKİL 5.** *Myzus persicae* popülasyonlarının 1mM pirimicarb ile AChE'nin engellenmesi sırasındaki engellenmemiş AChE aktiviteleri ile kalan aktivite yüzdelерinin birlikte değerlendirilmesi.

Hollanda seralarındaki biber bitkilerinden toplanan *M. persicae* örneklerinde de bu direnç mekanizması bulunmuştur. Ayrıca, Arjantin'den gelen bir örnekte, ilk defa homozigot formda modifiye AChE bulunmuştur. Bu örnekteki karboksilesteraz seviyesi tarla dirençli popülasyonu (R2) kadar olmasına rağmen, laboratuvar biyoassaylerinde bile pirimicarb ile öldürülememişlerdir. Bunların direnç oranının pirimicarb için 500'den, triazamate için ise 700'den fazla olduğu bulunmuştur (Moore *et al.* 1994b).

Oldukça seyrek olarak rastlanılan modifiye AChE mekanizmasının pirimicarb ve triazamate adlı iki afisite karşı bulunduğu saptanmıştır. İngiltere'de yaprakbiti örnekleri her iki direnç mekanizması bakımından rutin olarak analiz edilmektedir (Moore 1995). Bu çalışmalar sonucunda ilk kez 1996 yılında İngiltere'de modifiye AChE mekanizması nedeniyle pirimicarb ve triazamate'e karşı direnç durumu saptanmıştır (Foster *et al.* 1998). Criniti ve ark. (2008) tarafından İtalya'dan toplanan 59 *M. persicae* popülasyonunun insektisitlere direnç durumu biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle incelenmiş, popülasyonların %76.3'ünün yüksek veya çok yüksek düzeyde esteraz aktivitesine, %27.1'inin ise modifiye AChE'a sahip oldukları belirlenmiştir.

Aynı popülasyonlarla yürütülen biyoassay çalışmalarında pirimicarbın çok yüksek dozları denenmesine rağmen, İçel popülasyonlarının LC<sub>50</sub> değerlerini hesaplayabilmek için yeterli ölüm oranı elde edilememiş ve direnç oranlarının 600'den fazla olduğu tahmin edilmiştir (Velioglu ve Toros 2002). Gerek Velioglu

ve Toros (2006) tarafından yapılan spektrofotometrik analizlerde, gerekse bu çalışmada karboksilesteraz aktiviteleri oldukça yüksek bulunmasına rağmen, karboksilesteraz nedeniyle pirimicarb'a bu kadar yüksek direncin oluşmasının mümkün olamayacağı düşünülerek modifiye AChE durumu incelenmiştir. Sonuç olarak bu popülasyonların AChE'nin duyarlı hale geldiğinin belirlenmesi, pirimicarb'a karşı oluşan yüksek düzeydeki direnci de açıklamaktadır.

Denemeler sonucunda İçel popülasyonlarında, yüksek düzeydeki karboksilesteraz (E4 ve FE4) nedeniyle vücuda alınan pirimicarb'ın bir kısmının toksik olmayan yapıya dönüştürüldüğü (detoksikasyon), kalan pirimicarb'ın sinir sistemine ulaşabilen kısmının ise, AChE'nin duyarlı hale gelmesi nedeniyle (hedef alanın duyarlılaşması) etkisini gösteremediği belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, İçel popülasyonlarında farklı iki direnç mekanizması tespit edildiğinden bu popülasyonlarda "çoklu direnç mekanizması" olduğu belirlenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı destekleyen ve İngiltere'de eğitim imkanı sağlayan Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

## LİTERATÜR

- Anonymous, 2008. [http://www.rothamsted.ac.uk/insect-survey/STMyzus\\_persicae.php](http://www.rothamsted.ac.uk/insect-survey/STMyzus_persicae.php).
- Anstead, J. A., Williamson, M. S., Eleftherianos, I. and Denholm, I. 2004. High-throughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 871–877.
- Bizzaro, D., Mazzoni, E., Barbolini, E., Giannini, S., Cassanelli, S., Pavesi, F., Cravedi, P. and Manicardi, G. C. 2005. Relationship among expression, amplification, and methylation of FE4 esterase genes in Italian populations of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 81, 51-58.
- Criniti, A., Mazzoni, E., Cassanelli, S., Cravedi, P., Tondelli, A., Bizzaro, D. and Manicardi, G. C. 2008. Biochemical and molecular diagnosis of insecticide resistance conferred by esterase, MACE, *kdr* and super-*kdr* based mechanisms in Italian strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90, 168-174.
- Devine, G. and Devonshire, A. L. 1994. Immunoassay protocol for characterising insecticide-resistant *Myzus persicae*. 5 p., (basılmamış laboratuvar protokolu).
- Devonshire, A. L. 1975. Studies of the carboxylesterases of *Myzus persicae* resistant and susceptible to organophosphorus insecticides. *Proceedings 8<sup>th</sup> British Insecticide and Fungicide Conference*, 67-73.

- Devonshire, A. L. 1977. The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochem. J.*, 167, 675-683.
- Devonshire, A. L. and Moores, G. D. 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18, 235-246.
- Devonshire, A. L., Moores, G. D. and Chiang, C. L. 1983. The biochemistry of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. In: *Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment* (eds. Miyamoto, J., Kearney, P. C., Matsunaka, D. H. and Murphy, S. D.). Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Congress of Pesticide Chemistry, 191-196, Pergamon, Oxford.
- Devonshire, A. L. and Moores, G. D. 1984. Immunoassay of carboxylesterase activity for identifying insecticide resistant *Myzus persicae*. *British Crop Protection Conference-Pests and Diseases*, 515- 520.
- Devonshire, A. L., Moores, G. D. and Ffrench-Constant, R. H. 1986. Detection of insecticide resistance by immunological estimation of carboxylesterase activity in *Myzus persicae* (Sulzer) and cross reaction of the antiserum with *Phorodon humuli* (Schrank) (Hemiptera: Aphididae). *Bull. ent. Res.*, 76, 97- 107.
- Devonshire, A. L. 1989a. Insecticide resistance in *Myzus persicae* : from field to gene and back again. *Pestic. Sci.* 26, 375-382.
- Devonshire, A. L. 1989b. The role of electrophoresis in the biochemical detection of insecticide resistance. In: *Electrophoretic Studies on Agricultural Pests* (eds. Loxdale, H. D. and Hollander, J. den). *Systematic Association Special Volume No: 39*, Clarendon Press, 363-374, Oxford.
- Devonshire, A. L. 1991. Role of esterases in resistance of insects to insecticides. *Biochemical Society Transactions*, 19 (3), 755-759.
- Devonshire, A. L. and Field, L. M. 1991. Gene amplification and insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol.*, 36, 1-23.
- Devonshire, A. L., Devine, G. J. and Moores, G. D. 1992. Comparison of microplate esterase assays and immunoassay for identifying insecticide resistant variants of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Bull. ent. Res.*, 82, 459-463.
- Ffrench-Constant, R. H. and Devonshire, A. L. 1987. A multiple homogenizer for rapid sample preparation in immunoassays and electrophoresis. *Biochem. Genet.*, 25, 493- 499.
- Ffrench-Constant, R. H., Devonshire, A. L. and Clark, S. J. 1987. Differential rate of selection for resistance by carbamate, organophosphorus and combined pyrethroid and organophosphorus insecticides in *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Bull. ent. Res.*, 77, 227-238.

- Ffrench-Constant, R. H. and Devonshire, A. L. 1988. Monitoring frequencies of insecticide resistance in *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) in England during 1985-86 by immunoassay. *Bull. ent. Res.*, 78, 163-171.
- Ffrench-Constant, R. H., Devonshire, A. L. and White, R. P. 1988. Spontaneous loss and reselection of resistance in extremely resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 30, 1-10.
- Field, L. M. and Devonshire, A. L. 1992. Esterase genes conferring insecticide resistance in aphids. In: *Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance: Diversity Among Insects* (eds. Mullin, C. A. and Scott, J. G.). American Chemical Society, 209-217, USA.
- Field, L. M., Williamson, M. S., Moores, G. D. and Devonshire, A. L. 1993. Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem. J.*, 294, 569-574.
- Field, L. M. and Devonshire, A. L. 1997. Structure and organization of amplicons containing the E4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem. J.*, 322, 867-871.
- Field, L. M. and Foster, S. P. 2002. Amplified esterase genes and their relationship with other insecticide resistance mechanisms in English field populations of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Management Science* 58, 889-894.
- Foster, S. P., Denholm, I., Harling, Z. K., Moores, G. D. and Devonshire, A. L. 1998. Intensification of insecticide resistance in UK field populations of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) in 1996. *Bull. ent. Res.*, 88, 127-130.
- Mazzoni, E. and Cravedi, P. 2002. Analysis of insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer) populations collected in Italian peach orchards. *Pest Management Science* 58, 975-980.
- Metcalf, R. L. 1989. Insect resistance to insecticides. *Pestic. Sci.*, 26, 333-358.
- Moores, G. D., Denholm, I., Byrne, F. J., Kennedy, A. L. and Devonshire, A. L. 1988. Characterising acetylcholinesterase genotypes in resistant insect populations. Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases, 451-456.
- Moores, G. D., Ffrench-Constant, R. H. and Devonshire, A. L. 1989. Immunoassay for detecting insecticide resistance in aphids. *Pestic. Sci.*, 26, 324-326.
- Moores, G. D., Devine, G. J. and Devonshire, A. L. 1994a. Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 49, 114-10.
- Moores, G. D., Devine, G. J. and Devonshire, A. L. 1994b. Insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases, 413-418.
- Moores, G. D. 1995. New resistant-aphid threat from abroad. *Arable Farming*, 22 (7), 10-13.



- Moores, G. D., Gao, X., Denholm, I. and Devonshire, A. L. 1996a. Characterisation of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 56, 102-110.
- Moores, G. D., Han, Z. J., Denholm, I. and Devonshire, A. L. 1996b. Two forms of insecticide insensitive acetylcholinesterase in *Aphis gossypii*. Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases, 745-750.
- Ornstein, L. and Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis I. Background and theory. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 121, 321-349.
- Toutant, J. P. 1989. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Progress in Neurobiology*, 32, 423-446.
- Velioğlu, A. S. ve Toros S. 2002. Değişik bölgelerden toplanan *Myzus persicae* (Sulz.) (Homoptera: Aphididae) popülasyonlarının farklı gruptan bazı insektisitlere karşı duyarlılık farklarının belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*, 42 (1-4): 67-79.
- Velioğlu, A. S. ve Toros S. 2006. *Myzus persicae* (Sulz.) (Hemiptera: Aphididae)'de insektisitlere direnç ile ilişkili karboksilesterazın spektrofotometre ve elektroforez ile belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*, 46 (1-4): 1-12.