



## Cloning of Two Nicotinic Acetylcholine Receptor Genes from *Bemisia tabaci* (Gennadius)

Gül Satar<sup>1,a,\*</sup>, Mehmet Rifat Ulusoy<sup>2,b</sup>, Ke Dong<sup>3,c</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Research and Application Centre, Cukurova University, 01330 Adana, Turkey

<sup>2</sup>Department of Plant Protection, Cukurova University, 01330 Adana, Turkey

<sup>3</sup>Department of Biology, Duke University, Durham, North Carolina, US

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Research Article</p> <p>Received : 30/12/2019 Accepted : 26/10/2020</p> <p>Keywords: Cotton whitefly nAChR Neonicotinoid Phylogenetic analyses RACE</p>	<p>Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) mediate fast cholinergic synaptic transmission in the insect nervous system. Neonicotinoid insecticides exhibit insecticidal activities by targeting these receptors. The aim of this study was to isolate cDNA clones of nAChR subunit genes of <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). RACEs (Rapid Amplification of cDNA Ends) were applied to obtain partial-length cDNA sequences. We identified two partial cDNA clones encoding <math>\beta 1</math> and <math>\alpha 8</math> subunit genes (Bt<math>\beta 1</math>-1168 bp and Bt<math>\alpha 8</math>-755 bp), respectively, from <i>Bemisia tabaci</i> (Bt). This is the first report of isolation of <math>\alpha 8</math> from <i>B. tabaci</i> by cloning. Bt<math>\beta 1</math> and Bt<math>\alpha 8</math> possess characteristics that are typical of nAChR subunits. Phylogenetic analysis showed that Bt<math>\beta 1</math> and Bt<math>\alpha 8</math> clustered with the orthologous genes of other insect species.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(11): 2322-2329, 2020

## *Bemisia tabaci* (Gennadius)'de İki Nikotinik Asetilkolin Reseptör Genin Klonlanması

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 30/12/2019 Kabul : 26/10/2020</p> <p>Anahtar Kelimeler: Beyazsinek Filogenetik analiz nAChR Neonicotinoid RACE</p>	<p>Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR), böcek sinir sisteminde hızlı kolinerjik sinaptik geçişe aracılık ederler. Neonicotinoid grubu insektisitler, bu reseptörleri hedefleyerek böceklerde ölüme neden olurlar. Bu çalışmanın amacı, <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) nAChR alt birim genlerinin cDNA klonlarını izole etmektir. Bu genlerin elde edebilmesi için RACE (cDNA Ends'in hızlı amplifikasyonu) tekniği uygulanmıştır. Bu çalışmada, <i>B. tabaci</i> (Bt)'den sırayla iki kısmi nAChR alt birim geni <math>\beta 1</math> ve <math>\alpha 8</math> (Bt<math>\beta 1</math>-1168 bp ve Bt<math>\alpha 8</math>-755 bp) elde edilmiştir. Bu çalışmayla <i>Bemisia tabaci</i> nAChR <math>\alpha 8</math> alt birimi, klonlanarak ilk kez elde edilmiştir. Bt<math>\beta 1</math> ve Bt<math>\alpha 8</math>'in nAChR alt birimlerinin tipik ve birbirinden farklı özelliklerine sahip olduğunu belirlenmiştir. Filogenetik ağaç sonuçları, <i>B. tabaci</i>'nin Bt<math>\beta 1</math> ve Bt<math>\alpha 8</math> alt birim genlerinin, farklı böcek türlerine ait ortolog gen bölgeleriyle kümelendiğini göstermektedir.</p>

<sup>a</sup> [satarg@cu.edu.tr](mailto:satarg@cu.edu.tr)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5120-3313>

<sup>b</sup> [mrulusoy@cu.edu.tr](mailto:mrulusoy@cu.edu.tr)

<sup>c</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6610-1398>

<sup>c</sup> [ke.dong@duke.edu](mailto:ke.dong@duke.edu)

<sup>c</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9773-6350>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

## Giriş

Pamuk beyazsineği, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) ekonomik öneme sahip polyfag bir zararlı olup; başta pamuk olmak üzere, patlıcan, domates ve biberi de kapsayan 600'ün üzerinde konukçuya sahiptir (EPPO, 2004; Satar ve ark., 2018). Konukçularındaki zararı, emgi zararının yanında fumajin zararına ve en önemlisi de virüslere vektörlük etmesi ile ortaya çıkan zarardır ki, *B. tabaci*'nin 100'ün üzerinde virüse vektörlük ettiği bilinmektedir (Roditakis ve ark., 2005; Zaidi ve ark., 2017).

Zararlı ile mücadelede, etkili pekçok doğal düşmanı olmasına rağmen, üreticiler tarafından tercih edilen ve en çok kullanılan yöntem kimyasal mücadeledir. Aynı zamanda beyazsinek mücadelesinde sık kullanılan pestisit gruplarından birisi de neonikotinoidlerdir. Etki mekanizmaları dolayısıyla uzun süredir kullanılan ticari insektisit gruplarıyla çapraz dayanıklılık geliştirmemiş ve sonuç olarak kültür bitkileri üzerindeki önemli zararlılarla mücadelede kullanılan pyrethroidlerin, organofosforların, karbamatlıların ve birkaç diğer insektisit gruplarının yerini almaya başlamıştır (Jeschke ve Nauen, 2008). İnsektisitlerin bilinçsiz kullanımı, beraberinde birçok olumsuz çevre sorunlarını da ortaya çıkarmaktadır. Zaman içerisinde kullanılan ilaç dozlarının giderek etkisiz olması, ilaç doz ve uygulama sayılarının artmasına neden olmakta, bu durum çevre ve insan sağlığına olumsuz etkileri yanında hedef olmayan organizmalarda etkilemektedir. Ayrıca en önemli problemlerden biri olan dayanıklılık sorununun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Neonikotinoid grubu insektisitlere, *B. tabaci*'de İsrail, Çin, İspanya ve Türkiye'de yüksek düzeylerde dayanıklılık belirlenmiştir (Satar ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018).

Neonikotinoid insektisitler, böcek nikotinik asetilkolinesteraz reseptörlerinin (nAChR) seçici agonistleridir ve bu nedenle hem bitki hem de hayvan sağlığını koruma uygulamalarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar (Millar ve Denholm, 2007). Bu yoğun kullanım, neonikotinoidlere dayanıklılık sorununuda ortaya çıkarmaktadır. Böceklerde insektisitlere dayanıklılık mekanizmalarının ortaya çıkarılması, hedef etken maddenin yönetimi için önemlidir. Bugüne kadar neonikotinoid grubu insektisitlerin dayanıklılığının, ağırlıklı olarak bir detoksifikasyon enzimi olan monooksijenaz enzimi tarafından neden olduğu saptanmıştır (Karunker ve ark., 2008; Roditakis ve ark., 2011; Nauen ve ark., 2013). Son yıllarda ise bu mekanizmaya ek olarak *Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae) (Tan ve ark., 2008), *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) (Bass ve ark., 2011) ve *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae) (Zewen ve ark., 2003)'te nAChR genlerindeki nokta mutasyonlardan dolayı bir dayanıklılık olduğu saptanmıştır.

Böcek sinir sisteminde asetilkolin (ACh), kolinerjik (uçlarında asetilkolin çıkan) sinir sisteminin, uyarıcı sinir taşıyıcısı (neurotransmitter) ve içsel agonistidir. Nikotinik kolinerjik sinapslar boyunca sinir iletimi iki adımda gerçekleşir. Birincisi, exositozla presinaptik membrandan ACh açığa çıkar ve bağlanma noktalarıyla ilişki kurarak nAChR'ün iyon kanal kompleksinin hücreler arası kısmına yerleşir. İkincisi, reseptör moleküllerinin değişimi ile membranının denge statüsünü bozmak için hücre içerisine K<sup>+</sup> akışı ve hücre dışına Na<sup>+</sup> akışını teşvik ederek iyon kanallarının açılmasına neden olur. nAChR iyon

kanallarının hızlı bir şekilde açılmasını sağlayan iyonotropik reseptörler grubunda yer alır (Arias, 1997). Bu reseptörler 15 rezidüel bir Sistein (C) grubu, 4 transmembran bölgesi, benzer alt birim dizilimi, aminoasit sekanslarında benzerlik gibi yapısal özelliklere sahiptirler. Her bir reseptör beş alt birimden oluşur, bu alt birimler alpha, beta, gama gibi isimler alır ve farklı kombinasyonlara sahiptirler. Bu alt birimlerin, uzun bir hidrofilik ekstraselüler amino ucu (N terminus), oldukça hidrofobik dört transmembran bölge ve bir intraselüler karboksil ucu vardır (Jones ve Sattelle, 2010).

Böceklerde nAChR merkezi, sinir sisteminin neuropil (akson, dendrit ve sinapsların meydana getirdiği ağ sistemi) bölgelerinde geniş bir şekilde ve baskın olarak dağılmışlardır. Bu reseptörler sinir iletiminin gerçekleşmesinde önemli olması, insektisitlerin hedefi haline getirmektedir (Tomizawa ve Casida, 2003). Neonikotinoidler böceklerde, bu nAChR'e seçici olarak bağlanırlar. Çünkü iyon değildirler ve kolaylıkla böceklerin sinir sistemlerine penetre olabilirler (Stenersen, 2004). Neurotransmitterler sinapslarda serbest kaldıklarında, postsinaptik membranda reseptörlere bağlanmazlarsa hiçbir etki gösteremezler. Imidacloprid ve onun türevleri gibi maddeler bu reseptörlere bağlanarak, asetilkolinin asetilkolin reseptörlerine bağlanmasını önler (Abbick, 1991). Yapılan çalışmalarda *B. tabaci*'ye ait  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$  ve  $\beta 1$  nAChR alt birimleri tespit edilmiştir (NCBI, 2019). Ayrıca, tüm alt birimler rna-seq yöntemiyle protein düzeyinde ortaya konulmuştur (Ilias ve ark., 2015).

Bu çalışma da klasik moleküler yöntemlerle nAChR alt birimlerinin mRNA düzeyinde elde edilmesi hedeflenmiştir. Böylece, daha sonra yapılacak gen ekspresyonu ya da bu alt birimlerde neonikotinoid dayanıklılığı ile ilgili nokta mutasyon taramalarına ışık tutması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Yöntem

Çalışmada kullanılan *Bemisia tabaci* erginleri, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölüm arazisinden (Balcalı-ADANA) pamuk bitkileri üzerinden toplanmıştır.

### Toplam Ribo Nükleik Asit (RNA) izolasyonu

*Bemisia tabaci*'de nikotinik asetilkolin reseptörlerinin (nAChR) genlerinin belirlenmesi amacıyla toplam RNA, *B. tabaci* erginlerinden (20 mg) Trizol Reagent (Invitrogen)'in metodu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Elde edilen toplam RNA konsantrasyonu, spektrofotometrede ölçülerek diğer aşamalarda kullanılanana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

### Komplementer DNA (cDNA) Sentezi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Reaksiyonu

cDNA sentezi, thermocycler da SuperScript II Reverse Transcriptase kiti kullanılarak yapılmıştır. PCR ve yuvalanmış (nested) PCR reaksiyonları, 2  $\mu$ L cDNA, 10 mM dejenere primer veya nested primerlerle Plantium Tag kullanılarak 25  $\mu$ L final reaksiyonda gerçekleştirilmiştir. Dejenere primerler, Prof. Dr. Ke Dong'un Michigan State University, Entomoloji Bölümü, Böcek toksikoloji ve Nerobiyojoloji laboratuvarından temin edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. *Bemisia tabaci*'de nikotinic asetilkolin reseptör alt birim genlerinin elde edilmesinde kullanılan primerler  
 Table 1. Primers used to obtain nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in *Bemisia tabaci*

	Primerin adı	Primer
Dejenere primerler	F1	ATG AAR TTY GGN TCN TGG AC
	R1	GT RTA RSA NAG NGT YTT NCG
	FNest1	TAA TGA CCA CGA ATT TAT G
	RNest1	AAA ACC TTA TTC TAT ACA GT
Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) primerleri	Btα8_3F	GAA TTC TAC TTG TCG GTG GAA TGG G
	Btα8_5R	CTC ATT TCT TGT TGC GGG CAC TGC
	Btα8_3nestF:	GTA CTA TCC TTG TTG TAG TGA GCC
	Btα8_5nestR:	CCT ACT TTG ACT ATA TTG CTT CCG G
	Btβ1_3F:	CTG GAA GTC GGG GAC GTG GGA CAT
	Btβ1_5R:	TCG GCA CCC CCG GGT AGG TGT TCA
	Btβ1_3nestF:	CGA GGT GCC GGC ATA CTT GAA CAC
	Btβ1_5nestR:	GTA GTC CGA GAG GTC CAC GAA GTT

Termocycler'da reaksiyon; başlangıç denatürasyonu 94°C'de 2 dakika, denatürasyon 94°C'de 0.30 dakika, bağlanma 55°C'de 1 dakika, uzama 72°C'de 3 dakika, son uzama 72°C'de 7 dakika ile 40 döngü olarak yürütülmüştür. Elde edilen PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

#### PCR Ürününün Klonlanması

PCR ürünü, gen dizilemesi yapılmadan önce bakteri hücrelerine aktarılmıştır. Bu amaçla, önce ürün TOPO TA Cloning Kiti (pCR 2.1-TOPO vektör) kullanılarak vektöre aktarılmıştır. 2 µL PCR ürünü, 1 µL tuz solüsyonu, 2 µL deionize su ve 1 µL vektör karıştırılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu karışımdan 2 µL alınarak, 50 µL Ecoli bakteri hücrelerine aktarılmış ve 20 dakika buzda bekletilmiştir. 30 saniye 42°C'de sıcaklık şoku verildikten sonra, 2 dakika buzda bekletilmiştir. 250 µL SOC ortamı (1 L su, 20 g Bacto-tryptone, 5 g Bacto-maya ekstrakt ve 0,5 g sodyum klorid (NaCl)'den oluşmuş ortama, 20 mL 1 M glikoz eklendikten sonra, 1 saat 100 rpm'de 30°C'de çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Çoğalan bakteri hücrelerinden koloni elde etmek için LB ampisilin pleytelere (1 l su, 5 g NaCl kristal, 10 g Bacto-tryptone, 5 g Bacto-maya extract, 16 g Bacto agar ve 1 mL Ampisilin) 50 µL yayılmıştır. Bakteriler pleytelere yayılmadan önce, PCR ürününün bulunduğu bakteri hücrelerini ayırmak için 40 µL X gal (5-Bromo-4chloro-3indoyl-β-D galactoside) (20 mg mL<sup>-1</sup> (dimethyl formamide içinde çözülecek)) ve IPTG (0,2 g mL<sup>-1</sup>) yayılmıştır. Bakterilerin yayıldığı pleytler, 24-36 saat kolonilerin büyümesi için 30°C'de inkübe edilmiştir. Büyüyen kolonilerden beyaz olanlar seçilerek, 5 mL LB-Amp (1 l su, 5 g NaCl kristal, 10 g Bacto-tryptone, 5 g Bacto-maya ekstrakt ve 1 mL Ampisilin) içeren bakteri çoğaltma tüplerine ekilerek 16 saat 200 rpm'de 30°C'de çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Ortamlar, 4000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

#### Plasmid Pürifikasyonu

LB ortamında çoğaltılan kolonilerin pürifikasyonu, Wizard Plus SV Minipreps DNA pürifikasyon kitinin (Promega) yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Plasmidler içerisinde PCR ürününün olup olmadığını belirlemek için Bam H1 ve Eco RV enzimleri kullanılmıştır. Örneklerin % 1'lik agaroz jelde görüntülenmesi yapılmıştır.

Pozitif sonuç veren ürünler, T7 primeri kullanılarak gen dizileme yapmak üzere ilgili firmalara gönderilmiştir. Elde edilen dizilerin NCBI\_BLAST programı ile sistemdeki mevcut genlerle karşılaştırması yapılmış ve elde edilen genlerin hangi nAChR'ın alt birimlerine ait olduğu tespit edilmiştir.

#### 3' ve 5'RACE ve Nested RACE Reaksiyonlarının Kurulması

Blast programı kullanılarak yapılan analizler sonucunda belirlendiği düşünülen gen bölgelerinin, 3' ve 5' yönünde geri kalan kısımlarını elde etmek için RACE tekniği kullanılmıştır. RACE tekniğinde kullanılmak üzere 3' ve 5' yönlerinde biri nested PCR için ikiye gene spesifik primer dizayn edilmiştir (Tablo 1). Smart Race cDNA amplification kitinin (Clontech) yöntemine göre, cDNA'lar hazırlanmıştır. Bu amaçla toplam RNA ile kit içinde bulunan 3'-CDS primer ve 5'-CDS primerleri kullanılarak ayrı ayrı reaksiyonlarda, cDNA'lar elde edilmiştir. Advantages 2 PCR kiti (clontech) kullanılarak her iki yön için Btα8\_3F ve Btβ1\_3F Btα8\_5R ve Btβ1\_5R primerleriyle dört ayrı PCR reaksiyonları kurulmuştur. Termocycler'da reaksiyon; başlangıç denatürasyonu 94°C'de 2 dakika, 94°C'de 0.30 dakika, bağlanma 72°C'de 2 dakika 5 döngü, 94°C'de 0.30 dakika, 65°C'de 0.30 dakika, 72°C'de 2 dakika 5 döngü, 94°C'de 0.30 dakika, 65°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika 25 döngü, son uzama 72°C'de 7 dakla olarak yürütülmüştür. Elde edilen PCR ürünlerini görüntülemek için %1'lik jel kullanılmıştır. 3' ve 5' nested RACE reaksiyonları, Advantages 2 PCR kiti (Clontech) yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla, bir önceki PCR reaksiyonundan elde edilen 5 µL PCR ürünü, 75 µL Tricine-EDTA buffer içerisinde seyreltilmiştir. Herbir nested primer (Btα8\_3nestedF ve Btβ1\_3nestedR, Btα8\_5nestedR ve Btβ1\_5nestedR) için 3' ve 5' yönlerinde PCR reaksiyonları kurulmuştur. Termocycler'da reaksiyon; başlangıç denatürasyonu 94°C'de 2 dakika, denatürasyon 94°C'de 0.30 dakika, bağlanma 68°C'de 0.30 dakika, uzama 72°C'de 3 dakika 25 döngü ve son uzama 72°C'de 7 dakika olarak yürütülmüştür. Elde edilen PCR ürünlerini görüntülemek için %1'lik jel kullanılmıştır.

#### Jel Pürifikasyonu ve RACE Ürünün Klonlanması

Nested RACE reaksiyonlarının elektroforezi sonucunda elde edilen jellerde birden fazla bant olduğu için

Qiaex II Gel extraction kitini kullanarak elde edilen bantlardan, en büyük olandan başlayarak jel pürifikasyonu yapılmıştır. Pürifiye edilen DNA'yı görüntülemek için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Jel pürifikasyonundan elde edilen ürünler, önce vektöre sonra bakteriye aktarılmıştır. Daha sonra plazmid pürifikasyonu ve Bam H1 ve EcoRV enzimleri ile kesme işlemleri yapılmıştır. Jelde pozitif sonuç veren örneklerin gen dizilemesi yapılmak üzere ilgili firmalara gönderilmiştir.

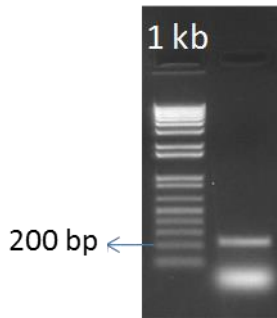
#### Data Analizi

Elde edilen diziler, BLAST programı kullanılarak sistemdeki mevcut genlerle karşılaştırması yapılarak, elde ettiğimiz örneklerle benzerlikleri ortaya konulmuştur. Lasergene 6 programındaki Segment Builder programıyla elde edilen sekanslar birleştirilmiştir. Lasergene 6 programının Edit alt programında, aminoasite çevrilmiş ve başlangıç kodonları tespit edilmiştir. Yine aynı programda, Fasta formatına dönüştürülerek diğer uygulamalarda kullanılmışlardır. Signal peptid bölgeleri signal IP programı, trans membran bölgeleri TMHMM programı ile belirlenmiştir. N-glikosizasyon bölgeleri, N linked Glycosylation Analyse programında, fosforilasyon bölgeleri NetPhos 2.0 Server programında analiz edilmiştir (Blom ve ark., 1999). Çalışmada kullanılan tüm karşılaştırma genleri, NCBI Genbank'dan elde edilmiştir. Sekansların hizalaması, Clustal X (Thompson ve ark., 1997) ve homoloji gölgelemesi GeneDoc programı (Nicholas ve ark., 1997) ile yürütülmüştür. Filogenetik ilişkiler, MEGA 6 programında çoklu hizalandırma nükleotid ve aa sekanslarına göre belirlenmiştir. Neighbor-joining metodu ile bootstrap analizi (1000) kullanılarak, filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Benzerlik (identity/smilarity) değerleri, EMBOSS 6.3.1. matcher programı kullanılarak elde edilmiştir (Rice ve ark., 2000).

#### Bulgular ve Tartışma

##### *Bemisia Tabaci nAChR Alt Birimlerinin Elde Edilmesi*

Dejenere primerlerle yürütülen PCR çalışmalarında elde edilen PCR ürünü, jelde 200 bp'nin biraz üzerinde bir bant vermiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Dejenere primer kullanılarak elde edilen PCR ürününün jelde görüntüsü

Figure 1. Gel image of the PCR product obtained using degenerate primer

PCR ürününün klonlanmasından sonra, 19 kolonide plasmidler içerisinde PCR ürününün olup olmadığını

belirlemek için Bam H1 ve Eco RV enzimleriyle kesimi yapılan örnekler, 200 bp'de bant vermiştir. Örneklerden 6 numaralı örnek, diğerlerine göre biraz daha büyük bir band vermiştir (Şekil 2). Bu nedenle, bu örneğin diğerlerinden farklı olabileceği düşünülmüştür. Pozitif sonuç veren örneklerin gen dizilemesinden sonra, BLAST programında yapılan karşılaştırmalar sonucunda, *B. tabaci*'de 2 nAChR geninin belirlenmiş olabileceği kanaatine varılmıştır. Örneklerden 18 tanesinin  $\alpha 8$ , Şekil 2'deki 6 numaralı örneğin ise  $\beta 1$  olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, bu genlerin geri kalan kısımlarını belirlemek için RACE tekniği uygulanmıştır.

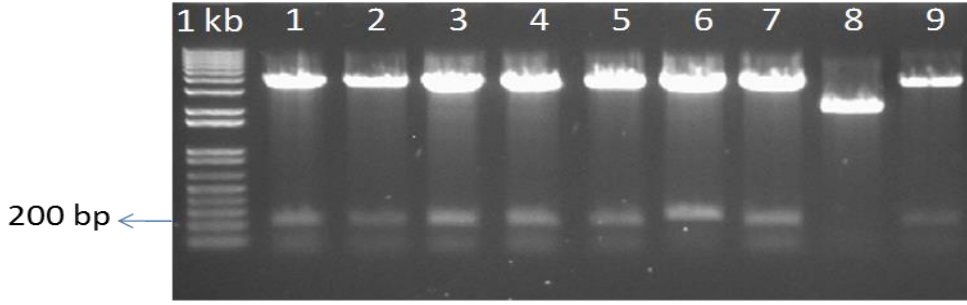
#### 3' ve 5' RACE Tekniği

nAChR alt birimleri olduğu düşünülen 2 gen parçasının 3' ve 5' yönünde geri kalan parçalarını belirlemek için yürütülen PCR çalışmaları sonucunda, birçok band elde edilmiştir. Jel pürifikasyonu sonucu elde edilen ürünlerin bakteriye klonlanmasına rağmen bantların çok zayıf olmasından dolayı, fazla koloni elde edilememiştir. Bu problemlerin çözülmesi için nested primerler dizayn edilerek, nested PCR yapılmaya karar verilmiştir. Yapılan deneme sonucunda, daha güçlü bantlar elde edilmiş ve jel pürifikasyonu yapılmıştır (Şekil 3).

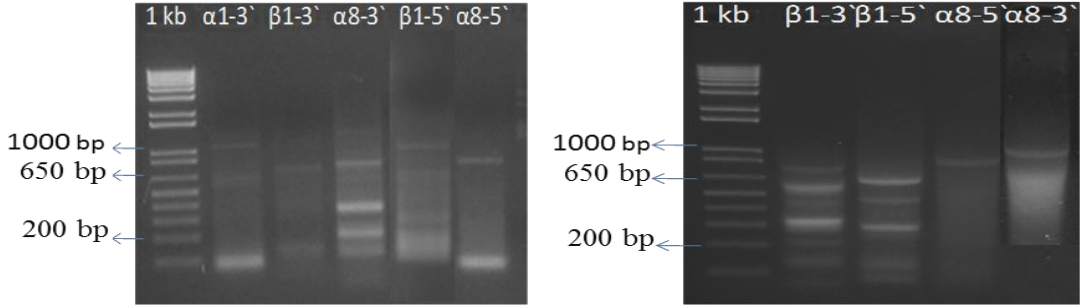
Klonlanan ve plazmid pürifikasyonu yapılan örneklerin Bam H1 ve Eco RV enzimleri ile reaksiyonları yapılmıştır (Şekil 4). Toplamda 36 kolonin pürifikasyonu yapılmış 30 örnek, gen dizileme yapılmak üzere T7 primeriyle ilgili kuruluşa gönderilmiştir. Bu çalışma sonucunda, nAChR  $\beta 1$  alt birim geninin 5'yönünde tamamına ulaşılmıştır. Toplamda, 1168 bp'lik bir gen bölgesi belirlenmiştir. nAChR  $\alpha 8$  alt biriminde ise sadece 5' yönünde sonuç elde edilmiş, bu geninde 5' yönünde başlangıç kodona ulaşılmıştır ve toplam 755 bp'lik kısmi gen bölgesi tespit edilmiştir.

#### nAChR Genlerinin Eşlilik/Benzerlik Değerlerinin Belirlenmesi

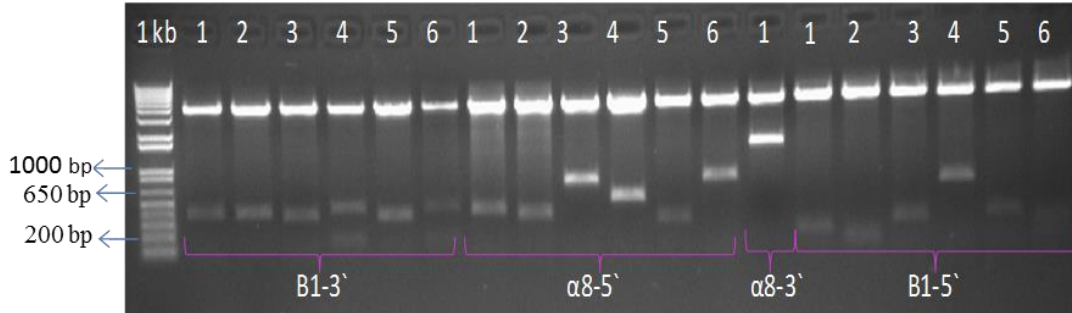
Filogenetikte kullanılan en önemli analizlerden biri, DNA ya da proteinler arasında benzerlik (smilarity) ya da eşliliğin (identity) ikili gruplar halinde karşılaştırılarak belirlenmesidir. Yüzde eşlilik, iki sekansın baza baz nasıl karşılaştırıldığının hesaplanmış yüzdesidir. Yüzde benzerlik ise daha kompleks bir formülü kullanan değerlendirmeye, sekans boşlukları ve eşleşmemelerini de dahil eden daha karmaşık bir hesaplama (Campanella ve ark., 2003). *Bemisia tabaci*  $\alpha 8$  geni *B. tabaci*'den elde edilmiş olan diğer nAChR alt birimlerle karşılaştırıldığında  $\alpha 4$  alt birimiyle daha yüksek benzerlik/eşlilik bulunmuş, en az benzerlik/eşlilik ise  $\alpha 7$  alt birimi ile elde edilmiştir. Diğer türlere ait  $\alpha 8$  ünitelerinden en yüksek benzerlik *L. decemlinata* ile saptanmıştır. *Bemisia tabaci*  $\beta 1$  geni ise diğer nAChR alt birimleriyle karşılaştırıldığında, yine  $\alpha 4$  ile daha yüksek benzerlik/eşlilik değerine sahip olmuş, ancak  $\alpha 7$  ile arasında en az benzerlik,  $\alpha 8$  ile en az eşlilik saptanmıştır. Diğer türlere ait  $\beta 1$  genleriyle karşılaştırıldığında ise en yüksek eşlilik *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) benzerlik değerleri *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) ile saptanmıştır (Table 2).



Şekil 2. Bam H1 ve Eco RV ile enzim reaksiyonundan sonra elde edilen jel görüntüsü  
Figure 2. Gel image obtained after enzyme reaction with Bam H1 and Eco RV



Şekil 3. nAChR  $\alpha 8$  ve  $\beta 1$  alt birimlerinin 3' ve 5' RACE ve 3' ve 5' nested RACE sonuçlarının jelde görüntüsü  
Figure 3. Gel image of 3' and 5' RACE and 3' and 5' nested RACE results of nAChR  $\alpha 8$  and  $\beta 1$  subunits

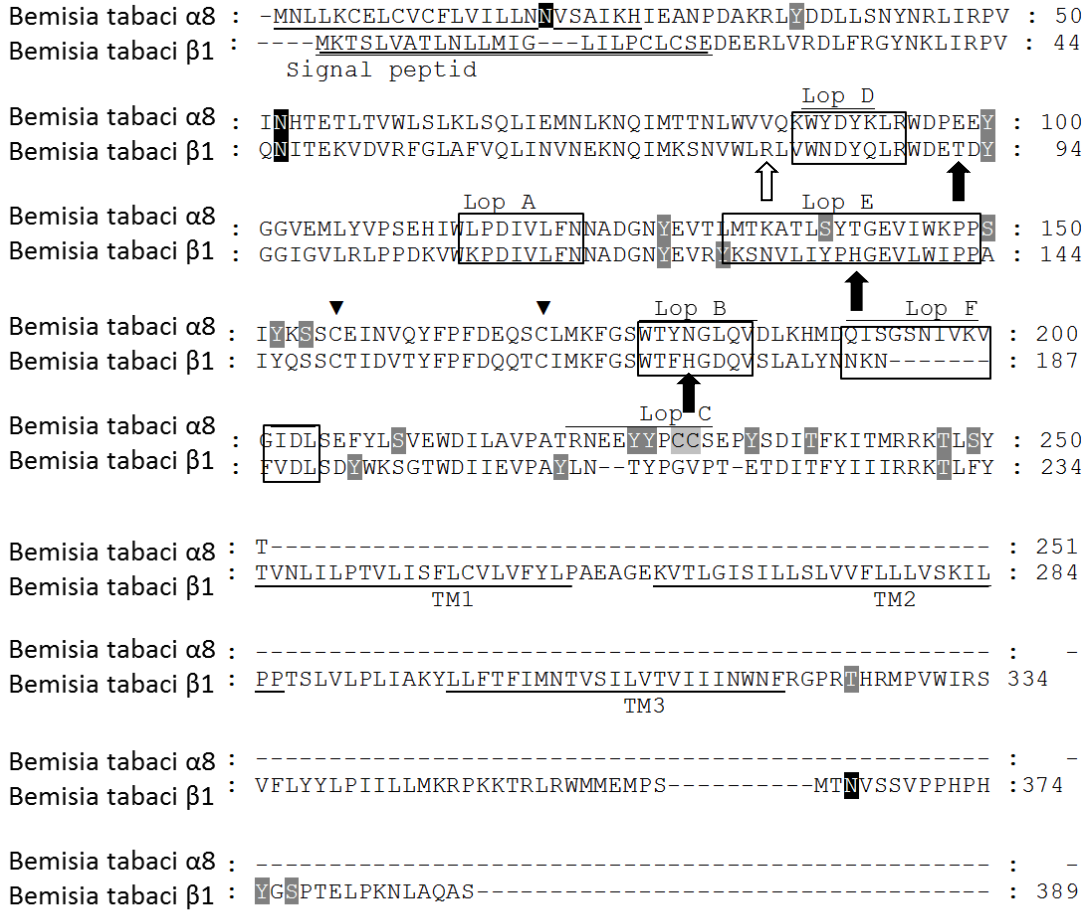


Şekil 4. Nested Race PCR ürünlerine uygulanan Bam H1 ve Eco RV ile enzim reaksiyonundan sonra elde edilen jel görüntüsü  
Figure 4. Gel image obtained after enzyme reaction with Bam H1 and Eco RV applied to Nested Race PCR products

Tablo 2. Farklı nAChR alt birim genlerinin karşılaştırılmaları sonucunda elde edilen eşlilik/benzerlik değerleri  
Table 2. The identity/similarity values obtained as a result of comparisons of different nAChR subunit genes

Popülasyon	NCBI erişim no	Eşlilik/Benzerlik	
		<i>Bemisia tabaci</i> _ $\alpha 8$	<i>Bemisia tabaci</i> _ $\beta 1$
<i>Bemisia tabaci</i> _ $\alpha 3$	CAI54098.1	74/87	53/72
<i>Bemisia tabaci</i> _ $\alpha 4$	AAV28925.1	82/93	53/73
<i>Bemisia tabaci</i> _ $\alpha 7$	CAI54100.1	45/65	49/69
<i>Anopheles gambiae</i> _ $\alpha 8$	AAU12512.1	78/89	53/71
<i>Bemisia tabaci</i> _ $\alpha 8$	MN862070		51/66
<i>Bombyx mori</i> _ $\alpha 8$	NP_001166817.1	80/89	51/71
<i>Leptinotarsa decemlinata</i> _ $\alpha 8$	ACJ64922.1	99/99	53/71
<i>Liposcelis bostrychophila</i> _ $\alpha 8$	ACG49259	81/89	56/72
<i>Nilaparvata lugens</i> _ $\alpha 8$	ACK75719	88/94	55/72
<i>Tribolium castaneum</i> _ $\alpha 8$	NP_001155998.1	89/93	54/71
<i>Aphis gossypii</i> _ $\beta 1$	AFH00994.1	-	89/94
<i>Anopheles gambiae</i> _ $\beta 1$	AAU12514	48/64	91/96
<i>Apis mellifera</i> _ $\beta 1$	NP_001073028.1	50/66	88/93
<i>Bemisia tabaci</i> _ $\beta 1$	MN862069	51/66	
<i>Bombyx mori</i> _ $\beta 1$	NP_001103398.1	50/65	88/93
<i>Heliothis virescens</i> _ $\beta 1$	AF096880.1	50/65	90/94
<i>Nilaparvata lugens</i> _ $\beta 1$	ACJ07013.1	50/66	90/94
<i>Tribolium castaneum</i> _ $\beta 1$	CDW44412.1	50/65	92/95





Şekil 6. *Bemisia tabaci* nAChR  $\alpha 8$  ve  $\beta 1$  genlerinin yapısal özellikleri (siyah yazısı beyaz bölgeler: N-bağlı glikozilasyon bölgeleri, gri bölgeler: dubleks sistein bölgeleri, gri yazısı beyaz bölgeler: fosforilasyon bölgeleri, ▼ işareti disülfid bağlı loop, ⤴ işareti *Myzus persicae*'de neonikotinoid dayanıklılığının saptanmış olduğu nAChR  $\beta 1$  üzerindeki mutasyon noktası (R81T)'ni, ⤴ işareti diğer türlere ait nAChR  $\beta 1$  genlerinden farklı olarak *B. tabaci*'de saptanmış olan aminoasit değişim noktalarını gösterir)

Figure 6. Structural features of *Bemisia tabaci* nAChR  $\alpha 8$  and  $\beta 1$  genes (black text white regions: N-linked glycosylation regions, gray regions: duplex cysteine regions, gray text white regions: phosphorylation regions, ▼ mark indicates disulfide linked loop, ⤴ mark indicates the mutation point (R81T) on nAChR  $\beta 1$  in which neonicotinoid resistance has been detected in *Myzus persicae*, ⤴ mark indicates the amino acid change points detected in *B. tabaci*, unlike the nAChR  $\beta 1$  genes belonging to other species)

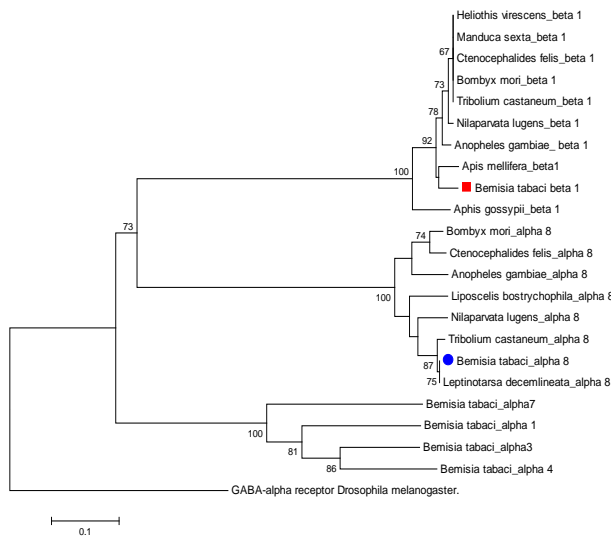
Çalışmada elde edilen  $\alpha 8$  ve  $\beta 1$  genlerinin nAChR alt birimine ait olduğunu gösteren yapısal analizler göstermiştir ki, iki gende de genin tamamı elde edilemediğinden karboksil (-COO) ucu yoktur. Alt birimler arasında, aminoasit dizilimi bakımından pek çok farklılığın olduğu görülmektedir. İki sekansta nAChR genlerinin karakteristik özelliği olan, uzun bir N terminal ucu, bu bölgede 6 adet reseptör bağlanmasında etkin loop, aminoasitler ökoryotlarda proteinlerin katlanarak kararlı bir yapı haline gelmelerinde görevli olan 2 adet N- bağlı glikozilasyon bölgesine (N-X-S/T) sahiptir.  $\alpha 8$  alt biriminde,  $\alpha$  alt birimlerinde bulunan bitişik sistein (CC) yapısı varken  $\beta 1$  geninde bu yapı bulunmamaktadır. Ayrıca  $\beta 1$ 'de 3 adet hidrofobik trans membran yapısı (normalde 4 adet bulunur, burda genler eksik olduğu için 3 adet) TM1<sup>251-272</sup>, TM2<sup>278-286</sup> ve TM3<sup>298-320</sup> belirlenmiştir (Şekil 6).

Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR) genlerine ait aminoasit dizilimlerinin filogenetik ilişkisini ortaya koymak için yapılan analizlerde, nAChR alt birimlerine ait

farklı türlerde beş alfa ve bir beta geni karşılaştırılmıştır. Dış grup olarak kullanılan *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera:Drosophilidae) gaba geni, diğer genlerden tamamen farklı bir şekilde dallanmıştır. Diğer genlere bakıldığında filogenetik ağaçta üç ayrı ana dal oluşmuş olup,  $\alpha 8$  ve  $\beta 1$  genleri ayrı dallarda diğer  $\alpha$  genleri ayrı bir dalda yüksek Bootstrap değerleriyle dallanmıştır (Şekil 7).

Bu çalışmayla, klonlama ile nAChR  $\alpha 8$  ve  $\beta 1$  genleri elde edilmiştir. Bu genlerden nAChR  $\alpha 8$ 'nin mRNA düzeyinde gen dizisine yapılan literatür çalışmalarında ve gen bankasında rastlanmamıştır.  $\beta 1$  ise hem mRNA hem de rna-seq metoduyla protein düzeyinde kaydedilmiştir (Ilias ve ark., 2015; Wang ve ark., 2017). Bu nedenle, ilk defa mRNA düzeyinde  $\alpha 8$  geni elde edilmiş ve NCBI gen bankasına  $\beta 1$  ile birlikte (nAChR\_ $\beta 1$ -MN862069, nAChR\_ $\alpha 8$ -MN862070) kaydedilmiştir. Bugüne kadar, *B. tabaci*'de nAChR alt birimlerinde meydana gelen bir mutasyondan dolayı, neonikotinoid grubu insektisit

dayanıklılığı ilk kez *Myzus persicae*'de bir tarla popülasyonunda nAChR $\beta$ 1 alt birimindeki Loop D üzerindeki R81T mutasyonundan olduğu kanıtlanmıştır (Bass ve ark., 2011). Daha sonra *Aphis gossypii* ile yürütülen çalışmalarda, laboratuvar seleksiyonu sonucunda aynı mutasyon saptanmıştır (Shi ve ark., 2012). Wang ve ark. (2017)'nin çalışmasında ise bir tarla popülasyonunda bu mutasyon bölgesini içeren 15 aminoasitlik bölgenin silinmesinden dolayı, neonicotinoid grubu insektisitlerin reseptörlere bağlanmasında azalma olduğu, bundan dolayı popülasyonda direnç gelişmiş olabileceğini vurgulanmıştır. Bu çalışmada ise ne 79. aminoasitte bu mutasyona rastlanmıştır ne de bir delesyon saptanmıştır (Şekil 6). Ancak *B. tabaci* AChR  $\beta$ 1 ile Tablo 2'deki diğer türler karşılaştırıldığında, diğer türlerde olmayan A92T, N135H ve N174H aminoasit değişimleri saptanmıştır (Şekil 6).



Şekil 7. Aminoasit dizilimlerine göre, *Anopheles gambiae*, *Aphis gossypii*, *Bombyx mori*, *Ctenocephalides felis*, *Heliiothis virescens*, *L. decemlineata*, *Liposcelis bostrychophila*, *Manduca sexta*, *Myzus persicae*, *Nilaparvata lugens*, *Tribolium castaneum* ve *Bemisia tabaci* nAChR  $\alpha$  ve  $\beta$ 1 genlerinin filogenetik ilişkileri. *Drosophila melanogaster* GABA $\alpha$  receptor dışgrup (M69057.1) olarak kullanılmıştır

Figure 7. Phylogenetic relationship of nAChR  $\alpha$  and  $\beta$ 1 genes of *Anopheles gambiae*, *Aphis gossypii*, *Bombyx mori*, *Ctenocephalides felis*, *Heliiothis virescens*, *L. decemlineata*, *Liposcelis bostrychophila*, *Manduca sexta*, *Myzus persicae*, *Nilaparvata lugens*, *Tribolium castaneum* and *Bemisia tabaci* according to the amino acid sequences. *Drosophila melanogaster* GABA $\alpha$  receptor was used as receptor outgroup (M69057.1)

Bu çalışmayla bazı türlerde neonicotinoid dayanıklılığının gelişmesinden sorumlu olan iki nAChR geni, RACE tekniğiyle elde edilmiştir. nAChR Bt $\beta$ 1 geninden 1168 bp, Bt $\alpha$ 8 geninden 755 bp'lik kısmi gen bölgeleri belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan örnekte, diğer türlerde saptanan aminoasit değişimleri ya da delesyonlara rastlanmamış, ancak farklı aminoasit değişimleri saptanmıştır. Bu değişimler üzerine yapılacak çalışmalar ile bu aminoasit değişimlerinin

neonicotinoidlere dayanıklılıkla ilişkisi olup olmadığı saptanabilir. Bu bilgiler, ileride *B. tabaci*'de neonicotinoid dayanıklılığının sorumlu olabilecek nAChR alt birimindeki bir mutasyonun belirlenmesinde ve gen ekspresyonu çalışmalarında yararlı olacaktır.

## Kaynaklar

- Abbick J. 1991. The biochemistry of imidacloprid. Pflanzenschutz-NACH. Richten Bayer, 44: 198–195.
- EPPO, 2004. *Bemisia tabaci*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 34: 281–288.
- Arias HR. 1997. Topology of ligand binding sites on the nikotinik asetilkoline receptor. Brain Res. Brain Res. Rev., 25(2): 133–91.
- Bass C, Puinean AM, Andrews M, Cutler P, Daniels M, Elias J, Paul VL, Crosswaite AJ, Denholm I, Field LM, Foster SP, Lind R, Williamson MS, Slater R. 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$  subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. BMC Neuroscience, 12: 51.
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. 1999. Sequence and structure based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. J. Mol. Biol., 294: 1351–1362
- Campanella JJ, Bitincka L, Smalley J. 2003. MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. BMC Bioinformatics, 4. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/4/29>.
- Ilias A, Lagnel J, Kapantaidaki D, Roditakis E, Tsigenopoulos CS, Vontas J, Tsagkarakou A. 2015. Transcription analysis of neonicotinoid resistance in Mediterranean (MED) populations of *B. tabaci* reveal novel cytochrome. BMC Genomics, 16 (1): 939.
- Jeschke P, Nauen R. 2008. Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. Pest Manag. Sci, 64: 1084–1098.939 (2015).
- Jones AK, Satelle DB. 2010. Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. In: Steeve Hervé Thany (editor) Insect nicotinic acetylcholine receptors. New York NY, Springer. pp. 25–43. ISBN 978-1-4419-6445-8 (Online).
- Karunker I, Juergen B, Bettina L, Tanja P, Nauen R, Emmanouil R, John V, Kevin G, Ian D, Shai M. 2008. Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 38(6): 634–44.
- Millar NS, Denholm I. 2007. Nikotinik asetilkoline receptors: targets for commercially important insecticides. Invert. Neurosci, 7: 53–66.
- Nauen R, Vontas J, Kaussmann M, Wolfel K. 2013. Pymetrozine is hydroxylated by CYP6CM1, a cytochrome P450 conferring neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. Pest Management Science, 69(4): 457–61.
- NCBI, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Bemisia+tabaci+Nicotinic+acetylcholine> (18.12.2019).
- Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DW. 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>, EMBNEW.NEWS, 4: 14.
- Rice P, Longden I, Bleasby A. 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. Trends Genet., 16: 276–277
- Roditakis E, Roditakis NE, Tsagkarakou A. 2005. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. Pest Manag Sci, 61: 577–582.
- Roditakis E, Morou E, Tsagkarakou A, Riga M, Nauen R, Paine M, Vontas J. 2011. Assessment of the *Bemisia tabaci* CYP6CM1vQ transcript and protein levels in laboratory and field-derived imidacloprid-resistant insects and cross-metabolism potential of the recombinant enzyme. Insect Science, 18(1): 23–29.

- Satar G, Ulusoy MR, Nauen R, Dong K. 2018. Neonicotinoid insecticide resistance among populations of *Bemisia tabaci* in the Mediterranean region of Turkey. *Bulletin of Insectology*, 71(2): 171–177.
- Shi X, Zhu Y, Xia X, Qiao K, Wang H, Wang K. 2012. The mutation in nicotinic acetylcholine receptor  $\beta 1$  subunit may confer resistance to imidacloprid in *Aphis gossypii* (Glover). *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10: 1227–1230.
- Stenersen J. 2004. Nicotinoids and Neonicotinoids Chemical pesticides. *Mode of Action and Toxicology*, pp. 135-136.
- Tan J, Salgado VL, Hollingworth RW. 2008. Neural actions of imidacloprid and their involvement in resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pest Manag. Sci*, 64: 37–47.
- Tomizawa M, Casida JE. 2003. Selective Toxicity of Neonicotinoids attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. *Annu. Rev. Entomol.*, 48: 339–64.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The *CLUSTAL\_X* windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25: 4876–4882.
- Wang W, Wang S, Han G, Du Y, Wang J 2017. Lack of cross-resistance between neonicotinoids and sulfoxaflor in field strains of Q-biotype of whitefly, *Bemisia tabaci*, from eastern China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 136: 46–51.
- Wang R, Fang Y, Mu C, Qu C, Li F, Wang Z, Luo C. 2018. Baseline susceptibility and cross-resistance of cycloxyprid, a novel cis-nitromethylene neonicotinoid insecticide, in *Bemisia tabaci* MED from China. *Crop Protection*, 110: 283–287.
- Zaidi SSEA, Briddon RW, Mansoor S. 2017. Engineering dual begomovirus-*Bemisia tabaci* resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 22(1): 6–8.
- Zewen L, Zhaojun H, Yinchang W, Lingchun Z, Hongwei Z, Chengjun L. 2003. Selection for imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: cross-resistance patterns and possible mechanisms. *Pest Manag. Science*, 59: 1355–1359.