

## ***Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)'nın hassas ve tarla popülasyonlarında enzim aktivitelerinin belirlenmesi ile insektisitlere dayanıklılık arasındaki ilişki<sup>1</sup>**

**Sakine UĞURLU KARAĞAÇ<sup>2</sup> Mesude İŞCAN<sup>3</sup> M.Oktay GÜRKAN<sup>4</sup>**

### **SUMMARY**

#### **Determination of enzyme activities of susceptible and field populations of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) and its relationship with insecticide resistance**

The purpose of this study was to determine the activities of general esterase, glutathione S-transferase (GST), and acetylcholinesterase (AChE) enzymes of *Helicoverpa armigera* (Hubner) strains, one of the most important pests of cotton, collected from cotton fields in Adana, Hatay, Antalya and susceptible strain (Israel), and to determine their relationship with insecticide resistance. The activities of general esterase, glutathione S-transferase enzyme (GST) and acetylcholinesterase (AChE) enzymes were determined in *Helicoverpa armigera* strains. The activities of general esterase enzyme in Adana, Hatay and Antalya populations were determined 0.65, 0.8 ve 1.14 fold, respectively. Adana and Hatay strains had lower general esterase enzyme activities than that of susceptible strain. However, general esterase enzyme activity in Antalya strain was found to be similar to susceptible strain. GST enzyme activities in Adana, Hatay and Antalya populations were determined 0.75, 0.92 ve 1.06 fold, and AChE enzyme activities were 0.43, 0.60 and 0.80 fold, respectively. GST and AChE enzyme activities of field strains and susceptible strain were found to be similar. Enzymes activities and insecticide resistance had been compared with the resistance ratios of at the same populations, to determine the relationship between enzyme activities and insecticide resistance in *H. armigera*.

**Key Words:** Cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, enzyme activities, insecticides, insecticide resistance, cotton

<sup>1</sup> Bu makale “*Heliothis armigera* (Lepidoptera:Noctuidae)'nın Değişik Bölge Popülasyonlarının Bazı İsektisitlere Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar” isimli doktora projesinin bir kısmıdır.

<sup>2</sup> Ankara Zirai Mücadele Merkez araştırma Enstitüsü-06172 Yenimahalle-Ankara

<sup>3</sup> Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoloji BölümüBiyokimya Anabilim Dalı-Ankara

<sup>4</sup> Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Dışkapı- Ankara

Sorumlu Yazar (Corresponding author) e-mail: sugurlu@hotmail.com

Yazının Yayın Kuruluna Geliş Tarihi (Received): 11.06.2010

## ÖZET

Bu çalışma, pamuğun önemli zararlılarından biri olan *Helicoverpa armigera* (Hübner)'nin İsrail (hassas)'den getirilen ve Adana, Hatay ve Antalya illerindeki pamuk ekim alanlarından toplanan popülasyonlarda genel esteraz, glutatyon S-transferaz ve asetilkolinesteraz enzim aktivitelerini ve enzim aktiviteleri ile dayanıklılık arasındaki ilişkileri belirlemek amacıyla ele alınmıştır. *H. armigera* popülasyonlarının genel esteraz, glutatyon S-transferaz (GST) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Genel esteraz enzim aktivitesi Adana, Hatay ve Antalya popülasyonlarında hassasa göre sırasıyla 0.65, 0.80 ve 1.14 kat olarak belirlenmiştir. Tarla popülasyonlarının genel esteraz enzim aktiviteleri hassas popülasyona göre Adana ve Hatay popülasyonlarında daha düşük bulunmasına rağmen, Antalya popülasyonunda benzer bulunmuştur. GST enzim aktivitesi Adana, Hatay ve Antalya popülasyonlarında sırasıyla 0.75, 0.92 ve 1.06 kat, AChE enzim aktivitesi ise Adana Hatay ve Antalya popülasyonlarında sırasıyla 0.43, 0.60 ve 0.80 kat olarak belirlenmiştir. Genel esteraz enzim aktivitesi GST ve AChE enzim aktivitesi açısından tarla popülasyonları ile hassas popülasyon arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Belirlenen enzim aktiviteleri ve insektisitlere dayanıklılık arasında bir ilişkinin olup olmadığı, aynı popülasyonlarda daha önce belirlenen dayanıklılık oranları ile karşılaştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Yeşilkurt, *Helicoverpa armigera*, enzim aktiviteleri, insektisit dayanıklılığı, pamuk

## GİRİŞ

*Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) pamuğun önemli bir zararlısıdır ve dünyanın pamuk ekilen pek çok yerinde *Helicoverpa* spp'nin bulunduğu ve zarar yaptığı bilinmektedir. Larvaları pamukta genellikle taraklar başta olmak üzere generatif organlarda beslenerek, pamuğun koza oluşumuna engel olup önemli oranda ürün kaybına neden olmaktadır. Polifag olan bu zararlı ülkemizde de başta pamuk olmak üzere tarımı yapılan birçok kültür bitkisinde zarar yapmaktadır. Bu zararlıya karşı uygulanan mücadelede yoğun olarak insektisit kullanılmaktadır.

Sürekli ve yoğun ilaç kullanımı çevre kirlenmesi, doğal dengenin bozulması ve direnç oluşumu gibi birçok problemi beraberinde getirmektedir. Özellikle böceklerin ilaçlara dayanıklı hale gelmesi, ilaçların etkisinin azalmasına neden olarak, tarımsal üretimi tehdit eden en önemli sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Knight and Norton 1990). Birçok ülkede *H. armigera*'nin ve diğer *Helicoverpa* spp'nin farklı gruptan insektisitlere karşı dayanıklılık geliştirdiği kaydedilmektedir (Luttrell et al. 1987, Ahmad and McCaffery 1988, Daly 1988, Elzen et al. 1992, Ahmad et al. 1995).

Klorlandırılmış hidrokarbonluların çevreye olumsuz etkileri nedeniyle yasaklanmasından sonra, organik fosforlu, karbamatlı ve sentetik piretroidli insektisitlerin kullanımına paralel olarak, yeni tip insektisitlere karşı da dayanıklılık

oluşmaya başlamıştır (Forgash 1984). Günümüzde 500'den fazla tür en az bir insektisit veya akarisine karşı dayanıklılık kazanmış durumdadır (Soderlund 1997).

İnsektisitlere karşı dayanıklılığın dört önemli mekanizması vardır. Fiziksel dayanıklılık mekanizması; böceğin vücudunun dış kısmındaki bazı değişikliklerle toksik maddenin alımı yavaşlatılır veya azaltılır. Örneğin, kütikular yapıdaki bir değişiklikle topikal olarak uygulanan insektisitlerin penetrasyon oranı azalabilir. Davranışsal dayanıklılık; böceğin davranışsal değişiklikleri ilacın toksik dozuna temas etmesini önlemektedir. Metabolik dayanıklılık; böceğin normal enzimatik metabolizması insektisit detoksifikasyonunu arttırmak veya insektisit aktivasyonunu önlemek için değiştirilir. Değiştirilmiş hedef bölge; toksik maddelere karşı duyarlılığı azaltmak için etki yeri değiştirilir (Hassall 1990, Callaghan 1991).

Organik fosforlu insektisitlere karşı metabolik dayanıklılık, artan karışık fonksiyonlu oksidaz, artan glutatyon S- transferaz ve esteraz aktivitelerini veya bu enzimlerin miktarı değiştirilmiş izozim formlarını içermektedir (Plapp 1984).

Dünyada özellikle son yıllarda insektisitlere dayanıklılık konusunda çok detaylı araştırmalar yapılmakta ve bu araştırmalarda geleneksel dayanıklılık belirleme yöntemlerinin yanında biyokimyasal ve moleküler tekniklerden de yararlanılmaktadır.

Bu çalışmada, *H. armigera*'nın değişik bölgelerden toplanan popülasyonlarının, dayanıklılıkta rol oynayan genel esteraz, glutatyon S- transferaz ve asetilkolinesteraz enzimlerinin spesifik aktiviteleri belirlenmiş ve enzim aktiviteleri ile dayanıklılık arasında bir ilişki olup olmadığına bakılmıştır. Denemeler 1998-2001 yılları arasında Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsünde yürütülmüştür.

## MATERYAL VE METOT

Denemelerde kullanılan hassas popülasyon İsrail'de bulunan Tarımsal Araştırma Organizasyonu'ndan temin edilmiştir. Tarla popülasyonları Adana, Hatay ve Antalya'da bulunan pamuk ekim alanlarından toplanmıştır. *H. armigera* popülasyonlarının laboratuarda beslenmeleri için hazır böcek besini Amerika'da bulunan Southland Product Inc. firmasından temin edilmiştir. Biyokimyasal çalışmalarda, Jasco Marka UV spektrofotometre, Biotec EL-311 Marka mikropate okuyucu, 96 kuyulu ve düz tabanlı mikropateler, farklı devirlerde çalışan soğutmalı santrifüj, ultrasantrifüj ve homojenizatör kullanılmıştır.

Tarlardan toplanan larvalar Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü laboratuvarına getirilmiş ve laboratuarda kültüre alınmıştır. Erginler 20 cm yükseklik ve 18 cm çaplı plastik silindir kaplarda tutulmuştur. Silindirin üst kısmı kelebeklerin yumurta bırakması için tülbentle kapatılmıştır.

Besin olarak %10 bal ve %20'lik şekerli su emdirilmiş pamuk bir petri içinde, bu silindirin iç kısmına yerleştirilmiştir. Bu silindir içine yaklaşık 100 adet değişik yaşlarda ergin bırakılmıştır. *H. armigera* kültürlerinin yetiştirilmesi  $27 \pm 2$  °C sıcaklık, %60-90 nem ve 16:8 saat aydınlık ve karanlık fotoperiyot koşullarına sahip iklim dolaplarında yapılmıştır.

Biyokimyasal çalışmalarda, böceklerde bulunan ve böceklerde insektisitlere karşı dayanıklılıkta önemli rolleri olan detoksifikasyon enzimlerinden genel esteraz (non- spesifik), glutatyon S-transferaz ve asetilkolinesteraz enzimleri ele alınmış ve bunların spesifik aktiviteleri belirlenmiştir.

### **Genel esteraz (non-spesifik) enzim aktivitesinin belirlenmesi**

Genel esteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi van Asperen (1962) tarafından kullanılan yöntemle göre yürütülmüştür. Bu metot, substrat olarak kullanılan propan-2-ol'den esteraz enzimi sayesinde ürün olarak oluşan p-nitrofenolün spektrofotometrik olarak 404 nm'de okunmasına dayanır. Örneklerin hazırlanması ise Yu (1991)'e göre yapılmıştır. Bu enzim aktivitesinin belirlenmesi için 1-2 günlük 6. dönem larvalar kullanılmıştır. Larvaların orta bağırsakları çıkarılarak %1.15'lik 4 °C'deki KCl çözeltisi ile yıkanarak mide içerikleri temizlenmiştir. Bir larvanın orta bağırsağı, teflon-cam homojenizatör kullanılarak 5 ml soğuk 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH: 7.0) içinde homojenize edilmiştir. Tülbenkten süzülen bu homojenat enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada substrat olarak p-nitrofenil asetat kullanılmıştır.

Enzim kaynağı ve substrat hazırlandıktan sonra enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla 96 kuyulu bir mikrotplate kullanılmıştır. Hazırlanan örnekler 37 °C sıcaklıkta ve karanlık ortamda 30 dakika inkübasyona bırakılıp, bu süre sonunda inkübatörden çıkartılarak 405 nm dalga boyuna ayarlanmış Biotec EL-311 Marka mikrotplate okuyucuda oluşan ürün miktarı için absorbans okumaları yapılmıştır. Kontrol olarak 10 µl homojenat yerine, 10µl 0.1 M Tris-HCl tampon (pH:7.0) çözeltisi kullanılmıştır. Böceklerden elde edilen enzimler 1:100 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

### **Protein tayini**

Böceklerde spesifik enzim aktivitesinin hesaplanabilmesi için protein miktarlarının da bilinmesi gerekmektedir. *H. armigera* larvalarında protein miktarını belirlemek amacıyla Bradford (1976) metodu kullanılmıştır. Larvalarda protein miktarının belirlenebilmesi için ihtiyaç duyulan standart protein doğrusu elde etmek amacıyla, protein standardı olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır. BSA'den 3-13 µg arasında farklı protein miktarı bir spektrofotometre küvetine konulmuş ve distile su ile 100 µl'ye tamamlanmıştır. Bunun üzerine 3 ml Bradford çözeltisi eklenerek karıştırılmış ve bu karışım 10 dakika bekletildikten sonra, 595 nm dalga boyunda Jasco Marka UV spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuştur. Denemelerde kontrol olarak 100 µl distile su kullanılmıştır.

Protein miktarları ve absorbans değerleri kullanılarak bilgisayarda Excel programında standart protein doğrusu elde edilmiştir. Larvalarda protein miktarının belirlenebilmesi için, larvalardan elde edilen enzim çözeltilerinden farklı miktarlarda (50 veya 100 µl) enzim bir spektrofotometre küveti içine konarak, üzerine 3 ml Bradford çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Bu karışım 10 dakika bekletildikten sonra 595 nm dalga boyunda Jasco Marka UV spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuştur. Buradan elde edilen absorbans değerleri, Bradford standart protein doğrusundaki değerlerle karşılaştırılarak larvalardaki protein miktarları hesaplanmıştır.

*H. armigera* larvalarında enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için p-nitrofenol ile standart bir doğru elde edilmiştir. Bu standart doğrudan denemelerde elde edilen fenol miktarı hesaplanmıştır. 1 ünite enzim 1 dakikada 1 mg enzim proteini tarafından oluşturulan 1 nmol p-nitrofenol olarak tanımlanmıştır.

### **Glutasyon-S-transferaz enzim aktivitesinin belirlenmesi**

Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Yu (1991) metodu kullanılmıştır. Bu enzim aktivitesinin belirlenmesi için de yine 1-2 günlük 6. dönem *H. armigera* larvaları kullanılmıştır. Beslendikleri ortamdan alınarak 3 saat aç bırakılan larvaların buz üzerine konarak hareketsiz kalmaları sağlanmıştır. Hareketsiz kalan larvaların orta bağırsakları çıkartılarak %1.15'lik KCl çözeltisi ile mide içerikleri uzaklaştırılmıştır. On adet larvanın midesi teflon-cam homojenizer kullanılarak, 15 ml soğuk 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH:6.5) içinde homojenize edilmiştir. Tülbentten süzülen bu homojenat önce 10,000 x g max'da 4°C'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra tüpün üst kısmında kalan homojenat cam pamuktan süzülerek yeniden 105,000 x g max 'da +4 °C' de 1 saat ultrasantrifüj yapılmıştır. Buradan elde edilen tüpün üst kısmında kalan kısım enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Protein konsantrasyonları Bradford (1976) metodu ile belirlenmiştir. Substrate olarak 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) kullanılmıştır. Enzim ve substrat hazırlandıktan sonra 340 nm dalga boyuna ayarlanmış Jasco Marka UV spektrofotometrede absorbanstaki değişim 5 dakika süre ile 10 saniye aralıklarla kaydedilmiştir.

### **Asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi**

Asetilkolinesteraz enzim aktivitesi Ellman et al. (1961) metoduna göre belirlenmiştir. Bu amaçla 3-5 günlük ergin *H. armigera*'nın baş kısımları kullanılmıştır. Farklı dokularda 20 adet erginin baş kısmı çıkartılarak 10 ml soğuk 0.1 M sodyum fosfat buffer (pH:8.0) içinde homojenize edilerek tülbentten süzümüştür. Süzülen homojenat 1000 g x max'da 4°C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra tüpün üst kısmında kalan homojenat enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Substrat olarak 0.075M asetiltiyokolin iyodür çözeltisi kullanılmıştır. Diğer enzimler için 6. dönem larvaların orta barsakları kullanıldığı halde asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesinde erginlerin baş kısmı kullanılmıştır. Bunun nedeni, sıçanların farklı organlarından alınarak yapılan

çalışmalarda ortalama asetiltiyokolinin hidrolizi en fazla beyin dokusunda görülmesidir.

Enzim aktivitesi thiokolinin dithiobisnitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girmesiyle oluşan sarı rengin şiddeti llmektedir. Enzim aktivitesinin ölümü için erginlerin baş kısımlarından elde edilen homojenattan 0.4 ml alınarak bir spektrofotometre küveti içine bırakılmış ve üzerine 2.6 ml sodyum fosfat buffer (pH:8.0) ve 100 µl 0.01 M DTNB zeltisi ilave edilmiştir. Bunlar karıştırıldıktan sonra 20 µL substrat eklenerek 412 nm dalga boyunda 10 saniye aralıklarla 5 dakika süre ile absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bu amaçla Jasco Marka UV spektrofotometre kullanılmıştır. Bu absorbans değerleri kullanılarak nmol/min/mg protein olarak enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

### **İstatistiksel değerlendirme**

Gruplara göre genel esteraz, glutatyon S-transferaz ve asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin ortalama, standart sapma, ortanca (medyan), minimum ve maksimum değerleri tanımlanmıştır. Dört popülasyonun (4 grubun) ortalamaları arasında fark olup olmadığı, önce Kruskal Wallis varyans analizi ile test edilmiştir.

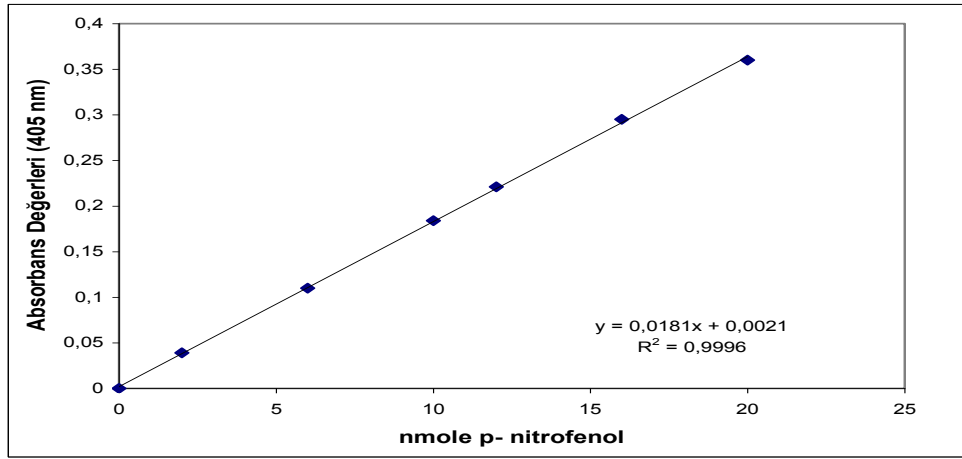
Tarla popülasyonlarının enzim aktivitesinin ortalaması ile hassas popülasyonun enzim aktivitesi ortalaması arasında fark olup olmadığı “oklu Karışılaştırma” (Multiple Comparisons, Post Hoc) testlerinden “Tamhane’s  $T_2$ ” testi kullanılarak belirlenmiştir. Antalya popülasyonunun ölüm değerleri normal dağılım göstermediği için genel esteraz enzim aktivitesinin karışılaştırılmasında veriler “non-parametrik” olarak kabul edilmiştir. Yukarıda bildirilen tüm analizler SPSS (10.0.1, 1999-USA) paket programı aracılığı ile yapılmıştır.

## **SONUÇLAR**

1998- 2001 yılları arasında Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsünde yürütülen bu araştırmada, değişik bölgelerden toplanan *H. armigera* popülasyonlarında genel esteraz, glutatyon S-transferaz ve asetilkolinesteraz enzim aktivitesi belirlenmiştir.

### **Genel esteraz enzim aktivitesinin ölümü**

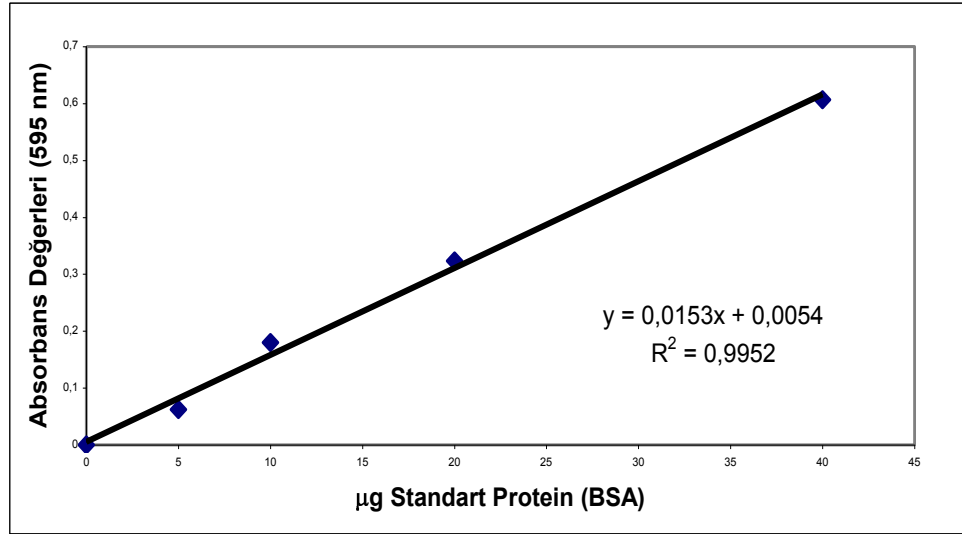
Genel esteraz enzimi aktivite tayini optimizasyonu ile ilgili olarak yapılan ön denemelerde, hazırlanan homojenattan hangi miktarda alınması gerektiğinin belirlenmesi için, esteraz aktivitesi 3–12 µg arasında protein miktarı değiştirilerek denenmiş ve 12 µg proteine kadar ürün miktarı ile doğru orantılı bulunmuştur (şekil 1).



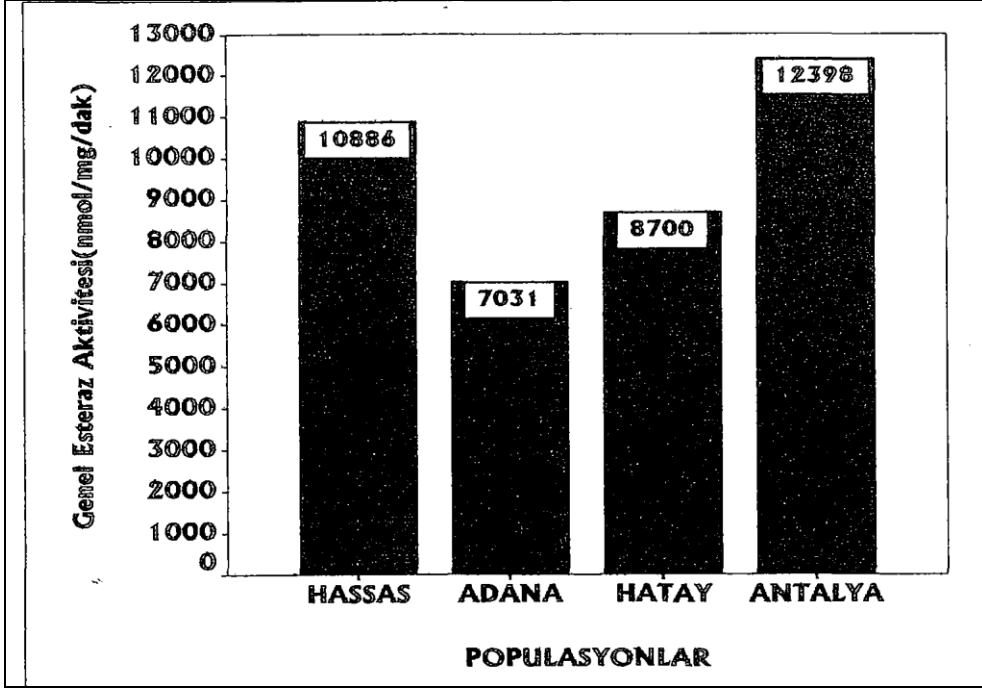
Şekil 1. p-Nitrofenol standart doğrusu, regresyon denklemleri ve regresyon katsayısı

Standart protein olarak BSA kullanılarak Bradford standart protein doğrusu elde edilmiştir. Bradford standart protein doğrusu ve bu doğruya ait regresyon denklemleri ve regresyon katsayısı Şekil 2'de verilmiştir.

p-Nitrofenol standart doğru denklemleri kullanılarak hesaplanan enzim aktivitesi ve Bradford standart protein doğrusu denklemleri yardımıyla hesaplanan protein miktarları kullanılarak böceklerdeki spesifik aktivite nmol/min/mg protein olarak hesaplanmıştır. *H. armigera* popülasyonlarının ortalama genel esteraz enzim aktiviteleri Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 2. Bradford standart protein doğrusu



Şekil 3. *Helicoverpa armigera* popülasyonlarının ortalama genel esteraz enzim aktiviteleri

Kruskal Wallis varyans analizi testine göre, en az bir popülasyonun genel esteraz enzim aktivitesi, diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $P=0.000$ ). Hassas popülasyonu ile Adana popülasyonu karşılaştırıldığında, Adana popülasyonunun genel esteraz enzim aktivitesinin, hassas popülasyonunkine göre, istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunduğu görülmüştür ( $P=0.000$ ).

Hassas popülasyonu ile Hatay popülasyonu karşılaştırıldığında, Hatay popülasyonunun genel esteraz enzim aktivitesinin, hassas popülasyonunkine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu bulunmuştur ( $P=0.007$ ).

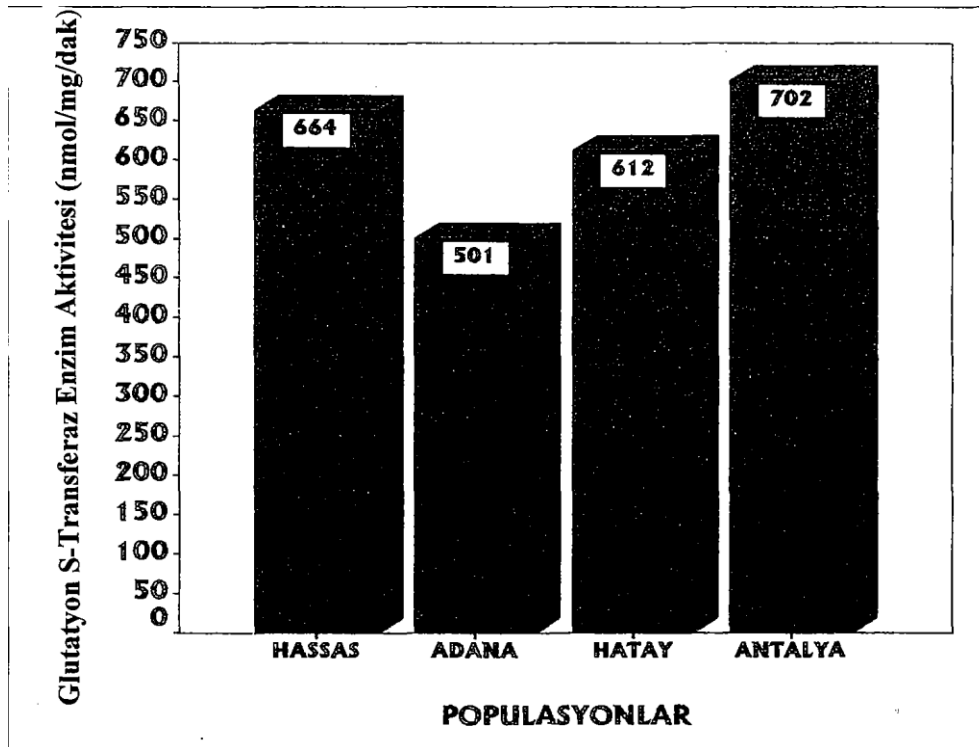
Hassas popülasyonu ile Antalya popülasyonunun genel esteraz enzim aktivitesi karşılaştırıldığında, Antalya popülasyonunun aktivitesinin, hassas popülasyonun aktivitesinden daha yüksek olmasına rağmen, bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $P=0,959$ ).

Adana ve Hatay popülasyonunun genel esteraz enzim aktivitesi hassas popülasyonun genel esteraz aktivitesinden daha düşük bulunmuştur. Antalya popülasyonunun genel esteraz enzim aktivitesi ise hassas popülasyonunkine benzer bulunmuştur.



#### Glutasyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesinin ölçümü

Kruskal Wallis varyans analizine göre, en az bir popülasyonun GST enzim aktivitesi diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır ( $P=0.004$ ). Popülasyonlara ait GST enzim aktiviteleri ortalamaları Şekil 4'te verilmiştir. Çoklu Karşılaştırma testi sonuçlarına göre, hassas ve tarla (Adana, Hatay ve Antalya) popülasyonlarının GST enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P=0.069$ ,  $P=0.520$ ,  $P=0.092$ ). Yani hassas popülasyon ile tarla popülasyonları arasında GST enzim aktivitesi yönünden farklılık yoktur. Ancak, tarla popülasyonlarından Antalya popülasyonunun GST enzim aktivitesi Adana popülasyonunun GST enzim aktivitesine göre daha yüksek olduğu ve bu farklılık istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ( $P=0.028$ ).

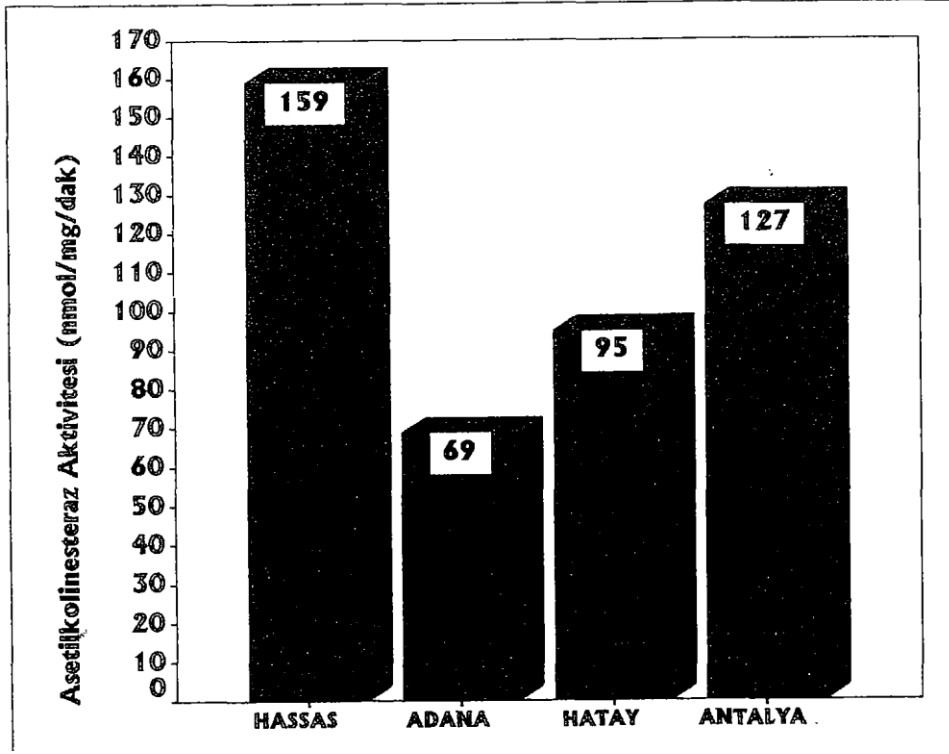


Şekil 4. *Helicoverpa armigera* popülasyonlarının glutasyon S-transferaz enzim aktiviteleri.

#### Asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesinin ölçümü

Çalışmamızda, *H. armigera*'da AChE enzim aktivitesinin ölçümü Elman *et al.* (1961) metoduna göre yapılmıştır. *H. armigera* popülasyonlarına ait AChE enzim aktivitesi ortalamaları Şekil 5'te verilmiştir. Kruskal Wallis varyans analizine göre, en az bir popülasyonun AChE aktivitesi diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $P=0.000$ ).

“Çoklu Karşılaştırma” testi sonuçlarına göre, hassas ve Adana popülasyonlarının AChE enzim aktiviteleri arasında, istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunmamıştır (P=0.47). Hassas ve Hatay popülasyonlarının AChE enzim aktiviteleri arasında, istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark yoktur (P=0.671). Hassas ve Antalya popülasyonlarının AChE enzim aktiviteleri arasında, istatistiksel tarla popülasyonlarından daha yüksek AChE enzim aktivitesine sahip olmasına olarak anlamlı derecede bir fark yoktur (P=0.960). Bu test sonucuna göre, hassas popülasyon rağmen, hassas popülasyonun AChE enzim aktivitesi ile tarla popülasyonlarının AChE enzimi aktiviteleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.



Şekil 5. *Helicoverpa armigera* popülasyonlarının asetilkolinesteraz enzim aktiviteleri.

Tarla popülasyonlarında en düşük AChE aktivitesine sahip olan popülasyon Adana popülasyonudur. En yüksek enzim aktivitesine sahip popülasyon ise Antalya popülasyonudur. Adana popülasyonu ile Antalya popülasyonu arasındaki fark, Antalya popülasyonunun lehine istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p=0.000). Hatay popülasyonunun AChE enzim aktivitesi de Antalya popülasyonunun enzim aktivitesinden daha düşüktür ve bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p= 0.016). Adana popülasyonu ile Hatay popülasyonu arasında AChE enzim aktivitesi açısından farklılık istatistiksel olarak önemli değildir (p=0.052).

## TARTIŞMA VE KANI

Bu çalışmada elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde, *H. armigera* popülasyonları ile yapılan biyokimyasal çalışmalar sonucunda, Adana ve Hatay popülasyonu genel esteraz enzim aktivitesi, hassas popülasyonun genel esteraz enzim aktivitesinden daha düşük bulunmuştur. Antalya popülasyonunun genel esteraz enzim aktivitesi ise, hassas popülasyonun enzim aktivitesine benzer bulunmuştur. Genel esteraz enzim aktivitesi Adana, Hatay ve Antalya popülasyonlarında sırasıyla 0.65, 0.80 ve 1.14 kat olarak belirlenmiştir.

Glutasyon S-transferaz ve asetilkolinesteraz enzim aktiviteleri açısından tarla popülasyonları ile hassas popülasyon arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. GST enzim aktivitesi Adana, Hatay ve Antalya popülasyonlarında sırasıyla 0.75, 0.92 ve 1.06 kat, AChE enzim aktivitesi ise Adana, Hatay ve Antalya popülasyonlarında sırasıyla 0.43, 0.60, 0.80 kat olarak belirlenmiştir.

Ugurlu and Gurkan (2007) tarafından aynı popülasyonlarda yapılan çalışmada, biyoassay çalışmaları sonucunda tarladan toplanan *H. armigera* popülasyonlarının endosulfan, profenofos, ve methomyl'e karşı dayanıklılık oranları düşük bulunmuştur (0.92-2.13 kat arasında değişmektedir). Tarla popülasyonlarının dayanıklılık oranları, sentetik piretroidli ilaçlardan tralomethrine karşı 15-24 kat arasında oranlarda ve lambda-cyhalothrine karşı 20-41 kat daha dayanıklı bulunmuşlardır.

Bu çalışmada elde edilen enzim aktivitesi sonuçlara göre, enzim aktiviteleri ile sentetik piretroidli insektisitlere dayanıklılık arasında doğrudan bir ilişki bulunmamıştır. Tarla popülasyonlarında tralomethrin ve lambda-cyhalothrine dayanıklı bulunan popülasyonlarda esteraz enzim aktivitesi hassas popülasyon göre daha düşük bulunmuştur. Bu durum yapılan diğer çalışmalarda da görülmektedir. Martin et al. (2002) *H.armigera*'nın dayanıklı BK99R9 popülasyonunda düşük esteraz aktivitesi elde etmiştir ve *H. armigera*'da deltamethrine karşı dayanıklılıkta esterazların oksidazlara göre muhtemelen daha az role sahip olduklarını bildirmektedirler. Siegfried and Scott (1992)'ta, birçok organik fosforlu ve karbamatlı insektisite çoklu dayanıklılık gösteren *Blattella germanica* (L) popülasyonu ile propoxur ve chlorpyrifos'a karşı dayanıklılık mekanizmasının belirlenmesi amacıyla yaptıkları araştırmada, belirlenen genel esteraz aktivitesi ile dayanıklılık seviyesi arasında beklenen bir ilginin olmadığını tespit etmişlerdir. Çin'de yapılan bir çalışmada, *H. armigera* popülasyonlarında fenvalerate dayanıklılığında esterazların önemli olmadığı ve dayanıklılığın esas olarak karışık fonksiyonlu oksidaz'ın metabolik mekanizması nedeniyle olduğu bildirilmektedir (Yidong and Jinliag 1996). Bin (1994), *H. armigera*'da dayanıklı ve hassas popülasyonlardan elde edilen karboksil esteraz aktivitesinin benzer olabileceğini ve piretroid dayanıklılığı ile bir bağlantısının olmadığını bildirmektedir.

GST enzim aktivitesi açısından incelendiğinde, yapılan birçok çalışma GST enzim aktivitesi ile deltamethrin ve diğer piretroidlere karşı dayanıklılık gelişimi arasında

pozitif bir ilişki olduğunu bildirmektedirler (Tang et al, 2000; Martin et al. 2002, Omer et al. 2009). Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda GST enzim aktivitesi tarla popülasyonlarında ve hassas popülasyonlarda benzer bulunmuştur. Ancak, Antalya popülasyonunda istatistiksel olarak önemli olmasa da GST enzim aktivitesinde hassas popülasyona göre daha yüksek GST aktivitesi belirlenmiştir.

GST aktivitesinin artmasının insektisitlere karşı dayanıklılıkla, özellikle organikfosforlu bileşiklere karşı dayanıklılıkla, ilgili olduğunu göstermektedir (Motoyoma and Dauterman 1980, Clark 1990, Reidy et al. 1990, Fournier et al. 1992). Ancak, bu çalışmada enzim aktivitelerinin belirlendiği popülasyonlarda, organik fosforlu insektisitlere karşı yüksek seviyede dayanıklılık tespit edilmemiştir (Ugurlu and Gurkan 2007). Organik fosforlu ve karbamatlılara dayanıklılık açısından ele aldığımızda, GST aktivitesi açısından tarla popülasyonlarının enzim aktivitesi ile hassas popülasyonun enzim aktivitesinin benzer çıkması beklenen bir sonuçtur.

İnsektisitlere karşı dayanıklılıkta GST'lerin önemli bir role sahip olduğuna dair birçok veri mevcuttur. İlk olarak, organik fosforlu bileşikler, cyclodienler ve 1,1,1-trichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethane'ı içeren birçok insektisit için bir detoksifikasyon yolunu göstermektedir (Fukami 1980). İkinci olarak, bazı dayanıklı böceklerin bir glutatyon-bağımlılığı yoluyla insektisitleri daha etkili bir şekilde metabolize ettikleri bulunmuştur (Motoyama et al. 1971; Oppenoorth et al 1972). Üçüncüsü olarak ise, bazı dayanıklı böcek ırklarında yüksek seviyede GST aktivitesi belirlenmiştir (Motoyama et al. 1977, Ottea and Plapp 1984 ). Fournier et al. (1987) tarafından yapılan bir çalışmada, GST aktivitesinin artması ve GST bağımlı insektisit metabolizması birbiriyle ilgili bulunmuştur. Dayanıklılık mekanizmasında GST'lerin önemine rağmen, onun temelini teşkil eden genetik mekanizma açıklanmamıştır.

Tarla ve hassas popülasyonlarda AChE enzim aktivitesinin benzer çıkması, sentetik piretroidli insektisitler dışında, organik fosforlu ve karbamatlı diğer insektisitlere karşı dayanıklılık oranının düşük olduğu dikkate alınırsa beklenen bir sonuçtur. Çünkü AChE enzimini engelleyen insektisitler organik fosforlu ve karbamatlı insektisitlerdir. Organik fosforlu ve karbamatlı insektisitlerin hedefi olan asetilkolinesteraz enzimi ile ilgili olarak birçok araştırma yapılmıştır. Memelilerde, asetilkolinesterazın iki tipi bilinmektedir. Bunlar, asetilkolinesteraz veya gerçek-kolinesteraz ve butirilkolinesteraz veya yalancı-kolinesterazdır. Yalancı-kolinesterazın fizyolojik fonksiyonunun bilinmemesine rağmen, bu iki kolinesterazın fonksiyonu, dağılımı ve özellikleri farklıdır. Böceklerdeki kolinesterazın özellikleri, memelilerdeki gerçek kolinesterazın özellikleri ile benzerdir. Bu nedenle ya asetilkolinesteraz ya da kolinesteraz olarak isimlendirilir. Kolinesterazın diğer formunun (yalancı-kolinesteraz) böceklerde varlığı henüz ispatlanmamıştır (Hama 1983).

AChE'lar diğer dayanıklılık mekanizmaları ile birleşmiş olarak bulunabilirler. Örneğin, insektisitlerin düşük penetrasyonu, oksidazlar, esterazlar veya GST

nedeniyle daha iyi bir degradasyon sağlanabilir (Oppenoorth et al. 1977). Bu durumda, enzim duyarsızlığı ve dayanıklılık arasında doğrudan bir birleşme beklenemez (Oppenoorth 1985).

Sonuç olarak, esterazlar, GST ve oksidazlar *H. armigera*'da insektisitlere dayanıklılık mekanizmasında detoksifikasyon yoluyla etkili olan üç önemli enzimdir. Ancak bunların her birinin dayanıklılıktaki kesin rolleri hala araştırılmaktadır. İnsektisitlere dayanıklılıktaki etkinlikleri, muhtemelen bu enzimlerin birlikte etkileri nedeniyle olmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen verilere göre, *H. armigera* popülasyonlarında enzim aktiviteleri ve dayanıklılık arasında herhangi bir bağlantının olduğu belirlenememiştir. Bu bağlantının ortaya konması için, bu çalışmada ele alınmayan ve dayanıklılıkla ilgisi olduğu düşünülen diğer enzim aktivitelerinin de belirlenmesi gerekmektedir.

### KAYNAKLAR

- Ahmad M. and McCaffery A. R. 1988. Resistance to insecticides in a Thailand strain of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 81 (1), 45-48.
- Ahmad M., Iqbal Arif M. and Ahmad Z. 1995. Monitoring insecticide resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) in Pakistan. *Journal of Economic Entomology*, 88 (4), 771-776.
- Bin X. 1994. The preliminary biochemical analyses of resistance of the cotton bollworm in China. *Resistant Pest Management*, 6 (2), 4-5.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive Method for the Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Callaghan A. 1991. Insecticide resistance: mechanism and detection methods. *Scientific. Progress Edinburgh*, 75, 423-438.
- Clark A. G. 1990. The glutathione S-transferases and resistance to insecticides. In *Glutathione S-transferases and Drug Resistance* (Edited by Hayes, J. D., Pickett C. B. and Mantle, T. J.); 369-378.
- Daly J. C. 1988. Insecticide resistance in *Heliothis armigera* in Australia. *Pesticide Science*, 23, 165-176.
- Ellman G. L. Courtney K. D., Andres V., Jr. and Featherstone R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Elzen G. W., Leonard B. R., Graves J. B., Burris E. and Micinski S. 1992. Resistance to pyrethroid, carbamate, and organophosphate insecticides in field populations of Tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) in 1990. *Journal of Economic Entomology*, 85 (6), 2064-2072.

- Forgash A. J. 1984. History, evolution and consequences of insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22, 178-186.
- Fournier D., Bride J. M., Mouches C., Raymond M., Magnin M., Berge J. B., Pasteur N. and Georghiou G. P. 1987. Biochemical characterization of esterases A1 and B1 associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens* L. complex. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 27, 211-217.
- Fournier D., Bride J. M., Poirie M., Berge J. B. and Plapp F. W. 1992. Insect Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 1840-1845.
- Fukami J. 1980. The metabolism of several insecticides by glutathione S-transferases. *Pharmacology and Therapeutics*, 10, 473-514.
- Hama H. 1983. Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase. " in *Pest resistance to pesticides*. Eds: G.P. Georghiou and T. Satio. Plenum Press, New York and London, p. 299-331.
- Hassall K. A. 1990. *The biochemistry and uses of pesticides*. Second Edition. VCH, New York.
- Knight A.L and Norton G.W. 1990. Economics of agricultural pesticide resistance in arthropods. *Annual Review of Entomology*, 34, 293-313.
- Luttrell R. G., Roush R. T. , Ali A., Mink J. S., Reid, M. R. and Snodgrass G. L. 1987. Pyrethroid resistance in field populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Mississippi in 1986. *Journal of Economic Entomology*, 80 (5); 985-989.
- Martin T., Chandre F., Ochoa O. G., Vaissayre M. and Fournier D. 2002. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 74 (1), 17-26.
- Motoyama N. and Dauterman W. C. 1980. Glutathione S- Transferases: Their role in the metabolism of organophosphorus insecticides. *Review of Biochemical Toxicology*, 2, 49-69.
- Motoyama N. and Dauterman W. C. and Plapp F. W. Jr. 1977. Genetic studies of glutathione-dependent reactions in resistant strains of house fly, *Musca domestica* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 7, 433.
- Motoyama N., Rock G. C. and Dauterman W. C. 1971. Studies on the mechanism of azinphosmethyl resistance in the predaceous mite, *Neoseiulus fallacis* (T.) (family: Phytoseiidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1, 205-215.
- Omer S. A. H., Konate G., Traore O. Traore O. and Menozzi P. 2009. Biochemical characterization of the Cotton Bollworm resistance to pyrethroids in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12 (13), 964-969.
- Oppenorth F. J. 1985. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. (eds. Kerkut, G.S. and Gilbert, L.I.). Vol. 12, Pergamon Press, Oxford, p. 731-773.

- Oppenoorth F. J., Rupes S. El Bashir S. Houx N. W. H., Voerman S. 1972. Glutathione-dependent degradation of parathion and its significance for resistance in the house fly. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol. 2; 262-269.
- Oppenoorth F. J., Smitsaert H. R., Welling W., van der Pas L. J. T. and Hitman K. T. 1977. Insensitive acetylcholinesterase, high glutathione S-transferase, and hydrolytic activity as resistance factors in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 7, 34-47.
- Ottea J. A. and Plapp F. W. 1984. Glutathione S-transferase in the housefly: Biochemical and genetic changes associated with induction and insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22, 203-208.
- Plapp F. W. 1984. The genetic basis of insecticide resistance in the housefly. Evidence that a single locus plays a major role in metabolic resistance to insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22, 194-201.
- Reidy G. F., Rose H. A. Visetson S. and Murray M. 1990. Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 36, 269-276.
- Siegfried B.D. and Scott J.G. 1992. Biochemical characterization of hydrolytic and oxidative enzymes in insecticide resistant and susceptible strains of the German cockroach (dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 85(4), 1092-1098.
- Soderlund D. M. 1997. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: *Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals* (ed. Sjit, V.). Springer, 21-56, Germany.
- Tang F., Yue Y. and Hua R. 2000. The relationships among MFO, glutathione S-transferases and phoxim resistance in *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68, 96-101.
- Van Asperen K. 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology*, 8; 401-416.
- Ugurlu S. and Gürkan M. O. 2007. Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* from cotton growing areas in Turkey. *Phytoparasitica*, 35 (4), 376-379.
- Yidong W. and Jinliang S. 1996. Characters of fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* (Hubner) from China. *Resistant Pest Management*. Vol. 8, No. 1.
- Yu S. J. 1991. Insecticide resistance in the Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 39, 84-91.